

На правах рукописи

ЗОТОВ ВАДИМ ВАЛЕРЬЕВИЧ

**ЦИРКУЛЯРНЫЙ ТОННЕЛЬНЫЙ
КРОССЛИНКИНГ РОГОВИЧНОГО КОЛЛАГЕНА
С ПРИМЕНЕНИЕМ ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРА
В ЛЕЧЕНИИ ПАЦИЕНТОВ
С ПРОГРЕССИРУЮЩИМ КЕРАТОКОНУСОМ**

14.01.07. – глазные болезни

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2016

Работа выполнена в Чебоксарском филиале Федерального государственного автономного учреждения «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н.Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Поздеева Надежда Александровна, доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Федорова» Минздрава России

Официальные оппоненты:

Калинников Юрий Юрьевич

доктор медицинских наук, врач-офтальмолог высшей категории ФГБУ Клинической больницы Управления делами Президента РФ

Суркова Валентина Константиновна

доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник отделения хирургии роговицы и хрусталика Уфимского НИИ глазных болезней

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт глазных болезней»

Защита состоится 3 октября 2016г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д.208.014.01 при ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава РФ по адресу: 127486, Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59 А.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Автореферат разослан _____ 2016 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

И.А. Мушкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Кератоконус (КК) – это генетически детерминированное дистрофическое заболевание роговицы, характеризующееся нарушением биомеханической стабильности за счет структурной дезорганизации коллагеновых волокон, которое приводит к оптической неоднородности ткани роговицы с последующим истончением, конусовидным выпячиванием и нарушением прозрачности (Пучковская Н. А., Титаренко З.Д., 1990).

В последнее время многообещающей методикой, останавливающей прогрессирование кератоконуса, является УФ-кросслинкинг роговичного коллагена (КРК). Данная операция представляет собой фотополимеризацию стромальных волокон под воздействием фоточувствительной субстанции (раствор рибофлавина) и низких доз ультрафиолетового излучения, в результате которого происходит усиление поперечных внутримолекулярных связей роговичного коллагена с образованием димеров из двух α -цепей без деградации коллагеновых белков (Fujimori E., 1998; Wollensak G., Spoerl E., Seiler T., 2003).

На фоне растущего числа публикаций, сообщающих об эффективности технологии КРК в лечении прогрессирующего кератоконуса, выявляются и негативные стороны классической методики КРК, предполагающей деэпителизацию роговицы. Идет разработка вариантов КРК, направленных на повышение безопасности и комфорта пациента путем проведения процедуры без удаления роговичного эпителия. Перспективной представляется техника КРК с использованием фемтолазера, предложенной А. Kanellouros в 2009 г. Согласно данной методике раствор рибофлавина вводится в роговичный карман, сформированный фемтосекундным лазером на определенной глубине, с последующим УФ облучением. Однако в клинических исследованиях данной методики КРК с применением ФСЛ были зарегистрированы осложнения в виде отека и облачковидного помутнения передних и средних слоев стромы в центральной зоне роговицы,

вызывающие снижение остроты зрения в первые месяцы после процедуры. При этом в доступной нам литературе экспериментальных доказательств эффективности данной методики мы не обнаружили.

Анисимовым С.И. с соавторами (2011) разработана технология локального УФ-кросслинкинга, учитывающая топографическое расположение верхушки кератоконуса. Она предполагает использование на этапе УФ-облучения индивидуальных масок, формирующих направление светового потока для локального облучения роговицы непосредственно в месте эктазии и участках роговицы со сниженной ригидностью. Однако данная методика требует локальной дезэпителизации роговицы для пропитывания стромы фотосенсибилизатором, что влечет за собой значительный послеоперационный дискомфорт, а также повышение риска развития инфекционных осложнений.

Учитывая достоинства технологии УФ-кросслинкинга, предложенной А. Kanelloroulos, с использованием интрастромального кармана для введения раствора фотосенсибилизатора, а также методики Анисимова С.И., учитывающей топографическое расположение верхушки кератоконуса и позволяющей проводить УФ облучение направленным потоком света в области эктазии и участков роговицы со сниженной ригидностью, одновременно принимая во внимание недостатки указанных методик (болевого синдром, риск инфекционных осложнений, помутнение в оптической зоне роговицы), нами предложена новая технология циркулярного тоннельного КРК с фемтолазерным формированием кольцевидного интрастромального тоннеля для введения фотосенсибилизатора с учетом расположения зоны эктазии, что и обусловило **цель нашего исследования** – повышение эффективности и безопасности кросслинкинга у пациентов с прогрессирующим кератоконусом на основе разработки метода циркулярного тоннельного кросслинкинга с фемтолазерным формированием интрастромального кольцевидного тоннеля для введения фотосенсибилизатора с учетом топографического

расположения зоны эктазии, при ее расположении вне центральной зоны роговицы.

Задачи исследования

1. Разработать технологию циркулярного тоннельного УФ-кросслинкинга роговичного коллагена с фемтолазерным сопровождением.

2. Исследовать и сравнить в эксперименте иммуногистохимические, электронномикроскопические и биомеханические изменения в роговице после проведения различных вариантов ультрафиолетового кросслинкинга.

3. Сравнить клинико-функциональные результаты лечения прогрессирующего кератоконуса I – II стадии (по классификации Amsler-Krumeich) методами циркулярного тоннельного фемтокросслинкинга и стандартного УФ-кросслинкинга роговичного коллагена.

4. Изучить по данным конфокальной микроскопии и оптической когерентной томографии *in vivo* морфологические изменения структуры облученной ультрафиолетом роговицы.

5. Определить показания для циркулярного тоннельного кросслинкинга с фемтолазерным формированием интрастромального кармана и стандартного УФ-кросслинкинга в лечении пациентов с прогрессирующим кератоконусом I – II стадии.

Научная новизна

1. Впервые в эксперименте доказано, что под действием УФ-кросслинкинга в нормальной и кератоконусной роговице образуются устойчивые сшивки преимущественно в основном между фибриллами коллагена I типа. При проведении кросслинкинга с фемтолазерным формированием тоннеля количество и плотность сшивок в передней и средней роговичной строме увеличивается, что свидетельствует о более эффективном распределении рибофлавина непосредственно в строме в сравнении со стандартным методом кросслинкинга роговичного коллагена.

2. В эксперименте доказано равное увеличение биомеханической прочности роговиц, подвергшихся процедурам циркулярного тоннельного

фемтокреслинкинга и стандартного креслинкинга роговичного коллагена, что свидетельствует об одинаковом биомеханическом эффекте методик. Фемтолазерное формирование интрастромального кармана без его механического расслоения не вызывает статистически значимого снижения биомеханической прочности всей роговицы.

3. Впервые показано, что после применения методики циркулярного тоннельного фемтокреслинкинга происходит равное по значениям стандартному креслинкингу роговичного коллагена улучшение биомеханических свойств роговицы, остроты зрения, уменьшение кератометрических показателей, одинаковая динамика изменений показателей пахиметрии в послеоперационном периоде на фоне большей безопасности за счет ускоренного восстановления целостности эпителиального покрова, снижения выраженности роговичного синдрома, минимизации риска инфекционных осложнений.

Практическая значимость

1. Разработанная технология циркулярного тоннельного креслинкинга с фемтолазерным формированием интрастромальных карманов для введения фотосенсибилизатора учитывает топографическое расположение зоны эктазии, позволяет, наравне со стандартной методикой КРК, добиться стабилизации кератоконуса (при наблюдении в сроки до 3 лет) на фоне уменьшения выраженности роговичного синдрома, минимизации инфекционных осложнений и сокращения сроков послеоперационной реабилитации.

2. Впервые в отечественной практике клинически апробирован и внедрен метод циркулярного тоннельного фемтокреслинкинга, позволяющий применять данный вид операции для стабилизации начальных стадий прогрессирующего кератоконуса с периферическим расположением верхушки эктазии.

3. Экспериментальное исследование показало отсутствие

статистически значимого снижения биомеханической прочности роговицы, подвергшейся процедуре фемтолазерного формирования интрастромального кармана при отсутствии этапа дополнительного инструментального расслоения роговичной ткани, а также равное увеличение силы, необходимой для растяжения образцов роговиц после циркулярного тоннельного фемтокросслинкинга и стандартного кросслинкинга роговичного коллагена.

Положения, выносимые на защиту

1. Циркулярный тоннельный фемтокросслиндинг, выполняемый при периферическом топографическом расположении верхушки эктазии в зоне от 4,0 до 9,0 мм диаметра роговицы, наравне со стандартной методикой кросслинкинга является эффективным методом стабилизации прогрессирующего кератоконуса I-II стадии (по классификации Amsler-Krumeich) при сроке наблюдения 3 года.

2. Циркулярный тоннельный фемтокросслиндинг обеспечивает равное со стандартным УФ-кросслинкингом увеличение количества сшивок коллагеновых волокон, улучшение биомеханических свойств роговицы, остроты зрения, уменьшение кератометрических показателей, стабильные данные ПЭК; в то же время циркулярный тоннельный фемтокросслиндинг демонстрирует большую безопасность и сокращение сроков реабилитации за счет интактности центральной зоны роговицы, ускоренного восстановления целостности эпителиального покрова, снижения выраженности роговичного синдрома, минимизации риска инфекционных осложнений.

Внедрение в практику

Разработанная технология циркулярного тоннельного УФ-кросслинкинга роговичного коллагена с фемтолазерным сопровождением внедрена в научно-клиническую и практическую деятельность Чебоксарского филиала ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России, включена в программу лекционного курса на сертификационном цикле по офтальмологии и курсах

тематического усовершенствования по диагностике и лечению патологии рефракции АУ Чувашии «Институт усовершенствования врачей» и Чебоксарского филиала ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза».

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на IX, XII и XIII научно-практических конференциях с международным участием «Федоровские чтения» (Москва, 2011, 2014, 2015), на научно-практической конференции «Современные технологии катарактальной и рефракционной хирургии» (Москва, 2014, 2015), на заседании регионального отделения Общества офтальмологов России (Чебоксары, 2013, 2014), на Ульяновской 50-й юбилейной научно-практической медицинской конференции с международным участием «Медицина регионов – основа здоровьесбережения страны» (Ульяновск, 2015), на научно-клинической конференции ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова совместно с кафедрой глазных болезней МГМСУ (Москва, 2013, 2014), на X съезде офтальмологов России (Москва, 2015), на межрегиональной научно-практической конференции офтальмологов, посвященной 90-летию профессора Л.В.Коссовского (Н.Новгород, 2015), а также на научно-практической конференции «Современные технологии диагностики и лечения кератэктазий» (Волгоград, 2016).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, из них – 7 в научных журналах, рецензируемых ВАК РФ. Получен 1 патент РФ на изобретение.

Структура и объём работы

Диссертация изложена на 149 листах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, 4-х глав собственных исследований, заключения, выводов и практических рекомендаций. Работа иллюстрирована 57 рисунками и 17 таблицами. Библиографический указатель содержит 152 источника, из них 48 работ отечественных и 104 – зарубежных авторов.

Гистоморфологические и иммуногистохимические исследования проводились в лаборатории микроскопии Казанского Института Биохимии и Биофизики КазНЦ РАН (проф. Петров С.В., проф. Сальников В.В.). Последующая компьютерная морфометрия и анализ локализации различных типов коллагена выполнялись на базе Республиканского клинического онкологического диспансера г. Чебоксары (к.м.н. Москвичев Е.В.).

Электронно-микроскопическое исследование выполнялось на базе Института Биотехнологии РАН г. Москва (к.б.н. Ларионов Е.В.)

Экспериментальные исследования биомеханических свойств роговицы проводились в лаборатории полимеризации НИИ химии при ННГУ им.Н.И. Лобачевского (Н.Новгород, доцент Рябов С. А.).

Клиническая часть работы проводилась на базе Чебоксарского филиала федерального государственного автономного учреждения «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Дизайн исследования

Дизайн работы основан на проведении экспериментальных и клинических исследований эффективности метода циркулярного тоннельного фемтокросслинкинга и анализе полученных результатов в сравнении с результатами стандартного УФ-кросслинкинга (табл.1).

I. Экспериментальные исследования	
Иммуногистохимические исследования типов коллагена	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 2 роговичных диска, полученных при кератопластике у пациентов с кератоконусом после УФ-кросслинкинга ✓ 2 нормальных роговичных диска донорских роговиц, полученных из глазного банка после УФ-кросслинкинга
Электронно-микроскопическое исследование ультраструктуры стромы роговицы после проведения вариантов процедуры УФ-кросслинкинга	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 1 (опытная) группа - 6 глаз кроликов, на которых проводили процедуру ЦТФКРК ✓ 2 группа (сравнения) - 6 глаз, на которых проводили процедуру СКРК ✓ 3 группа (контроля) - 6 глаз, на которых проводили только фемтолазерное формирование интрастромального тоннеля без процедуры УФ-кросслинкинга
Исследование влияния фемтокросслинкинга на биомеханические свойства роговицы	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 1 группа - 5 глаз кроликов с интактными роговицами ✓ 2 группа - 5 глаз после СКРК ✓ 3 группа - 5 глаз после ЦТФКРК ✓ 4 группа - 5 глаз фемтолазерного формирования интрастромального тоннеля без кросслинкинга
II. Клинико-функциональные исследования	
Основная группа – 64 глаза , на которых была проведена процедура ЦТФКРК	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 1-я подгруппа – 33 глаза с I стадией КК ✓ 2-я подгруппа – 31 глаз со II стадией КК
Контрольная группа - 63 глаза , на которых КРК был проведен по стандартной методике	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 1-я подгруппа – 32 глаза с I стадией КК ✓ 2-я подгруппа – 31 глаз со II стадией КК

Экспериментальные исследования

Задачами экспериментальной части работы последовательно явились оценка количества и распределения типов коллагена стромы роговицы, изучение ультраструктуры роговичной ткани, а также исследование биомеханических свойств роговицы после проведения циркулярного

тоннельного фемтокреслинкинга и стандартного УФ-креслинкинга роговичного коллагена.

С целью оценки количества и распределения коллагена типа I, II, III, IV и VI стромы роговицы после УФ-креслинкинга были проведены **иммуногистохимические исследования типов коллагена** с помощью непрямого иммуноферментного метода (ELISA) на 2-х роговичных дисках диаметром 9,0 мм, полученных при кератопластике у пациентов с кератоконусом IV стадии, и 2-х роговичных дисках роговиц донорских глаз, полученных из патологоанатомического бюро. Данное исследование проводили после получения одобрения этического комитета АУ Чувашии «Институт усовершенствования врачей» Министерства здравоохранения и социального развития Чувашской Республики и подписания информированного согласия пациентами с IV стадией КК, которым планировали проведение операции СКП. Проведенные иммуногистохимические исследования роговиц пациентов с кератоконусом показали значительные количественные изменения всех типов коллагена в результате деструкции, происходящей в результате повышения уровня лизосомальных ферментов и ингибиторов протеиназы в строме роговицы. Так, в роговице с КК количество коллагена типа I, по данным гистоморфометрии, падает до 35-45% по сравнению с нормой (55%). В результате развития патологического процесса строма роговицы теряет свою ориентацию в волокнах коллагена, которые скручиваются по своей оси. Другие типы коллагенов стромы также изменяются при КК в количественном и качественном отношении. Так, количество коллагена типа III, IV и VI уменьшается в среднем на 25–30% по сравнению с нормой, но изменений в их локализации не обнаруживается. Под действием УФ креслинкинга образуются устойчивые сшивки, в основном между фибриллами I типа коллагена. При проведении креслинкинга с фемтолазерным формированием тоннеля количество и плотность сшивок увеличивается, что вероятно связано с таргетированной доставкой рибофлавина в строму роговицы и прямой

реакцией со стромальным коллагеном и, следовательно, с более эффективным процессом кросслинкинга. Распределение и локализация в роговице различных типов коллагена под действием УФ кросслинкинга не изменяется, а возникающие сшивки концентрируются в основном на коллагене I типа.

С целью сравнения структуры ткани роговицы после стандартного КРК и фемтокросслинкинга было проведено **электронно-микроскопическое исследование** состояния ультраструктуры коллагена стромы роговицы кроликов на трансмиссионном электронном микроскопе JEOL 1200 EX (Япония). Исследования выполнены на 18 глазах 9 кроликов. Животные были разделены на 3 группы: 1 (опытная) группа - кролики, которым проводили процедуру кросслинкинга с применением фемтолазера, 2 группа (сравнения) – кролики, которым проводили процедуру стандартного кросслинкинга по цюрихскому протоколу, 3 группа (контроля) - кролики которым проводили только фемтолазерное формирование интрастромального кармана без процедуры кросслинкинга. На сроках 1 неделя, 1 и 3 месяца кроликов выводили из эксперимента воздушной эмболией, глаза энуклеировали, роговицы вырезали трепаном 9,0 мм.

В результате исследования ультраструктуры коллагена стромы роговицы экспериментальных животных выявлены сопоставимые изменения в группах стандартного КРК и фемтокросслинкинга, проявившиеся в одинаковом количестве появившихся «сшивок» волокон коллагена, сохраняющихся на всех сроках наблюдения, что можно расценить, как равноценный эффект обоих методов. Были выявлены изменения в базальной мембране в виде отежных базальных клеток эпителия с признаками полиморфизма и увеличенными межклеточными пространствами после стандартного КРК, свидетельствующие о травматичности этапа удаления эпителия в отличие от методики КРК с введением рибофлавина в стромальный карман, сформированный фемтолазером, при которой базальная мембрана остается интактной.

Для исследования биомеханических свойств роговицы, с целью проверки гипотезы увеличения прочности роговицы после УФ-кросслинкинга, с помощью универсальной испытательной разрывной машины ZWICK/ROELL Z005 изучали способность к растяжению образцов роговицы экспериментальных животных, подвергшихся процедурам ЦТФКРК, СКРК и фемтолазерного формирования интрастромального тоннеля. Для экспериментальной работы использовали самцов кроликов породы Шиншилла массой 2-3 кг. Исследования выполняли на 20 глазах 10 кроликов. Глаза животных были разделены на 4 группы по 5 глаз в каждой. Группа 1-я – контроль, 2-я - глаза после стандартного УФ-кросслинкинга, 3-я - после циркулярного тоннельного кросслинкинга с фемтолазерным формированием интрастромального кармана, 4-я - после фемтолазерного формирования интрастромального тоннеля без УФ-кросслинкинга.

Через 1 месяц кроликов выводили из эксперимента воздушной эмболией, глаза энуклеировали. Выкраиваемые полоски ткани размером 12 на 20 мм захватывали весь диаметр роговицы и часть склеры для закрепления между лапками универсальной испытательной машины ZWICK/ROELL Z005 на расстоянии 10 мм. Натяжение повышали линейно со скоростью 50 мм/мин до напряжения в 7 МПа. Полученные результаты фиксировали программным управлением испытательной машины численно и графически. Уменьшение растяжимости роговичной ткани расценивали как увеличение ее прочности, произошедшее в результате достижения эффекта УФ-кросслинкинга с формированием новых ковалентных связей, «сшивок» между фибриллами коллагена.

При сравнении напряжения при растяжении образцов на 8% установлено различие в деформационных кривых, показывающих зависимость напряжения, приложенного к испытываемому образцу, от удлинения этого образца. Так, напряжение при растяжении образцов на 8% в 1 группе составило $3,6 \pm 0,27$ МПа ($p=0,0213$), во 2 группе $6,4 \pm 0,4$ МПа ($p=0,413$), в 3 группе $6,1 \pm 0,25$ МПа ($p=0,0338$), в 4 группе $3,5 \pm 0,18$ МПа

($p=0,0547$).

Таким образом, исследование показало почти 2-х кратное увеличение силы, необходимой для растяжения образцов, подвергшихся процедуре ЦТФКРК и СКРК, что свидетельствует о достижении эффекта УФ-кросслинкинга с формированием новых ковалентных связей («сшивок») между фибриллами коллагена. В то же время, само по себе фемтолазерное формирование интрастромального кармана не вызвало статистически значимого снижения биомеханической прочности роговицы, что может быть связано с отсутствием этапа инструментального расслаивания и подъема роговичного клапана и сохранением тонких тканевых мостиков.

Клинико-функциональные исследования

Клинико-функциональные результаты проанализированы на основе хирургического лечения 127 глаз 116 пациентов с прогрессирующим КК 1-2 стадии (по классификации Amsler-Krumeich), которые были разделены на 2 группы по методу проведения КРК и топографии расположения вершины КК.

В **основную группу** включены 64 глаза, с периферическим расположением вершины эктазии, на которых была проведена процедура циркулярного тоннельного КРК с применением ФСЛ.

Контрольную группу составили 63 глаза с центральным расположением вершины КК, на которых КРК был проведен по стандартной методике.

В соответствии со стадиями клинического течения кератоконуса основная группа была разделена на 2 подгруппы: **1-я подгруппа** – 33 глаза (26%) с I стадией кератоконуса; **2-я подгруппа** – 31 глаз (24,5%) с КК II стадии. Контрольная группа также была разделена на 2 подгруппы: **1-я подгруппа** – 32 глаза (25%) с I стадией, **2-я подгруппа** – 31 глаз (24,5%) со II стадией кератоконуса.

Для оценки результатов до и после операции в течение 3-х лет пациентам проводилось полное обследование: визометрия, биомикроскопия,

кераторефрактометрия (UKR 700, Unisos, Корея), определение биомеханических свойств роговицы (ORA Riechert, США), aberromетрия с корнеотопографией (Tomey 4, OPD-Scan II Nidek, Япония), конфокальная биомикроскопия с подсчетом плотности эндотелиальных клеток (ПЭК) на конфокальном микроскопе Confoscan - 4 (Nidek, Япония). Для изучения степени интенсивности болевых ощущений после проведения КРК в обеих группах после процедуры проводили анкетирование, где пациентам предлагали оценить выраженность болевых ощущений в баллах от 1-го до 4-х (0 = отсутствие боли; 4 = самая сильная боль). Срок наблюдения 3 года.

Методику циркулярного тоннельного кросслинкинга роговичного коллагена с фемтолазерным формированием тоннеля применяли при периферическом расположении вершины кератоконуса.

Процедуру ЦТФКРК начинали с формирования интрастромального тоннеля с помощью ФСЛ IntraLase FS 60 кГц. Для этого на заданной глубине 150 мкм формировали кольцевидный канал, проходящий через вершину кератэктазии, внутренним диаметром 4,0 мм и внешним 9,0 мм, после чего в радиальном направлении проводили входной разрез длиной 2,0 мм. Энергия импульса составила 1,5-1,8 мкДж. В сформированный таким образом тоннель вводили раствор «Декстралинк» с интервалом 5 минут в течение 15 минут в количестве 0,5-0,7 мл до проникновения раствора фотосенсибилизатора из входа в тоннель и полного пропитывания стромы в выше и нижележащих областях от сформированного тоннеля. Затем в проекции сформированного кольцевидного тоннеля проводили облучение ультрафиолетовым светом в течение 30 минут с использованием аппарата для фототерапии роговицы EVOLUTION производства ООО «Трансконтакт» (Москва), в котором применяли специальную диафрагму в виде двух полукруглых сегментов.

Стандартную методику кросслинкинга роговичного коллагена применяли при центральном расположении вершины кератоконуса и осуществляли согласно Цюрихскому протоколу.

Результаты клинико-функциональных исследований

Ранний послеоперационный период у пациентов основной группы характеризовался наличием роговичного синдрома слабой интенсивности (в среднем $1,65 \pm 0,65$ балла по 4 бальной шкале), который сохранялся в течение первых 12 часов после операции до наступления полной эпителизации. Степень интенсивности и длительности роговичного синдрома у пациентов после стандартной процедуры КРК была большей (в среднем $3,55 \pm 0,55$ балла, а его купирование происходило в среднем на 3-и сутки после процедуры) в связи с большой площадью деэпителизации и облучения роговичной ткани. Выявленная нами закономерность говорит о большей травматизации роговицы при проведении процедуры СКРК в сравнении с ЦТФКРК.

Из осложнений раннего послеоперационного периода отмечен 1 случай (0,78%) развития кератита и 1 случай (0,78%) длительно незаживающей эрозии роговицы у пациентов контрольной группы. Ранние послеоперационные осложнения возникли в основном у пациентов контрольной группы, чему способствовала большая площадь деэпителизации и облучения роговицы, а также неправильный уход за контактной линзой при ее применении в послеоперационном периоде. Само применение МКЛ является фактором риска развития кератита и инфильтратов роговицы при неправильной гигиене при закапывании пациентом капель в послеоперационном периоде на фоне ухудшения оксигенации роговицы и относительно длительного контакта между поверхностью линзы и деэпителизированной роговичной стромой.

Динамика остроты зрения в основной и контрольной группах была различна. В послеоперационном периоде в 1-й подгруппе основной группы через 1 месяц не было отмечено достоверного изменения средних показателей НКОЗ и КОЗ по сравнению с дооперационными значениями, в то время как в 1 подгруппе контрольной группы было достоверное снижение средних показателей НКОЗ на $0,09 \pm 0,04$ и КОЗ на $0,08 \pm 0,04$ по сравнению с дооперационными значениями, что связано с появлением хейза в

центральной зоне роговицы, подвергавшейся облучению, выявляемом при биомикроскопии, и представляющим отек стромы роговицы на месте гибели кератоцитов. Через 3 года наблюдения НКОЗ в 1 подгруппе основной группы достоверно с $0,22 \pm 0,11$ до $0,33 \pm 0,1$, средний показатель КОЗ в этот срок достоверно увеличился с $0,64 \pm 0,14$ до $0,75 \pm 0,14$. В контрольной группе НКОЗ увеличилась с $0,2 \pm 0,09$ до $0,3 \pm 0,09$ и КОЗ с $0,53 \pm 0,13$ до $0,63 \pm 0,14$ через 36 месяцев после процедуры.

Послеоперационная динамика клинико-функциональных показателей у пациентов 2-й подгруппы была сходна с таковой у пациентов 1-й подгруппы. Во 2-й подгруппе основной группы НКОЗ повышалась с $0,11 \pm 0,03$ до $0,21 \pm 0,09$ и КОЗ с $0,41 \pm 0,14$ до $0,53 \pm 0,11$ через 36 месяцев после операции, а в контрольной группе градиент повышения НКОЗ и КОЗ через 36 месяцев после процедуры составил $0,1 \pm 0,04$ и $0,12 \pm 0,02$ соответственно (табл.2,3).

Таблица 2

Динамика изменений клинико-функциональных показателей у пациентов с кератоконусом I стадии после ЦТФКРК (основная группа, n=33), стандартного КРК (контрольная группа, n = 32), M±SD

Метод операции	Параметры	До операции	Через 1 мес		Через 36 мес	
		M±SD	M±SD	p	M±SD	p
ЦТФКРК (основная группа)	НКОЗ	$0,22 \pm 0,11$	$0,26 \pm 0,09$	0,2853	$0,33 \pm 0,1$	0,0019
	КОЗ	$0,64 \pm 0,19$	$0,65 \pm 0,1$	0,8941	$0,75 \pm 0,14$	0,0123
	Kmax, D	$53,03 \pm 2,95$	$52,35 \pm 2,16$	0,0688	$50,75 \pm 2,16$	0,0003
	Kave, D	$46,3 \pm 2,48$	$46,5 \pm 2,05$	0,0778	$45,11 \pm 2,31$	0,0069
	ФРР, мм рт.ст.	$6,74 \pm 1,31$	$7,7 \pm 2,9$	0,0431	$8,5 \pm 1,25$	0,0012
	КГ, мм рт.ст.	$7,9 \pm 1,22$	$8,1 \pm 2,2$	0,0531	$9,3 \pm 1,31$	0,0020
Стандартный КРК (контрольная группа)	НКОЗ	$0,2 \pm 0,14$	$0,11 \pm 0,1$	0,0122	$0,3 \pm 0,09$	0,0004
	КОЗ	$0,53 \pm 0,2$	$0,45 \pm 0,1$	0,0331	$0,63 \pm 0,14$	0,0011
	Kmax, D	$52,8 \pm 2,75$	$52,88 \pm 2,32$	0,0688	$50,6 \pm 2,31$	0,0188
	Kave, D	$45,2 \pm 2,4$	$45,08 \pm 2,24$	0,0778	$42,9 \pm 2,22$	0,0099
	ФРР, мм рт.ст.	$6,23 \pm 1,21$	$7,2 \pm 2,0$	0,0431	$8,1 \pm 1,05$	0,0008
	КГ, мм рт.ст.	$7,47 \pm 1,09$	$7,9 \pm 2,08$	0,0634	$8,9 \pm 1,2$	0,0017

Таблица 3

Динамика изменений клинико-функциональных показателей у пациентов с кератоконусом II стадии после ЦТФКРК (основная группа, n = 31), стандартного КРК (контрольная группа, n = 31), M±SD

Метод операции	Параметры	До операции	Через 1 мес		Через 36 мес	
		M±SD	M±SD	p	M±SD	p
ЦТФКРК (основная группа)	НКОЗ	0,11±0,03	0,13±0,09	0,3792	0,21±0,09	0,0007
	КОЗ	0,41±0,14	0,45±0,1	0,0862	0,53±0,11	0,0042
	Kmax, D	57,29±3,05	56,95±2,86	0,2317	54,95±2,96	0,0073
	Kave, D	50,23 ± 2,77	49,9± 2,65	0,5691	48,3± 2,38	0,0012
	ФРР, мм рт.ст.	6,3±0,96	6,7±0,8	0,0955	7,9±1,17	0,0047
	КГ, мм рт.ст.	7,31±1,2	7,9±1,14	0,0451	8,7±1,16	0,0002
Стандартный КРК (контрольная группа)	НКОЗ	0,09±0,02	0,05±0,02	0,0492	0,19±0,09	0,0007
	КОЗ	0,35±0,11	0,29±0,1	0,0335	0,47±0,13	0,0089
	Kmax, D	56,88 ± 3,19	56,76±3,1	0,7892	54,6± 2,77	0,0022
	Kave, D	49,33 ± 2,8	48,9± 2,95	0,0855	47,25±3,05	0,0127
	ФРР, мм рт.ст.	5,8±0,8	6,2±0,9	0,0567	7,7±0,95	0,0016
	КГ, мм рт.ст.	7,3±1,02	7,9±1,2	0,0459	8,73± 1,11	0,0001

В обеих группах в послеоперационном периоде отмечали уменьшение преломляющей силы роговицы. Уменьшение в 1-й подгруппе основной группы показателей Kmax и Kave через 3 года после операции в среднем составило $2,28 \pm 0,4$ дптр и $2,1 \pm 0,5$ дптр, в то время как в 1 подгруппе контрольной группы уменьшение Kmax и Kave через 3 года после операции составило $2,2 \pm 0,4$ дптр и $2,3 \pm 0,6$ дптр по сравнению с дооперационными значениями. Во 2-й подгруппе основной группы снижение Kmax и Kave по сравнению с дооперационными значениями в среднем составило $2,34 \pm 0,8$ дптр и $1,93 \pm 0,7$ дптр, в контрольной – $2,28 \pm 0,5$ дптр и $2,08 \pm 0,7$ дптр соответственно.

При изучении биомеханических свойств роговицы у пациентов 1-й подгруппы выявлено статистически значимое повышение данных в основной группе: ФРР с $6,74 \pm 1,31$ до $8,5 \pm 1,25$, КГ с $7,9 \pm 1,22$ до $9,3 \pm 1,31$ мм рт. ст.; в контрольной группе: ФРР с $6,23 \pm 1,21$ до $8,1 \pm 1,05$ и КГ с $7,47 \pm 1,09$ до $8,9 \pm 1,2$ мм рт. ст. через 3 года после процедуры.

Во 2-й подгруппе основной и контрольной групп анализ биомеханических свойств роговицы выявил статистически значимое повышение в основной группе ФРР с $6,3 \pm 0,96$ до $7,9 \pm 1,17$, КГ с $7,31 \pm 1,2$ до $8,7 \pm 1,16$ мм рт. ст.; в контрольной группе: ФРР с $5,8 \pm 0,8$ до $7,7 \pm 0,95$ и КГ с $7,3 \pm 1,02$ до $8,73 \pm 1,11$ мм рт. ст. через 3 года после процедуры.

При анализе изменений кератопахиметрических величин у пациентов обеих групп были отмечены одинаковые закономерности. Пахиметрия роговицы в месте облучения незначительно снижалась, что свидетельствовало об уплотнении роговицы и формировании прочных интра- и межфибрилярных связей волокон коллагена. В дальнейшем в течение всего послеоперационного периода отмечали постепенное увеличение толщины роговицы, которая оставалась однако ниже дооперационных значений.

По данным ОКТ переднего отрезка у пациентов основной и контрольной групп просматривали почти равное увеличение оптической плотности передних отделов стромы роговицы и наличие демаркационной линии через 1 месяц после операции, которая постепенно исчезала к 6 месяцу наблюдения. Через 1 месяц после вмешательства в основной группе средняя глубина расположения демаркационной линии составила 336 ± 21 мкм, в контрольной группе данный показатель составил 329 ± 28 мкм. Статистически значимых различий между данными показателями обнаружено не было ($p=0,2351$).

Анализ карт подъёма передней поверхности роговицы у пациентов 1-й подгруппы обеих групп через 3 года после операции выявил статистически значимое снижение элевации передней поверхности с $24,4 \pm 5,1$ до $12,4 \pm 3,1$ мкм. У пациентов 2-й подгруппы основной и контрольной групп было обнаружено статистически значимое снижение ($p=0,024$) элевации передней вершины с $32,4 \pm 6,7$ до $18,7 \pm 4,4$ мкм.

По данным конфокальной микроскопии обнаруживали одинаковые изменения у пациентов основной и контрольной групп в передних и средних

слоях стромы в пределах глубины 300-350 мкм, задняя строма оставалась без выраженных изменений, визуализировался лишь переход гипоцеллюлярных слоев к слоям с нормальной плотностью кератоцитов, что доказывает безопасность КРК для подлежащих структур глаза. Безопасность обоих методов была подтверждена исследованиями плотности эндотелиальных клеток, достоверного снижения которой не выявляли в послеоперационном периоде, а также вычислением коэффициента безопасности, который соответствовал нормальным значениям и был больше 1,0 в обеих подгруппах основной и контрольной групп, что свидетельствовало об отсутствии потери строк КОЗ.

Различия между изменениями гистоморфологической картины роговицы после КРК, выполненного по стандартной методике, и ЦТФКРК проявлялись на уровне боуеновой мембраны с изменениями которой начинается развитие КК. После СКРК выявлялась уплотненная боуенова мембрана с линейными гипер- и гипорефлексирующими включениями, что, по нашему мнению, свидетельствует о травматичности этапа удаления эпителия. Изменений в боуеновой мембране после ЦТФКРК выявлено не было.

В ходе данного исследования было отмечено 4 случая (3,14% от общего количества глаз) прогрессирования КК в послеоперационном периоде. В частности, на 2-х глазах (1,57%), перенесших ЦТФКРК, и 2-х (1,57%) после СКРК через 1 год после процедуры имело место повышение показателей K_{max} и K_{ave} на 1 дптр и более, которое было расценено как прогрессирование КК. Во всех 4-х случаях K_{max} была более 57 дптр, что вероятно является фактором риска прогрессирования КК и может служить ограничением для выполнения КРК. На 1-м глазу контрольной группы была выполнена передняя глубокая послойная пересадка роговицы в связи с переходом заболевания в III стадию с истончением роговичной ткани менее 350 мкм. На остальных 3-х глазах была проведена процедура имплантации кольца Myoring, что позволило стабилизировать прогрессирование КК.

ВЫВОДЫ

1. Разработана технология циркулярного тоннельного УФ-кросслинкинга роговичного коллагена, основанная на фемтолазерном формировании интрастромального тоннеля внутренним диаметром 4,0 мм и внешним 9,0 мм для введения фотосенсибилизатора с захватом наиболее эктазированного участка роговицы, определяемого по кератотопограмме пациента.
2. Под действием УФ-кросслинкинга в нормальной и кератоконусной роговице образуются устойчивые «сшивки», в основном между фибриллами коллагена I типа. Методом электронной микроскопии выявлены изменения в базальной мембране после стандартного УФ-кросслинкинга, свидетельствующие о травматичности этапа удаления эпителия. В эксперименте доказано равное двукратное увеличение биомеханической прочности роговиц, подвергшихся процедурам циркулярного тоннельного фемтокросслинкинга и стандартного УФ-кросслинкинга, свидетельствующее об одинаковом эффекте методик. Фемтолазерное формирование интрастромального кармана без механического расслаивания не вызывает статистически значимого снижения биомеханической прочности всей роговицы.
3. Анализ клинико-функциональных результатов показал эффективность метода циркулярного тоннельного УФ-кросслинкинга с применением фемтолазера, обеспечивающего меньшую по интенсивности послеоперационную боль ($1,65 \pm 0,65$ балла из 4-х против $3,65 \pm 0,55$ при стандартном УФ-кросслинкинге), повышение в 93% случаев НКОЗ и КОЗ в раннем послеоперационном периоде (по сравнению с 58% случаев после стандартного кросслинкинга роговичного коллагена), равное или сопоставимое улучшение биомеханических свойств роговицы (повышение корнеального гистерезиса в 1,5 раза, фактора резистентности в 1,3 раза), что позволило добиться стабилизации прогрессирующего кератоконуса в 96,8% случаев при сроке наблюдения

до 3-х лет у пациентов с кератоконусом I-II стадии по классификации Amsler-Krumeich на фоне уменьшения выраженности роговичного синдрома, минимизации инфекционных осложнений и сокращения сроков послеоперационной реабилитации.

4. По данным конфокальной микроскопии *in vivo* выявлено уплотнение боуменовой мембраны после стандартного кросслинкинга, свидетельствующее о травматичности этапа удаления эпителия. По данным оптической когерентной томографии переднего отрезка в обеих группах через 1 месяц после операции определено равное увеличение оптической плотности передних отделов стромы роговицы и наличие демаркационной линии на глубине в среднем 336 ± 21 мкм в основной группе и 329 ± 28 мкм в контрольной, указывающие на факт успешного выполнения УФ-кросслинкинга.
5. Выполнение циркулярного тоннельного УФ-кросслинкинга на основе использования фемтосекундного лазера для формирования интрастромального тоннеля показано при прогрессирующем кератоконусе I-II стадии по классификации Amsler-Krumeich при максимальной кератометрии до 57 дптр и пахиметрии в зоне эктазии не ниже 400 мкм, а также периферическом расположении зоны эктазии в проекции формируемого кольцевидного тоннеля внутренним диаметром 4,0 и внешним 9,0 мм от центра роговицы; при более центральном расположении наиболее эктазированного участка роговицы необходимо применение стандартной методики УФ-кросслинкинга.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При прогрессирующем кератоконусе I-II стадии по классификации Amsler-Krumeich с периферическим расположением зоны эктазии в проекции кольцевидного тоннеля внутренним диаметром 4,0 и внешним 9,0 мм от центра роговицы, при максимальной кератометрии до 57 дптр и пахиметрии в зоне эктазии не ниже 400 мкм рекомендуется проведение

циркулярного тоннельного УФ-кросслинкинга на основе использования фемтосекундного лазера для формирования интрастромального кармана.

2. При прогрессирующем кератоконусе I-II стадии по классификации Amsler-Krumeich с центральным расположением наиболее эктазированного участка роговицы, при максимальной кератометрии до 57 дптр и пахиметрии в зоне эктазии не ниже 400 мкм рекомендуется применение стандартной методики УФ-кросслинкинга.
3. Оптимальными параметрами роговичного тоннеля, формируемого с помощью фемтолазера, для введения фотосенсибилизатора с последующим УФ-кросслинкингом являются: внутренний диаметр – 4,0 мм, наружный диаметр – 9,0 мм, глубина залегания тоннеля – 150 мкм.
4. Пациентам с кератоконусом I-II стадии после проведения УФ-кросслинкинга рекомендовано динамическое наблюдение для оценки динамики прогрессирования кератоконуса по показателям K_{max} и K_{ave} , данным пахиметрии, а также элевации передней поверхности роговицы. Рекомендуемые сроки обследования после операции: 1,6,12 месяцев, затем при стабильности данных K_{max} и K_{ave} , пахиметрии, элевации передней поверхности роговицы, осмотры возможно проводить однократно в год.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации в ведущих рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК

1. **Зотов В.В., Сальников В.В., Поздеева Н.А.** Изменения ультраструктуры стромы роговицы после проведения кросслинкинга // **Практическая медицина.** – 2012. – Т.1, № 4. – С. 95-96.
2. **Зотов В.В., Паштаев Н.П., Ларионов Е.В., Поздеева Н.А., Анисимов С.И.** Сравнительное гистохимическое исследование структуры коллагена нормальной и кератоконусной роговицы в ходе моделирования процедуры кросслинкинга с применением фемтолазера *in vitro* // **Катарактальная и рефракционная хирургия.** – 2013. - № 2. – С. 32-36.

3. Паштаев Н.П., **Зотов В.В.** Сравнительный анализ отдаленных результатов стандартного и локального фемтокросслинкинга у больных с прогрессирующим кератоконусом // **Вестник ОГУ.**–2014.- №12. – С.248-251.

4. Паштаев Н.П., Поздеева Н.А., **Зотов В.В.**, Тихонов Н.М. Сравнительное исследование влияния фемтокросслинкинга на биомеханические свойства роговицы в эксперименте // **Фундаментальные исследования.** – 2015. - №1, ч.6. – С. 1217-1221.

5. **Зотов В.В.**, Паштаев Н.П., Ларионов Е.В., Поздеева Н.А., Анисимов С.И. Электронная микроскопия роговичной стромы после стандартного кросслинкинга и с применением фемтолазера в эксперименте // **Офтальмохирургия.** – 2015. - №2. –С.22-27.

6. **Зотов В.В.**, Паштаев Н.П., Поздеева Н.А. Кросслинкинг роговичного коллагена в лечении кератоконуса (обзор литературы) // **Вестник офтальмологии.** – 2015.-№4.-С.88-93.

7. Паштаев Н.П., Поздеева Н.А., **Зотов В.В.**, Сеницын М.В., Гаглов Б.В. Сравнительный анализ влияния различных вариантов кросслинкинга на биомеханическую стабильность роговицы// **Вестник офтальмологии.** – 2016.-№2.-С.38-46.

Патенты по теме диссертации

1. Паштаев Н.П., Поздеева Н.А., Анисимов С.И., **Зотов В.В.** Способ лечения прогрессирующего кератоконуса. Патент РФ на изобретение № 2456971 от 27.07.2012г.

Список сокращений

КОЗ – корригированная острота зрения	ORA – анализатор биомеханических свойств роговицы (Ocular Response Analyzer)
НКОЗ – некорригированная острота зрения	SAI – индекс асимметрии поверхности роговицы (Surface Asymmetry Index)
ОКТ – оптическая когерентная томография	SRI – индекс регулярности поверхности роговицы (Surface Regularity Index)
Kave – средняя кератометрия	КРК – кросслинкинг роговичного коллагена
Kmax – максимальная кератометрия	КК – кератоконус
ПЭК – плотность эндотелиальных клеток	МКЛ – мягкие контактные линзы
мкм – микрометр	СКРК – стандартный кросслинкинг роговичного коллагена
УФ – ультрафиолет, ультрафиолетовый	ЦТФКРК – циркулярный тоннельный фемтокросслинкинг роговичного коллагена
ФСЛ – фемтосекундный лазер	
КГ – корнеальный гистерезис (corneal hysteresis)	
ФРР – фактор резистентности роговицы (corneal resistance factor)	

Биографические данные

Зотов Вадим Валерьевич, 1984 года рождения, в 2007 году окончил медицинский факультет Ульяновского государственного университета по специальности лечебное дело. С 2007 по 2009 год проходил обучение в клинической ординатуре по специальности «офтальмология» на базе Чебоксарского филиала МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова. По окончании ординатуры в 2009 году принят на должность врача - офтальмолога Чебоксарского филиала ФГАУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова.