На правах рукописи

Горохова Мария Валерьевн

КЕРАТОПЛАСТИКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КРОССЛИНКИНГ МОДИФИЦИРОВАННОГО ДОНОРСКОГО МАТЕРИАЛА У ПАЦИЕНТОВ С ЯЗВАМИ РОГОВИЦЫ

14.01.07. – глазные болезни

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва - 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном учреждении «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:
Малюгин Борис Эдуардович - доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕН, заместитель генерального директора по научной работе ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. Акад. С.Н. Федорова» Минздрава России
Мороз Зинаида Ивановна - доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:
Анисимов Сергей Игоревич – доктор медицинских наук, профессор кафедры офтальмологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова, научный директор офтальмологического центра «Восток-Прозрение»
Оганесян Оганес Георгиевич – доктор медицинских наук, профессор, старший научный сотрудник отдела травматологии и реконструктивной хирургии ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России

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

Защита состоится 20 ноября 2017 года в_____часов на заседании Диссертационного совета №……. при ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. Акад. С.Н. Федорова» Минздрава России по адресу: 127486, Москва, ул. Бескудниковский бульвар, дом 59А

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. Акад. С.Н. Федорова» Минздрава России по адресу: 127486, Москва, ул. Бескудниковский бульвар, дом 59А

Автореферат разослан «___»_____2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук Мушкова И.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Кератопластика в настоящее время является эффективным, а нередко и единственным методом лечения заболеваний роговицы, таких как развитые стадии кератоконуса, буллезная кератопатия, посттравматические рубцы, глубокие язвы и фистулы, а также стойкие помутнения роговицы при кератитах.

В результате кератопластики приживление роговичного трансплантата может быть прозрачным или непрозрачным, вариантами последнего могут быть полупрозрачное или мутное приживление, а также расплавление трансплантата. Полупрозрачное приживление не всегда является неблагоприятным исходом кератопластики, так как позволяет восстановить целостность роговицы при перфоративных язвах роговицы и уменьшить субъективные жалобы пациента на слезотечение и светобоязнь при буллезной кератопатии (Мороз З.И. и др., 2004).

Одну из наиболее тяжелых патологий роговицы составляют глубокие язвы. Это обусловлено сложностью консервативного и хирургического лечения, высокими рисками помутнения трансплантата, особенностями течения послеоперационного периода. Замедленная эпителизация трансплантата, выраженная послеоперационная воспалительная реакция в раннем послеоперационном периоде, риск развития стойкой гипертензии и помутнения хрусталика в отдаленном послеоперационном периоде способствуют не только помутнению и неоваскуляризации роговичного трансплантата, но также могут явиться причиной его расплавления (Копаева В.Г. и др., 1981; Старков Г.Л. и др., 1988; Ильина, С.Н. и др., 2013).

Главное место в консервативном лечении инфекционных язв роговицы занимает антибактериальная, противовирусная, метаболическая терапия. Лечение стерильных язв роговицы включает в себя в первую очередь слезозаместительную терапию, направленную на улучшение трофики и

ускорение эпителизации роговицы (Тарасова Л.Н. и др., 2004; Бобкова Т.Г. и др., 2008).

Нередко консервативные методы лечения эффективны лишь при условии купирования этиологического фактора повреждения роговицы, например, лагофтальма, либо используются как подготовительный этап к последующей операции. В остальных случаях, при длительном и упорном течении процесса, а также при рецидивирующем характере заболевания и наличии глубокого дефекта роговичной ткани прибегают к хирургическому лечению. При поверхностных язвах роговицы применяют покровную кератопластику с использованием различных материалов, таких как амниотическая мембрана, аллопланты, конъюнктива, донорская роговица (Батманов Ю.Е. и др., 2004; Мурзабекова Ф.А., 2006).

При длительной персистенции язвы роговицы, а также в случаях ее перфорации, прежде всего с органосохраняющей целью выполняют сквозную лечебную кератопластику, основной целью которой является восстановление анатомической целостности ткани роговицы и устранение причин риска инфицирования глазного яблока.

При сопутствующем синдроме сухого глаза и высоких рисках замедленной эпителизации в послеоперационном периоде, и как следствие высоких рисках не только помутнения, но и расплавления донорского трансплантата, кератопластика часто комбинируется с покрытием роговицы амнионом, конъюнктивой и дополняется блефарорафией (Пучковская Н.А., 1985; Журова С.Г. и др., 2010). К факторам, способствующим расплавлению трансплантата, помимо нарушений слезообразования, замедленной эпителизации и повышенной агрессии ферментов слезы, также относятся рецидивирующий язвенный дефект, рецидивирующая инфекция, нейротрофические нарушения, сопутствующая соматическая патология, такая как ревматоидный артрит и другие аутоиммунные заболевания (Тарасова Л.Н. и др., 1999, 2004; Полянская Н.К., 2007). До настоящего времени глубокие язвы роговицы являются прогностически неблагоприятной патологией в плане

прозрачного приживления роговичного трансплантата после кератопластики. Процент помутнения трансплантата в послеоперационном периоде довольно высок и по данным литературы составляет от 50 до100 % (Мороз З.И. и др., 2004, 2007).

Одним из факторов успешной кератопластики является подготовка донорского материала. Более 25-ти лет в Межотраслевом научно-техническом комплексе «Микрохирургия глаза» (МНТК МГ) для этого используется консервация донорской роговицы в среде Борзенка – Мороз (Борзенок С. А. и др., 1991, 2008).

Однако, проблема подготовки донорского материала с повышенными прочностными свойствами для кератопластики у пациентов с риском помутнения и расплавления роговичного трансплантата в послеоперационном периоде, в первую очередь, у пациентов с глубокими язвами роговицы, является актуальной до настоящего времени и требует дальнейшего решения. Это позволит снизить процент рецидивов язв роговицы и количество рекератопластик.

Известно, что прочностные свойства роговицы зависят от состояния волокон стромального коллагена, межколлагеновых связей и их структурной организации (Kenney M.C. et al., 1994; Khaderm J. et al., 1994; Doxer A. et. al., 1998; Cheng E.L. et. al., 2001). Использование метода кросслинкинга позволит усилить межколлагеновые связи, а, следовательно, повысить прочностные свойства донорской роговицы. При данной патологии кросслинкинг роговичного коллагена способствует повышению биохимической и биомеханической стабильности донорской роговицы.

В связи с этим актуальность проблемы хирургического лечения пациентов с глубокими язвами роговицы, а также возможность применения кросслинкинга для усиления прочностных свойств донорского трансплантата и в дальнейшем его использование для кератопластики явились основанием к проведению данного исследования.

Цель: Разработать технологию лечения пациентов с глубокими язвами роговицы методом кератопластики на основе модификации способа подготовки донорского трансплантата.

Для достижения указанной цели поставлены следующие **задачи**:

1.Изучить временные параметры насыщения стромы донорской роговицы рибофлавином методом спектроскопии диффузного отражения в зависимости от способа нанесения раствора.

2.Изучить биомеханические свойства кросслинкинг модифицированной донорской роговицы методами торсионного взвешивания, оптической когерентной томографии и с помощью разрывной машины.

3.Изучить химическую устойчивость кросслинкинг модифицированной донорской роговицы к протеолитическим ферментам методом сканирующей электронной микроскопии.

4.Разработать способ подготовки донорского материала для кератопластики у пациентов с язвами роговицы различной этиологии.

5.Разработать и обосновать оптимальную технику кератопластики с использованием кросслинкинг модифицированного донорского трансплантата у пациентов с язвами роговицы.

6.Оценить результаты различных видов кератопластики с использованием донорского материала, обработанного по модифицированной методике кросслинкинг в сравнении со стандартной техникой без обработки донорского материала.

Научная новизна результатов исследования

1.Впервые создан способ подготовки донорского материала для кератопластики, при котором в результате воздействия ультрафиолета на роговицу, пропитанную фотосенсибилизатором (1% рибофлавин) изменяются биофизические и биохимические свойства роговичного трансплантата, а именно уменьшается степень отека ткани, увеличивается прочность на разрыв и ферментативная устойчивость к коллагеназе, что достигается за счет

формирования новых ковалентных соединений, усиления межфибриллярных связей и более компактной укладки пластин коллагена.

2.Впервые в клинической практике проведено сравнение результатов разных видов кератопластики с использованием кросслинкинг модифицированного и консервированного по стандартным условиям донорского материала, и сделан вывод об эффективности предложенной технологии лечения пациентов с глубокими язвами роговицы, обеспечивающей лучшие биологические результаты трансплантации в отдаленном послеоперационном периоде.

Практическая значимость

1.Детально отработан и внедрен в клиническую практику новый способ подготовки роговичного трансплантата для кератопластики у пациентов с глубокими язвами роговицы, который заключается в обработке деэпителизированного роговично-склерального диска консервированного в растворе для хранения перед кератопластикой по методу УФ кросслинкинга с добавлением в консервационную среду 1% рибофлавина, экспозицию в течение 15 минут и дальнейшем облучении его ультрафиолетом с длиной волны 370 нм мощностью 3мВ/см2 в течение 30 минут с последующим выкраиванием донорского трансплантата нужного диаметра.

2.Разработана и апробирована на практике техника кератопластики с использованием модифицированного трансплантата, включающая выбор размера и глубины трепанации с учетом размеров и глубины пораженного участка роговицы, технические приемы по формированию трепанационного отверстия в условиях гипотонии, технику реконструкции передней камеры глаза, а также шовной фиксации донорской роговичной ткани.

3.Доказано, что проведение глубокой послойной кератопластики у больных с неперфоративными язвами роговицы и сохранной Десцеметовой мембраной с использованием кросслинкинг модифицированного донорского материала характеризуется меньшим количеством осложнений со стороны структур передней камеры глаза, умеренной выраженностью сосудистой

реакции, роговичного синдрома и экссудативно-воспалительного ответа, что свидетельствует о минимально реактивном течении послеоперационного периода и обеспечивает сокращение сроков реабилитации по сравнению с пациентами после сквозной пересадки роговицы.

Положения, выносимые на защиту

Использование разработанной оригинальной технологии лечения пациентов с глубокими язвами роговицы, включающей новый способ обработки донорской роговицы на основе УФ кросслинкинга с добавлением фотосенсибилизатора непосредственно в консервационную среду, позволяет получить трансплантат с усиленными прочностными свойствами, резистентный к ферментативному лизису и гидратации, а также дифференцированный подход на основе предложенных оперативно-технических приемов выполнения глубокой послойной и сквозной кератопластики, позволяет существенно улучшить биологические результаты пересадки роговицы путем снижения риска расплавления донорской ткани и уменьшения количества повторно выполняемых кератопластик при сроках наблюдения до 4-х лет.

Внедрение в практику

Основные положения работы включены в тематику лекций для обучения ординаторов и аспирантов в ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, а также в клиническую практику отдела трансплантационной и оптико-реконструктивной хирургии переднего отдела глазного яблока головной организации ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. Результаты и положения работы включены в программу теоретических и практических занятий на циклах тематического усовершенствования врачей в Научно-образовательном центре в ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Апробация работы

Основные положения диссертационной работы представлены на еженедельной научно-практической конференции ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России
(Москва, 2016).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 14 статей, из них 4 статьи в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ. Имеется 1 патент РФ на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 132-х листах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, 3-х глав собственных исследований, заключения, выводов и практических рекомендаций. Работа иллюстрирована 33 рисунками и 13 таблицами. Библиографический указатель содержит 154 источник, из них 66 работ отечественных и 75 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Дизайн исследования основан на проведении экспериментальных и клинических исследований эффективности метода обработки донорского материала по модифицированной методике кросслинкинг и анализе полученных результатов (таблица 1). Экспериментальные исследования выполнены на базе центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем под руководством д.м.н. Борзенка С.А. Клиническая часть работы выполнена на базе отдела трансплантационной и оптико-реконструктивной хирургии переднего отрезка глаза ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Таблица 1 - Дизайн исследований и общий расход материалов

Название исследования	Материалы исследования	Задачи исследования
Экспериментальное изучение временных параметров насыщения раствором рибофлавина стромы донорской роговицы методом спектроскопии диффузного отражения	6 роговично-склеральных дисков, диаметр 16 мм.	Изучить временные параметры насыщения донорской роговицы
Экспериментальное исследование степени выраженности отека обработанного донорского материала методами торсионного взвешивания и оптической когерентной томографии ПОГ	16 роговично-склеральных дисков, диаметр 16 мм.	Изучить биофизические свойства донорской роговицы
Экспериментальное исследование предела прочности кросслинкинг модифицированной донорской роговицы	6 роговичных дисков, диаметр 10,5 мм.	Изучить биомеханические свойства донорской роговицы
Исследование химической устойчивости обработанного донорского материала методом электронной микроскопии в эксперименте с коллагеназой	24 роговичных диска, диаметр 10,5 мм.	Изучить биохимические свойства донорской роговицы
Клинико-функциональное исследование	1 группа – 42 глаза, выполнена СКП по стандартной методике, 2 группа - 44 глаза выполнена КП с использованием кросслинкинг модифицированного донорского материала: 32 глаза СКП, 12 глаз ГПК	Оценить результаты различных видов кератопластики, выявить особенности и осложнения послеоперационного периода

Клинико-функциональные исследования были основаны на изучении анатомического, функционального и клинического состояния 86-ти глаз (86 пациентов) с глубокими язвами роговицы различной этиологии до и в различные сроки после проведения хирургического лечения.

Все пациенты были разделены на 2 клинические группы в зависимости от проводимого хирургического вмешательства.

Контрольную группу составили 42 глаза 42-х пациентов, которым была выполнена сквозная кератопластика с использованием донорского материала консервированного в среде Борзенка-Мороз.

В опытную группу вошли 44 глаза 44-х пациентов, которым выполнена кератопластика с использованием донорского материала консервированного в среде Борзенка-Мороз и обработанного методом кросслинкинга. На 12-ти глазах (12 пациентов) выполнена глубокая послойная кератопластика с использованием кросслинкинг модифицированного донорского материала. На 32-х глазах (32 пациента) выполнена сквозная кератопластика с использованием кросслинкинг модифицированного донорского материала.

В качестве донорского материала во всех случаях использовали аллогенные кадаверные роговицы с показателем трансплантабельности не ниже 2В-3А (по классификация трансплантабельности трупных роговиц человека Борзенка С.А., 2008), деэпителизированные и консервированные в «Растворе для хранения роговицы» (среда Борзенка-Мороз) (Экспериментально-техническое производство «Микрохирургия глаза», Россия) в условиях гипотермии на базе Глазного тканевого банка Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» (заведующий Центром – д.м.н., профессор, академик РАЕН Борзенок С.А.). Срок от момента консервации до проведения кросслинкинга составил не более суток.

Кросслинкинг донорского материала проводили на приборе для кросслинкинга роговичного коллагена UV-X 1000 (IROC, Швейцария). Контроль за толщиной донорской роговицы во время проведения

кросслинкинга осуществлялся на измерительной системе OcuScanRxP (Alcon, США).

Всем пациентам, вошедшим в данное исследование, проводили комплексное офтальмологическое обследование, включающее: биомикроскопию, фильтрационную флюоресцеиновую пробу, офтальмоскопию, пробу Ширмера и Норна, визометрию, кератотопографию, периметрию, Б- метод сканирования, офтальмотонометрию, эхобиометрию, электрофизиологическое исследование, оптическую когерентную томографию переднего отрезка глаза, конфокальную и эндотелиальную микроскопии.

Статистический анализ при сравнении анатомического, функционального, клинического состояния глаз пациентов обеих групп и возможностей различных диагностических методик до операции и в различные сроки после нее выполняли с использованием стандартных статистических программ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты экспериментальных исследований

Для изучения **временных параметров насыщения стромы донорской роговицы рибофлавином в зависимости от способа нанесения раствора** был использован метод спектроскопии диффузного отражения. Исследование проводилось на 6-ти роговично-склеральных дисках, которые были разделены на две группы в зависимости от способа инстилляции или помещения роговицы в консервационный раствор с 1% рибофлавином. При анализе данных спектроскопии выявили, что в обеих группах максимальное увеличение коэффициента отражения происходило к 15 минуте, далее этот коэффициент выходил на плато и оставался неизменным. Таким образом, к 15-ой минуте происходило полное насыщение стромы консервированной роговицы раствором рибофлавина как при закапывании, так и при помещении роговицы в емкость с раствором. Насыщение рибофлавином происходило с одинаковой скоростью независимо от способа нанесения раствора.

Для определения **степени развития отека стромы донорской роговицы после обработки по методике кросслинкинг** в сравнении с необработанной роговицей в разные временные промежутки использовали метод оптической когерентной томографии и метод торсионного взвешивания. Для развития отека роговицы помещали в физиологический раствор на 24 и 72 часа. Весь экспериментальный материал был распределен по двум группам: опытная группа– донорские консервированные роговично-склеральные диски, обработанные по методике кросслинкинг (n=8)**;** контрольная группа– донорские консервированные роговично-склеральные диски без кросслинкинга (n=8).

Изначально средняя толщина донорских роговично-склеральных дисков опытной группы (по данным OCT Visante) составила 741,8±11,7 мкм, через 24 часа после помещения образцов в физиологический раствор вес увеличился до 786,1±20,2 мкм, а через 72 часа до 846,0±11,2 мкм, таким образом средний прирост толщины стромы в опытной группе составил 44,4±9,2 мкм и 104,3±1,8 мкм через 24 и 72 часа соответственно. В контрольной группе средняя толщина дисков до эксперимента 741,9±11,5 мкм, через 24 часа 930,3±13,1 мкм, через 72 часа 1022,6±28,4 мкм, средний прирост толщины стромы 188,4±4,2 мкм, 280,8±18,2 мкм через 24 и 72 часа соответственно.

Таким образом, учитывая данные оптической когерентной томографии, можно увидеть, что роговицы опытной группы отекают меньше (средний процент прироста веса составил 6,0±1,2% и 14,0±0,4% через 24 и 72 часа соответственно) в сравнении с роговицами контрольной группы (средний процент прироста веса составил 25,4±0,6% и 37,8±2,0% через 24 и 72 часа соответственно). При анализе данных оптической когерентной томографии переднего отрезка глаза выявлено, что прирост толщины стромы в опытной группе был меньше, чем в контрольной группе. Изменения, наблюдаемые через 24 часа, сохраняются и через 72 часа.

Эти данные были подтверждены и методом торсионного взвешивания. Доля прироста массы в контрольной группе всегда превышала долю прироста в

опытной группе (20,2±4,7 % в опытной группе и 30,4±5,3 % в контрольной группе). Таким образом, после воздействия кросслинкинга консервированные донорские роговицы пропитываются физиологическим раствором в 1,5 раза меньше и утолщаются в 2,7 раз меньше в сравнении с контрольной группой, что подтверждает факт усиления биофизических свойств роговицы за счет формирования уплотнений пластов коллагена.

Для определения **предела прочности кросслинкинг модифицированной донорской роговицы** использовали разрывную машину Инстрон. Эксперимент проводили на корнеальных полосках размером 10 на 8 мм, которые закрепляли в универсальной испытательной машине. Выявлено, что для растяжения кросслинкинг обработанной донорской роговицы на 2 мм требуется нагрузка в 4 раза большая, чем для растяжения необработанной роговицы. Возрастание нагрузки на строму роговицы в 4 раза при одинаковом растяжении и усилие необходимое для разрыва большее в 1,4 раза расценивали как значительное увеличение ее прочности, произошедшее в результате достижения эффекта кросслинкинга с формированием новых ковалентных связей «сшивок» между фибриллами коллагена.

Для изучения **химической устойчивости донорской роговицы, обработанной по методике кросслинкинг к протеолитическим ферментам** использовали метод сканирующей электронной микроскопии. Протеолитические ферменты слезы могут проявлять свои агрессивные свойства в послеоперационном периоде и оказывать негативное влияние на эпителизацию и приживление донорского трансплантата. На примере коллагеназы была создана модель протеолитических ферментов in vitro. Объектом исследования являлись донорские роговицы, которые были распределены по 4 экспериментальным группам. Первая группа содержала только консервированные донорские роговицы (n=6). Во вторую группу входили консервированные донорские роговицы, обработанные по методике кросслинкинг (n=6). Третья группа была сформирована из консервированных донорских роговиц, обработанных коллагеназой: результат оценивался в

динамике через 24 часа (n=3) и через 72 часа (n=3). Четвертая группа состояла из консервированных донорских роговиц, после кросслинкинга обработанных коллагеназой: результат оценивался в динамике через 24 часа (n=3) и через 72 часа (n=3).

В строме роговиц опытной группы отмечали утолщение коллагеновых фибрилл, уменьшение расстояния между пластинами коллагена, более компактную укладку пластин под воздействием рибофлавина и ультрафиолета по сравнению с контрольной группой.

В роговицах контрольной группы после воздействия коллагеназы через 24 часа отмечали разрушение коллагеновых фибрилл, нарушение продольной направленности пластин коллагена, нарушение структуры белка, визуализировали оставшиеся коагулированные части белковой фракции. Через 24 часа фибриллы коллагена роговиц опытной группы сохраняли свою структуру и направленность, прослеживали более компактную укладку пластин коллагена. Динамическая оценка действия коллагеназы через 72 часа показала, что в контрольной группе наблюдалось отчетливое разрушение коллагена стромы, отсутствие какой-либо направленности волокон, визуализировали оптические пустоты в зонах разрушенного коллагена, в то время как в опытной группе воздействие коллагеназы было минимальным с сохранением структуры и направленности пластов коллагена.

Таким образом, процедура кросслинкинга оказывает стабилизирующее физико-химическое воздействие на коллагеновые фибриллы роговичной ткани, увеличивает биомеханические свойства и биохимическую устойчивость к действию протеолитических ферментов слезы. Учитывая данные всех экспериментов, был разработан новый **способ подготовки роговичного трансплантата на основе модификации метода кросслинкинг**, заключающийся в этапах:

1.Первым этапом все донорские роговично-склеральные диски были деэпителизированы и консервированы в «Растворе для хранения» (среда Борзенка-Мороз) в условиях гипотермии по стандартной методике.

Кросслинкинг донорского материала проводили в операционной не позднее суток после консервации.

2.Перед проведением операции, консервированные деэпителизированные роговично-склеральные диски помещалась в среду Борзенка-Мороз с добавлением 1 мл. 1% раствора рибофлавина на 15 минут.

3.По истечении 15 минут роговично-склеральные диски перемещали в стерильный флакон эндотелием вниз.

4.Роговично-склеральные диски обрабатывали ультрафиолетом с длиной волны 370 нм мощностью 3мВ/см^2 в течение времени, рекомендованного фирмой производителем (30 минут). Для облучения использовали прибор UV-X s/n 1000-401-39 (производство Швейцария). В процессе обработки ультрафиолетом на донорскую роговицу каждые 5 минут капали по 1 капле декстралинка. Интраоперационно проводили контроль пахиметрии (патент №2381649 от 20.02.2010г).

5.После завершения процедуры кросслинкинга роговично-склеральный диск перекладывали в стерильный флакон с раствором для хранения роговицы (среда Борзенка-Мороз).

6.После подготовки донорского роговично-склерального диска по методике кросслинкинг, не позднее 2-х суток, из него выкраивали трансплантат нужного диаметра с помощью одноразового вакуумного трепана фирмы Baron (США) и проводили кератопластику.

Результаты клинических исследований

Этиология язвенного процесса у исследуемых пациентов была различной. В обеих группах превалировали язвы роговицы, которые развились в исходе кератита: 20 пациентов (47,6%) в 1-й группе и 21 пациент (47,7%) во 2-й. Из них наиболее часто встречались вирусные кератиты герпетической этиологии. На 27-ми оперируемых глазах ранее была выполнена кератопластика по поводу глубокой язвы роговицы. Однако в сроки от 1-го до 6-ти месяцев произошло расплавление донорского трансплантата, что потребовало выполнения рекератопластики.

Таблица 8 - Распределение пациентов по этиологии язв роговицы (n=86)

Этиологический фактор	1-я группа (n=42), n (%)	2-я группа (n=44), n (%)	Общее кол-во (n=86), n (%)
Язва роговицы, исход герпетического кератита	11(26,2%)	11(25,0%)	22(25,6%)
Язва роговицы на фоне ревматоидного артрита	6(14,3%)	7(15,9%)	13(15,1%)
Язва роговицы, исход нейропаралитической кератопатии	3(7,1%%)	2(4,6%)	5(5,8%)
Язва роговицы, исход бактериального кератита	9(21,4%)	10(22,7%)	19(22,1%)
Язва роговицы на фоне расплавления донорского трансплантата	13(31,0%)	14(31,8%)	27(31,4%)

Острота зрения до операции у пациентов обеих групп была снижена и колебалась от pr. certa до 0,3 . Степень снижения остроты зрения была обусловлена локализацией язвы, ее размерами, наличием сопутствующей патологии. В исследование последовательно были включены 59 женщин и 27 мужчин в возрасте от 31 до 80 лет.

Всем пациентам предварительно проводилось противобактериальное и противовоспалительное консервативное лечение, таким образом все язвы были стерильные, о чем свидетельствовали отрицательные данные микробиологического посева.

По данным OCT Visante было подтверждено наличие дефекта эпителия и стромы роговицы неправильной формы, размером от 2,5 до 6,5 мм до глубоких слоев стромы, толщина остаточной стромы при неперфоративных язвах роговицы в центральной зоне дефекта не превышала 80 мк (21 глаз). На 15-ти глазах дефект занимал периферическое положение. На 45-ти глазах отмечали положительную фильтрационную пробу с флюоресцеином, при этом передняя камера отсутствовала или была щелевидной, что указывало на перфорацию десцеметовой мембраны.

На 8-ми глазах диагностировали помутнение хрусталика разной степени выраженности. На 3-х глазах было стойкое повышение ВГД. По данным ОСТ Visante на этих глазах было диагностировано закрытие УПК на всем протяжении за счет иридокорнеальных сращений и отека радужки.

В анамнезе у пациентов были проведены экстракции катаракты, антиглаукоматозные операции, операции по устранению лагофтальма и трихиаза.

Все пересадки роговицы выполнялись, в первую очередь, с лечебной целью. При проведении сквозной кератопластики учитывали следующие факторы:

1.Трепанация роговицы осуществлялась в пределах дефекта с учетом максимального сохранения собственной здоровой ткани и локализации дефекта

2.Формирование трепанационного отверстия представляло определенные трудности на гипотоничном глазу. Это было связано с высоким риском повреждения радужки и хрусталика в момент трепанации роговицы в условиях отсутствия передней камеры и риска получения неправильной формы трепанационного отверстия.

3.При наличии сопутствующих изменений структур переднего отрезка глаза проводилась максимальная его реконструкция.

4.Фиксацию донорского трансплантата осуществляли преимущественно узловыми швами нейлон 10-0.

Экстракцию катаракты проводили экстракапсулярно на 8-ми из 10 глаз. На 2-х глазах с подвывихом хрусталика 3-ей степени проводили интракапсулярную экстракцию катаракты. Всем больным производили не менее 2-х иридэктомий с целью профилактики развития зрачкового блока в послеоперационном периоде. В ряде случаев дополнительно одновременно проводилась имплантация дренажа Ахмед (n=3) и амниопластика при высоких рисках расплавления донорского трансплантата.

Проведение глубокой послойной кератопластики было возможно на глазах с истончением роговицы, но при отсутствии перфорации десцеметовой мембраны и сохранной передней камере. Операция выполнена на 12 глазах.

Выполнение глубокой послойной кератопластики при неперфоративных язвах роговицы с сохранной десцеметовой мембраной позволило уменьшить выраженность воспалительного процесса, сократить число послеоперационных осложнений, минимизировать риски, связанные с помутнением трансплантата и ускорить реабилитацию пациентов.

Основным и обязательным в раннем послеоперационном периоде наряду с оценкой выраженности воспалительной реакции и оценкой состояния структур передней камеры являлось проведение флюоресцеиновой пробы и оптической когерентной томографии, а также пальпаторная тонометрия

В послеоперационном периоде наблюдали ряд особенностей:

Особенности послеоперационного периода	1 группа n=42, (%)	2 группа n=44, (%)	Общее кол-во n=86, (%)
Замедленная эпителизация	12 (28,6%)	9 (20,5%)	21 (24,4%)
Рецидивирующие эрозии трансплантата	10 (23,8%)	3 (6,8%)	13 (15,1%)
Несостоятельность рубца	2 (4,8%)	1 (2,3%)	3 (3,5%)
Провисание и прорезывание швов	5 (11,9%)	4 (9,1%)	9 (10,5%)
Развитие катаракты	5 (11,9%)	3 (6,8%)	8 (9,3%)
Вторичная закрытоугольная глаукома	1 (2,4%)	-	1 (1,2%)
Рецидивирующие воспалительные заболевания переднего отрезка глаза	2 (4,8%)	1 (2,3%)	3 (3,5%)

Фибропластические процессы в передней камере с формированием ретрокорнеальной мембраны (синдром мелкой передней камеры, заращение зрачка, зрачковый блок)	2 (4,8%)	-	2 (2,3%)

Статистически значимых различий при оценке воспалительной реакции и эпителизации у пациентов обеих групп после сквозной кератопластики выявлено не было, однако отмечено, что после выполнения глубокой послойной кератопластики отмечалось более ареактивное течение послеоперационного периода.

Остальные особенности чаще встречались в 1 группе пациентов и требовали проведения дополнительных хирургических вмешательств, таких как амниопластика, экстракция катаракты, имплантация дренажа Ахмед, дополнительное наложении швов.

При оценке результатов хирургического лечения установлено, что по данным биомикроскопии и OCT Visante через 1 месяц после операции у 9-ти пациентов1-ой клинической группы было полупрозрачное состояние трансплантата, у 13-ти пациентов отмечали мутное состояние трансплантата с помутнением всех слоев роговицы, однако отсутствие дефектов эпителия было стойким, что также оценивали как благоприятный исход кератопластики. У 10-ти пациентов 2-ой клинической группы после СКП и у 4-х пациентов после глубокой послойной кератопластики состояние трансплантата было полупрозрачным, у 5-ти и 3-х пациентов соответственно мутным.

У всех остальных пациентов обеих клинических групп отмечали прозрачное состояние трансплантата.

Анализ результатов хирургического лечения 86-ти пациентов с глубокими язвами роговицы позволил выявить, что прозрачное приживление трансплантата к концу 4 года отмечали на 7-ми глазах из 86-ти, на остальных глазах было непрозрачное приживление (91,9%). Все операции выполнялись, в

первую очередь, с лечебной целью, ни в одном случае не было функциональной и анатомической гибели глаза. Основным признаком успешного проведения кератопластики с использованием кросслинкинг модифицированного материала стало значительное уменьшение количества расплавлений трансплантата: 42,9 % в 1 группе и 13,6 % во 2 группе, что позволило значительно снизить необходимость проведения рекератопластики.

Таблица 12 - Результаты приживления донорской роговицы у пациентов (первая/вторая группа)

Приживление трансплантата	После операции					
	3 месяца n=42/44, (%)	6 месяцев n=32/39, (%)	1 год n=27/37, (%)	2 года n=25/36, (%)	3 года n=24/36, (%)	4 года n=24/36, (%)
Прозрачное приживление	13/19 (31,0/43,2)	9/13 (28,1/33,3)	6/9 (22,2/24,3)	4/7 (16,0/19,4)	4/6 (16,6/16,6)	2/5 (8,3/13,9)
Полупрозрачное приживление	14/15 (33,3/34,1)	10/14 (31,3/35,9)	14/20 (51,9/54,1)	12/18 (48,0/50,0)	10/20 (41,7/55,6)	12/19 (50,0/52,8)
Мутное приживление	15/10 (35,7/22,7)	13/12 (40,6/30,8)	7/8 (25,9/21,6)	9/11 (36,0/30,6)	10/10 (41,7/27,8)	10/12 (41,7/33,3)

достоверное отличие значений между группами $p<0,05$

Наиболее часто расплавления трансплантата отмечали в течение первого года после кератопластики.

Наиболее частые причины помутнения роговичного трансплантата:

-рецидивирующие эрозии трансплантата

-наличие ретрокорнеальной мембраны, синдром мелкой передней камеры

-болезнь трансплантата иммунного характера

-декомпенсация эндотелия трансплантата на фоне прогрессирующего снижения ПЭК

При этом клиническая картина на глазах 1-ой и 2-ой группы была различна. На глазах 1-ой группы длительная деэпителизация трансплантата способствовала развитию отека стромы со снижением прозрачности по типу септического или асептического инфильтрата роговичного трансплантата с последующим формированием глубокого сосудистого бельма или изъязвлением стромы и развитием рецидива язвы роговицы. На глазах 2-ой

группы при длительной эрозии трансплантата в асептических условиях отека стромы не возникало, а развивался фиброз поверхностных слоев стромы трансплантата.

Выводы

1. При анализе параметров импрегнации донорской роговицы раствором рибофлавина методом спектроскопии выявлено, что насыщение стромы роговицы рибофлавином равнозначно как в случае инстилляции с частотой 1 капля в 5 минут на протяжении 30 минут, так и при помещении роговично-склерального диска в консервационную среду, содержащую 1 мл 1% рибофлавина, и наступает в полном объеме к 15-ой минуте.

2. В ходе изучения характеристик консервированных донорских роговиц человека, подвергшихся кросслинкингу методами торсионного взвешивания и оптической когерентной томографии при сроках хранения до 72-х часов определено, что они после воздействия кросслинкинга пропитываются физиологическим раствором в 1,5 раза меньше и утолщаются в 2,7 раз меньше в сравнении с группой контроля. При этом для растяжения обработанной кросслинкингом роговицы на 2,0 мм требуется в 4 раза большая нагрузка, а усилие необходимое для разрыва должно быть в 1,4 раза выше.

3. При оценке ферментативной резистентности кросслинкинг модифицированного трансплантата с использованием 25 ЕД коллагеназы добавленной к 5 мл изотонического раствора натрия хлорида, методом сканирующей электронной микроскопии выявлены сохранность поперечной направленности и более компактная укладка пластин коллагена по сравнению с необработанной роговицей.

4. Разработан принципиально новый способ подготовки консервированного роговичного трансплантата, заключающийся в помещении перед кератопластикой роговично-склерального диска на 15 минут в раствор рибофлавина (1%), добавленный к консервационной среде, и последующем облучении ультрафиолетом с длиной волны 370 нм и мощностью 3мВт/см^2 в течение 30-ти минут. Последующее выкраивание трансплантата необходимого

диаметра производится непосредственно на операционном столе с учетом размеров дефекта роговицы реципиента.

5. В процессе клинического исследования оптимизирована техника глубокой послойной кератопластики у больных с неперфоративными язвами роговицы на основе использования кросслинкинг модифицированного донорского материала, заключающаяся в максимально полном удалении пораженной ткани стромы роговицы и профилактике перфорации глубоких её слоев, обеспечивающая существенно меньшее количество интраоперационных осложнений и минимальную реактивность послеоперационного периода, в виде экссудативной реакции и роговичного синдрома, что обусловило существенное сокращение сроков реабилитации по сравнению с пациентами с аналогичной патологией, которым была выполнена сквозная кератопластика.

6. Клиническая апробация модифицированного донорского материала и анализ отдаленных клинико-функциональных результатов всех видов кератопластики (как сквозной, так и глубокой послойной) доказали, что разработанный способ обработки донорского материала является эффективным и безопасным, позволяет сократить количество расплавлений трансплантата в три раза при сроке наблюдения до 4-х лет, и может быть рекомендован для внедрения в практику лечения глубоких язв роговицы.

Практические рекомендации

1. Для кератопластики у пациентов с глубокими язвами роговицы целесообразно использовать разработанный новый способ подготовки роговичного трансплантата, который заключается в обработке деэпителизированного роговично-склерального диска, консервированного в растворе для хранения, по методу УФ кросслинкинга с добавлением в консервационную среду 1% рибофлавина, экспозицию в течение 15 минут и дальнейшем облучении его ультрафиолетом с длиной волны 370 нм мощностью 3мВ/см2 в течение 30 минут с последующим выкраиванием донорского трансплантата нужного диаметра.

2. Техника кератопластики с использованием модифицированного трансплантата должна включать в себя выбор размера и глубины трепанации с учетом размеров и глубины пораженного участка роговицы, технические приемы по формированию трепанационного отверстия в условиях гипотонии, технику реконструкции передней камеры глаза, а также узловую шовную фиксацию донорской роговичной ткани.

3. У больных с неперфоративными язвами роговицы и сохранной Десцеметовой мембраной целесообразно проведение глубокой послойной кератопластики с использованием кросслинкинг модифицированного донорского материала, что характеризуется меньшим количеством осложнений со стороны структур передней камеры глаза, умеренной выраженностью сосудистой реакции, роговичного синдрома и экссудативно-воспалительного ответа и обеспечивает сокращение сроков реабилитации по сравнению с пациентами после сквозной пересадки роговицы.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Горохова М.В. Мороз З.И. Борзенок С.А. Послойная кератопластика с использованием модифицированного донорского материала при дистрофических и воспалительных заболеваниях роговицы// «Актуальные проблемы офтальмологии»: 3-я Всерос.науч. конф. молодых ученых с участием иностр. специал. : Сб. науч. работ / Под ред. Х.П. Тахчиди.- М., 2008.- С. 26-27.

2. Мороз З.И. Горохова М.В., Борзенок С.А., Шацких А.В., Ковшун Е.Н. Keratoplasty with CXL-modified donor grafts in corneal dystrophies and infections corneal diseases// SOE 2009. The 17th Congress of the European Society of Ophthalmology: Abstract book.- Amsterdam, 2009.- P. 67.

3. Борзенок С.А., Мороз З.И., Горохова М.В., Ковшун Е.Н., Комах Ю.А., Волкова О.С., Кравчук О.В. Cross-linking technique in vitro modification of cadaver donore corneas for high risk lamellar keratoplasty// SOE 2009. The 17th

Congress of the European Society of Ophthalmology: Abstract book.- Amsterdam, 2009.- P. 70.

4. Мороз З.И., Борзенок С.А., Ковшун Е.В., Горохова М.В. Кератопластика с использованием модифицированного донорского материала при фистулах роговицы// Материалы 5-й Евро-Азиатской конференции по офтальмохирургии.- Екатеринбург, 2009.- С. 47.

5. Борзенок С.А., Мороз З.И., Ковшун Е.В., Комах Ю.А., Шацких А.В., Горохова М.В. Новая технология кросс-линкинг-модификации донорских роговиц для выполнения послойных кератопластик высокого риска// Филатовские чтения: Научно-практ. конф. с международным участием.- Одесса, 2009.- С. 8-9.

6. Мороз З.И., Ковшун Е.В., Измайлова С.Б., Мороз О.В., Горохова М.В. Кератоконус и методы его хирургического лечения// 8-я Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Федоровские чтения – 2009»: Сб. тез.- С. 509-510.

7. Мороз З. И., Борзенок С. А., Ковшун Е. В., Горохова М. В. Кератопластика с использованием модифицированного донорского материала при фистулах роговицы// Съезд офтальмологов России, 9-й: Тез. докл.- М., 2010.- С. 313.

8. Горохова М.В., Мороз З.И, Майчук Д.Ю., Ковшун Е.В., Власова В.А. Кератопластика с использованием кросслинкинг модифицированного донорского материала при фистуле роговицы// Офтальмохирургия.- 2012.- №4.- С. 88-92.

9. Малюгин Б.Э., Борзенок С.А., Мороз З.И., Шацких А.В., Горохова М.В. Экспериментальное изучение ферментативной устойчивости донорской роговицы, обработанной по методике УФ-кросслинкинга// Офтальмохирургия.- 2014. ─ N1. ─ С.20-23.

10. Горохова М.В., Борзенок С.А., Комах Ю.А. Экспериментальное изучение биомеханических свойств донорских роговиц, обработанных по методике кросслинкинга// IX Всероссийская научная конференция молодых ученых с

международным участием «Актуальные проблемы офтальмологии».- М., 18 июня 2014. (стендовый)

11. Ковшун Е.В., Горохова М.В. Лечебная послойная кератопластика при язвах роговицы// XII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Фёдоровские чтения-2014».- М., 19-20 июня 2014. (стендовый)

12. Ковшун Е.В., Мороз З.И., Власова В.А., Горохова М.В. Возможности использования кросслинкинг-модифицированного донорского материала для кератопластики и кератопротезирования// Катарактальная и рефракционная хирургия.- 2014.- Т.14.- №1.- С. 27-31

13. Мороз З.И., Малюгин Б.Э., Горохова М.В., Ковшун Е.В. Результаты кератопластики при фистулах роговицы с использованием УФ-кросслинкинг модифицированного донорского материала// Офтальмохирургия.- 2014.- № 2.– С. 29-32.

14. Ковшун Е.В., Мороз З.И., Горохова М.В. Глубокая послойная кератопластика в лечении язв роговицы// XII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Федоровские чтения-2014»,Сб.тез. М.: Издательство «Офтальмология», 2014. ─ С.59.

Патенты по теме диссертации

Мороз З.И., Борзенок С.А., Горохова М.В. и др. Способ обработки трупной роговицы человека перед кератопластикой. Положительное решение о выдаче патента РФ №2381649 от 20.02.2010г.

Список сокращений

ВГД	внутриглазное давление
ГПК	глубокая послойная кератопластика
ЕД	единица действия
ИОЛ	интраокулярная линза
КП	кератопластика
мк	микрон
ПОГ	передний отрезок глаза
ПЭК	плотность эндотелиальных клеток
СКП	сквозная кератопластика
СЭМ	сканирующая электронная микроскопия
УФ	ультрафиолет
ЭК	экстракция катаракты
ОСТ	оптическая когерентная томография

Биографические данные

Горохова Мария Валерьевна окончила Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова в 2005 году по специальности «Лечебное дело» С 2005 по 2007 год проходила обучение в клинической ординатуре по офтальмологии в ФГАУ "Межотраслевой научно-технический комплекс "Микрохирургия глаза" им. акад. С.Н. Фёдорова" Минздрава России. В 2008 году поступила в очную аспирантуру по специальности «Глазные болезни» на базе ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. С 2014 по 2016 год выполняла научные исследования по теме «Кератопластика с использованием кросслинкинг модифицированного донорского материала у пациентов с язвами роговицы» в отделе трансплантационной и оптико-реконструктивной хирургии переднего отрезка глаза. Автор 14 печатных работ (из них 4 в журналах, рецензируемых ВАК РФ), 1 патента РФ на изобретение.