УДК 617.7-089

КОНФОКАЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ ПОСЛЕ ФЕМТОСЕКУНДНОЙ СКВОЗНОЙ КЕРАТОПЛАСТИКИ С ПОМОЩЬЮ FS – ЛАЗЕРА "INTRALASE – FS" 60 КГЦ ПРИ КЕРАТОКОНУСЕ IV СТАДИИ

О.В. Шленская, Л.В. Лебедь

Чебоксарский филиал ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Федорова» Минздрава России, г. Чебоксары

Проанализированы результаты конфокальной микроскопии роговицы 42 глаз 40 пациентов с кератоконусом IV степени (по Амслеру), которым была выполнена фемтосекундная СКП с помощью «IntraLase Fs» 60 кГц. При конфокальной микроскопии наблюдалась реиннервация трансплантата на более ранних сроках (1 месяц), в 100% случаях определялся четкий рубец с выраженной фибропластической реакцией, активацией волокон коллагена, отсутствие дендритических клеток в отдаленном послеоперационном периоде, в околорубцовой зоне - отсутствие ацеллюлярных зон.

Ключевые слова: конфокальная микроскопия, фемтосекундный лазер, реиннервация трансплантата, фиброзированный рубец.

CONFOCAL MICROSCOPY AFTER FEMTOSECOND PENETRATING KERATOPLASTY WITH 60 KHZ INTRALASE-FS IN CASE OF IV DEGREE KERATOCONUS

Shlenskaya O.V., Lebed L.V.

Corneal confocal microscopy results of 42 eyes of 40 patients with IV degree keratoconus (according to Amsler) after 60 kHz "IntraLase FS" femtosecond penetrating keratoplasty (PK) were analyzed. Reinnervation of transplant was observed in early periods (1 month), clear cicatrix with expressed fibroplastic reaction, collagen fibers activation, absence of dendritic cells in remote postoperative period, absence of acellular zones in cicatrix zone was defined in 100% of cases.

Key words: confocal microscopy, femtosecond laser, transplant reinnervation, fibrotic cicatrix

Кератоконус во всем мире является широко распространенным заболеванием. Частота встречаемости кератоконуса по данным разных авторов колеблется от 1:250 до 1:250 000 (Kennedy R.H. et al., 1986; Mannis M.J.,1987; Rabinowitz Y.S.,1998; Слонимский Ю. Б., 2004). В настоящее время в странах Европы кератоконус является наиболее частым показанием к сквозной кератопластике (СКП) (на его долю приходится около четверти всех проводимых СКП). В Израиле кератоконус занимает первое место, в США и Канаде – третье место по частоте показаний к СКП [3,4,6,7].

После проведения сквозной кератопластики (СКП) для пациента важно не только получить прозрачное приживление роговичного трансплантата, но и максимально возможную остроту зрения без коррекции. На сегодня остается актуальной и проблема невысокой биомеханической стабильности послеоперационной раны из-за большой протяженности рубца, недостаточно точного сопоставления ткани донора и реципиента, продолжительного времени формирования рубца.

Внедрение фемтосекундных лазеров в клиническую практику ознаменовало открытие новой эры в трансплантации роговицы, позволило улучшить клинико-функциональные результаты СКП. Анализ зарубежной и отечественной литературы выявил ограниченное количество исследований конфокальной микроскопии, позволяющей оценить in vivo состояние роговицы на клеточном уровне после применения ФСЛ IntraLase FS 60 кГц для формирования роговичных дисков при СКП при кератоконусе.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить особенности конфокальной микроскопии роговицы после фемтосекундной СКП с помощью Fs-лазера «IntraLase Fs» 60 кГц при кератоконусе IV стадии.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

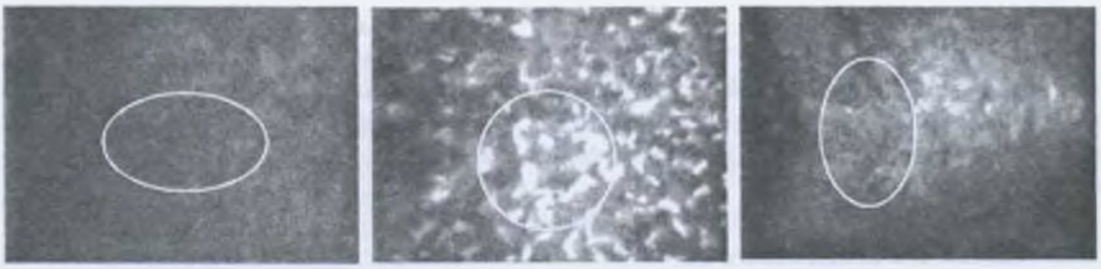
Клинико-функциональные результаты проанализированы на основе хирургического лечения 42 глаз 40 пациентов со средним возрастом 25 лет с кератоконусом IV степени (по Амслеру), которым была выполнена фемтосекундная СКП с помощью Fs-лазера «IntraLase Fs» с частотой повторения импульсов 60 кГц.

Операция фемтосекундной сквозной кератопластики с комбинированным роговичным профилем состояла из 3 этапов (патент на изобретение РФ № 2424786): 1 этапом выкраивали роговичный диск с комбинированным профилем на донорском глазу с использованием фемтосекундного лазера. Фемтосекундным лазером выполняли интрастромальные разрезы посредством трехэтапной резекции, при этом сначала выполняли задний боковой разрез роговицы от передней камеры в строму роговицы с углом цилиндрического бокового разреза относительно поверхности роговицы 110-115?, диаметром 6,3-7,5мм, с начальной глубиной 900-1200 мкм, конечной - 350-370 мкм; затем производили ламеллярный несквозной разрез в форме кольца параллельно передней поверхности роговицы наружным диаметром 7,8-9,1мм, внутренним 6,2-7,4 мм, на глубине 380- 400 мкм; с последующим передним боковым разрезом с начальной глубиной 410-430 мкм – от стромы кпереди до эпителиальной поверхности роговицы с углом цилиндрического бокового разреза относительно поверхности роговицы 90?, диаметром 7,7-9,0 мм. При этом разница между внутренним и наружным диаметрами трансплантата составляла не менее 1.5 мм, а вертикальный и ламеллярный разрезы частично перекрывали друг друга на 1 мм, для улучшения отделения трансплантата по краям среза. Энергия 2,2 мкДж., расстояние между импульсами 4 мкм, между уровнями 4 мкм. 2 этапом выкраивание роговичный диск с комбинированным профилем на глазу реципиента с использованием фемтосекундного лазера по тем же параметрам, лишь с изменением начальной глубины заднего бокового разреза (600-800 мкм) с учетом пахиметрических данных пациента. 3 этапом производили выделение трансплантата и фиксацию его в ложе реципиента [2].

Для исследования роговицы на клеточном и микроструктурном уровне in vivo проводилась конфокальная микроскопия с помощью прибора Confoscan -4 фирмы Nidek (Япония) с увеличением 500, позволяя исследовать зону размером 440?330 мкм с послойным пошаговым сканированием в 5 мкм. Исследование проводилось всем пациентам в различные сроки после операции в области рубца и в центральной зоне роговицы для оценки морфологических изменений трансплантата, с одновременным подсчетом плотности клеток заднего эпителия роговицы (ПЭК).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

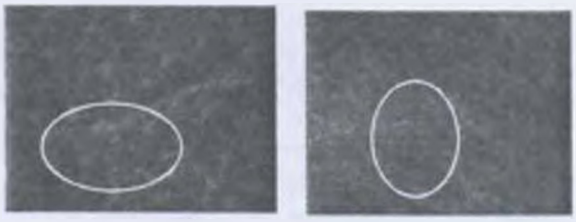
Учитывая ступенчатый разрез, при конфокальной микроскопии рубец визуализировался либо в задней, либо в передней строме роговицы. Полная эпителизация трансплантанта наступала на 2-3 день после операции. Толщина эпителиального слоя 43 мкм. Визуализировался полиморфизм базального эпителия с нечеткими границами клеток. В передней строме роговицы, ближе к боуменновой мембране определялось выраженное нарушение прозрачности, с отсутствием дифференцировки кератоцитов и большим количеством мелкоточечных гиперрефлексирующих включений, в нижележащих слоях передней стромы роговицы - гипорефлексирующие включения и активные кератоциты. В средней и задней строме роговицы встречались гипер – и гипорефлексирующие мелкоточечные и линейные включения, больше в средней строме. В задней строме роговицы - выраженные разнонаправленные складки. В единичных случаях просматривались обрывки гиперрефлексирующего стромального нерва трансплантата. В области рубца четко визуализировались ядра эндотелиальных клеток, наблюдалось более выраженное нарушение прозрачности стромы и складчатость в области рубца (рис.1).



а б в

Рис. 1. Конфокальная микроскопия роговицы через 3 дня после ФСКП:
а - полиморфизм базального эпителия с нечеткими границами клеток, б - выраженное нарушение прозрачности средней стромы с большим количеством активных кератоцитов и мелкоточечных гиперрефлексирующих включений, в - выраженное нарушение прозрачности стромы в области рубца

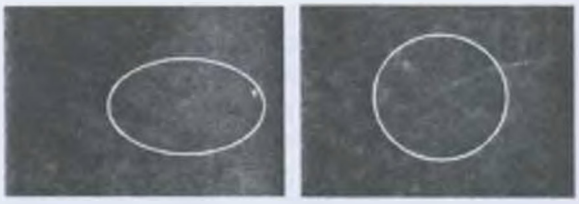
Через 1 месяц после операции толщина эпителиального слоя в среднем составляла 57 мкм, сохранялся полиморфизм базального эпителия с нечеткими границами клеток. У 38,3 % пациентов определялись эпителиальные дендритические клетки, увеличивалось содержание мелкоточечных включений и активных кератоцитов в передней строме роговицы, при этом уменьшалась выраженность отека. В 20,8% визуализировался утолщенный, с дихотомическим делением стромальный нерв. Складки в области рубца и в задней строме роговицы сохранялись практически во всех случаях (рис. 2).



а б

Рис. 2. Конфокальная микроскопия роговицы через 1 месяц после ФСКП:
а - стромальный утолщенный с дихотомическим делением нерв, б - складки в области рубца с нарушением прозрачности стромы

В течение 3-6 месяцев наблюдений после операции определялась повышенная адгезия и псевдокератинизация поверхностных эпителиальных клеток, границы базального эпителия становились более четкими, дендритические клетки отсутствовали. В передней строме роговицы количество активных кератоцитов и мелкоточечных включений уменьшилось на фоне незначительного нарушения прозрачности. Встречались тонкие гиперрефлексирующие стромальные нервы. В средней и задней строме роговицы кроме мелкоточечных, появлялись сгруппированные и гиперрефлексирующие линейные включения. Складки задней стромы роговицы и ядра в эндотелиальных клетках сохранялись. В зоне рубца просматривался участок, с плотно расположенными гипорефлексирующими кератоцитами, что свидетельствовало о формировании фиброза (рис. 3).



а б

Рис. 3. Конфокальная микроскопия роговицы через 3-6 месяца после ФСКП:
а - в зоне рубца увеличенный гипорефлексирующий участок, с плотно расположенными гипорефлексирующими кератоцитами вокруг и складками, б - стромальный нерв тонкий, гиперрефлексирующий

Через 6-12 месяцев после операции сохранялась повышенная адгезия и псевдокератинизация поверхностных эпителиальных клеток, четкость границ базального эпителия. В передней и средней строме роговицы плотность кератоцитов и рефлексия мелкоточечных включений уменьшалась. В средней и задней строме роговицы встречались единичные активные кератоциты. На фоне прозрачности уменьшалась выраженность разнонаправленных складок в задней строме роговицы. Встречались тонкие гиперрефлексирующие стромальные нервы, с дихотомическим делением. Появились гиперрефлексирующие единичные субэпителиальные

нервы. В области заднего и переднего боковых разрезов определялся выраженный фиброзированный рубец, с четкими границами, кроме зоны ламеллярного разреза, при этом прилежащая строма оставалась прозрачной, кератоциты четко дифференцировались (рис. 4).

а б

Рис. 4. Конфокальная микроскопия роговицы через 1 год после ФСКП:
а - ветви гиперрефлексирующих субэпителиальных нервов, б - в области рубца сформированный фиброз с четкими границами

В отдаленные сроки после операции через 1,5-2 года размеры эндотелиальных клеток были увеличены, границы четко очерчены, в клетках визуализировались 1-2 ядра, единичные из которых рефлексировали. В задней строме сохранялись разнонаправленные складки, встречались единичные линейные включения и активные кератоциты. В средней строме определялся тонкий, гипорефлексирующий стромальный нерв, встречались единичные линейные, гиперефлексирующие и гипорефлексирующие включения. Передняя строма - гипоцеллюлярна. Субэпителиальные нервы четко визуализировались, гипорефлексировали. В околорубцовой зоне определялась гипоцеллюлярность, сохранялись гипорефлексирующие мелкоточечные и линейные включения, складки - умеренно выражены. В средней строме, в интраламелярном пространстве возле рубца - гипоцеллюлярность, линейных включений больше, чем в задней строме роговицы. Субэпителиальные нервы ветвистые, гипорефлексирующие.

При анализе ПЭК в зоне послеоперационного рубца и в центре роговицы заметных различий не отмечалось. Коэффициент полимегатизма составлял в среднем 31,0±6,3, плеоморфизма - 47,44±10,0. Потеря эндотелиальных клеток через 1 месяц составляла 29,6%.

Проводя сравнительный анализ с литературными данными, мы обращали внимание на наличие активированных кератоцитов, числа дендритических клеток, сроки реиннервации, мелкоточечных и линейных включений в центре и на периферии [5,8,9,10].

Активация кератоцитов представляет собой перемещение клеток в зону регенерации и наблюдается в ранние сроки после операции. В нашем случае при использовании Fs-лазера «IntraLase Fs» с частотой повторения импульсов 60 кГц активные кератоциты встречаются в большом количестве в течение 1 месяца после операции, через 3-6 месяцев после операции – активность уменьшилась.

Дендритические клетки участвуют в клеточном иммунитете в условиях воспаления. При ранее проведенных исследованиях наблюдалась положительная корреляция между активностью кератоцитов и появлением дендритических клеток. В нашем случае появление дендритических клеток через 1 месяц после операции с увеличением активности кератоцитов свидетельствует об усилении иммунного ответа не в сторону отторжения, а в сторону повышении адаптации трансплантата, так как через 3-6 месяцев их не встречали.

Сроки реиннервации зависят от характеристик роговичного разреза (от глубины, диаметра, формы, профиля), а также от того, чем выполнен разрез - трепаном или лазером. При выполнении 3-этапного разреза с помощью лазера «IntraLase Fs» 60 кГц стромальные нервы появляется через 1 месяц после операции и сохраняется в течение всего срока наблюдения, субэпителиальные нервы появляются к году.

Природа и клиническая значимость мелкоточечных и линейных включений остается неизвестной. Предполагают, что они могут представлять собой дезорганизованный экстрацеллюларный матрикс, пластины коллагена или мигрировавшие кератоциты. Возможно, это разрушенные клетки кератоцитов без цитоплазмы и с фрагментированным ядром. Так, при проведении разреза с помощью лазера «IntraLase Fs» 60 кГц наступает в любом случае повреждение не только коллагена, но и кератоцитов, о чем свидетельствует наличие мелкоточечных включений различной интенсивности в любом отделе стромы, как в раннем, так и в позднем послеоперационном периодах, кроме того, количество и плотность кератоцитов после операции уменьшается. Интерес представляют собой и сгруппированные гиперефлексирующие линейные включения в задней и средней строме через 3-6 месяцев после операции, интенсивность

которых уменьшается к году. Их природа пока тоже остается загадкой.

В исследованиях А.Н. Каримовой после стандартной сквозной кератопластики с помощью конфокальной микроскопии было выявлено два варианта рубцевания: 1-й вариант – с выраженной фибропластической реакций, без расхождения рубца; 2-й вариант – с отсутствием или с единичными элементами фиброзной ткани, с локальным расхождением краев рубца в глубоких слоях стромы роговицы [1]. Наши исследования показали завершенный 1-ый тип рубцевания во всех случаях, с непосредственно прилежащей неповрежденной стромой роговицы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При конфокальной микроскопии после фемтолазерной СКП с помощью Fs-лазера «IntraLase Fs» 60 кГц при кератоконусе IV стадии наблюдалась реиннервация трансплантата на более ранних сроках (1 месяц), что свидетельствует об ускоренном заживлении послеоперационной раны. В 100% случаях определялся четкий рубец с выраженной фибропластической реакцией, активацией волокон коллагена, что подтверждает усиленное фиброзирование после воздействия фемтосекундного лазера. Отсутствие повреждающего воздействия Fs - лазера подтверждает отсутствие ацеллюлярных зон в околорубцовой зоне. Отсутствие дендритических клеток в отдаленном послеоперационном периоде свидетельствует об отсутствии воспаления и риска развития отторжения трансплантата. На фоне прозрачности стромы роговицы уменьшалась выраженность разнонаправленных складок в задней строме роговицы к 6-12 месяцам после операции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каримова, А. Н. Оптимизация кераторефракционных лазерных методов лечения пациентов с индуцированной аметропией после сквозной кератопластики: дис. канд. мед. наук / А. Н. Каримова. – М., 2012. – С.71-79.

2. Лебедь, Л.В. Фемтосекундная сквозная кератопластика при кератоконусе / Л.В. Лебедь, Н.П. Паштаев // Офтальмохирургия. – 2012. – № 1. – С. 62-68.

3. Слонимский, Ю. Б. Место сквозной субтотальной трансплантации роговицы в хирургии кератоконуса на современном этапе / Ю. Б. Слонимский, А. Ю. Слонимский // Федоровские чтения – 2004. Новые технологии в лечении заболеваний роговицы: материалы науч.-практ. конф. – М., 2004. – С. 339-344.

4. Balestrazzi, E. Femtosecond laser enhances safety and efficacy of keratoplasty procedures / E. Balestrazzi, L. Mosca // EuroTimes. – 2009. – № 7/8. – P. 18.

5. Hollingsworth, J. G. Correlation of the appearance of the keratoconic cornea in vivo by confocal microscopy and in vitro by light microscopy / J. G. Hollingsworth, R. E. Bonshek, N. Efron // Cornea. – 2005. – Vol. 24, № 4. – P. 397-405.

6. Imre, L. In vivo confocal corneal microscopy after keratoplasty / L. Imre, M. Rech, A. Nagymihaly // Ophthalmologe. – 2005. – Vol. 102, № 2. – P. 140-146.

7. Rabinowitz, Y. S. Keratoconus / Y. S. Rabinowitz // Surv. Ophthalmol. – 1998. – Vol. 42, № 4. – P. 297. – 319.

8. Roni, M. S. In vivo Confocal Microscopic Evaluation of Corneal Wound Healihg after Femtosecond laser-Assisted Keratoplasty / M. S. Roni, H.K. Kurt et al. // Ophthalmic Surg. Lasers Imaging. – 2012. – Vol. 43, № 3. – P. 205-213.

9. Shtein, R. In vivo confocal microscopic evaluation of corneal wound healing after femtosecond laser-assisted keratoplasty / R. Shtein et al. // Ophthalmic surg. lasers imaging. – 2012. – P. 205-213.

10. Terry, M.A. Peripheral endothelial cell damage after trephination of donor tissue / M.A. Terry // Cornea. – 2009. – Vol. 28, № 10. – P.1149-1152.