## БЕЛОДЕДОВА АЛЕКСАНДРА ВЛАДИМИРОВНА

# ДИАГНОСТИКА И ХИРУРГИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ КЕРАТОКОНУСА НА ОСНОВЕ УГЛУБЛЕННОГО ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ ЗАБОЛЕВАНИЯ И ФЕМТО-АССИСТИРОВАННОЙ КЕРАТОПЛАСТИКИ

14.01.07 – глазные болезни 03.02.07 – генетика

#### АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научнотехнический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

### Научные руководители:

Малюгин Борис Эдуардович — доктор медицинских наук, профессор, заместитель генерального директора по научной работе ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России

Скородумова Любовь Олеговна — кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики человека ФГБУ "Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства".

#### Официальные оппоненты:

Слонимский Алексей Юрьевич — доктор медицинских наук, профессор, врачофтальмолог, ООО «Московская глазная клиника».

Стрельников Владимир Викторович – доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией эпигенетики ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» им. академика Н. П. Бочкова

#### Ведущая организация:

ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»

Защита состоится «06» апреля 2020 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д.208.014.01 при ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России по адресу: 127486, г. Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59А.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России по адресу: 127486, г. Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59А.

Автореферат разослан « » 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор медицинских наук

И.А. Мушкова

#### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

#### Актуальность проблемы

Кератоконус — это хроническое прогрессирующее дистрофическое заболевание роговицы, характеризующееся её истончением, растяжением, конусовидным выпячиванием, а при далеко зашедшем процессе — помутнением и рубцеванием, приводящим к значительному снижению остроты зрения (Barbara A., 2011).

Несмотря на достаточно широкую распространенность в мире, этиология и патогенез развития кератоконуса до сих пор продолжают активно изучаться, в связи с отсутствием единой подтвержденной теории. Большинством ученых признается генетическая обусловленность возникновения заболевания. По данным публикаций выявлена конкордантность по кератоконусу между монозиготными и дизиготными близнецами, а исследование семейных случаев заболевания показало повышенную частоту его встречаемости у родственников первого порядка (Owens H., 1995; Burdon K.P., 2013; Weed K.H., 2006; Tuft S.J., 2012).

В то же время, крупные исследования в популяциях европейского и азиатского происхождения доказали генетическую гетерогенность кератоконуса, а так же его популяционную специфичность (Bykhovskaya Y., 2012; Bykhovskaya Y., 2016; Нао Н.D., 2013; Nowak D.M., 2015; Iglesias A.I., 2018; Li X., 2012; Loukovitis E., 2018). В Российской Федерации, исследование генетической природы кератоконуса не проводилось, за исключением поиска вариантов в гене *SOD1* в выборке пациентов из Башкортостана (Титоян К.Х., 2017).

В клинической практике диагноз кератоконус выставляется, как правило, исходя из данных врачебного осмотра и результатов инструментального исследования роговицы. При этом субклинические формы кератоконуса являются одной из самых распространенных причин реактивных кератэктазий после лазерных рефракционных вмешательств (Giri P., 2017; Randleman J.B., 2008; Said A., 2011). Понимание механизмов развития кератоконуса и определение

вероятных генетических вариантов, влияющих на его манифестацию, определит новый подход к ранней диагностике данного заболевания и, как следствие, к его лечению.

В настоящее время наиболее распространенными современными методиками кератоконуса являются: кросслинкинг роговичного лечения коллагена (Wollensack G., Spoerl E., 2003), межслойная кератопластика с имплантацией интрастромальных роговичных сегментов (Измайлова С. Б., 2013; Ferrara P., 2002), глубокая передняя послойная кератопластика (ГППК), (Малюгин Б.Э., 2013; Паштаев А.Н., 2017; Anvar M., Teichmann K.D., 2002) и сквозная кератопластика (СКП).

Наиболее распространенными современными методиками лечения кератоконуса являются: кросслинкинг роговичного коллагена (Wollensack G., Spoerl E., 2003), межслойная кератопластика с имплантацией интрастромальных роговичных сегментов (Измайлова С. Б., 2013; Ferrara P., 2002), глубокая передняя послойная кератопластика (ГППК), (Малюгин Б.Э., 2013; Паштаев А.Н., 2017; Anvar M., Teichmann K.D., 2002) и сквозная кератопластика (СКП).

В случае хирургического лечения развитых стадий кератоконуса (III-IV стадии по классификации Амслера-Крумейха) большинство современных хирургов отдает предпочтение передней глубокой послойной кератопластике, ведь ее проведение позволяет сохранить Десцеметову мембрану (ДМ) и эндотелий, что особенно важно, учитывая молодой возраст пациентов (Shimazaki J., 2002; Sarnicola V., 2010). Кроме того, в связи с тем, что данная операция не является процедурой по типу «открытого неба», существенно снижается риск интра- и послеоперационных осложнений (Biggelaar V., 2011; Khattak A., 2018). Выкраивание трансплантата для ГППК возможно осуществить с сохранением ДМ эндотелия донора, что позволяет использовать ИΧ ДЛЯ проведения эндотелиальной кератопластики у другого пациента И, таким образом, существенно снизить расход донорского материала (Heindl L. M., 2010).

Однако несмотря на очевидные преимущества методики, распространение ГППК не стало повсеместным. По данным мировой литературы, даже самые

опытные хирурги не могут полностью исключить интраоперационную перфорацию ДМ, частота которой варьируется в широких пределах от 0% до 30% (Whatson S., 2004; Caporossi A., 2004; Huang O. S., 2019; Mehta J.S., 2019).

Первая послойная кератопластика при кератоконусе была проведена Malbran L. еще в 1965 году. С тех пор были предложены различные варианты и модификации отделения глубоких слоев стромы роговицы от ДМ, направленные на повышение безопасности данной процедуры. Наибольший представляет идея M.Anwar и К.Teichman (2002 г.), предложивших вводить воздух в глубокие слои стромы для ее отделения от ДМ. Данная методика получила название техники «большого пузыря» («БП») или «big-bubble». В неоднократно модифицировалась последующем она И пересматривалась (Малюгин Б. Э., 2014; Shimazaki S., 2002; Fournie P., 2007; Borderie V. M., 2012).

Ряд исследований показал, что при помощи фемтосекундного лазера (ФСЛ) можно частично стандартизировать проведени ГППК, повышая её безопасность и предсказуемость (Chamberlian, W. D. 2011; Lu Y. 2016; Salouti R., 2019). В настоящее время на рынке представлены фемтосекундные установки с различными техническими характеристиками. Однако при использовании высокочастотных ФСЛ с малой энергией в импульсе формируется более гладкая поверхность реза, в отличие от установок с меньшей частотой и большей энергией (Дога А.В. 2016 г., Zhang C., 2012; Cleary C., 2012), что делает их оптимальным выбором для проведения ГППК с фемтосопровождением (ФС).

Несмотря на то, что, по мнению многих авторов, проведение ГППК с ФС процедуру более безопасной И делает данную уменьшает риск послеоперационных осложнений, продолжается поиск новых методик, направленных на еще большее снижение процента перфорации ДМ.

Вышеупомянутые факты обуславливают поиск путей как по совершенствованию методов клинико-генетической диагностики, так и хирургического лечения кератоконуса.

#### Цель исследования

Оптимизировать подходы к диагностике и хирургическому лечению кератоконуса на основе углубленного изучения генетических аспектов развития данного заболевания и разработки модифицированной техники фемтоассистированной кератопластики.

#### Задачи исследования

- 1. Провести генотипирование пациентов российской популяции на наличие вариантов, ассоциированных с кератоконусом, предварительно отобранных по данным анализа литературных источников. На основании результатов генотипирования рассчитать ассоциацию исследованных вариантов с кератоконусом и оценить возможность их использования для уточняющей диагностики заболевания.
- 2. Учитывая результаты, полученные при генотипировании пациентов российской популяции, провести мета-анализ вариантов, ассоциированных с кератоконусом, в выборках пациентов европейского происхождения
- 3. Оптимизировать технику проведения глубокой передней послойной фемто-ассистированной кератопластики с применением низкоэнергетического фемтосекундного лазера и созданием интрастромальных тоннелей для уменьшения количества интраоперационных осложнений, сокращения времени проведения хирургического вмешательства и улучшения клинико-функциональных результатов.
- 4. Провести сравнительный анализ возникших интраоперационных осложнений и оценить безопасность проведения глубокой передней послойной фемто-ассистированной кератопластики, выполненной с использованием стандартной и модифицированной техник с формированием интрастромальных тоннелей.
- 5. Оценить в динамике послеоперационного периода клиникофункциональные результаты передней глубокой послойной фемто-

ассистированной кератопластики у пациентов с кератоконусом, выполненной по стандартной и модифицированной техникам.

#### Научная новизна

- 1. Впервые в российской популяции была определена частота встречаемости вариантов, ассоциированных с кератоконусом: rs1536482 рядом с геном *COL5A1* и rs7044529 в гене *COL5A1*, rs2286194 в гене *HGF*, rs4954218 в гене *MAP3K19*, rs4839200 в гене *KCND3*, rs2721051 вблизи гена *FOXO1*, rs1324183, расположенного между генами *MPDZ* и *NF1B*, и rs121908120 в гене *WNT10A*.
- 2. Была установлена значимая ассоциация вариантов rs1536482 рядом с геном *COL5A1* и rs2721051 вблизи гена *FOXO1* для пациентов с кератоконусом в российской популяции
- 3. По результатам мета-анализа выборок пациентов с кератоконусом европейского происхождения и данных настоящего исследования выявлены низкие значения индекса гетерогенности (*I*<sub>2</sub>) для rs1536482 рядом с геном *COL5A1*, rs7044529 в гене *COL5A1*, rs2721051 вблизи гена *FOXO1* и rs1324183, расположенного между генами *MPDZ* и *NF1B*, (21%, 0%, 0% и 24%, соответственно).
- модифицированная Разработана техника проведения передней глубокой послойной фемто-ассистированной кератопластики лазере с созданием Данная интрастромальных тоннелей. техника характеризуется высоким процентом формирования большого пузыря (64,3%), небольшим процентом Десцеметовой мембраны (7,1%),относительной перфорации простотой выполнения, сокращением времени проведения хирургического вмешательства и высокими клинико-функциональными результатами.
- 5. Впервые проведена сравнительная характеристика клиникофункциональных результатов различных техник фемто-ассистированной передней глубокой послойной кератопластики.

#### Практическая значимость

- 1. Определены молекулярно-генетические варианты (rs1536482 рядом с геном *COL5A1* и rs2721051 вблизи гена *FOXO1*), которые при исследовании образцов венозной крови пациентов позволяют увеличить вероятность обнаружения у исследуемого субъекта кератоконуса в 2,58 раз, что создает базовые предпосылки для дальнейшего углубленного поиска методов генной диагностики данного заболевания.
- модифицированная Разработана техника проведения передней глубокой послойной фемто-ассистированой кератопластики, основанная на создании интрастромальных тоннелей, с последующим введением в них воздуха для отделения стромы от Десцеметовой мембраны. Данная методика сводит к характерные послойной минимуму метода кератопластики ДЛЯ интраоперационные осложнения, сокращает время проведения хирургического вмешательства и обеспечивает высокие клинико-функциональные результаты.
- 3. Использование модифицированной фемто-ассистированной техники с формированием интрастромальных тоннелей дает возможность достижения формирования «большого пузыря» у 64,3% пациентов, на фоне снижения числа интраоперационных перфораций Десцеметовой мембраны до 7,1%.

#### Положения, выносимые на защиту

Варианты rs1536482 рядом с геном COL5A1 и rs2721051 вблизи гена FOXO1, значимо ассоциированные с кератоконусом в российской популяции, не могут быть использованы для уточняющей диагностики заболевания. Однако локусы, в которых они расположены, являются перспективными для дальнейших исследований.

Разработанная и клинически верифицированная техника фемтоассистированной передней глубокой послойной кератопластики с применением низкоэнергетического фемтосекундного лазера, основанная на создании интрастромальных тоннелей для аэрации стромы роговицы и ее отделения от Десцеметовой мембраны, повышает вероятность формирования «большого пузыря», снижает вероятность интраоперационной перфорации Десцеметовой мембраны, сокращает время хирургического вмешательства и обеспечивает высокие клинико-функциональные результаты.

Сравнительный анализ клинико-функциональных результатов фемтоассистированной глубокой передней послойной кератопластики, проведенной по стандартной и модифицированной технике с созданием интрастромальных тоннелей, показал сопоставимые клинико-функциональные результаты, за исключением показателя плотности эндотелиальных клеток, который был ниже в случае выполнения стандартной фемто-ассистированной техники.

#### Внедрение в практику

Разработанная глубокой послойной передней фемтотехника практическую ассистированной кератопластики внедрена В деятельность головной организации и филиалов ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Фёдорова» Минздрава России. Результаты и положения работы включены в программу теоретических и практических занятий на циклах тематического усовершенствования врачей и обучения ординаторов в Научнообразовательном центре ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России.

#### Апробация работы

Основные положения диссертационной работы представлены на всероссийских научно-практических конференциях с международным участием: «Федоровские чтения» (Москва 2018, 2019) и «Современные технологии катарактальной и рефракционной хирургии» (Москва 2019), LXX Конгрессе Делийского Офтальмологического общества (Дели 2019), XXXVII Конгрессе Европейского Общества Катарактальных и Рефракционных хирургов (Париж, 2019), IV Российском национальном конгрессе с международным участием «Трансплантация и донорство органов» (Москва, 2019), еженедельных научно-

практических конференциях ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России (Москва, 2019).

#### Публикации

По материалам исследования опубликовано 3 печатных работы в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации результатов диссертационных исследований. По теме работы получен патент РФ на изобретение № 2695628, от 24 июля 2019 года.

#### Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 148 листах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, 2 глав собственных исследований, обсуждения и заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 25-тью рисунками и 21-ой таблицей. Список литературы содержит 12 отечественных и 208 иностранных источников.

Работа выполнена на базе отдела трансплантационной и оптикореконструктивной хирургии переднего отрезка глаза ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Фёдорова» Минздрава России.

Молекулярно-генетические исследования образцов ДНК пациентов выполнены на базе лаборатории молекулярной генетики человека ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва. Генотипирование пациентов осуществляли в рамках гранта Российского Фонда Фундаментальных исследований «офи\_м»: Конкурс ориентированных фундаментальных исследований по актуальным междисциплинарным темам «Роль генетических и аутоиммунных факторов в патогенезе кератоконуса» №17-29-06077(2017-2019гг.).

#### СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

#### Материалы и методы исследования

Представленная диссертационная работа включает в себя молекулярногенетическое и клинико-функциональное исследования. В рамках молекулярногенетического этапа производили генотипирование 170 пациентов российской популяции на предварительно отобранные по данным литературных источников однонуклеотидные варианты (SNV): rs1536482 рядом с геном и rs7044529 в гене *COL5A1*, rs2286194 в гене *HGF*, rs4954218 в гене *MAP3K19*, rs4839200 в гене *KCND3*, rs2721051 вблизи гена *FOXO1*, rs1324183, расположенный между генами *MPDZ и NF1B*, и rs121908120 в гене *WNT10A*.

В группу I.А вошли 70 пациентов с диагнозом кератоконус, 100 пациентов составили группу I.Б с достоверным его отсутствием.

Всем пациентам, вошедшим в данный этап исследования, проводили комплексное офтальмологическое обследование, а также проводили забор венозной крови, которую хранили в замороженном состоянии (при температуре -20<sub>°</sub> C) с последующим выделением ДНК. Проведение генетического анализа было реализовано методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования по Сэнгеру ПЦР-продуктов.

Полученные в ходе генотипирования российской популяции результаты были проанализированы и в рамках мета-анализа сравнены с данными других популяций европейского происхождения.

Статистический анализ результатов выполняли с использованием программ Microsoft Excel 2017 и StatPlus:mac Pro 6.2.2.0 (Analyst Soft Inc., США). Расчеты и построение диаграмм для мета-анализа происходили с помощью применения пакета программ R- meta.

клинико-функционального была разработана рамках этапа модифицированная фемто-ассистированная техника ГППК. Кроме того, был проведен анализ интраоперационных и функциональных результатов пациентов с (61 ГППК кератоконусом пациент), которым была проведена ПО модифицированной и стандартной фемто-ассистированной техникам.

Фемто-ассистированная ГППК в обеих группах проводилась с использованием низкоэнергетической фемтолазерной установки Femto LDV Z8 (Ziemer Ophthalmic Systems AG, Швейцария).

Пациенты были разделены на две группы:

II.А группа – пациенты с кератоконусом, прооперированные по модифицированной фемто-ассистированной технике ГППК с созданием интрастромальных тоннелей.

П.Б группа – пациенты с кератоконусом, прооперированные по стандартной фемто-ассистированной технике ГППК. С помощью ФСЛ выполнялась трепанация до 60% верхних слоев стромы, после чего расслаивание резидуальной стромы и ДМ проводилось по методике «большого пузыря», предложенной М.Апwar и К.Теісhman (2002 г.), дополненной техникой аэро-вискосепарации (Малюгин Б. Э. 2014 г.).

Всем пациентам, вошедшим в данный этап исследования, проводили комплексное офтальмологическое обследование, включающее авторефрактометрию, визометрию без коррекции и с коррекцией, тонометрию, биомикроскопию, офтальмоскопию, эндотелиальную микроскопию, оптическую когерентную томографию глаза с пахиметрическим картированием, а также кератотопографию с определением индексов SAI (spherical assimetry index, индекс асимметрии поверхности) и SRI (spherical regularity index, индекс регулярности поверхности).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

# Результаты молекулярно-генетических исследований пациентов российской популяции

По результатам генотипирования пациентов российской популяции были получены частоты встречаемости маркерных аллелей восьми вариантов (Таблица 1). Значимая ассоциация с кератоконусом была выявлена только для вариантов rs1536482 рядом с геном *COL5A1* и rs2721051 вблизи гена *FOXO1*. Для данных вариантов были проведены расчеты диагностических параметров с учетом

генотипов в исследуемых І.А и І.Б группах (Таблица 2). Учитывая, что кератоконус чаще всего имеет аутосомно-доминантное наследование, считалось, что вариант присутствует, если у участника была обнаружена хотя бы одна маркерная (в данном случае минорная) аллель.

Таблица 1 — Частота встречаемости маркерного аллеля в группах пациентов российской популяции

Название гена	SNV	Группа І.А n=70	Группа І.Б n=100	pf
	rs1536482	0.450	0.265	0.0004
COL5A1	rs7044529	0.150	0.110	0.2765
HGF	rs2286194	0.293	0.245	0.3254
MAP3K19	rs4954218	0.086	0.075	0.7193
KCND3	rs4839200	0.179	0.220	0.3506
FOX01	rs2721051	0.143	0.060	0.0123
MPDZ-NF1B	rs1324183	0.271	0.185	0.0598
WNT10A	rs121908120	0.021	-	-

Таблица 2 – Показатели чувствительности (SE), специфичности (SP), относительного риска (RR) и отношения шансов (OR) для вариантов, ассоциированных с кератоконусом в выборке пациентов российской популяции

Название гена	SNV	SE	SP	<b>p</b> f	OR	RR
COL5A1	rs1536482	0,671	0,54	0,0078	2,933	1,725
FOXO1	rs2721051	0,286	0,88	0,0091	2,399	1,692
rs1536482 <i>กนดิง</i> rs2721051		0,814	0,5	0,0001	4,385	2,582
rs1536482 + rs2721051		0,143	0,92	0,2125	1,917	1,407

Частота встречаемости хотя бы одной маркерной аллели rs1536482 или rs2721051 были достоверно выше в группе (I.A) у пациентов с кератоконусом, чем в группе (I.Б) – 81,4% против 50%, соответственно (значение pf=0,0001).

Детекция хотя бы одной маркерной аллели rs1536482 или rs2721051 повышала вероятность того, что у исследуемого есть кератоконус в 2,58 раза (RR). Однако коэффициент специфичности равный 0,5 фактически означает, что у здорового человека с наличием хотя бы одной маркерной аллели вероятность возникновения кератоконуса составляет 50%. Маркер с таким показателем

специфичности не может быть применен в клинической практике. На основании полученных результатов оказалось невозможным выделить маркеры, или их комбинацию, которые могли бы быть использованы для уточняющей диагностики кератоконуса.

# Сравнительная характеристика полученных данных с результатами популяции европейского происхождения

Исследование восьми вышеперечисленных вариантов в российской популяции проводилось впервые. В связи с этим было принято решение о проведении мета-анализа для сравнения полученных результатов с другими выборками пациентов с кератоконусом европейского происхождения.

В данном исследовании SNV rs2286194 в гене HGF, rs4954218 в гене MAP3K19 и rs4839200 в гене KCND3 оказались статистически не значимы. Полученные результаты подтверждаются оценкой высокого значения индекса гетерогенности  $I_2$  (> 75%) для данных вариантов в выборках европейского происхождения. Для rs1536482 рядом с геном COL5A1 и rs7044529 в гене COL5A1, rs2721051 вблизи гена FOXO1 значение гетерогенности  $I_2$  было низким (<25%). rs1324183, расположенный между генами MPDZ и NF1B, также имеет низкие значения  $I_2$  (<25%), но в российской выборке не был определен как вариант, ассоциированный с кератоконусом (pf=0,0598).

Среднее значение OR для rs1536482 (рядом с геном *COL5A1*) выше, чем результаты, находящиеся в 95% доверительном интервале (ДИ) других исследований. rs7044529 в гене *COL5A1*, rs2721051 около гена *FOXO1* и rs1324183, расположенного между генами MPDZ и NF1B, находятся в 95% ДИ других исследований.

Таким образом, было обнаружено, что однонуклеотидные варианты rs1536482 рядом с геном *COL5A1* и rs2721051 вблизи гена *FOXO1* по данным мета-анализа популяций европейского происхождения имеют сопоставимые с настоящим исследованием результаты, что делает локусы, в которых они расположены, перспективными для дальнейших исследований.

# Разработка модифицированной техники фемто-ассистированной ГППК с созданием интрастромальных тоннелей

Предложенная модифицированная техника проведения фемтоассистированной ГППК заключалась в следующем: для формирования ложа трансплантата с помощью низкоэнергетического ФСЛ выкраивают роговичный лоскут, при этом ламеллярный рез роговицы выполняют концентрично лимбу на глубину 60% от толщины роговицы реципиента, в самом тонком ее месте, с диаметром от 6 мм до 9 мм, с одновременным формированием интрастромального тоннеля, берущего начало от основания сформированного ложа.

Тоннель иметь любое расположение, может однако чаще всего располагается на 3-х, 9-ти или 12-ти часах, для удобства введения воздуха, в зоне с диаметром от 5,5 до 7,5 мм, под углом 45-65 градусов по направлению к центру роговицы, ширина каждого тоннеля 0,6 мм, длина 90-150 мкм. После окончания работы фемтосекундного лазера, верхние слои стромы удаляют пинцетом, тоннель раскрывают с помощью шпателя, и в него, используя канюлю 27G, вводят стерильный воздух для формирования воздушного пузыря и расслоения остаточной стромы и ДМ для формирования «большого пузыря» («БП»). Заканчивают операцию как стандартную переднюю глубокую послойную кератопластику с наложением обвивного шва.

особенностях конфигурации Останавливаясь на интрастромального тоннеля, стоит отметить, что, учитывая толщину остаточной стромы на границе с ДМ, длина (глубина) тоннеля колебалась в диапазоне от 90 до 150 мкм. Такая длина была выбрана не случайно, так как, по нашим наблюдениям, при глубине менее 90 мкм могло пройти прорезывание тоннеля при попытке введения в него воздуха. Длина более 150 мкм была чрезмерной, в этом случае воздух не всегда достигал ДМ. Ширина каждого тоннеля была 0,6 мм, что оптимально соответствовало ширине офтальмологического шпателя и канюли 27 G, с помощью которой осуществляется введение стерильного воздуха, а расположение тоннелей под углом 450-650 по направлению к центру позволяло наилучшим образом достигнуть ДМ. Пример интерфейса работы лазера с созданием интрастромального тоннеля (данные получены с интегрированного в установку оптического когерентного томографа) представлен на рисунке 1.

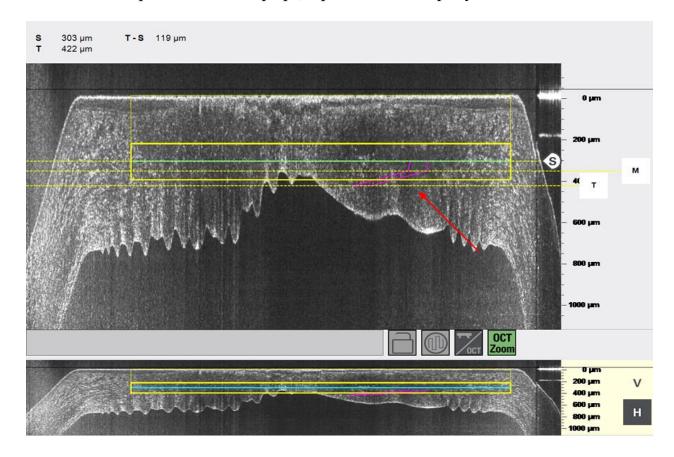


Рисунок 1 — Интерфейс работы лазера Femto LDV Z8. Визуализируется интрастромальный тоннель, обращенный к ДМ (отмечен красной стрелкой) для последующего введения в него воздуха и формирования «большого пузыря»

В связи с возможностью применения интегрированной системы ОКТ на данной лазерной установке существует возможность формирования тоннеля в центральной зоне роговицы, рядом с зоной наибольшего истончения и на оптимальной глубине. Заданная глубина (не мене чем на 100 мкм выше ДМ) позволяет избежать слишком поверхностного введения воздуха и аэрации слоев стромы, что в дальнейшем делает формирование «БП» невозможным. Также отсутствует необходимость применения острого инструмента (иглы) для введения воздуха в глубокие слои стромы.

# Анализ интраоперационных осложнений фемто-ассистированной ГППК, проведенной по различным техникам

В общей сложности, из 28 кератопластик, оперированных по предложенной нами модифицированной технике (II.А группа), в 64,3% (18 глаз) «БП» сформировался, разделение резидуальной стромы и ДМ произошло на этапе введения воздуха в интрастромальный тоннель. «БП» не сформировался на 10 глазах (35,7%). В этом случае осуществляли переход к мануальному расслаиванию резидуальной стромы до ДМ. Переход на инструментальную технику выделения ДМ позволил завершить глубокую послойную кератопластику в 92,9% (26 из 28) случаев. В 2 случаях (7,1%) в процессе расслаивания резидуальной стромы произошла перфорация ДМ и конвертация операции в СКП.

В случае проведения фемто-ассистированной ГППК по стандартной технике в группе II.Б (без формирования интрастромальных тоннелей) процент перехода на мануальную технику был значительно выше и составил 63,6% (16 глаз), а центральный разрыв ДМ и, как следствие, переход на СКП произошел в 15,1% (5 глаз) случаев.

Согласно проведенному анализу частоты формирования «БП» в обеих группах, p=0.04087 (p<0.05), что говорит о том, что частота формирования «БП» статистически значимо выше во II.А группе, где проводилось создание интрастромальных тоннелей.

#### Анализ продолжительности хирургического вмешательства

Среднее время продолжительности манипуляции в группе II.Б составило 27  $\pm 15$  минут, в то время как в группе II.А -  $18 \pm 9$  минут. Таким образом, средняя продолжительность операции была статистически значимо выше в группе II.Б (p<0,05). Увеличенная средняя продолжительность операции в данной группе напрямую связана с большим количеством операций, выполненных с мануальным выделением ДМ.

Таким образом, формирование «БП» не только снижает количество интраоперационных осложнений, но также существенно сокращает время

проведения хирургического вмешательства и, как следствие, время пребывания пациента в наркозе.

# Результаты клинико-функциональных исследований пациентов после фемто-ассистированной ГППК, выполненной по различным техникам

В связи с тем, что целью данной части исследования стала оценка результатов фемто-ассистированной ГППК, проведенной по различным техникам, из анализа предварительно были исключены пациенты, которым в связи с возникновением перфорации ДМ осуществляли конвертацию в СКП (2 пациента в группе II.А и 5 пациентов в группе II.Б).

В послеоперационном периоде в обеих группах наблюдались следующие осложнения, представленные в таблице 3.

Таблица 3 – Послеоперационные осложнения пациентов обеих групп после проведения фемто-ассистированной ГППК

Послеоперационное осложнение	II. А группа (n=26)	II. Б группа (n=28)
Синдром Урретс-Завалия	1 (3,8%)	2 (7,1 %)
Герпетический кератит	1 (3,8%)	0
Ослабление роговичного шва	0	1 (3,5%)
Вторичная гипертензия	1 (3,8%)	2 (7,1%)

Восстановление прозрачности роговицы с полным купированием дооперационной симптоматики пациентов достигнуто в 98,15% случаях (53 глаза). Исключением стал 1 случай развития герпетического кератита с возникновением облаковидного помутнения в исходе.

В обеих группах в послеоперационном периоде выявлено увеличение показателей НКОЗ по сравнению с дооперационными значениями (p<sub>n</sub><0,05). При проведении сравнительного анализа средних значений НКОЗ между группами в указанные сроки наблюдения: 7 дней 1, 3, 6, 12 и 18 мес., статистически значимых различий между группами зафиксировано не было (p>0,05). Данные НКОЗ и МКОЗ пациентов обеих групп представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Показатели остроты НКОЗ и МКОЗ зрения пациентов обеих групп в динамике ( $M\pm\sigma$ )

Срок наблюдения	II.А группа (n=26)		II.Б группа (n=28)		
	НКО3	МКО3	НКО3	МКО3	
Исходно	0,05±0,03	0,09±0,08	0,05±0,07	0,1±0,07	
7 дней (р>0,05)	0,1±0,06	0,2±0,11	0,16±0,08	0,19±0,12	
1 мес (p>0,05)	0,1±0,08	0,31±0,19	0,16±0,06	0,23±0,15	
3 мес (p>0,05)	0,14±0,11	0,35±0,17	0,17±0,08	0,33±0,15	
6 мес (р>0,05)	0,20±0,19	0,42±0,20	0,15±0,07	0,36±0,14	
12 мес (р>0,05)	0,15±0,12	0,46±0,21	0,17±0,09	0,48±0,19	
18 мес (р>0,05)	0,25±0,19	0,51±0,17	0,23±0,12	0,53±0,14	

<sup>\*</sup> р – оценка t-критерия Стьюдента для несвязанных совокупностей

Было проведено пахиметрическое картирование роговицы на приборе ОКТ. Во II.А группе значение минимальной пахиметрии до операции составило  $357,29\pm31,22$  мкм, а через 1 год после операции  $513,38\pm28,17$  мкм (pn<0,05). В группе II.Б данные значения составили  $369,13\pm33,65$  мкм и  $511,25\pm25,41$  мкм соответственно (pn<0,05). Данные послеоперационной пахиметрии свидетельствуют о восстановлении физиологической толщины роговицы в обеих группах до нормальных показателей (p>0,05) (Таблица 5).

Таблица 5 – Показатели толщины роговицы в самой тонкой точке. Данные с прибора ОКТ получены в обеих группах на сроке наблюдения 18 месяцев (М±σ)

Срок наблюдения	II.А группа (n=26), мкм	II.Б группа (n=28), мкм
До операции	357,29±31,22	369,13±33,65
1 месяц (р>0,05)	525,45±39,75	526,24±36,74
3 месяца (р>0,05)	530,92±33,10	510,35±41,02
6 месяцев (р>0,05)	521,47±37,91	507,77±26,61
12 месяцев (р>0,05)	513,38±28,17	511,25±25,41
18 месяцев(р>0,05)	519,00±26,72	523,00±26,02

<sup>\*</sup>р – оценка t-критерия Стьюдента для несвязанных совокупностей

В послеоперационном периоде у пациентов всех групп также проводили эндотелиальную микроскопию с подсчетом плотности эндотелиальных клеток. Дооперационные значения ПЭК составили в II.А группе 2127,1±434,9 кл/мм2 и во П.Б 2357,2±386,2 группе кл/мм2 соответственно. Было зафиксировано невыраженное, но постепенное снижение ПЭК роговицы (Таблица 4). При проведении сравнительного анализа между группами на сроках наблюдения 1, 3 и 6 месяцев, статистически значимых различий между группами выявлено не было (р>0,05). Однако, при анализе потери ПЭК в отдаленные сроки наблюдения была выявлена статистически значимая потеря клеток во ІІ.Б группе на сроке 12 и 18 по сравнению с дооперационными значениями, 16% и соответственно (p<sub>n</sub><0,05). Показатели ПЭК и динамика ее потери в разные сроки после операций представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Динамика потери ПЭК в процентах у пациентов обеих групп на различных сроках наблюдения по сравнению с дооперационными значениями ( $M\pm\sigma$ )

Срок наблюдения	<b>II.A группа</b> (n = 26)		II.Б группа (n = 28)		
	Потеря ЭК (%)	кл/мм 2	Потеря ЭК (%)	кл/мм 2	
До операции	-	2127,1±434,9	-	2357,2±386,2	
1 месяц	6%	1999,8±442,8	8%	2169,7±391,1	
3 месяца	6,5%	1987,0±398,9	9%	2143,5±448,4	
6 месяцев	9,3 %	1929,7±440,1	14%	2025,4±418,3	
12 месяцев	10%	1916,3±313,4	16%**	1981,1±367,3	
18 месяцев	10,7%	1899,2±398,2	16,5%**	1965,2±388,5	

<sup>\*</sup>рп— оценка t-критерия Стьюдента для связанных совокупностей

После проведенного хирургического лечения было зафиксировано статистически значимое изменение индексов SAI (индекс асимметрии поверхности) и SRI (индекс регулярности поверхности) в обеих группах.

<sup>\*\*</sup>pn<0,05

Сравнивали дооперационные значения, а также значения, полученные через несколько месяцев (минимум 3) после снятия обвивного роговичного шва.

Значение индекса SAI снизилось по сравнению с дооперационными значениями и составило в среднем 1,27±0,80 – в группе II.А и в группе II.Б  $1,21\pm0,72$  (p<sub>n</sub><0,05) через 18 месяцев после операции (дооперационные значения  $4,12 \pm 1,61$  и  $3,54\pm 1,89$  соответственно). Индекс SRI до операции составил в среднем  $2,08\pm0,48$  – в II.А и  $2,11\pm0,52$  в группе II.Б. В норме его значения не превышают 1, таким образом, результаты  $1,13\pm0,62$  и  $1,14\pm0,51$ , полученные в группах II.А и II.Б соответственно, через 18 месяцев после операции, свидетельствуют о регулярности роговичной поверхности в оптической зоне и статистически значимых изменениях ПО сравнению cдооперационными значениями (pn<0,05). Данные были сопоставимы в II.А и II.Б группах (p>0,05).

Анализируя вышеизложенные сравнительные результаты, стоит отметить, что существенных различий в полученных клинико-функциональных результатах хирургического лечения пациентов, кроме более выраженной потери ПЭК на отдаленных сроках наблюдения в группе П.Б, не наблюдали. На основании вышеизложенного, мы полагаем, что проведение фемто-ассистированной ГППК с созданием интрастромальных тоннелей является наиболее рациональной техникой, которая увеличивает вероятность формирования «БП», снижает риск перфорации ДМ, сокращает время проведения хирургического вмешательства и время пребывания пациента в наркозе, а также технически легче выполнима для хирурга.

#### выводы

1. В ходе генотипирования пациентов российской популяции выявлена значимая разница в частоте встречаемости среди больных кератоконусом только для rs1536482 рядом с геном *COL5A1* и rs2721051 вблизи гена *FOXO1*. Детекция искомых вариантов в генах COL5A1 и FOXO1 повышает вероятность того, что у исследуемого есть кератоконус в 2,58 раза (RR), Однако комбинация данных вариантов обладает низким значением параметра специфичности (SP = 0,50), что

- в настоящее время делает невозможным их применение в клинической практике для уточняющей диагностики кератоконуса.
- 2. На основании проведенного мета-анализа определено, что индекс гетерогенности величины эффекта *I*<sup>2</sup> (отношения шансов) rs1536482 рядом с геном *COL5A1*, и rs2721051 вблизи гена *FOXO1* является низким (21% и 0%, соответственно) в выборках европейского происхождения и российской популяции, что делает локусы, в которых они расположены, перспективными для дальнейших исследований.
- 3. Разработана и оптимизирована модифицированная техника проведения передней глубокой послойной фемто-ассистированной кератопластики с созданием интрастромальных тоннелей, позволяющая уменьшить количество интраоперационных осложнений, сократить время проведения хирургического вмешательства, а также получить высокие клинико-функциональные результаты.
- 4. Частота успешного формирования «большого пузыря» в ходе отделения глубоких слоев стромы от ДМ реципиента была статистически значимо выше во II.А группе, где операцию проводили по модифицированной технике с формированием интрастромальных тоннелей. «Большой пузырь» был сформирован в 64,3% в II.А группе, что примерно в 1,7 раза чаще, чем в II.Б группе, где данный показатель составил 36,4% (р<sub>f</sub>= 0.04087, p<0,05).
- 5. Проведение фемто-ассистированной ГППК с применением различных техник является эффективным методом, позволяющим получить высокие биологические результаты: в 53 случаях из 54 (98, 1%) было зафиксировано приживление трансплантата прозрачное c минимальным количеством осложнений в сроки до 18 месяцев. Значения НКОЗ, МКОЗ а также центральной толщины трансплантата значимо увеличились в обеих группах по сравнению с дооперационными значениями (p<sub>n</sub><0,05), однако достоверной разницы между группами зафиксировано не было (р>0,05). Результаты сравнительного анализа индексов асимметрии поверхности (SAI) и индекса регулярности поверхности (SRI) показали уменьшение данных показателей в обеих группах в отдаленном периоде по сравнению с дооперационными значениями (p<sub>n</sub><0,05). Результаты

динамического наблюдения потери плотности эндотелиальных клеток на сроке 18 месяцев показали снижение ПЭК на 10,7% во II.А группе (p<sub>n</sub>>0,05) и 16,5% в II.Б группе (p<sub>n</sub><0,05) по сравнению с дооперационными значениями.

#### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

- 1. При проведении фемто-ассистированной ГППК целесообразно отдать предпочтение модифицированной технике с формированием интрастромальных тоннелей в связи с меньшим количеством интраоперационных осложнений и сокращением времени нахождения пациента в наркозе.
- 2. При формировании интрастромальных тоннелей, следует выбирать локализацию входа в тоннель на 12 или 15 часах для удобства введения воздуха.
- 3. Между окончанием тоннеля и ДМ должно быть не менее 100 мкм для снижения риска перфорации и минимизации лазерного воздействия на эндотелий.
- 4. Длина интрастромального тоннеля для введения воздуха должна быть не менее 90 мкм и не более 150 мкм для наилучшего достижения воздухом ДМ и профилактики прорезывания стенок тоннеля.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1. Белодедова, А. В. Передняя глубокая послойная кератопластика с фемтосопровождением и созданием интрастромальных тоннелей для формирования «большого пузыря» у пациентов с кератоконусом. Первые клинико-функциональные результаты / А. В. Белодедова, О. П. Антонова, Б. Э. Малюгин // Практическая медицина. 2018. Т.16, № 4. С. 13-17.
- 2. Белодедова, А. В. Поиск генетических маркеров для уточняющей диагностики кератоконуса / А. В. Белодедова, Л. О. Скородумова., Б. Э. Малюгин и др. // Биомедицинская химия. 2019. Т. 65, № 1. С. 9-20.
- 3. Белодедова, А. В. Применение современных технологий как способ рационального использования донорского материала: модифицированная техника передней глубокой послойной кератопластики с фемтосопровождением / А. В.

Белодедова, О. П. Антонова, Б. Э. Малюгин // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21, № S. – С. 143.

- 4. Belodedova, A. Clinical outcomes of OCT-guided femtosecond laser-assisted DALK with intracorneal channel to create big bubble / O. Antonova, A. Gelyastanov, B. Malyugin et al. // XXXVII Congress of the European Society of Cataract and Refractive Surgeons (ESCRS). Paris, 2019. (электронный ресурс).
- 5. Belodedova, A. OCT-guided femtosecond laser-assisted DALK with intracorneal channel to create big bubble: a case series / O. Antonova, I. Eletin, B. Malyugin // Delhi Ophthalmological Society Congress 2019 Delhi, 2019. (электронный ресурс).

#### ПАТЕНТ РФ НА ИЗОБРЕТЕНИЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Малюгин Б.Э., Белодедова А.В., Елетин И. К. Способ проведения передней глубокой послойной кератопластики с применением низкоэнергетического фемтосекундного лазера Патент РФ № 2695628. Опубл. 24.07.2019 Бюл. № 21 (Приоритет от 26.07.2018).

#### БИОГРАФИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

Белодедова Александра Владимировна, 1990 года рождения, в 2014 г. окончила Медицинский институт Российского университета дружбы народов по специальности «Лечебное дело».

В период с 2014 по 2016 гг. проходила ординатуру по специальности «Офтальмология» на базе кафедры глазных болезней Медицинского института Российского университета дружбы народов. С 2016 по 2019 г. обучалась в очной аспирантуре по специальности «Глазные болезни» на базе отдела трансплантационной и оптико-реконструктивной хирургии переднего отрезка глазного яблока в ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Автор 9 научных работ: из них 3-x-в журналах, рецензируемых ВАК РФ, и 3-x-в иностранных журналах; 2-x патентов РФ на изобретение.

За время обучения в аспирантуре являлась участником проектов, поддержанных грантами Российского Фонда Фундаментальных исследований - «Роль генетических и аутоиммунных факторов в патогенезе кератоконуса» №17-29-06077 (2017-2019 гг.), а также Российского научного фонда — «Изучение патогенетической роли экспансии тринуклеотидных повторов гена ТСF4 в развитии первичной дистрофии эндотелия роговицы Фукса» № 17-75-10158 (2017-2019 гг.).

## СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

«БП» большой пузырь, «big bubble»

ГППК глубокая передняя послойная кератопластика

ДИ доверительный интервал

ДМ Десцеметова мембрана

МКОЗ максимальная корригированная острота зрения

МКМ микрометры

НКОЗ некорригированная острота зрения

ОКТ оптическая когерентная томография

ПЭК плотность эндотелиальных клеток

ТДМ трансплантация Десцеметовой мембраны

ФСЛ фемтосекундный лазер

СКП сквозная кератопластика

AUC (area under curve) площадь под кривой

 $I_2$  индекс гетерогенности

**М** (Mean) среднее арифметическое

OR (Odds Ratio) отношение шансов

р t-критерий Стьюдента для связанных совокупностей

**p**<sub>n</sub> t-критерий Стьюдента для связанных совокупностей

рғ коэффициент достоверности по Фишеру

**RR** (Relative Risk) относительный риск

SAI (spherical assimetry index) индекс асимметрии поверхности

SE (Sensetivity) чувствительность

SNV (Single nucleotide variant) однонуклеотидный вариант

SP (Specifity) специфичность

SPE (spherical equivalent) сферический эквивалент

SRI (spherical regularity index) индекс регулярности поверхности

σ среднее квадратическое отклонение