

На правах рукописи

Саркисова Кристина Гургеновна

**КОМБИНИРОВАННЫЙ КРОССЛИНКИНГ РОГОВИЧНОГО
КОЛЛАГЕНА ПРИ ПРОГРЕССИРУЮЩЕМ КЕРАТОКОНУСЕ**

3.1.5. – Офтальмология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Бубнова Ирина Алексеевна

Официальные оппоненты:

1. **Слонимский Юрий Борисович**, доктор медицинских наук, доцент, ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, профессор кафедры офтальмологии;

2. **Труфанов Сергей Владимирович**, доктор медицинских наук, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, профессор кафедры офтальмологии с клиникой.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ.

Защита состоится 20 ноября 2023 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.174.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова» по адресу: 119021, Москва, ул. Россолимо, д. 11, корпус А, Б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.niigb.ru Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова».

Автореферат диссертации разослан «_____» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

М.Н. Иванов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Кератоконус (КК) – это хроническое, невоспалительное, чаще двустороннее заболевание роговицы, сопровождающееся ее конусовидным «выпячиванием» в центральной зоне и истончением в проекции верхушки (чаще в нижней половине или нижне-назальном квадранте роговицы). Как правило, кератэктазия возникает у людей молодого возраста, что делает болезнь социально значимой. Важной особенностью является неуклонное прогрессирование заболевания, приводящее к изменениям структуры роговицы, которые не всегда заметны и ощутимы на начальных стадиях, но приводят к выраженному снижению максимально скорректированной остроты зрения на более развитых стадиях. В связи с чем современный подход к лечению кератоконуса предполагает его раннее выявление и проведение процедуры кросслинкинга роговичного коллагена, которая позволяет остановить или существенно замедлить развитие кератэктазии.

Кросслинкинг роговичного коллагена (КРК) – это метод лечения кератоконуса, впервые предложенный группой ученых из Германии и Швейцарии в 2003 году, суть которого заключается в комбинации УФ-облучения и рибофлавина, который являясь индуктором активных форм кислорода приводит к формированию новых связей в структуре коллагена. Тогда был разработан стандартный, так называемый Дрезденский, протокол, который предполагает удаление эпителиального слоя в зоне диаметром 8–9 мм, последующее за ним пропитывание роговицы рибофлавином и облучение ультрафиолетом А-спектра с длиной волны 370 нм интенсивностью излучения $3,0 \text{ мВт/см}^2$ в течение 30 минут (G. Wollensak et al., 2003; G. Wollensak et al., 2004).

В настоящее время эффективность стандартной процедуры кросслинкинга роговичного коллагена уже многократно была доказана, но вместе с тем, появились сообщения, что данное вмешательство может приводить к появлению выраженной боли и дискомфорта, временному снижению зрения, стромальным помутнениям роговицы, риску развития

инфекционных осложнений, возникающих вследствие удаления эпителия (S. Dhawan et al., 2011; C.B. Evangelista et al., 2018; R. Agarwal et al., 2022). Чтобы избежать такого рода побочных эффектов и осложнений в 2010 г. был предложен метод КРК без удаления эпителия, который был назван трансэпителиальным кросслинкингом роговичного коллагена (тКРК) (B.S.V. Wachler et al., 2010).

В ходе дальнейших исследований касательно оценки эффективности тКРК в аспекте остановки или замедления прогрессирования кератоконуса, были получены весьма противоречивые результаты (Z. Shalchi et al., 2014; S. Nath et al., 2019; S. Nath et al. 2021). По мнению разных авторов, одним из ключевых моментов для успешности процедуры КРК является насыщение роговицы рибофлавином, который выполняет функцию фотосенсибилизатора и защищает подлежащие структуры от облучения, поскольку значительно увеличивает коэффициент абсорбции роговицей УФ-излучения. Рибофлавин легко проникает в роговицу после дезэпителизации, при этом его гидрофильные и макромолекулярные свойства лимитируют проникновение через эпителий. В связи с чем, для повышения эффективности трансэпителиального КРК было предложено изменить либо химический состав раствора рибофлавина, либо изменить проницаемость самого эпителия посредством закапывания бензалкония хлорида, консерванта, который входит в состав многих глазных капель, в том числе и анестетика, применяемого при проведении процедуры КРК (C. Koppen et al. 2012; F. Raiskup et al. 2012).

Компромиссным решением может быть частичное удаление эпителия во время проведения процедуры КРК при так называемом локальном (персонализированный) кросслинкинге, предложенном профессором Анисимовым С.И., который предполагает частичное облучение роговицы только в пределах зоны дезэпителизации, тогда как остальная часть остается интактной (С.И. Анисимов и соавт., 2011).

Вместе с тем, не менее интересным представляется другой подход, при котором происходит комбинация стандартного и трансэпителиального протоколов кросслинкинга роговичного коллагена, что обеспечивает оптимальное сочетание преимуществ каждого из протоколов и уменьшение их недостатков.

Цель работы: оценка эффективности и структурно-функционального состояния роговицы в результате проведения комбинированного метода кросслинкинга роговичного коллагена на основе стандартного и трансэпителиального протоколов при прогрессирующем кератоконусе.

Задачи исследования:

1. Разработать комбинированный метод кросслинкинга роговичного коллагена с применением стандартного и трансэпителиального протоколов и оценить клиническую эффективность нового метода при прогрессирующем кератоконусе.

2. Изучить состояние прероговичной слезной пленки и слезопродукции в послеоперационном периоде при проведении комбинированного протокола кросслинкинга роговичного коллагена при прогрессирующем кератоконусе.

3. Усовершенствовать способ объективной количественной оценки толщины липидного слоя прероговичной слезной пленки на основе тиаскопии, с помощью которого исследовать состояние липидного слоя прероговичной слезной пленки в послеоперационном периоде у пациентов с прогрессирующим кератоконусом при применении комбинированного протокола кросслинкинга роговичного коллагена.

4. Исследовать с помощью оптической когерентной томографии особенности топографии демаркационной линии в послеоперационном периоде у пациентов с прогрессирующим кератоконусом при применении комбинированного протокола кросслинкинга роговичного коллагена.

5. Оценить при помощи конфокальной лазерной микроскопии состояние и процесс регенерации эпителия и нервных волокон суббазального сплетения роговицы в послеоперационном периоде при проведении комбинированного протокола кросслинкинга роговичного коллагена при прогрессирующем кератоконусе.

6. Составить практические рекомендации по применению апробированного метода в клинической практике.

Научная новизна исследования

Разработана и клинически апробирована принципиально новая методика проведения КРК при прогрессирующем КК.

Доказана эффективность и безопасность нового комбинированного протокола КРК при прогрессирующем КК в течение одного года после проведенной операции: установлено отсутствие отрицательной динамики (прогрессирования протрузии) по данным кератотопотографии и подтверждена стабилизация зрительных функций по данным визометрии.

Проведен комплексный анализ влияния КРК, выполненного по новому комбинированному методу, на состояние прероговичной слезной пленки и уровень слезопродукции в послеоперационном периоде.

Проведено комплексное изучение влияния КРК, выполненного по новому комбинированному протоколу, на морфологическое состояние роговицы по данным лазерной конфокальной сканирующей микроскопии роговицы и оптической когерентной томографии переднего отдела глазного яблока.

Сформулированы практические рекомендации по применению апробированного метода КРК при лечении пациентов с прогрессирующим КК.

Усовершенствована методика тиаскопии, позволяющая объективно количественно оценивать толщину липидного слоя прероговичной слезной пленки.

Теоретическая ценность и практическая значимость работы

Полученные в результате диссертационного исследования данные подтверждают клиническую безопасность и эффективность нового комбинированного протокола КРК, что выражается в стабилизации патологического процесса и отсутствии осложнений в течение всего периода послеоперационного наблюдения. Разработанная методика КРК сочетает преимущества стандартного и трансэпителиального протоколов, что позволяет уменьшить сроки послеоперационной реабилитации пациентов, снизить риски побочных эффектов и осложнений хирургического вмешательства. Комплексное изучение состояния прероговичной слезной пленки, эпителия, нервных волокон и стромы роговицы в послеоперационном периоде позволили раскрыть особенности комбинированного протокола КРК и дать объективную характеристику его влиянию на морфофункциональное состояние переднего

отдела глаза (глазной поверхности). Новая методика КРК успешно применяется в клинической работе ФГБНУ «НИИГБ им. М.М. Краснова».

Методология и методы исследования

Методологической основой диссертационного исследования положен комплекс методов научного познания. Диссертационная работы выполнена в соответствии с принципами проведения научного исследования, с точным соблюдением его схемы и этапов. Сочетание качественных и количественных методик клинических методов обследования позволили достичь поставленной цели и решить обозначенные в работе задачи. Объективность исследования обеспечена применением современных компьютерных программ и статистических методов информационной обработки данных. Диссертационная работа выполнена в дизайне клинического проспективного исследования, с использованием комплекса клинических, инструментальных, аналитических и статистических методов.

Основные положения, выносимые на защиту

Новый комбинированный метод КРК с применением стандартного и трансэпителиального протоколов может быть успешно применен при прогрессирующем КК с целью стабилизации патологического процесса (с целью остановки прогрессирования КК).

Состояние прероговичной слезной пленки и уровень слезопродукции в послеоперационном периоде стабилизируются и возвращается к предоперационным показателям к третьему месяцу после проведения КРК по новому комбинированному протоколу.

Характер топографии демаркационной линии соответствует глубине проникновения рибофлавина и прохождения фотохимической реакции кросслинкинга коллагена. Профиль демаркационной линии свидетельствует о стандартной глубине воздействия УФ-облучения в дезэпителизированной зоне (области вершины конуса) и о более поверхностном трансэпителиальном воздействии в периферийной зоне (к периферии от вершины конуса).

Восстановление стромы роговицы в послеоперационном периоде с исчезновением хейза, лакунарного отека и демаркационной линии происходит

к шестому месяцу после перенесенного КРК по новому комбинированному протоколу.

Восстановление нервных волокон роговицы с возвращением коэффициентов анизотропии и симметричности направленности к предоперационным значениям происходит к году после проведения КРК по новой комбинированной методике.

Усовершенствованная методика тиаскопии позволяет количественно определять толщину липидного слоя прероговической слезной пленки.

В клинической практике новый метод комбинированного КРК может быть рекомендован пациентам на начальных стадиях КК, когда зона эктазии не превышает 4–5 мм.

Степень достоверности и апробация результатов работы

Достоверность проведенного исследования и полученных результатов определена достаточным и репрезентативным объемом материала. В работе использовано современное сертифицированное офтальмологическое и аналитическое оборудование, условия всех исследований стандартизированы. Анализ материала и статистическая обработка полученных результатов выполнены в соответствии с современными стандартами и с применением современных методов сбора, объективной обработки и анализа научных данных.

Основные положения и материалы диссертации доложены на:

Научно-практической конференции аспирантов и молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы офтальмологии», Москва, 12 мая 2020 г.;

Научно-практической конференции аспирантов и молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы офтальмологии», Москва, 27 мая 2021 г.;

XI Научно-практическая конференция «Офтальмологические образовательные университеты», Москва, 20 октября 2021 г.;

Научно-практической конференции аспирантов и молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы офтальмологии», Москва, 25 ноября 2021 г.;

Заседании проблемной комиссии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт глазных болезней» (ФГБНУ «НИИГБ им. М.М. Краснова») – 27.06.2022 г.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в подготовке и проведении всех исследований, обработке полученных данных, анализе и интерпретации результатов, апробации результатов работы, подготовке публикаций и докладов по теме диссертационного исследования.

Внедрение результатов работы в практику

Полученные в ходе настоящего исследования результаты комбинированного метода КРК позволили включить новую методику в клиническую практику ФГБНУ «НИИГБ им. М.М. Краснова» при лечении пациентов с прогрессирующим КК. Разработанная методика оценки толщины липидного слоя прероговичной слезной пленки применяется в научно-практической работе ФГБНУ «НИИГБ им. М.М. Краснова».

Публикации по теме исследования

По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, из которых 5 – в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК. Получен патент РФ на изобретение № 2778968

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 139 страницах машинописного текста. Диссертация состоит из введения, главы обзора литературы, главы о материале и методах исследования, главы о результатах исследования и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 5 таблицами и 33 рисунками. Библиографический указатель включает 271 источник (104 – русскоязычных и 167 – иностранных).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы

Работа выполнена на базе ФГБНУ «НИИГБ им. М.М. Краснова» с использованием инструментально-технического оснащения института. Все клинические исследования были проведены в период с 2019 по 2022 гг.

В качестве *клинического материала* в настоящее исследование были включены 30 глаз (30 пациентов) с прогрессирующим КК I–III стадии в возрасте от 18 до 39 лет (в среднем $29,7 \pm 6,0$ года): 76,7% (23 глаза) – мужчин, и 23,3% (7 глаз) женщин. Критерии включения пациентов в исследование: прогрессирующий КК I–III стадии, минимальная толщина роговицы более 400 мкм, локальный характер эктазии (до 4–5 мм). Критерии исключения: противопоказания к проведению КРК (непереносимость рибофлавина, минимальная толщина роговицы менее 400 мкм, возраст менее 15 лет, низкая острота зрения с максимальной коррекцией, наличие рубцов роговицы, аллергический конъюнктивит); сопутствующие заболевания глазной поверхности; травмы глаза или офтальмологические операции в анамнезе; инстилляции лекарственных препаратов; ношение контактных линз; сопутствующие общесоматические заболевания, заболевания системного характера и применение лекарственных средств, которые имеют возможное влияние на результаты настоящего исследования.

Пациентам проводили опрос со сбором анамнеза и жалоб, и *стандартное офтальмологическое обследование*, которое включало визометрию с определением некорригированной и максимально корригированной остроты зрения (НКОЗ и МКОЗ), авторефрактокератометрию, кинетическую периметрию, биомикроскопию, обратную офтальмоскопию. *Специальные офтальмологические методы* диагностики включали компьютерную кератотопотографию, оптическую когерентную томографию (ОКТ) переднего отдела глазного яблока, конфокальную лазерную сканирующую микроскопию роговицы (КМР), функциональные «слезные» пробы (тесты Норна, Ширмера и Джонеса), лакримальную ОКТ-

менискометрию и интерференционную тископию по усовершенствованной методике.

Всем пациентам была выполнена операция **КРК по новой комбинированной методике (кКРК)** – *Рис. 1*. Первым этапом после инстилляции местноанестезирующих капель раствора Проксиметакаина 0,5% («Алкаин», Alcon) механически дезэпителизировали роговицу в пределах 4–5 мм в области вершины кератэктазии в зависимости от ее расположения для обеспечения более щадящего воздействия на роговицу. Вторым этапом строму роговицы активно насыщали фотосенсибилизатором – раствором Рибофлавина 0,1% (витамин В2) с раствором Декстрана 20% (протектор роговицы для кросслинкинга «Декстралинк», ГУ «Уфимский НИИГБ») путем инстилляций с двухминутным интервалом в течение 30 минут. На третьем этапе ультрафиолетовым светом облучали зону роговицы диаметром 9 мм по стандартным параметрам в течение последующих 30 минут, продолжая инстилляции раствора фотосенсибилизатора с двухминутным интервалом; в качестве источника УФО использовали «UV-X 1000» («IROC», Швейцария), излучающие УФ-диоды («LED») которого создают ультрафиолет спектра А (UV-A) с длиной волны 365 нм и мощностью 3,0 мВт/см² с общей дозой облучения 5,4 Дж/см²).

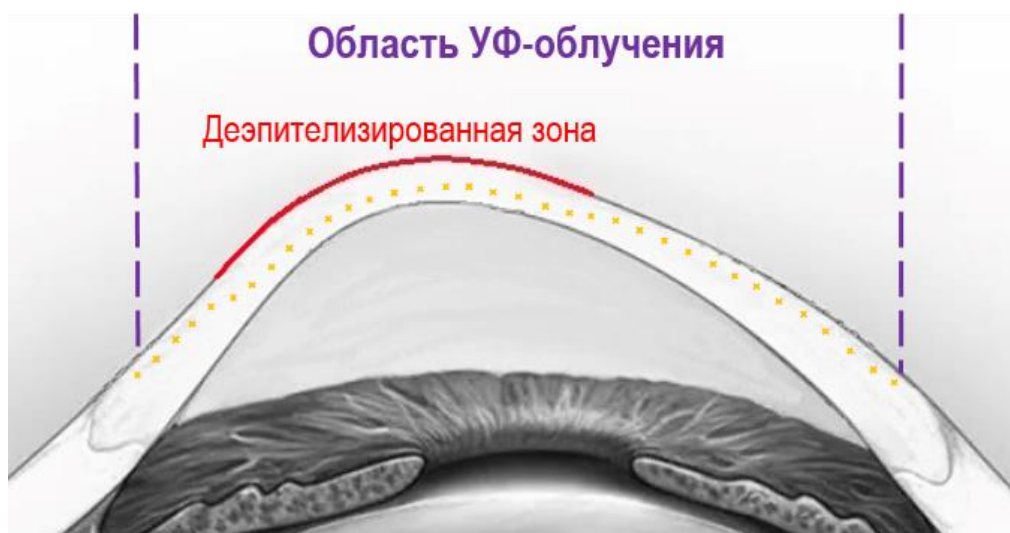


Рисунок 1. Схематическое пояснение методики кКРК

Желтым пунктиром условно обозначена глубина фотохимического воздействия (демаркационная линия).

При этом на протяжении всей процедуры (30 минут до облучения и 30 минут УФ-воздействия) каждые 5 минут продолжали инстилляции анестетика,

содержащего Бензалкония хлорид в качестве вспомогательного вещества, с целью облегчения проникновения фотосенсибилизатора в строму роговицы в зоне с сохранным эпителием. Операцию завершали инстилляцией раствора Хлорамфеникола 0,25% («Левомецетин», Лекко) и наложением бандажной мягкой контактной линзы. В послеоперационном периоде назначали инстилляцию раствора Хлорамфеникола 0,25% («Левомецетин», Лекко) 4 р/сут 7 сут. Линзу удаляли после завершения эпителизации роговицы (в течение 2–5 дней); далее назначали глазной гель с Декспантенолом 5% («Корнерегель», Vausch&Lomb) 2 р/сут 7 сут и инстилляцию раствора Дексаметазона 0,1% («Офтан Дексаметазон», Santen) 4 р/сут 7 сут с последующей постепенной отменой в течение одной недели.

Период послеоперационного наблюдения составил один год: плановые осмотры проводили спустя одну неделю, через один, три, шесть и двенадцать месяцев после проведения кКРК.

При информационной обработке набранного материала были использованы современные методы накопления и оценки данных с использованием программного обеспечения MS Office Excel 2019 и IBM SPSS Statistics Version 26. Характер распределения полученных значений в выборке оценивали по критерию Колмогорова-Смирнова: нулевую гипотезу о том, что исследуемая совокупность распределена согласно закону нормального распределения Гаусса, принимали при уровне значимости $p > 0,05$; а полученные данные в итоге представляли как среднее значение со стандартным отклонением ($M \pm \sigma$). Первым этапом анализ значимости различий в средних значениях на разных сроках наблюдения проводили методом дисперсионного анализа (ANOVA) для связанных выборок: при уровне значимости $p > 0,05$ принимали, что динамика изучаемого показателя статистически не значима. Для подтверждения достоверности отличий применяли парные сравнения – t -критерий парных (зависимых, связанных) выборок Стьюдента: нулевую гипотезу об отсутствии различий между подвыборками принимали при уровне значимости $p > 0,05$.

Результаты собственных исследований и их обсуждение

По данным *визометрии* предоперационно НКОЗ составила $0,35 \pm 0,26$, через год после операции – $0,41 \pm 0,37$ ($p=0,287$). Предоперационно МКОЗ составила $0,65 \pm 0,23$, через год после операции – $0,74 \pm 0,25$ ($p=0,072$). Статистически достоверных отличий по остроте зрения выявлено не было, что свидетельствует об отсутствии отрицательной динамики; улучшение зрительных функций может носить субъективный характер.

Биомикроскопически при осмотрах в послеоперационном периоде наблюдали реэпителизацию роговицы в пределах операционной зоны в течение двух–пяти дней после операции. Послеоперационное помутнение роговицы (транзиторная отечность и псевдохейз в передних и средних слоях стромы) визуализировалось в течение нескольких месяцев после кКРК, полное разрешение видимых проявлений фотохимической реакции наблюдали к шести месяцам после вмешательства.

Результаты *компьютерной кератотопотомографии* («Pentacam», Oculus) представлены в Табл. 1.

Таблица 1. Результаты кКРК по данным кератотопотомографии

Показатель кератотопотомографии «Pentacam»	Предоперационно	Послеоперационно				
		1 неделя	1 месяц	3 месяца	6 месяцев	12 месяцев
Преломляющая сила роговицы в слабом меридиане «К1», дптр	$46,3 \pm 4,7$	$46,6 \pm 4,7$	$46,4 \pm 4,5$	$46,0 \pm 4,2$	$46,3 \pm 4,4$	$45,8 \pm 4,7$
Преломляющая сила роговицы в сильном меридиане «К2», дптр	$50,0 \pm 5,0$ *	$50,4 \pm 5,2$	$50,1 \pm 5,3$	$49,7 \pm 4,5$	$49,7 \pm 4,7$	$48,9 \pm 5,1$ *
Средняя преломляющая сила роговицы «Кт», дптр	$48,1 \pm 4,7$ *	$48,4 \pm 4,9$	$48,2 \pm 4,7$	$47,8 \pm 4,2$	$48,0 \pm 4,4$	$47,3 \pm 4,7$ *
Роговичный астигматизм «Astig», дптр	$3,65 \pm 2,23$ *	$3,74 \pm 2,03$	$3,85 \pm 2,27$	$3,72 \pm 2,07$	$3,49 \pm 2,17$	$3,13 \pm 2,21$ *
Максимальная преломляющая сила роговицы «Ктах», дптр	$58,1 \pm 7,3$ *	$56,0 \pm 6,8$	$57,7 \pm 6,4$	$56,9 \pm 6,3$	$56,1 \pm 5,6$	$55,4 \pm 6,5$ *
Минимальная толщина роговицы «Тн» (пахиметрия), мкм	$451,7 \pm 28,8$ *	$453,9 \pm 32,4$	$446,6 \pm 28,0$	$450,6 \pm 29,9$	$450,6 \pm 29,9$	$441,1 \pm 26,7$ *

Прим.: * – $p < 0,05$

По итогам двенадцатимесячного периода послеоперационного наблюдения случаев прогрессирования КК не было; было установлено достоверное снижение преломляющей силы и минимальной толщины роговицы, что связано с ее морфологическими изменениями (уплотнение стромы) в области эктазии.

ОКТ роговицы («Visante», Carl Zeiss) позволяла визуализировать формирование стромальной демаркационной линии (отграничивает области фотохимического кросслинкинга коллагена от подлежащих интактных тканей) через месяц после проведения кКРК. Глубина залегания демаркационной линии в области вершины конуса (деэпителизованная зона) составляла 263 ± 39 мкм. Периферичнее зоны протрузии (область с сохранным эпителием, не подвергшаяся деэпителизации при кКРК), демаркационная линия располагалась на глубине 147 ± 23 мкм. Демаркационная линия визуализировалась в проекции деэпителизованной зоны отчетливо и ярко, а по направлению к периферии выглядела тонкой и прерывистой – *Рис. 2*. Спустя три месяца после кКРК, демаркационная линия становилась менее видимой и более прерывистой в центре и подвергалась резорбции на периферии; к шести месяцам после операции демаркационная линия не визуализировалась.

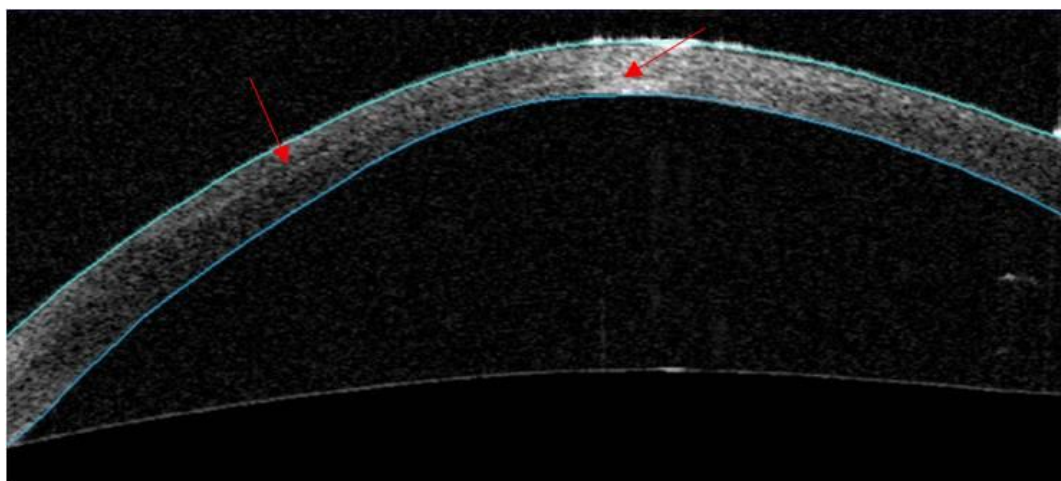


Рисунок 2. Демаркационная линия, визуализируемая при помощи оптической когерентной томографии роговицы, через один месяц после кКРК

КМР («HRT III», Heidelberg Engineering) с использованием специальной роговичной насадки (модуль) «Rostock» на седьмой день после операции позволила визуализировать эпителиопатию в виде незначительного полиморфизма и полимегатизма эпителиоцитов.

На седьмой день после кКРК на конфокальных снимках наблюдали выраженный стромальный отек роговицы. Спустя один месяц после операции, отмечали снижение плотности и апоптоз кератоцитов, нечеткие и разрозненные границы ядер кератоцитов, лакунарный («сотовидный») отек передней и средней стромы в форме «пчелиных сот» (соответствует псевдохейзу на биомикроскопии) – на глубине до 269 ± 44 мкм (соответствует демаркационной линии по данным ОКТ). К третьему месяцу наблюдения начинался процесс репопуляции кератоцитов, начинали разрешаться явления лакунарного отека стромы. На сроке в шесть месяцев происходило почти полное восстановление плотности кератоцитов, разрешение лакунарного отека. Восстановление плотности кератоцитов до предоперационного уровня и полный регресс всех признаков лакунарного отека наблюдали в период от шести до двенадцати месяцев; в течение этого периода времени в строме нарастала так называемая «складчатость», что обусловлено эффектом стягивания и уплотнения (компактизация) коллагеновых волокон и межклеточного вещества стромы роговицы.

По данным конфокальных снимков на седьмой день после операции нервные волокна роговицы (НВР) становились «четкообразными» и изогнутыми. В первые один–три месяца после проведения кКРК наблюдали выраженное нарушение хода и структуры НВР, множественные участки поврежденных нервов (фотохимическая травма и гибель нервных волокон). На сроке в три месяца было значительно снижено количество основных нервных стволов и их ветвей, их длина и плотность, отмечали наличие единичных невром. Постепенное восстановление длины, плотности и извитости НВР происходило, начиная с шести месяцев после кКРК и вплоть до двенадцати месяцев послеоперационного наблюдения, отмечали наличие множественных невром. Восстановление нервных волокон до предоперационного состояния происходило к году после перенесенного кросслинкинга.

По данным КМР оригинальное ПО «Liner 1.2S» (ФГБНУ «НИИГБ», Патент RU2014142571) рассчитывает коэффициенты состояния НВР: коэффициент анизотропии *Kaniz* (KAL) и коэффициент симметричности

направленности K_{sym} . K_{aniz} , по сути, характеризует степень однонаправленности хода НВР (величина обратно пропорциональная извитости и ветвистости). K_{sym} , по сути, отражает степень разновекторности направленности хода НВР (величина прямо пропорциональная извитости и ветвистости). Для нейропатии характерна патологическая чрезмерная извитость НВР. Дисперсионный анализ показал отсутствие статистически значимых изменений этих коэффициентов в течение периода послеоперационного наблюдения. Результаты представлена в Табл. 2. При этом в первые месяцы после кКРК K_{aniz} транзиторно снижается, а K_{sym} транзиторно повышается, что может свидетельствовать об увеличении извитости и степени ветвлений НВР в связи с фотохимической травмой. К году послеоперационного наблюдения происходит восстановление коэффициентов к предоперационным значениям, что говорит о восстановлении структуры НВР с уменьшением их чрезмерной извитости.

Таблица 2. Динамика коэффициентов, отражающих состояния нервных волокон роговицы, после кКРК по данным конфокальной лазерной сканирующей микроскопии

Коэффициент	Предоперационно	Послеоперационно				
		1 неделя	1 месяц	3 месяца	6 месяцев	12 месяцев
K_{aniz}	$3,340 \pm 1,298$	$2,780 \pm 0,745$	$2,587 \pm 0,593$	$3,056 \pm 1,189$	$3,353 \pm 1,180$	$3,457 \pm 1,092$
K_{sym}	$0,895 \pm 0,063$	$0,913 \pm 0,042$	$0,919 \pm 0,054$	$0,896 \pm 0,072$	$0,900 \pm 0,064$	$0,896 \pm 0,063$

Функциональные «слезные» тесты – пробы Норна, Ширмера (Ширмер–I) и Джонеса – выполняли по стандартным методикам. Результаты пробы Норна возвращались к предоперационным значениям через три месяца после кКРК, теста Ширмера – через месяц после операции, дисперсионный анализ показал отсутствие статистически значимых изменений пробы Джонеса. Результаты функциональных «слезных» тестов представлены в Табл. 3.

Лакримальную ОКТ-менискометрию («Visante», Carl Zeiss) проводили с целью измерения условных высоты (отрезок между точкой соприкосновения слезной жидкости с роговицей и точкой соприкосновения слезной жидкости с краем века) и глубины (отрезок между точкой соприкосновения роговицы с крем века и точкой посередине интерфейса «слеза–воздух») нижнего и верхнего слезных менисков, и расчета коэффициента слезного мениска

(соотношение условных высоты и глубины). Результаты биометрии нижнего слезного мениска восстанавливались до предоперационных значений к трем месяцам после кКРК. По результатам дисперсионного анализа статистически значимой динамики со стороны верхних слезных менисков не выявлено. Результаты биометрии слезных менисков представлены в Табл. 3.

Интерференционную тиаскопию по усовершенствованной методике проводили на приборе «Тиаскоп параболический» (ФГБНУ «НИИГБ», Патент RU121434U1) с помощью компьютерной программы «Lacrima» (ФГБНУ «НИИГБ», регистрационный номер 2010613451). По результатам компьютерного анализа оригинальное ПО позволяет рассчитывать коэффициент распределения липидов (КРЛ) и интегральную толщину липидного слоя (ИТЛС), как наиболее объективные критерии состояния липидного слоя прероговичной слезной пленки – Рис. 3 и 4.

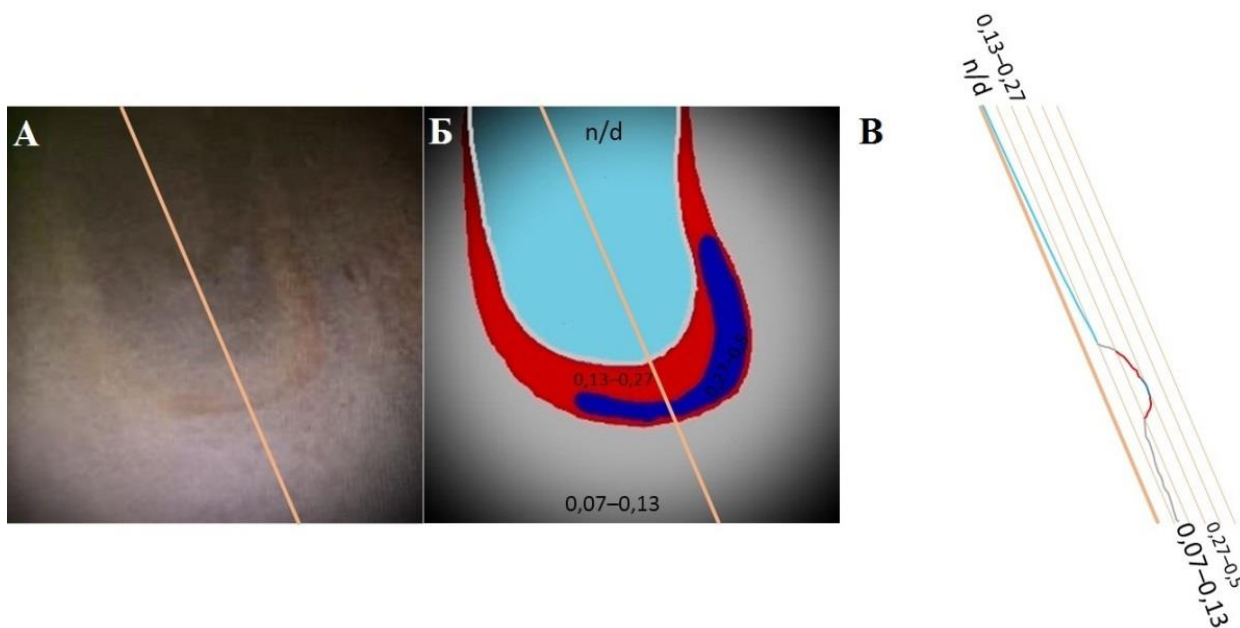


Рисунок 3. Графическое пояснение к методике интерференционной тиаскопии
 А – Тиаскопическая картина липидного слоя прероговичной слезной пленки;
 Б – Графическая интерпретация тиаскопической картины в соответствии с цветовой шкалой, отражающей толщину липидного слоя (в нм);
 В – Схематическое изображение профиля липидного слоя с различной его толщиной (в нм) в соответствии с цветовой шкалой.

КРЛ отражает степень равномерности распределения липидов по поверхности водного слоя. ИТЛС представляет собой усредненную толщину слоя липидов (в нм). К предоперационным значениям эти параметры возвращались через три месяца после кКРК. Результаты тиаскопии представлены в *Табл. 3*.

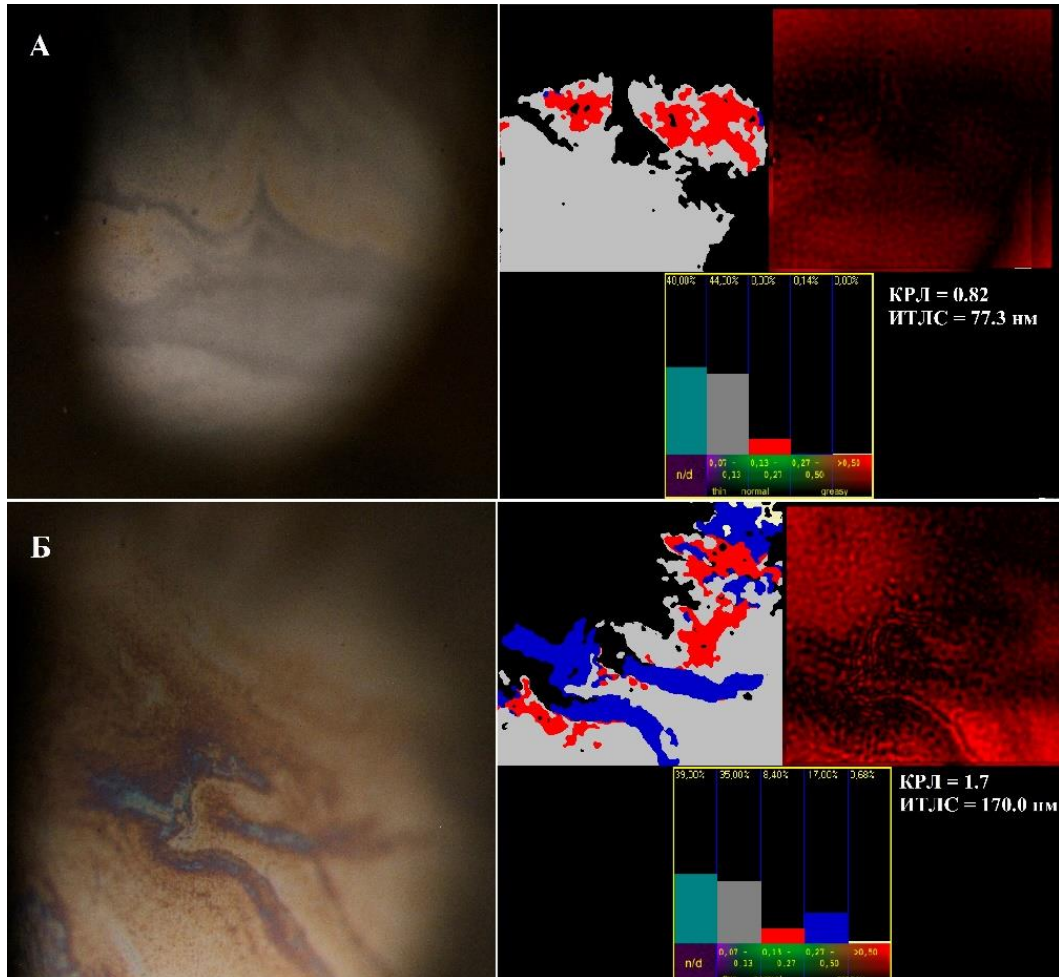


Рисунок 4. Алгоритм применения оригинальной методики интерференционной тиаскопии (слева – тиаскопическая картина,

справа – графическая интерпретация с результатами компьютерного расчета КРЛ и ИТЛС)

А – Пациент с синдромом «сухого глаза» до лечения;

Б – Тот же пациент после курса слезозаместительной терапии

(увеличение КРЛ и ИТЛС свидетельствует об увеличении толщины липидного слоя прероговичной слезной пленки и о повышении равномерности распределения липидов).

Таблица 3. Влияние кКРК на состояние прероговичной слезной пленки и уровень слезопродукции

Показатель состояния прероговичной слезной пленки или уровня слезопродукции	Предоперационно	Послеоперационно		
		1 неделя	1 месяц	3 месяца
Функциональные «слезные» тесты				
Проба Норна, сек	8,2±5,1 *	5,8±3,4	6,6±3,8	8,1±4,4*
Проба Ширмера, мм	18,7±9,9 *	23,8±8,7	19,3±9,1*	19,6±9,4*
Проба Джонеса, мм	14,1±8,9	14,8±7,1	15,1±5,8	14,6±7,2
Лакримальная ОКТ-менискометрия				
Высота нижнего мениска, мкм	254±57 *	320±80	319±236	267±78 *
Глубина нижнего мениска, мкм	198±47 *	231±59	249±113	208±46 *
Коэффициент нижнего мениска	1,31±0,30 *	1,40±0,25	1,24±0,23	1,29±0,22 *
Высота верхнего мениска, мкм	220±35	222±38	220±30	218±39
Глубина верхнего мениска, мкм	197±41	197±44	196±46	196±52
Коэффициент верхнего мениска	1,17±0,29	1,16±0,27	1,16±0,25	1,17±0,32
Интерференционная тиаскопия				
КРЛ	1,38±0,15 *	1,39±0,23 *	1,27±0,17	1,44±0,16 *
ИТЛС, нм	72,4±4,6 *	70,6±4,3	68,0±5,8	73,1±6,4 *

Прим.: * – $p > 0,05$

К трем месяцам после проведения кКРК наблюдали возвращение значений функциональных слезных проб, лакримальной ОКТ-менискометрии и интерференционной тиаскопии к предоперационным значениям, что свидетельствует о восстановлении состояния глазной поверхности.

ВЫВОДЫ

1. Впервые предложен и на репрезентативном материале (30 глаз с прогрессирующим кератоконусом) апробирован в клинической практике комбинированный метод кросслинкинга роговичного коллагена с применением стандартного и трансэпителиального протоколов для стабилизации процесса прогрессирования кератоконуса. Комбинированный протокол позволяет уменьшить интраоперационную травматизацию роговицы за счет сокращения площади деэпителизированной поверхности и максимального воздействия на зону эктазии в результате избирательного глубокого насыщения рибофлавином стромы роговицы в зоне деэпителизации.

2. Доказаны безопасность и эффективность разработанного комбинированного протокола кросслинкинга роговичного коллагена, подтвержденные отсутствием осложнений в послеоперационном периоде и прогрессирования кератоконуса в сроки наблюдения до двенадцати месяцев, соответственно.

3. В результате применения комбинированного протокола кросслинкинга роговичного коллагена в сроки наблюдения до двенадцати месяцев отмечены стабилизация показателей некорригированной и максимальной корригированной остроты зрения и статистически значимое уменьшение средней преломляющей силы роговицы (с $48,1 \pm 4,7$ до $47,3 \pm 4,7$ дптр; $p=0,006$), роговичного астигматизма (с $3,65 \pm 2,23$ до $3,13 \pm 2,21$ дптр; $p=0,000$) и максимальной преломляющей силы роговицы (с $58,1 \pm 7,3$ до $55,4 \pm 6,5$; $p=0,001$).

4. Усовершенствовано оригинальное программное обеспечение для интерпретации метода интерференционной тископии, позволяющее не только рассчитывать коэффициент распределения липидов, но и количественно оценивать интегральную толщину липидного слоя прероговичной слезной пленки.

5. Изменения состояния прероговичной слезной пленки и уровня слезопродукции имели место в первые три месяца после проведения комбинированного кросслинкинга роговичного коллагена и заключались в транзиторном снижении времени разрыва слезной пленки (проба Норна, с $8,2 \pm 5,1$ до $5,8 \pm 3,4$ сек.; $p=0,000$), рефлекторном увеличении слезопродукции (тест Ширмера, с $18,7 \pm 9,9$ до $23,8 \pm 8,7$ мм; $p=0,003$) и уменьшении интегральной

толщины (с $72,4 \pm 4,6$ до $68,0 \pm 5,8$ нм; $p=0,000$) и равномерности распределения липидного слоя (коэффициент, с $1,38 \pm 0,15$ до $1,27 \pm 0,17$; $p=0,000$) прероговичной слезной пленки.

6. По данным оптической когерентной томографии роговицы через месяц после проведения комбинированного кросслинкинга роговичного коллагена демаркационную линию в строме роговицы визуализировали в дезэпителизированной зоне на глубине 263 ± 39 мкм в виде отчетливой яркой линии, а к периферии в зоне трансэпителиального воздействия – на глубине 147 ± 23 мкм в виде тонкой прерывистой линии. Резорбцию демаркационной линии наблюдали через шесть месяцев после вмешательства.

7. Структурные особенности роговицы после проведения комбинированного кросслинкинга роговичного коллагена были проанализированы с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии роговицы:

А) через месяц глубина фототерапевтического воздействия (области лакунарного отека и апоптоза кератоцитов в строме) составила 269 ± 44 мкм в центральной дезэпителизированной зоне, что соответствует значениям глубины залегания демаркационной линии, полученным в те же сроки наблюдения с помощью оптической когерентной томографии;

Б) разрешение лакунарного отека и репопуляцию кератоцитов наблюдали преимущественно до 6 мес., а полностью – на сроке 6–12 месяцев после вмешательства; в отдаленные сроки в строме роговицы визуализировали остаточные изменения в виде уплотнения коллагеновых волокон и межклеточного вещества в результате фотохимической реакции кросслинкинга;

В) в первые три месяца после вмешательства отмечено выраженное нарушение хода и структуры нервных волокон роговицы; восстановление структуры нервных волокон происходило в течение 12 месяцев.

8. На основании полученных данных сформулированы практические рекомендации по применению и мониторингу результатов комбинированного кросслинкинга роговичного коллагена с применением стандартного и трансэпителиального протоколов для лечения прогрессирующего кератоконуса.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанный комбинированный метод кросслинкинга роговичного коллагена с применением стандартного и трансэпителиального протоколов может быть рекомендован для лечения пациентов с прогрессирующим кератоконусом, особенно на ранних стадиях, когда зона эктазии не превышает 4–5 мм, поскольку позволяет провести эффективную и при этом щадящую процедуру.

2. Предложенная новая методика интерпретации интерференционной тиаскопии, обеспечивающая возможность оценки интегральной толщины липидного слоя прероговичной слезной пленки, может быть использована для подбора оптимальной слезозаместительной терапии у пациентов с кератоконусом, а также медикаментозной коррекции синдрома «сухого глаза» после процедуры кросслинкинга роговичного коллагена по комбинированному протоколу.

3. Принимая во внимание новизну комбинированного метода кросслинкинга роговичного коллагена, отсутствие обширной выборки и многолетнего периода наблюдения, необходим тщательный мониторинг показателей кератометрии и пахиметрии роговицы у пациентов, перенесших вмешательство по новому протоколу.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Саркисова К.Г. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия в изучении морфологических изменений в роговице при кератоконусе до и после кросслинкинга роговичного коллагена / Научно-практическая конференция аспирантов и молодых учёных: тезисы докладов. – М.: Сеченовский Университет, 2020. – С. 28–30.
2. Бубнова И.А., Сурнина З.В., Аверич В.В., Саркисова К.Г. Влияние кросслинкинга роговичного коллагена на структуру роговицы при кератоконусе (обзор литературы) // **Вестник офтальмологии.** – 2020. – Т. 136. – № 5. – С. 268–276.
3. Бубнова И.А., Новиков И.А., Аверич В.В., Саркисова К.Г. Определение интегральной толщины липидного слоя прероговичной слезной пленки на примере пациентов, перенесших кросслинкинг роговичного коллагена / Научно-практическая конференция аспирантов и молодых учёных: тезисы докладов. – М.: Сеченовский Университет, 2021. – С. 20–23.
4. Бубнова И.А., Саркисова К.Г. Эпителиальные осложнения при различных протоколах кросслинкинга роговичного коллагена // **Офтальмология.** – 2021. – Т. 18. – № 3S. – С. 740–745.
5. Воронин Г.В., Бубнова И.А., Аверич В.В., Саркисова К.Г. Состояние прекорнеальной слезной пленки после кросслинкинга роговичного коллагена при кератоконусе (предварительное сообщение) // **Вестник офтальмологии.** – 2021. – Т. 137. – № 5-2. – С. 224–230.
6. Сурнина З.В., Бубнова И.А., Аверич В.В., Саркисова К.Г. Изменение структуры роговицы после применения кросслинкинга роговичного коллагена при кератоконусе // **Медицинский Совет.** – 2022. – Т. 16. – № 6. – С. 226–233.
7. Бубнова И.А., Саркисова К.Г. Возможности лазерной сканирующей конфокальной микроскопии в изучении кросслинкинга роговичного коллагена / Научно-практическая конференция аспирантов и молодых учёных: тезисы докладов. – М.: Сеченовский Университет, 2021. – С. 5–7.
8. Бубнова И.А., Саркисова К.Г. Изменение состояния прероговичной слезной пленки и глазной поверхности после кросслинкинга роговичного коллагена при кератоконусе // **Вестник офтальмологии.** – 2022. – Т. 138. – № 3. – С. 18–23.

Список изобретений по теме диссертации:

Новиков И.А., Бубнова И.А., Саркисова К.Г. «Способ проведения кросслинкинга роговичного коллагена при кератэктазиях различного генеза», Патент РФ № 2778968, 01.09.2022 г.

Список сокращений

ИТЛС – интегральная толщина липидного слоя

кКРК – комбинированный кросслинкинг роговичного коллагена

КК – кератоконус

КМР – конфокальная (лазерная сканирующая) микроскопия роговицы

КРК – кросслинкинг роговичного коллагена

КРЛ – коэффициент распределения липидов

тКРК – трансэпителиальный кросслинкинг роговичного коллагена

МКОЗ – максимально скорректированная острота зрения

НВР – нервные волокна роговицы

НКОЗ – некорректированная острота зрения

ОКТ – оптическая когерентная томография

ПО – программное обеспечение

ССГ – синдром «сухого глаза»

УФ – ультрафиолет, ультрафиолетовый

УФО – ультрафиолетовое облучение