

ЗАЙЦЕВ

Максим Сергеевич

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ
ВОЗДЕЙСТВИЯ ВЫСОКОИНТЕНСИВНОГО ДИАГНОСТИЧЕСКОГО
УЛЬТРАЗВУКА НА ТКАНИ ГЛАЗА**

3.1.5. — Офтальмология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва — 2022

Работа выполнена в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России (директор – Заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Нероев Владимир Владимирович).

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор Киселева Татьяна Николаевна

Официальные оппоненты:

Анджелова Диана Владимировна – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник отделения патологии сетчатки и зрительного нерва ФГБУ «НИИГБ им. М.М. Краснова».

Борзенко Сергей Анатольевич – доктор медицинских наук, профессор кафедры глазных болезней МГМСУ им. А.И. Евдокимова, руководитель центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Ведущая организация: Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского».

Защита состоится « » 2022 года в 14 часов на заседании диссертационного совета 21.1.024.01. при ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России (105062, Москва, ул. Садовая – Черногрязская, д.14/19).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» МЗ РФ. По адресу: 105062, Москва, ул. Садовая – Черногрязская, д.14/19; <http://helmholtzeyeinstitute.ru>

Автореферат разослан

« »

2022г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Филатова И.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации

Ультразвуковая диагностика занимает одну из лидирующих позиций среди неинвазивных методов исследования в медицине. Значительный научно-технический прогресс привел к разработке и внедрению в клиническую практику высокоинформативных ультразвуковых методов (цветовой и энергетический доплер, объемная эхография, соноэластография и др.), которые в сочетании со стандартными режимами позволили расширить диагностические возможности ультразвука (Нероев В.В., Киселева Т.Н., 2019; Митьков В.В., 2019; Харлап С.И., 2006; Forward H. et al. 2014).

Эффективность специализированной офтальмологической помощи во многом зависит от использования новых инструментальных методов диагностики. В настоящее время доказана высокая информативность ультразвукового исследования (УЗИ) в режимах цветового доплеровского картирования (ЦДК) и импульсной доплерографии в оценке состояния гемодинамики в сосудах глаза при различных заболеваниях органа зрения (Киселева Т.Н. и соавт., 2021; Byrne S.F., Green R.L., 2002; Singh A.D., Hayden V.C. 2012). Доплеровские методы имеют огромное значение в диагностике и определении тактики лечения сосудистой и опухолевой патологии глаза, витреоретинальных поражений у больных с сахарным диабетом (Нероев В.В. и соавт., 2016; Harris A. et al, 2014; Pinto A.L. et al, 2016). Появление современного цифрового оборудования для проведения высокотехнологичных методик ультразвукового сканирования значительно повышает информативность исследования и обеспечивает качественную диагностику на раннем этапе развития офтальмопатологии. Однако в офтальмологии применение этих методов ограничено ввиду отсутствия достоверной информации о биоэффектах высокоинтенсивного ультразвука на ткани глаза.

Известно, что ультразвук может оказывать механическое, термическое и физико-химическое воздействие на биологические ткани человеческого организма (Sheiner E. et al, 2005; Zha L et al., 2017). Механический эффект достигается за счет изменений давления акустических импульсов, воздействующих на структуры органа зрения. Термическое влияние обусловлено преобразованием ультразвуковой энергии в тепловую непосредственно под датчиком на поверхности исследуемой зоны. В совокупности, эти два эффекта определяют биологическое действие ультразвука и могут приводить к повышению проницаемости клеточных мембран, разрушению митохондрий, разрыву лизосом и гибели клетки. В целях безопасного использования

диагностического ультразвука были определены такие параметры, как тепловой (TI) и механический (MI) индексы (Осипов Л.В., 1999; Abramowicz J. et al, 2021)

Согласно рекомендациям международных профессиональных организаций FDA и Американского Института Ультразвука в Медицине верхний нормативный безопасный предел для усредненной по времени акустической мощности (ISPTA) для исследования органа зрения составляет не более 50 мВт/см² с индексами TI <1,0 и MI < 0,23 (Guidance for Industry and FDA staff/ Information for Manufacturers Seeking Marketing Clearance of Diagnostic Ultrasound Systems and Transducers, 2008).

При проведении исследований глаза и орбиты с помощью многофункциональных ультразвуковых систем обычно снижают экспозицию и интенсивность выходного акустического сигнала до уровня, с одной стороны, позволяющего четко визуализировать и регистрировать параметры эхографического исследования, с другой - не превышать допустимый уровень ультразвукового излучения согласно принципу ALARA (As Low As Reasonably Achievable – настолько низко, насколько это возможно в разумных пределах).

Следует отметить, что качество получаемых эхограмм, и соответственно информативность количественных показателей в ходе исследования напрямую зависят от интенсивности ультразвуковых сигналов или акустической мощности (Harris G.R. et al., 2019). Наибольшая интенсивность акустической энергии отмечается при проведении ЦДК и импульсной доплерографии, что теоретически может привести к неблагоприятному воздействию на биологические ткани глаза. Однако при снижении акустической мощности и, соответственно, MI и TI снижается качество изображения сосудистых структур глаза и орбиты.

На сегодняшний день комбинация изображения в режиме «серой шкалы» с другими высокотехнологичными методиками: ЦДК, энергетическим доплером, объемной эхографии значительно расширило диагностические возможности ультразвука для качественной и количественной оценки структур глаза и орбиты, анализа показателей кровотока, плотности и эластичности тканей. В то же время в рутинной клинической практике большинство зарубежных и отечественных специалистов не используют доплеровские методы в офтальмологии вследствие отсутствия доказательной базы безопасности высокоинтенсивного ультразвука.

В связи с этим **цель настоящей работы** - изучить влияние высокоинтенсивного диагностического ультразвука на структуры и ткани глазного яблока в эксперименте *in vivo*.

Для достижения поставленной цели определены следующие **задачи**:

1. Оценить влияние высокоинтенсивного диагностического ультразвука (MI 0,9-1,2, TI 1,5-2,0, Ispta.3 50-100 мВт/см²) на состояние структур переднего отдела глаза и офтальмотонус кроликов в эксперименте с помощью стандартных инструментальных методов исследования
2. Исследовать термические, биометрические и структурные характеристики роговицы после прямого воздействия на глазное яблоко высокоинтенсивного диагностического ультразвука у животных в эксперименте
3. Определить биометрические и акустические характеристики оптических сред глаза после воздействия высокоинтенсивного диагностического ультразвука у животных в эксперименте
4. Изучить немедленные и отсроченные биоэффекты высокоинтенсивного диагностического ультразвука на биологические среды и ткани глаза животных в эксперименте на основании лабораторных исследований уровня белков теплового шока и медиаторов воспаления в стекловидном теле и сыворотке крови у кроликов в эксперименте
5. Провести гистологическое и морфометрическое исследование сетчатки у кроликов в эксперименте в ближайшем и отсроченном периоде после высокоинтенсивного акустического воздействия.
6. Определить параметры акустической мощности для безопасного и высокоинформативного использования высокотехнологичных ультразвуковых исследований глаза с помощью многофункциональных сканеров в эксперименте на животных

Научная новизна

1. Впервые на большом экспериментальном материале 46 кроликов (92 глаза) *in vivo* с использованием комплекса инструментальных, лабораторных и гистологических методов исследования определена безопасность применения ЦДК с импульсной доплерографией для биологических сред и тканей глаза
2. Установлено отсутствие прямого термического эффекта высокоинтенсивного ультразвука в режимах ЦДК и импульсной доплерографии на поверхность роговицы и определены биометрические и структурные характеристики состояния роговицы с помощью оптической когерентной томографии (ОКТ) у интактных кроликов и после воздействия высокоинтенсивного ультразвука на ткани глаз животных в ближайшем и отсроченном периоде.
3. Впервые определены биометрические и акустические характеристики передней камеры, хрусталика и стекловидного тела после воздействия высокоинтенсивного ультразвука на ткани глаз животных в эксперименте в ближайшем и отсроченном периоде.

4. Впервые в эксперименте представлено отсутствие немедленных и отсроченных биоэффектов высокоинтенсивного диагностического ультразвука на биологические среды и ткани глаза на основании результатов исследования белков теплового шока и медиаторов воспаления в стекловидном теле и сыворотке крови у животных в эксперименте.

5. Впервые в эксперименте у животных проведено гистологическое исследование с морфометрической оценкой ретинальной ткани в динамике после акустического воздействия на глазное яблоко и установлено отсутствие достоверного влияния диагностического ультразвука высокой акустической мощности с MI 0,9-1,2 и TI 1,5-2,0 на толщину сетчатки и морфометрические параметры ретинальных слоев.

6. Впервые определено отсутствие немедленных и отсроченных биоэффектов высокоинтенсивного диагностического ультразвука (MI=0,9-1,2, TI=1,5-2,0) продолжительностью воздействия до 30 минут на оптические среды и оболочки глаза на микроструктурном и молекулярном уровне в эксперименте *in vivo*.

Практическая значимость

1. Экспериментальное обоснование отсутствия немедленных и отсроченных биоэффектов высокоинтенсивного диагностического ультразвука в режиме ЦДК и импульсной доплерографии с индексами MI=0,9-1,2; TI=1,5-2,0 продолжительностью воздействия до 30 минут на оптические среды и ткани глаза является основанием для возможного его применения в клинической практике

2. Использование высокотехнологичных ультразвуковых диагностических систем с режимами ЦДК и импульсной доплерографии при высоком и безопасном уровне акустической мощности позволит значительно улучшить визуализацию сосудистых структур глаза и орбиты и повысить информативность диагностики офтальмопатологии

3. Отсутствие негативного влияния высокоинтенсивного диагностического ультразвука на оптические среды и оболочки глаза в эксперименте позволяет пересмотреть рекомендуемые FDA в 1997г. безопасные нормативы теплового и механического индексов для проведения высокотехнологичных ультразвуковых исследований в офтальмологии

Методология и методы исследования.

Методологической основой диссертационного исследования явилось последовательное применение методов научного познания. Работа выполнена в дизайне сравнительного открытого экспериментального исследования с использованием инструментальных, лабораторных, морфологических, аналитических и статистических методов исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. Обоснование безопасности воздействия высокоинтенсивного диагностического ультразвука на состояние структур переднего отдела глаза и офтальмотонус у животных в эксперименте
2. Обоснование безопасности воздействия высокоинтенсивного диагностического ультразвука на акустические и биометрические характеристики оптических сред глаза животных в эксперименте
3. Оценка немедленных и отсроченных биоэффектов высокоинтенсивного диагностического ультразвука на биологические среды и ткани глаза животных в эксперименте
4. Анализ параметров акустической мощности для безопасного и высокоинформативного использования высокотехнологичных ультразвуковых исследований глазного яблока в эксперименте

Степень достоверности и апробации результатов работы

Степень достоверности полученных результатов определяется достаточным и репрезентативным объемом выборок обследованных животных, использованием современных высокоинформативных методов исследования, адекватной статистической обработкой полученных результатов. Сформулированные в диссертации выводы, положения и рекомендации аргументированы и логически вытекают из системного анализа результатов выполненных исследований.

Основные положения диссертационной работы и результаты исследований доложены и обсуждены на научно-практических конференциях: The 1st Ocular Blood Flow Summit, (Швейцария, 2019), научно-образовательная конференция «Медицинская визуализация в многопрофильном стационаре. Акцент на неинвазивные методы диагностики» (Москва, 2020), научно-практической конференции с международным участием «XII Российский общенациональный офтальмологический форум», Москва. Апробация диссертационной работы состоялась 29.06.2022 на объединенной научной конференции отделений ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 4 – в изданиях, входящих в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК и включенных в международную базу Scopus, 1 глава в Руководстве по ультразвуковым исследованиям в офтальмологии. Получен 1 патент РФ на изобретение № 2726478 от 14.07.2020 г.

Внедрение в практику

Результаты исследования внедрены в клиническую практику отдела ультразвуковых исследований, отдела иммунологии и вирусологии, а также отдела патологической анатомии и гистологии ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России. Материалы диссертации включены в программы лекций для клинических ординаторов, на курсах повышения квалификации специалистов, сертификационных циклах последипломного образования для врачей-офтальмологов, проводимых на базе ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 138 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, материала и методов, 3 глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, содержащего 206 источников (41 отечественных и 165 зарубежных). Диссертация иллюстрирована 13 таблицами и 30 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Работа проведена на базе отдела ультразвуковых исследований глаза (руководитель отдела - д.м.н., проф., Киселева Т.Н.) совместно с отделами патологии сетчатки и зрительного нерва (руководитель отдела - д.м.н., проф., академик РАН Нероев В.В.), иммунологии и вирусологии (руководитель отдела – к.б.н. Балацкая Н.В.), инфекционных и аллергических заболеваний глаз (руководитель отдела – к.м.н. Яни Е.В.) на базе научного экспериментального центра (начальник отдела – к.б.н. Щипанова А.И.) ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России и на базе Института регенеративной медицины научно-технологического парка биомедицины при ПМГМУ им. Сеченова при участии Игрунковой А.В.(руководитель отдела – Хлебникова Т.М.) в период с 1 февраля 2018 г. по 1 февраля 2022 г.

Экспериментальное исследование *in vivo* выполнено на 46 кроликах (92 глаза) - самцах породы Шиншилла средней массой тела 2-2,5 кг. Из них 38 кроликов (76 глаз) составили основную группу и 8 intactных кроликов (16 глаз) – контрольную группу. Возраст животных колебался в пределах от 3 до 5 месяцев.

Основные правила содержания и ухода за животными соответствовали «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» и «Санитарным правилам по содержанию экспериментально-биологических клиник

(вивариев), утвержденным МЗ СССР 06.07.73 г., приказу МЗ СССР №755 от 12.08.77 и положениям Хельсинской декларации.

Всем животным основной группы после предварительной инстилляционной анестезии конъюнктивы 0,4% раствором оксибупрокаина (инокаин) проводилось УЗИ обоих глаз в режиме цветового доплеровского картирования (ЦДК) и импульсной доплерографии с использованием ультразвуковой диагностической системы экспертного класса Voluson E8 при максимальной акустической мощности (MI 0,9-1,2, TI 1,5-2,0, Ispta.3 50 мВт/см²) в течение 30 минут.

Инструментальное обследование животных включало традиционное офтальмологическое обследование (осмотр с помощью бинокулярной лупы, биомикроскопию, прямую и обратную офтальмоскопию, тонометрию), бесконтактную термометрию роговицы, прижизненную оценку толщины роговицы в оптической зоне с использованием оптической когерентной томографии (ОКТ) на приборе Zeiss Visante OCT до и сразу после ультразвукового облучения и через 2 недели.

В эти же сроки выполнены лабораторные исследования содержания белков теплового шока HSP27 (HSPB1) и HSP60 (HSPD1), медиаторов воспаления моноцитарного хемотаксического протеина-1 (MCP-1), интерлейкина-6 (IL6), интерлейкина-8 (IL8) в сыворотке крови (СК) и стекловидном теле (СТ) методом иммуноферментного анализа (ИФА; ELISA) с помощью тест-систем Cloud-Clone Corp. (КНР). Учет результатов выполнен на мультифункциональном фотометре Cytation 5 (BioTek Instruments Inc., США) при длине волны 450 нм. Сыворотка крови забиралась прижизненно в вышеуказанные сроки наблюдения, стекловидное тело – постмортально перед энуклеацией.

Для проведения гистологического исследования с морфометрической оценкой толщины сетчатки энуклеацию глазного яблока у кроликов осуществляли в первые сутки (20 кроликов – 40 глаз) и через 2 недели (18 кроликов – 36 глаз) после ультразвукового воздействия. Аутопсийный материал погружался в криогель, подвергался заморозке в жидком азоте и хранился при температуре -87°С. Срезы толщиной 20 мкм были приготовлены в криомикротоме Thermo Fisher HM525 NX при температуре -20° С, помещены на адгезивные полилизинные стекла и окрашены гематоксилином и эозином по стандартному протоколу. Патогистологическая оценка препаратов выполнялась на универсальном микроскопе LEICA DM4000 B LED с видеокамерой LEICA DFC7000 T. Для морфометрического анализа изображений использовано программное обеспечение LAS V4.8 Software («Leica Microsystems», Switzerland).

Статистическая обработка Математическая и статистическая обработка экспериментальных данных выполнена автором самостоятельно и проводилась с использованием стандартного пакета программы GraphPad Prism, версия 8.00 для

Windows (GraphPad Software, Inc). Для определения распределения полученных значений использовался Shapiro-Wilk's тест. Межгрупповые различия данных морфометрического исследования и данных, полученных при оптической когерентной томографии, которые имели нормальное распределение, анализировали с применением однофакторного ANOVA теста с поправкой Tukey. Для анализа данных с ненормальным распределением (толщина слоя ганглиозных клеток и нервных волокон) использовали Kruskal-Wallis test с поправкой Dunn. При анализе результатов исследования белков теплового шока и провоспалительных цитокинов в сыворотке крови и в стекловидном теле животных в эксперименте *in vivo* также использовали двухфакторный ANOVA-тест с поправкой Tukey. Для сравнительного анализа показателей толщины сетчатки животных, полученных с помощью ОКТ и морфометрического исследования использовали критерии корреляции Пирсона.

Результаты статистической обработки всех данных были представлены в виде диаграмм с указанием среднего арифметического и стандартного отклонения или медианы с 95% доверительным интервалом для нормального и ненормального распределения данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальное изучение влияния высокоинтенсивного диагностического ультразвука *in vivo* на структуры глазного яблока кроликов с помощью инструментальных методов исследования

В работе была выполнена прижизненная оценка состояния переднего отдела глаза кролика после воздействия высокоинтенсивного ультразвука с использованием комплекса современных инструментальных методов исследования.

Анализ показателей термометрии передней поверхности роговицы у животных показал, что до и сразу после акустического воздействия средние значения температуры составили $33,1 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$ и $34,0 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$, соответственно. Через 2 недели средний показатель термометрии роговицы статистически достоверно не отличался от исходных данных и от таковых в группе контроля ($33,4 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$, $p > 0,1$).

По данным биомикроскопии в 1-е сутки и через 2 недели после акустического воздействия роговица оставалась прозрачной, блестящей, гладкой и сферичной. Влага передней камеры была прозрачной, цвет и рисунок радужной оболочки не изменялись. Размер зрачка (в горизонтальном и вертикальном меридиане) в 1-е сутки и через 14 дней после акустического воздействия не

изменялся. Статистически достоверных отличий средних значений размера зрачка в опытной и контрольной группах не отмечалось ($p>0,05$).

Для определения возможных дефектов поверхности роговицы дополнительно проводили биомикроскопию сразу после окрашивания роговицы 0,5% раствором флюоресцеина. После акустического воздействия в динамике при обследовании переднего отдела глаз кроликов с помощью щелевой лампы участков, накапливающих флюоресцеин на поверхности роговицы, не обнаружено.

Анализ результатов тонометрии не выявил статистически достоверных изменений средних показателей ВГД у животных основной группы в динамике. Исходное среднее значение ВГД составило $20,40 \pm 0,54$ мм рт.ст., сразу после ультразвукового облучения и через 2 недели – $20,22 \pm 0,63$ мм рт. ст. и $20,71 \pm 0,71$ мм рт.ст., соответственно ($p=0,5$). В группе контроля средний показатель ВГД составил $20,63 \pm 0,65$ мм рт.ст ($p=0,7$).

Сразу после окончания ультразвукового воздействия на глазное яблоко кролика производилась корректировка функций прибора, устанавливался режим серошкального В-сканирования с соответствующей глубиной сканирования зоны фокуса. На полученных эхограммах измеряли аксиальную длину или переднезаднюю ось (ПЗО) глаза, толщину хрусталика и глубину передней камеры, а также оценивали акустическую прозрачность оптических сред и состояние оболочек глаза кроликов. Средние показатели ПЗО глаза кролика в группе контроля составили $15,4 \pm 0,2$ мм, в основной группе до облучения, в 1-е сутки и 14-е сутки после ультразвукового воздействия – $15,3 \pm 0,25$ мм, $15,4 \pm 0,15$ мм и $15,3 \pm 0,2$ мм, соответственно ($p>0,05$). Биометрические параметры глубины передней камеры и толщины хрусталика у кроликов после акустического воздействия достоверно не изменялись. При В-сканировании стекловидное тело определялось в виде анэхогенного пространства между гиперрефлективной задней капсулой хрусталика и гиперэхогенным ретинохориосклеральным комплексом. Эхографических изменений стекловидного тела в динамике (в 1-е и 14-е сутки) после акустического воздействия у кроликов основной группы не выявлено.

Методом оптической когерентной томографии (ОКТ) была проведена качественная оценка состояния роговицы. В результате исследования не было выявлено изменений рефлективности ее слоев после воздействия высокоинтенсивного диагностического ультразвука в течение всего периода наблюдения.

Анализ данных ОКТ переднего отдела глаз у кроликов основной группы показал незначительное уменьшение средних показателей центральной толщины роговицы от 412 ± 20 мкм до 410 ± 23 мкм сразу после акустического воздействия и 411 ± 22 мкм ($p \geq 0,1$) через 14 суток. Полученные значения толщины роговицы в

центральной зоне у кроликов основной группы достоверно не отличались от таковых в группе контроля (400 ± 21 мкм, $p \geq 0,73$) (рис.1)

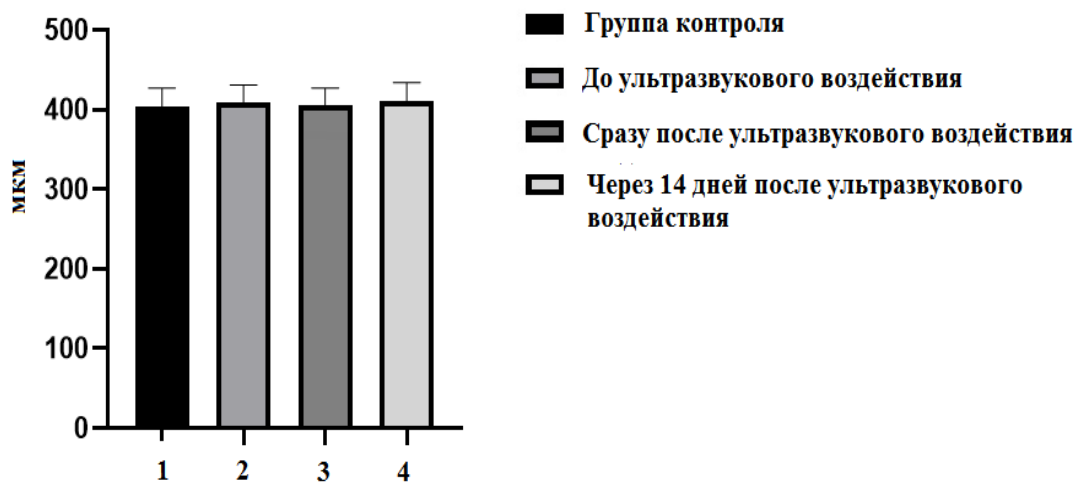


Рис.1 Средние показатели центральной толщины роговицы у кроликов в экспериментальном исследовании.

Таким образом, несмотря на наиболее близкое расположение роговицы к источнику высокоинтенсивного ультразвука, достоверных изменений ее структурных и биометрических характеристик в динамике по сравнению с таковыми в группе контроля не выявлено. По данным термометрии, ОКТ роговицы, эхографии глаза установлено отсутствие немедленных и отсроченных биоэффектов диагностического ультразвука высокой акустической мощности продолжительностью воздействия до 30 минут на структуры переднего отдела и оптические среды глаза животных в эксперименте.

Оценка состояния сетчатки с использованием метода оптической когерентной томографии

Прижизненная оценка состояния заднего полюса глаза с помощью метода ОКТ была выполнена однократно в группе контроля (16 глаз) и всем животным основной группы до воздействия (76 глаз), в 1-е сутки (76 глаз) и через 2 недели (36 глаз) после ультразвукового воздействия.

По данным ОКТ после ультразвукового облучения глаз животных основной группы признаков повреждающего действия ультразвука, таких как нарушение целостности слоев сетчатки, ретинальные и субретинальные кровоизлияния,

ретиальный отек, деструкция и дезорганизация нервных волокон и ганглиозных клеток не выявлено. Микроархитектоника сетчатки у кроликов в 1-е и 14-е сутки после акустического воздействия полностью соответствовала таковой в группе контроля.

Анализ результатов ОКТ с морфометрической оценкой общей толщины сетчатки в 300 мкм книзу от диска зрительного нерва показал статистически недостоверное изменение средних показателей толщины сетчатки непосредственно после воздействия высокоинтенсивного диагностического ультразвука и через 2 недели по сравнению с исходными данными ($164,8 \pm 3,61$ мкм, $163,3 \pm 5,2$ мкм и $163 \pm 5,57$ мкм, соответственно) (рис.3)

Таким образом, в ходе эксперимента у кроликов сразу после воздействия диагностического ультразвука высокой акустической мощности на глазное яблоко и через 2 недели установлено отсутствие статистически достоверных различий между морфометрическими показателями сетчатки, полученными с помощью метода ОКТ в разные сроки наблюдения. Кроме того, оценка томографической картины сетчатки у животных основной группы в динамике продемонстрировала отсутствие структурных ретиальных изменений в центральной зоне сетчатки экспериментальных животных.

Экспериментальное изучение влияния высокоинтенсивного диагностического ультразвука *in vivo* на биологические среды и ткани глазного яблока кроликов с помощью лабораторных методов исследования

Всем животным в ходе эксперимента выполнено исследование концентрации белков теплового шока HSP27(HSPB1) и HSP60 (HSPD1), медиаторов воспаления: моноцитарного хемотаксического протеина-1 (MCP-1), интерлейкина-6 (IL6) и интерлейкина-8 (IL8) в сыворотке крови и стекловидном теле. В группе контроля лабораторные исследования проводились однократно, в основной группе до акустического воздействия, сразу после облучения (1-е сутки) и через 2 недели.

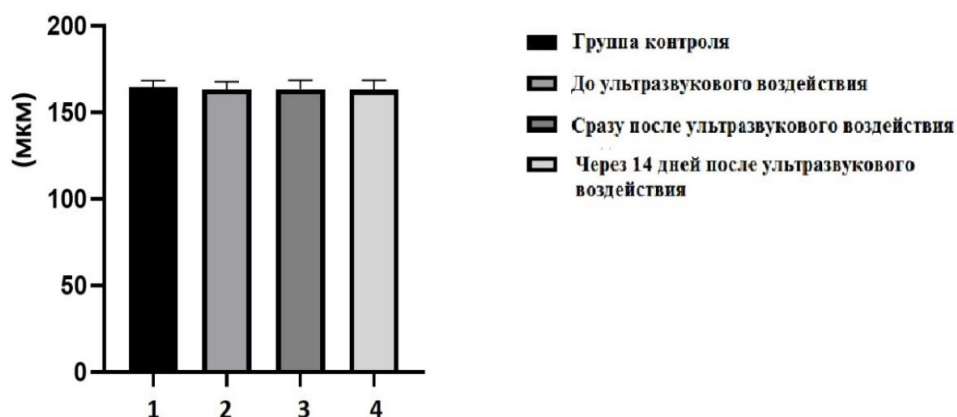


Рис. 3 Средняя толщина сетчатки кроликов в экспериментальном исследовании

Анализ результатов лабораторных исследований показал отсутствие достоверных изменений показателей HSP60, HSP27, MCP-1 и IL-8 в сыворотке крови и стекловидном теле в динамике после воздействия высокоинтенсивного ультразвука у животных основной группы (табл.1 и 2). Поскольку уровень IL-6 в сыворотке крови в группе контроля и основной группе в динамике не достигал пороговых значений, регистрировать и оценить концентрацию этого показателя не представлялось возможным. Показатели белков теплового шока и медиаторов воспаления в стекловидном теле у кроликов основной группы в динамике сравнивали с контролем.

В стекловидном теле животных основной группы статистически достоверных изменений концентрация IL-6 после воздействия ультразвука по сравнению с контрольной группой не наблюдалось. Следует отметить, что в стекловидном теле у всех животных концентрация белка HSP60 была в 4 раза больше, чем в сыворотке крови, однако статистически достоверных различий между этими показателями до и после ультразвукового воздействия в динамике не отмечалось ($p > 0,75$). Значения уровней HSP27, MCP1 и IL-8 в сыворотке крови почти соответствовали таковым в стекловидном теле, межгрупповые различия также не выявлялись ($p > 0,25$).

На основании полученных данных лабораторных методов исследования в эксперименте установлено отсутствие немедленных и отсроченных системных и локальных биоэффектов высокоинтенсивного диагностического ультразвука (MI=0,9-1,2; TI=1,5-2,0) продолжительностью воздействия до 30 минут.

Таблица 1

Средние показатели* концентрации белков теплового шока и медиаторов воспаления (pg/ml) в сыворотке крови в эксперименте *in vivo*

Показатели, pg/ml	Контрольная группа n=8	Основная группа		
		До воздействия n=38	Сразу после воздействия n=20	Через 2 недели n=18
HSP60	1,33±0,62	1,23±0,79	1,41±0,65	1,30±0,68
HSP20	1,12±0,11	1,18±0,16	1,15±0,2	1,20 ±0,17
MCP1	0,72±0,04	0,72±0,03	0,72±0,03	0,72±0,02
IL-6	abs	abs	abs	abs
IL-8	21,3±2,44	20,56±2,9	20,83±2,77	20,92±0,52

Примечание: n- число глаз

***p >0,4** - достоверность относительно контрольной группы

abs- отсутствие показателей

Таблица 2

Средние показатели* концентрации белков теплового шока и медиаторов воспаления (pg/ml) в стекловидном теле в эксперименте *in vivo*

Показатели pg/ml	Контрольная группа n=16	Основная группа	
		Сразу после воздействия n=40	Через 2 недели n=36
HSP60	5,98±3,24	6,58±2,8	6,0±3,2
HSP20	1,16±0,13	1,15±0,2	1,20 ±0,17
MCP1	0,70±0,08	0,69±0,005	0,68±0,01
IL-6	10,9±3,12	10,1±3,58	11,32±2,34
IL-8	23,1±2,78	23,75±2,93	22,82±3,82

Примечание: n- число глаз

***p >0,25** достоверность относительно контрольной группы

Результаты гистологического и морфометрического анализа сетчатки кроликов после воздействия высокоинтенсивного диагностического ультразвука в эксперименте *in vivo*

При гистологическом исследовании тканей сетчатки кроликов дифференцировалось 8 слоев: ретинальный пигментный эпителий, слой фоторецепторов, наружный плексиформный слой, внутренний ядерный слой, внутренний плексиформный слой, слой ганглиозных клеток и слой нервных волокон. У животных в контрольной группе и основной группе после воздействия ультразвука четко визуализировались все слои, без каких-либо структурных нарушений. Выполнена морфометрическая оценка всех слоев сетчатки в динамике после ультразвукового облучения. Толщину слоя ганглиозных клеток сетчатки (ГКС) и нервных волокон анализировали как единый комплекс (табл.3).

Морфометрический анализ показал статистически недостоверные изменения показателей толщины слоев сетчатки после воздействия диагностического ультразвука максимальной акустической мощности в течение 30 минут (табл. 3).

Среднее значение общей толщины сетчатки составило $164,6 \pm 38,9$ мкм в группе контроля, $165,0 \pm 57,96$ мкм и $164,7 \pm 50,79$ мкм сразу после воздействия высокоинтенсивного ультразвука и через 2 недели, соответственно. Морфометрические значения толщины слоя ГКС и нервных волокон у всех животных отличались вариабельностью и находились в пределах от 14,0 мкм до 87,0 мкм, что, вероятно, было обусловлено проведением измерения на различных участках по удаленности от центрального отдела сетчатки.

В результате гистологического исследования с морфометрической оценкой ретинальной ткани у кроликов основной группы сразу после воздействия диагностического ультразвука высокой акустической мощности и через 2 недели структурных и клеточных изменений сетчатки не выявлено.

Анализ параметров акустической мощности для безопасного и высокоинформативного использования высокотехнологичных ультразвуковых исследований глазного яблока в эксперименте

В ходе эксперимента у 6 животных (6 глаз) основной группы проведен анализ качества изображения сосудов орбиты на эхограмме в зависимости от параметров акустической мощности при проведении ЦДК орбиты. Регистрировали изображение сосудов орбиты кролика, включая задние короткие цилиарные артерии (ЗКЦА), задние длинные цилиарные артерии (ЗДЦА),

центральную артерию сетчатки (ЦАС), верхнюю глазную артерию (ВГА) и нижнюю глазную артерию (НГА), меняя при этом одновременно значения МІ и ТІ.

Таблица 3

Средние значения толщины слоев сетчатки по данным морфометрии

Слои сетчатки	Контрольная группа (мкм)	Основная группа		Степень достоверности (р)
		сразу после воздействия (мкм)	через 14 дней после воздействия (мкм)	
Пигментный эпителий	3,73 ± 1,66	4,74 ± 1,91	3,64 ± 2,07	p>0,05
Фоторецепторы	29,97 ± 9,15	25,50 ± 6,608	29,25 ± 13,54	p=0,12
Наружный ядерный слой	33,1 ± 15,73	30,51 ± 11,94	30,35 ± 10,39	p=0,47
Наружный плексиформный слой	7,02 ± 2,96	7,57 ± 1,81	7,83 ± 3,22	p>0,2
Внутренний ядерный слой	15,8 ± 5,02	13,27 ± 6,44	13,51 ± 6,23	p=0,09
Внутренний плексиформный слой	23,61 ± 5,52	20,75 ± 10,65	22,23 ± 8,327	p=0,14
Слой ганглиозных клеток и нервных волокон	57,8 (95% доверительный интервал 53,4 – 69,3)	52,3 (95% доверительный интервал 35,7 – 62,7)	54,43 (95% доверительный интервал 48,23 – 64,6)	p=0,09
Общая толщина сетчатки	164,7 ± 50,79	165,0 ± 57,96	162,7 ± 40,79	p=0,79

Примечание: n- число глаз

p - достоверность относительно контрольной группы

В результате проведенного исследования у всех животных при минимальных значениях индексов акустической мощности (МІ=0,6 и ТІ= 0,1) сосуды орбиты не визуализировались. При показателях МІ=0,9 и ТІ=0,1 отмечали цветное картирование потока в НГА и частично в ВГА. Далее при установке показателей МІ=0,9 и ТІ=0,7 дополнительно наблюдали кровотоки в ЗКЦА и ЗДЦА, при МІ=1,0 и ТІ=1,0 отмечалось кодирование цветом кровотока в ЦАС. При максимальных индексах регистрировали наиболее четко цветовую карту потоков

в ЦАС, ЗКЦА, ЗДЦА, ВГА и НГА, что свидетельствует о высокой информативности высокоинтенсивного ультразвука для получения изображения сосудистых структур орбиты кролика. Полученные данные продемонстрировали прямую зависимость качества визуализации мелких сосудов от интенсивности диагностического ультразвука.

В клинической практике использование высокоинтенсивного диагностического ультразвука с индексами $MI = 0,9-1,2$ и $TI=1,5-2,0$ соответствует проведению ультразвукового исследования в режимах ЦДК и импульсной доплерографии (спектральный доплеровский режим), а также объемной эхографии (табл.4). Значения механического индекса при соноэластографии значительно превышают исследованные нами параметры в эксперименте и поэтому нуждаются в дальнейшем изучении.

Таблица 4

Значения механического индекса (MI) и термического индекса (TI) при проведении высокотехнологичных методов ультразвукового исследования

Режим сканирования	MI	TI
В-сканирование	0,9-1,0	0,1- 0,3
Цветовое доплеровское картирование	0,9-1,2	1,5-2,0
Спектральный доплеровский режим	0,9-1,2	1,5-2,0
Объемная эхография глаза и орбиты	1,0-1,2	0,2-0,4
Соноэластография	1,0-1,9	0,4-1,0

Таким образом, выполненное нами экспериментальное исследование показало отсутствие биоэффектов высокоинтенсивного диагностического ультразвука на оптические среды и ткани глаза, поэтому применение высокотехнологичных ультразвуковых диагностических методов визуализации при механическом индексе, не превышающем показатель 1,2 и термическом индексе не более 2,0 можно считать безопасным для проведения ультразвуковых исследований глаза.

Выводы.

1. На основании результатов экспериментального исследования на кроликах *in vivo* установлено, что высокоинтенсивный диагностический ультразвук ($MI\ 0,9-1,2$; $TI\ 1,5-2,0$, $Ispta.3\ 50\ мВт/см^2$) не оказывает влияния на

офтальмотонус, состояние зрачка и не вызывает видимых структурных изменений роговицы, радужной оболочки и хрусталика в ближайшем и отсроченном периоде после акустического воздействия.

2. С помощью бесконтактной термометрии и оптической когерентной томографии (ОКТ) переднего отдела глаза у животных в эксперименте установлено отсутствие прямого термического эффекта и изменений структурных и биометрических характеристик роговицы в ближайшем и отсроченном периоде после воздействия высокоинтенсивного диагностического ультразвука в режиме ЦДК и импульсной доплерографии продолжительностью 30 минут

3. Высокоинтенсивный диагностический ультразвук не оказывает негативного влияния на акустические характеристики (прозрачность оптических сред) и биометрические параметры глаза (глубина передней камеры, толщина хрусталика, ПЗО) в ближайшем и отсроченном периоде после ультразвукового воздействия

4. Результаты лабораторных исследований белков теплового шока HSP60 и HSP27 и медиаторов воспаления, включающих моноцитарный хемоаттрактивный белок-1 (MCP-1), интерлейкин-6 (IL-6) и интерлейкин-8 (IL-8) в стекловидном теле и сыворотке крови показали отсутствие немедленных и отсроченных системных и локальных биоэффектов высокоинтенсивного диагностического ультразвука (MI=0,9-1,2; TI=1,5-2,0) продолжительностью воздействия до 30 минут у животных в эксперименте.

5. По данным гистологического исследования ретинальной ткани у кроликов в ближайшем и отсроченном периоде после воздействия высокоинтенсивного диагностического ультразвука структурных и клеточных изменений сетчатки не выявлено. Анализ морфометрических параметров толщины сетчатки и ее слоев (фоторецепторы, наружный ядерный и наружный плексиформный слой, внутренний ядерный и внутренний плексиформный слой, слой ганглиозных клеток) показал отсутствие достоверных изменений толщины ретинальных слоев в ближайшем и отсроченном периоде после высокоинтенсивного ультразвукового воздействия на глаза кроликов по сравнению с интактными животными.

6. Сравнительный анализ показателей морфометрии сетчатки показал отсутствие достоверных изменений между значениями общей толщины сетчатки по данным гистологии и ОКТ как у интактных животных, так и у животных, подвергшихся ультразвуковому облучению ($p < 0,05$). Установлена достоверная прямая корреляционная связь между морфометрическими показателями сетчатки, полученными с помощью ОКТ и гистологических исследований (r – от 0,78 до 0,99; $p < 0,01$).

7. В эксперименте на животных определены безопасные параметры акустической мощности ($MI=0,9-1,2$ и $TI=1,5-2,0$), соответствующие проведению высокотехнологичных ультразвуковых исследований глаз в режимах ЦДК, импульсной доплерографии и объемной эхографии, что позволяет расширить спектр инструментальных исследований для высокоинформативной диагностики офтальмопатологии.

Практические рекомендации

1. Экспериментальное обоснование отсутствия биоэффектов высокоинтенсивного диагностического ультразвука ($MI=0,9-1,0$ и $TI=1,5-2,0$) на оптические среды и ткани глаза позволяет рекомендовать высокотехнологичные ультразвуковые методы исследования в режимах ЦДК, импульсной доплерографии и объемной эхографии к более широкому использованию в клинической практике.

2. Применение высокоинтенсивного диагностического ультразвука в режимах ЦДК и импульсной доплерографии необходимо для повышения эффективности дифференциальной диагностики различных заболеваний органа зрения, включая онкопатологию, витреоретинальные заболевания, сосудистую патологию орбиты т.д.

3. Учитывая отсутствие негативного влияния высокоинтенсивного диагностического ультразвука на оптические среды и оболочки глаза в эксперименте, необходимо проведение дальнейших исследований по корректировке индексов акустической мощности, рекомендованных FDA в 1997г. для проведения ультразвуковых исследований в офтальмологии

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Возможности цветового дуплексного сканирования в диагностике сосудистой патологии глаза /Киселева Т.Н., **Зайцев М.С.**, Рамазанова К.А., Луговкина К.В. // **Российский офтальмологический журнал.** - 2018 – Том 11. – № 3. – С.84 - 94.

2. Вопросы безопасности диагностического ультразвука в офтальмологии/Киселева Т.Н., **Зайцев М.С.**, Луговкина К.В. // **Офтальмология.** 2018; Т.15, №4, с. 447-454

3. Глава 2. Физические основы ультразвука/Киселева Т.Н., Романова Л.И., **Зайцев М.С.** // «Ультразвуковые исследования в офтальмологии: Руководство для врачей» под редакцией Нероева В.В., Киселевой Т.Н. – Издательство «Икар» - 2019. - 341с.

4. Влияние антоцианозидов на микроциркуляцию и ретробульбарный кровоток при офтальмопатологии / Киселева Т.Н., Судовская Т.В., **Зайцев М.С.**, Луговкина К.В. // **Офтальмология.** – 2019. - Т. 16, № 3. – С. 360 – 365.
5. Возможности ультразвука в диагностике патологии зрительного нерва / Киселева Т.Н., Луговкина К.В., Рамазанова К.А., **Зайцев М.С.**, [и др.]. // Сборник научных трудов XII Российского общенационального офтальмологического форума. – 2019. – С. 54 – 57
6. Влияние высокоинтенсивного диагностического ультразвука на структуры глаза животных в эксперименте/ Киселева Т.Н., **Зайцев М.С.**, Луговкина К.В., Рябина М.В., Щипанова А.И., Яни М.В. // Сборник тезисов XIII Российского общенационального офтальмологического форума. – 2020. – С.460 - 464
7. Оценка влияния диагностического ультразвука высокой акустической мощности на ткани глаз животных в эксперименте / **Зайцев М.С.**, Киселева Т.Н., Луговкина К.В. [и др.]. // **Российский офтальмологический журнал.** – 2022. – Т. 13, № 3. – С. 47 – 58.
8. Морфологическое обоснование безопасности воздействия высокоинтенсивного диагностического ультразвука на ткани глаза в эксперименте у животных / Киселева Т.Н., **Зайцев М.С.**, Измайлова Н.С., Луговкина К.В. // Сборник научных трудов XV Российского общенационального офтальмологического форума. – 2022. – С. 78 – 80

В том числе патент

9. **Патент № 2726478 РФ, МПК7 А 61 В 8/10, А 61 В 8/00.** Способ определения состояния оболочек глаза на периферии глазного дна при наличии силиконовой тампонады витреальной полости : № 2019138551: заявл. 28.11.2019: опубл. 14.07.2020 / Киселева Т.Н., Луговкина К.В., **Зайцев М.С.**, Рамазанова К.А., Бедретдинов А.Н.; заявитель и патентообладатель ФГБУ "НМИЦ ГБ им. Гельмгольца" Минздрава России. – 9 с. : ил. – Текст: непосредственный.

Список сокращений

УЗИ – ультразвуковое исследование

ЦДК – цветное доплеровское картирование

MI – механический индекс

TI – термический индекс

ISPTA – пространственный пик усредненной во времени акустической мощности

FDA - управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов

ОКТ – оптическая когерентная томография

ИФА – иммуноферментный анализ

HSP60 – митохондриальный белок, регулирующий гомеостаз митохондриальных функций

HSP27 - малый белок теплового шока, поддерживающий клеточный гомеостаз

MCP-1 – моноцитарный хемоаттрактантный протеин

IL–интерлейкин