ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«МЕЖОТРАСЛЕВОЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС
«МИКРОХИРУРГИЯ ГЛАЗА» ИМ. АКАД. С.Н.ФЕДОРОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ГОРОХОВА МАРИЯ ВАЛЕРЬЕВНА

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

14.01.07. – глазные болезни

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
профессор Малюгин Б.Э

Москва - 2017

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ 4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 12
1.1 Этиология язв роговицы и факторы способствующие язвообразованию 12
1.2 Механизм язвообразования 15
1.3 Лечение язв роговицы 16
1.4 Основные направления подготовки донорского материала для кератопластики 19
1.5 Особенности строения коллагена роговицы 22
1.6 Кросслинкинг роговичного коллагена. История вопроса. Механизм действия 24
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 33
2.1 Дизайн исследований 33
2.2 Методы экспериментальных исследований 34
2.2.1. Экспериментальное изучение временных параметров насыщения раствором рибофлавина стромы донорской роговицы 36
2.2.2. Экспериментальное исследование степени выраженности отека кросслинкинг модифицированного донорского материала 38
2.2.3. Экспериментальное исследование предела прочности кросслинкинг модифицированной донорской роговицы 39
2.2.4. Исследование химической устойчивости кросслинкинг модифицированного донорского материала 40
2.3 Клинико-функциональные методы исследования 41
2.3.1. Методы обследования пациентов 43

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ 48
3.1 Гистоморфологическое изучение донорской роговицы 49
3.2 Результаты изучения временных параметров насыщения раствором рибофлавина стромы донорской роговицы методом спектроскопии диффузного отражения 51
3.3 Результаты исследования влияния метода кросслинкинг на степень выраженности отека донорской роговицы методами торсионного взвешивания и оптической когерентной томографии переднего отрезка глаза 53
3.4 Результаты исследования влияния кросслинкинга на биомеханические свойства донорской роговицы 59
3.5 Результаты изучения влияния кросслинкинга на химическую устойчивость донорской роговицы к протеолитическим ферментам методом электронной микроскопии 61
3.6 Способ подготовки донорского трансплантата для кератопластики 65
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ 68
4.1 Результаты дооперационного обследования пациентов 69
4.2 Техника хирургического лечения пациентов 77
4.2.1. Особенности проведения сквозной кератопластики 77
4.2.2. Особенности проведения глубокой послойной кератопластики 79
4.3 Факторы, осложняющие хирургические манипуляции 81
4.4 Ведение послеоперационного периода 82
4.5 Результаты хирургического лечения пациентов 83
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 99
ВЫВОДЫ 111
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ 113
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 114
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 115

ВВЕДЕНИЕ

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. Исходы кератопластики неоднородны и зависят от целого ряда факторов: исходной патологии роговицы реципиента, наличия сопутствующей патологии, качества и способа подготовки донорского материала, техники и объема хирургического вмешательства, течения послеоперационного периода, частоты рецидивов при наличии хронического заболевания глаза, количества кератопластик в анамнезе (Малюгин Б.Э., 2012; Мороз 3. И. и др., 2007).

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 течение 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 в большей мере 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.

Немецкие ученые Spoerl E., Wollensak G. в 2004-м году проводили экспериментальные исследования, которые подтвердили повышение

устойчивости роговицы после комбинированного воздействия рибофлавина и ультрафиолетового излучения.

Метод кросслинкинга в настоящее время широко используется в лечении начальных стадий кератоконуса, буллезной кератопатии, поверхностных язвах роговицы (Измайлова С.Б., 2014; Ченцова Е.В. и др., 2016).

В литературе имеются немногочисленные работы использования метода кросслинкинга в подготовке донорского материала в эксперименте при подготовке роговично-протезного комплекса на глазах кроликов (Шипунова А.В., 2012).

Изучение литературы по данной проблеме свидетельствует о том, что все экспериментальные работы были проведены на нативных донорских роговицах, не изучены биофизические и биохимические свойства консервированной донорской роговицы, изменение и стабильность этих свойств после воздействия кросслинкинга. Также имеются лишь единичные данные об использовании кросслинкинга для кератопластики (Медведев М.А. и др., 2013).

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 нами 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 результатов исследования

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.

Основные 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 результатов исследования в практическую деятельность

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.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 14 статей, из них 4 статьи в журналах, рецензируемых Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ и 1 статья в иностранной печати. 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Язва роговицы – деструктивно- воспалительно- некротический процесс в роговой оболочке глаза, сопровождающийся образованием кратерообразного язвенного дефекта с расплавлением эпителия и частично стромы роговицы. По данным литературы, в 70% случаев поражения роговицы протекают с изъязвлением передней поверхности [26]. Глубокие язвы роговицы составляют одну из наиболее тяжелых патологий ввиду риска перфорации роговицы и инфицирования глазного яблока с развитием эндофтальмита и гибелью глаза.

1.1 Этиология язв и факторы способствующие язвообразованию

Авторы выделяют инфекционные и асептические или стерильные язвы роговицы [14]. К факторам, вызывающим инфекционные язвы относят бактерии, вирусы и грибы. Асептические язвы представляют большой практический интерес ввиду их рецидивирующего характера и частых осложнений. Этиологическими факторами стерильных язв являются: синдром сухого глаза, нейротрофическая кератопатия (например, в результате перенесенной герпетической инфекции), нейропаралитическая кератопатия (при параличе 7 пары черепных нервов), кератопатия на фоне рубцового лагофтальма, аутоиммунные заболевания (чаще всего при ревматоидном артрите) [49].

В литературе всегда уделялось большое внимание значительной роли микробного фактора в развитии инфекционного процесса, так как особенности течения инфекционного процесса любой локализации, в том числе и в роговице, зависят от вида возбудителя, вызвавшего данное заболевание [27, 61]. По данным Rocha G.A. и соавт., проводивших ретроспективный анализ этиологии инфекционных язв роговицы за 2005–2009 гг., лишь у 28,9% из всех пациентов, которым проводилось микробиологическое исследование, был выявлен рост микроорганизмов. Наиболее частыми возбудителями бактериального процесса

были: Staphylococcus aureus (30,6%), Staphylococcus epidermidis (30,6%), Streptococcus spp. (9,4%) и Pseudomonas spp. (9,43%) [129]. В России в исследовании, проведенном Бобковой Т.Г и соавт. в 2008 году, у пациентов с язвенными поражениями роговицы микрофлора была выявлена в 73% случаев. Первое место в этиологии язвенных кератитов принадлежало эпидермальному стафилококку (21%), кроме того, выделен протей и энтерококк (2%), синегнойная палочка (3,5%), в единичных случаях были выделены коринебактерии и золотистый стафилококк. В 28% случаев микрофлора не была выявлена, причем на глазах с явным гнойным процессом [3, 31, 37, 56, 73]. Тенденции в изменении состава микрофлоры при бактериальном язвенном кератите, изменение пропорции штаммов, резистентных к антибиотикам, требуют постоянного мониторинга состава и количества бактериальной микрофлоры, что имеет принципиальное значение для оптимизации этиотропной терапии заболевания [59, 77, 114].

Изъязвления роговой оболочки, вызванные вирусом простого герпеса, составляют по некоторым данным до 55,4% от всех язвенных поражений роговицы. В развитии заболевания имеет значение состояние общего и местного иммунитета; что в значительной степени определяет характер течения и тяжесть патологического процесса [34]. Использование новых методов диагностики, появление новых противовирусных средств, снижение частоты бесконтрольного применения кортикостероидов в качестве монотерапии, несомненно, способствовало снижению числа тяжелых деструктивных форм герпетического кератита. [25, 26]

Трагедия грибковых форм поражения роговицы связана, прежде всего, с тем, что грибковая природа инфекции не всегда бывает распознана сразу. Обычно проходит время неэффективных попыток лечения, при этом состояние безнадежно ухудшается, прежде чем начнется специфическая противогрибковая терапия. К факторам риска грибковых поражений роговицы относятся: местная кортикостероидная терапия, травма роговицы, контактные линзы, местное

длительное применение антибиотиков, противовирусных средств, анестетиков, хронические воспалительные заболевания глаз, сухой кератоконъюнктивит, рецидивирующие эрозии роговицы, системные заболевания (диабет, атопический дерматит и др.). Поражения роговицы могут вызывать различные грибы, при язве выделено более 70 видов грибов. Candida spp вызывает кератит, отличающийся глубокой торпидной язвой с подрытыми и утолщенными краями, развивается медленно, захватывая почти всю роговицу. Из всех выделенных грибковых возбудителей 25,3% составили Aspergillus spp, которые относятся к числу самых частых причин развития язвенных кератитов [34, 35, 36].

В настоящее время все чаще приходится сталкиваться с состояниями, когда нарушения слезообразования возникают не в силу особенностей организма человека или естественных причин, а являются спровоцированными или индуцированными. Различные факторы, в том числе пересадки роговицы, инфекционные, аллергические, метаболические заболевания глаз приводят к вторичным нарушениям слезообразования [95, 96, 106]. Вторичный (индуцированный) сухой глаз следует рассматривать как отдельное заболевание с вариацией различных клинических форм и, соответственно, с четко определенными алгоритмами терапии [7, 8, 9, 10, 32, 33, 82, 83, 86, 88, 105, 115, 116, 124, 125, 126, 130, 134, 142]. Именно нарушение защитной прероговичной слезной пленки создает благоприятные условия для развития вторичной бактериальной, вирусной, грибковой патологии роговицы. К тому же при синдроме «сухого глаза» наряду с легкими формами, сопровождающимися только выраженным дискомфортом, встречаются и особо тяжелые клинические формы, к которым относятся: изъязвления или перфорации роговицы ксеротического генеза [6, 20, 71]. Ксеротическая язва роговицы характеризуется прогрессирующим течением (зачастую - несмотря на активные терапевтические мероприятия) и достаточно часто осложняется десцеметоцеле и макро- и микроперфорациями роговицы, что приводит к резкому снижению зрения, слепоте, гибели глазного яблока.

К факторам риска развития язв роговицы относятся также неполное смыкание век (тиреотоксикоз с выраженной эндокринной офтальмопатией, состояние после черепно-мозговой травмы, удаления опухоли мозга или острого нарушения кровообращения, сопровождающегося параличом VII пары черепно-мозговых нервов и др.); соматические заболевания, при которых необходим длительный прием кортикостероидных препаратов, цитостатиков (бронхиальная астма и др.); сахарный диабет в стадии суб- и декомпенсации и другие заболевания, приводящие к иммунодефициту. За последние годы отмечается увеличение частоты системных заболеваний соединительной ткани. Патология органа зрения при таких клинически разных системных заболеваниях как ревматоидный артрит, болезнь Шегрена, системная красная волчанка, системная склеродермия, болезнь Бехчета встречается у 30-100% больных [30, 60, 61, 62].

1.2 Механизм язвообразования

Глубокие язвы роговицы составляют одну из наиболее тяжелых патологий ввиду риска перфорации роговицы, инфицирования глазного яблока с развитием эндофтальмита. Трудность лечения данных состояний роговицы обусловливается многогранностью патогенетического механизма язвообразования. Проникновение в роговицу инфекционного агента приводит к образованию инфильтрата, а воздействие же на воспаленную роговицу токсинов и протеолитических ферментов микроорганизма, особенно на фоне трофических и /или иммунных нарушений, определяет распад инфильтрата с отторжением эпителия и образованием язвы. В то же время доказано, что внедрение микробного фактора в роговицу и его токсинов индуцирует активацию и/или освобождение из макрофагов эпителиальных, стромальных и прочих клеток множества собственных литических ферментов, вызывающих деструкцию стромы [107, 135]. Регуляция деятельности протеаз происходит через сыворотку крови, поскольку в

ней обнаружены белки с антипротеазной активностью подавляющие действие трипсина, коллагеназы и других протеаз [3, 74].

Проценко А.А., Оприжко В.В., Нестеров Е.И. в 1981 году установили, что бактериальная интоксикация ведет как к активации ферментов протеолиза в очаге воспаления, так и к функциональной недостаточности их ингибиторов [50].

Протеолитические ферменты не только разрушают коллагеновые фибриллы, но и разрушают фибронектин-гликопротеин межклеточного вещества. Последний содержится в плазме крови и при развитии воспалительного процесса проникает в ткани. Он способствует миграции эпителиальных клеток в область изъязвления, упрочнению межклеточных контактов и скорейшей эпителизации дефекта [123]

Следует, однако, учитывать аваскулярную природу роговицы и вследствие этого трудность проникновения к язвенному дефекту сывороточных антипротеаз, а также необходимых для процесса заживления мигрирующих фибробластов и фибронектина, других трофических компонентов крови.

Вышесказанное позволяет характеризовать язвенный процесс в роговице как непрерывную самоподдерживающую деструкцию [18].

1.3 Лечение язв роговицы

Главное место в консервативном лечении рецидивирующих эрозий и язв роговицы занимает антибактериальная, противовирусная, метаболическая и слезозаместительная терапия, направленная на улучшение трофики и ускорение эпителизации роговицы [52, 54, 55, 57, 99, 103]. Однако, консервативные методы лечения эффективны лишь при условии купирования этиологического фактора повреждения, например, лагофтальма, либо используются как подготовительный этап к последующей операции [71, 73, 78, 82, 100]. В остальных случаях, при длительном и упорном течение процесса, а также при рецидивирующем характере заболевания прибегают к хирургическому лечению [53, 75, 140].

В различное время с целью восстановления и герметизации дефектов роговицы применялись различные материалы: роговица, склера, амнион, ахориоаллантоисная пленка, аллоплант, твердая мозговая оболочка, конъюнктива, биологический клей и другие материалы [13, 15, 16, 17, 19, 45, 48, 63, 68, 73, 104]. При длительной персистенции язвы роговицы, а также в случаях перфорации роговицы, чаще всего выполняется с органосохранной целью сквозная или послойная лечебная кератопластика , а также эпикератопластика. При сопутствующем синдроме «сухого глаза», кератопластика комбинируется с постоянной блефарорафией [16, 52]. Красновым М.М. с соавт. в 1989-м году предложена операция стромопластики [29]. По мнению авторов, данный метод обладает преимуществами как послойной, так и сквозной кератопластики и удобен ввиду своей технической простоты и надежности. Как дополнение к проводимой кератопластике для улучшения эффекта применяется операция временной тарзорафии, либо «кровавой тарзорафии», которая показана при ксеротической язве роговицы, осложненной десцеметоцеле или перфорацией [27].

В настоящее время наряду с лечебной кератопластикой используется метод конъюнктивальной пластики роговицы. Аутоконъюнктивальная пластика роговицы с жесткой фиксацией лоскута является операцией выбора при показаниях к экстренной кератопластике, когда отсутствует донорский материал [46, 47].

В последнюю четверть века в качестве материала для биопокрытия роговицы применяется амнион [27, 67, 72]. Амниотическая оболочка является доступным биоматериалом, и представляет собой биогенный стимулятор с множеством уникальных свойств. Консервированную силиковысушенную амниотическую мембрану применяют для лечения больных с глубокими несквозными дефектами роговицы на фоне воспалительных и трофических повреждений и травмами роговицы [40, 12, 80, 81]. Перечисленные методы закрытия дефектов роговицы широко распространены в офтальмологической практике. Однако, при персистенции этиопатогенетического фактора

повреждения роговицы, эти методики имеют временный органосохранный эффект, и актуальны лишь с ургентной целью. При продолжении влияния фактора повреждения известные методики трансплантации роговицы не предотвращают развития рецидивов в последующем, то есть не обладают профилактическим, противорецидивным эффектом. Несмотря на совершенствование микрохирургической техники, отбора и защиты донорского трансплантата, новые подходы к пред- и послеоперационной терапии, включающие иммуносупрессивные препараты и антибиотики последнего поколения, увеличивающаяся во многих странах частота рекератопластики свидетельствует о том, что вопрос приживления роговичного трансплантата является чрезвычайно актуальным. Частота прозрачного приживления при рекератопластике уменьшается с течением времени и зависит от количества предшествовавших трансплантаций. Низкий показатель прозрачного приживления при рекератопластике обусловлен дооперационным состоянием повышенного риска и послеоперационными осложнениями. Каспаров А.А. приводит данные по анализу результатов собственных исследований за последние 10 лет, согласно которым рекератопластика занимает первое место и составляет 25,4% в общей структуре сквозных кератопластик (СКП) [25].Таким образом, является актуальным разработка новой органосохранной методики кератопластики, способной противостоять агрессивному воздействию и обладающей профилактическим противорецидивирующим и органосохранным эффектом.

1.4 Основные направления подготовки донорского материала для кератопластики

Выдающийся вклад в разработку проблемы пересадки роговицы и внедрение этой операции в клиническую практику внес В.П. Филатов [69, 70].

В течение последней четверти XX века возможности офтальмохирургов в области пересадки роговицы значительно расширились благодаря совершенствованию микрохирургической техники, тщательному отбору донорского материала, внедрению новейших методов консервации донорской роговицы [22, 76, 11, 120]. Несмотря на это, часть операций до сих пор не приносит успеха не только в функциональном отношении, но и не дает биологического результата - трансплантат приживает непрозрачно, а иногда и вовсе происходит лизис донорской роговицы. В то же время расширение возможностей хирургии роговичной патологии привело к увеличению доли повторных пересадок роговицы в общей структуре кератопластик [41].

Увеличившееся количество операций и не всегда благоприятный результат заставили ученых заняться исследованием особенностей проведения повторной кератопластики и особенностей подготовки донорского материала.

До настоящего времени в нашей стране и за рубежом продолжают использовать роговичные трансплантаты обезвоженные над силикагелем. Простота метода, длительность сроков хранения, позволяющая накапливать трансплантационный материал, легкость транспортировки являются существенными достоинствами для использования такого материала в ургентной офтальмохирургии. Вместе с тем, обезвоженные трансплантаты лишены жизнедеятельности и, в первую очередь, слоя эндотелиальных клеток. Они выполняют лишь аллостатическую (каркасную) функцию и потому рассчитывать на их прозрачное приживление не приходится. Поэтому после регидратации этот материал может быть использован только для передней послойной кератопластики преимущественно не с оптической, а с лечебной, мелиоративно-

тектонической целью. При угрозе или развитии перфорации роговицы в результате тяжелых и особо тяжелых ожогов глаз данные трансплантаты могут использоваться как биологическая повязка при васкуляризирующих операциях.

Наиболее перспективным способом длительной (месяцы и годы) консервации роговиц для послойной и особенно сквозной кератопластики является низкотемпературное (-196° С) содержание их в жидком азоте с использованием различных криопротекторов.

Так, замораживание роговиц с каймой склеры, помещенных в 10% раствор криопротектора полиэтиленоксида с молекулярной массой 400 дальтон, производится по двухэтапной программе со скоростью охлаждения на 1-м этапе 1-2 град/мин до начала кристаллизации и на 2-м этапе - 300-400 град/мин до -196° С. Такая программа способствует сохранению структурно-функциональных свойств ткани роговицы. Биологические и оптические результаты кератопластики, полученные при использовании консервированных таким образом трансплантатов, не уступают в ряде случаев свежеконсервированным. Поэтому криоконсервация обещает стать единственным методом консервации роговиц с неограниченным сроком хранения. Однако, дороговизна методики и возникающие повреждения (хотя и обратимые) эндотелиальных клеток, препятствуют широкому внедрению в клинику данного метода консервирования [154].

Хотя уже в 1953-м году было показано, что критическая длительность консервации роговиц определяется сроком жизни эндотелиальных клеток, только в 1974 году биохимику Б. МакКери и офтальмологу Г. Кауфману [4, 5, 42] удалось создать среду, которая позволила надежно консервировать роговицу на срок до 48 часов. При этом корнеосклеральный трансплантат помещали в среду для культуры клеток ТС-199, содержащую декстран с добавлением антибиотиков, и хранили при температуре 4° С. В настоящее время для краткосрочного культивирования используют и другие среды (Chondroitin Sulphate, K-Sol, Dexsol,

Optisol, Eusol), позволившие увеличить максимальное время хранения до 10 дней, но они, в конечном счете, являются производными среды МакКери-Кауфмана.

Надежным, но дорогостоящим методом, позволяющим сегодня сохранять роговицы до 35 дней, является хранение в среде для культуры органов в условиях термостата (t = 32-37° С), заполненного для создания буферных свойств среды 5% углекислым газом.

Получение качественного донорского материала было и остается одной из кардинальных проблем в пересадке роговицы. Огромное значение имела разработанная в 1930-е годы академиком В.П.Филатовым методика консервации донорской трупной роговицы. Начиная с первых работ В.П.Филатова наша страна являлась признанным мировым лидером в разработке проблемы трансплантации роговицы [92, 113]. Школа академика Федорова С. Н. также внесла весомый вклад в мировую офтальмологию, доказав на практике и в фундаментальных исследованиях возможность широкого применения нативных донорских роговиц человека для сквозной кератопластики [64, 65, 66].

В МНТК МГ разработан отечественный раствор для хранения роговицы ТУ №9398-013-29039336-2008 (среда Борзенка-Мороз) для гипотермической консервации жизнеспособных трупных роговиц человека, обладающая высокими защитными свойствами, обеспечивающая стабилизацию клеточных мембран, сохранность макроэргических соединений и стабильность плотности эндотелиальных клеток в процессе холодового хранения [4]. Однако совершенствования методов подготовки донорского материала не решили до конца проблему рецидивов заболеваний роговицы. До сих пор остается актуальным вопрос об уменьшении количества повторных кератопластик в связи с рецидивом заболевания.

1.5 Особенности строения коллагена роговицы

Известно, что биомеханические свойства роговицы зависят в основном от состояния волокон коллагена, межколлагеновых связей и их структурной организации. Таким образом, усилить биомеханические свойства роговицы, возможно, повлияв именно на коллаген роговицы. Именно усиление межколлагеновых связей, утолщение волокон коллагена и приведет к усилению биомеханических свойств, что позволит роговице противостоять усиленному воздействию агрессивных факторов и уменьшить количество рецидивов заболеваний [91, 108, 109, 110, 118].

В человеческой роговице коллагеновые волокна ориентированы преимущественно горизонтально и вертикально (под углом 90° и 180°), параллельно друг другу и поверхности роговицы, что определяет ее кривизну и прозрачность. Подобная закономерность имеет место на большей части роговицы, за исключением полосы шириной 2 мм вдоль лимба. Коллагеновые волокна, идущие от лимба до лимба, связаны между собой в передне-заднем направлении с помощью матриксных белков (протеогликаны и др.), а также коллагена VI типа, являющегося своеобразным «мостом» между коллагеновыми фибриллами I типа. Кератоциты, благодаря наличию отростков, также участвуют в образовании поперечных связей, взаимодействуя друг с другом и коллагеновыми фибриллами [117, 118, 144].

Коллаген составляет около 80% органического содержания собственного вещества роговицы. Взаимноадаптированные фибриллы коллагена (преимущественно I, а также III, и V типов) роговичной стромы окружены протеогликановым матриксом. Они обеспечивают радиально во всех направлениях равномерное распределение прочности на разрыв, минимальное светорассеяние и достаточную прозрачность роговицы. Нефибриллярный коллаген IV типа является основным компонентом передней и задней пограничных мембран роговицы. Коллаген VII типа необходим для закрепления

связи между базальными клетками эпителия, базальной мембраной и передней стромой [122, 127, 141].

Первостепенной задачей кератоцитов (стромальных фибробластов) является поддержание в прозрачном состоянии и регенерация роговичной стромы. Они принадлежат к мезенхимальным клеткам. В ходе защитно-восстановительных процессов, следующих за повреждением стромы, кератоциты способны изменять свои фибропластические способности, включая: фагоцитоз коллагеновых фибрилл, синтез коллагена, гликозаминогликанов, синтез коллагеназы и ингибиторов металлопротеиназ. При определенных условиях эти метаболические функции кератоцитов могут регулироваться цитокинами из эпителия, клеток воспаления или других кератоцитов [72]

Репарация поврежденного собственного вещества роговицы происходит за счет продукции коллагена кератоцитами, которые мобилизуются из прилежащих участков роговицы посредством миграции, начинающейся обычно на эндотелиальной стороне стромы.

В интактном глазу регулируемое расщепление коллагена собственного вещества роговицы связано с действием группы энзимов, называемыми матричными металлопротеиназами (коллагеназа I типа, стромальная желатиназа и др.).

Коллагеназа I типа расщепляет молекулы фибриллярного коллагена I, II и III типов. Она является единственным энзимом, способным расщеплять спираль нативного коллагена I типа в условиях физиологически нейтрального pH внеклеточного пространства стромы.

Первоначально считалось, что роговичная коллагеназа I типа продуцируется роговичным эпителием, однако в дальнейшем было установлено, что она вырабатывается кератоцитами. При этом интактный роговичный эпителий секретирует специфический цитокин, угнетающий продукцию коллагеназы кератоцитами. В случае повреждения эпителия угнетающая функция может быть утрачена, что способствует изъязвлению роговицы. Более того, поврежденный

эпителий начинает вырабатывать коллагеназу V типа, действующую на коллаген IV и VII типов и вызывающую деградацию эпителиальной базальной мембраны. Коллагеназа I типа также может продуцироваться полиморфноядерными лейкоцитами [72]. По мнению ряда ученых, усиление продукции коллагена представляется сомнительным, и более эффективным для усиления биомеханических свойств роговицы может быть воздействие на уже имеющееся в ней собственные коллагеновые волокна [104, 132, 153].

1.6 Кросслинкинг роговичного коллагена. История вопроса. Механизм действия

История кросслинкинга начинается с идеи использования его в качестве консервативного метода лечения кератоконуса. В 90-ых годах у группы исследователей Дрезденского Технического Университета встала задача достичь стабилизации процесса с целью максимальной отсрочки сквозной кератопластики [133].

Основанием для проведения исследований в этой области послужила серия работ, посвященных эффекту «склеивания» фибрилл коллагена с образованием димеров из двух α-цепей под влиянием различных внешних факторов: ферментов, озона, ультрафиолетового излучения и т.д.

Данный эффект является результатом окислительного механизма, сопровождающегося высвобождением различных свободных радикалов. Оказалось, что в отличие от других способов индукции «склеивания», ультрафиолетовое излучение стимулирует образование синглетного кислорода, не вызывающего, в отличие от гидроксильного радикала, сопутствующей деградации CNBr белков коллагена [102]. Кроме того, была подтверждена способность ультрафиолетового излучения стимулировать продукцию матричных металлопротеиназ [118].

Первые исследования в офтальмологии были начаты в 1990 году попыткой оценить возможность биологического окислительного «склеивания» роговичного коллагена под воздействием энзимов, тепла или излучения определенной длины волны, что приводило бы к повышению резистентности стромального коллагена [111]. Известно, что похожий механизм уплотнения и утолщения приблизительно на 4,5% коллагеновых волокон сопровождает «старение» роговицы, а также имеет место при сахарном диабете и связан с активацией гликозилирования в молекулах тропоколлагена [97, 102]. Механизм индукции «склеивания» коллагена при сахарном диабете включает каскад биохимических окислительных реакций, отражающих неферментативное гликозилирование [133]. Феномен повышения диаметра волокон коллагена может быть продемонстрирован с помощью сканирующей электронной микроскопии в стекловидном теле у больных сахарным диабетом [147]. Подобный процесс лежит в основе снижения эластичности стенок сосудов и развития микроангиопатии у пациентов этой категории [133].

В результате серии работ была разработана наиболее эффективная и безопасная техника кросслинкинга роговичного коллагена, основанная на эффекте фотополимеризации стромальных волокон под воздействием фоточувствительной субстанции (раствор рибофлавина) и низких доз ультрафиолетового излучения твердотельного UVA – источника [145, 148]. Было доказано, что под влиянием ультрафиолетового излучения и рибофлавина происходит усиление поперечных внутримолекулярных связей роговичного коллагена с образованием димеров из двух α-цепей без деградации коллагеновых белков [102].

Идея разработки клинического метода заключалась во временном приостановлении прогрессирования кератоконуса в рефракционной фазе за счет «склеивания» коллагеновых фибрилл и повышения биомеханической стабильности роговицы. Для использования в клинической практике был разработан прибор с твердотельным ультрафиолетовым источником, имеющий

два наконечника и кнопку регулировки мощности, который в настоящее время нашел широкое применение в клинической практике.

Общепризнанным является протокол, предложенный доктором Seiler T. и коллегами, включающий удаление эпителия в центральной 7-миллимитровой зоне, инстилляции 0,1% раствора рибофлавина в течении 30-ти минут с последующим воздействием УФ с длиной волны 370 мкм и энергией излучения 3,0 МВт/см² [145, 146].

Перед процедурой кросслинкинга проводится местная анестезия. Шпателем удаляется роговичный эпителий в пределах предварительно отмеченной окружности диаметром 7 мм. Затем пациенту закапывают 2-4 капли раствора, содержащего 0,1% рибофлавин, 20% декстран и анестетик. Луч ультрафиолетового излучения с длиной волны 365 нм фокусируется на вершине роговицы. Воздействие производится в течение 30 минут, мощность излучения на поверхности роговицы - 3 МВт/см² (5,4 Дж/ см²). Инстилляции раствора рибофлавина с последующим воздействием ультрафиолетового излучения повторяют 5 раз (общее время экспозиции - 25 минут, время процедуры в целом - 30 минут), после чего роговицу промывают физиологическим раствором, закапывают антибиотик и надевают мягкую контактную линзу. В послеоперационном периоде больному назначают противоотечную и противовоспалительную терапию. На 5 день после полной эпителизации роговицы снимают контактную линзу и назначают инстилляции кортикостероидов и антибиотиков в течение 20 дней.

До внедрения новой методики в клиническую практику было проведено множество экспериментальных работ, доказавших ее эффективность и безопасность.

Wollensak и соавт. в 2004 году с помощью электронной микроскопии подтвердили факт «склеивания» фибрилл и утолщения коллагеновых волокон в роговице под воздействием рибофлавина и ультрафиолетового излучения, что приводило к повышению биомеханической устойчивости ткани. В передних

отделах стромы диаметр коллагеновых волокон достоверно повышался на 12,2% (3,64 нм), в задних отделах стромы диаметр волокон увеличивался лишь на 4,6% (1,63 нм). Выявленные изменения оказываются значительно ниже критического порога толщины волокон, приводящего к помутнению роговицы [147].

В экспериментах было доказано значительное повышение устойчивости ткани роговицы кроликов к механическому воздействию после процедуры кросслинкинга [136]. В другой серии работ в результате экспериментально индуцированного кросслинкинга роговичного коллагена ригидность человеческой роговицы возросла приблизительно на 300%, роговицы свиней – на 75% [148]. Повышение биомеханической ригидности ткани авторы связывают с фактом «склеивания» фибрилл и увеличения толщины коллагеновых волокон [143, 149, 152].

Экспериментальные исследования подтвердили двукратное повышение устойчивости роговицы после комбинированного воздействия рибофлавина и ультрафиолетового излучения к действию ферментов: пепсина, трипсина и коллагеназы. Стабилизирующий биохимический эффект кросслинкинга может быть объяснен изменением третичной структуры коллагеновых фибрилл и блокированием специфических участков, взаимодействующих с ферментами. Данный факт объясняет эффективность метода в лечении язвы роговицы, а также частично обуславливает остановку прогрессирования кератоконуса, в патогенезе которого также играет роль повышенная активность коллагеназы. Подобный эффект повышения устойчивости ткани к коллагеназной биодеградации в результате процедуры кросслинкинга широко используется в современных биотехнологиях изготовления различных имплантов на основе коллагена [139].

Помимо биомеханического и биохимического эффекта, процедура кросслинкинга роговичного коллагена ведет к формированию повышенной устойчивости роговицы к термическому воздействию. Денатурация коллагена с разрушением ковалентных связей между молекулами в роговицах, подвергшихся

комбинированному воздействию UVA и рибофлавина, происходила при более высокой температуре, чем в контроле [90, 137].

Во всех проведенных исследованиях эффект кросслинкинга оказался максимальным в передних отделах стромы толщиной не более 300 мкм. Это связано с высокой степенью абсорбции излучения в присутствии рибофлавина и поглощением до 95% излучения на уровне передних и средних слоев стромы. Данный факт объясняет преимущественно переднюю локализацию зоны утолщения коллагеновых волокон, асимметрию между передними и задними отделами стромы относительно устойчивости к ферментному, механическому и термическому воздействию, а также обуславливает минимальную степень воздействия ультрафиолетового излучения на эндотелий роговицы, хрусталик и другие структуры глаза [84, 93, 119, 121, 128, 137, 147]. Следует учитывать, что именно передние отделы стромы роговицы наиболее важны для поддержания кривизны роговицы и формирования оптического эффекта процедуры [122].

Для подтверждения безопасности процедуры для подлежащих структур была проведена дополнительная серия экспериментальных работ [151]. Специфический цитотоксический эффект на эндотелий роговицы отмечался при интенсивности ультрафиолетового излучения на уровне эндотелия 0,65 Дж/см² (0,36 МВт/см²), что вдвое превышает мощность при терапевтических параметрах излучения (0,32 Дж/см²; 0,18 МВт/см²). Зная коэффициент абсорбции излучения в ткани человеческой роговицы в присутствии рибофлавина, было рассчитано, что при стандартной терапевтической мощности излучения (3 МВт/см²) на поверхности роговицы толщиной более 400 мкм, энергия на уровне глубоких слоев роговицы безопасна для эндотелия. Однако, в случаях язвы роговицы, развитого кератоконуса с выраженным истончением роговицы стандартная доза воздействия оказывается токсичной для эндотелиальных клеток. В таких случаях рекомендуется использовать альтернативные способы лечения или снижать мощность излучения. По мнению исследователей, у пациентов с кератоконусом и локальным истончением роговицы на ограниченном участке возможно

использование стандартных доз излучения, так как локальная потеря эндотелиальных клеток компенсируется путем миграции с соседних участков [146].

G.Wollensak и соавторы в эксперименте показали, что УФ излучение с длиной волны 370нм, используемое при проведении кросслинкинга, обладает повреждающим эффектом на клетки роговицы [150]. Во время исследований на кроликах после кросслинкинга авторы отметили гибель кератоцитов на глубине до 350 мкм, а через 6 месяцев их популяция полностью восстанавливалась. Клетки эндотелия роговицы имеют низкую регенеративную способность и их повреждение во время операции недопустимо[146]. E. Spoerl определил, что строма роговицы, пропитанная рибофлавином, поглощает 95% УФ излучения, в то время как в отсутствии рибофлавина данный показатель составляет лишь 32%. Таким образом, рибофлавин обладает защитным эффектом по отношении к эндотелию роговицы и остальным структурам глаза[138].

K. Rocha с соавторами (2011) была предложена методика «Flash-linking», в которой предлагался новый сшивающий агент поливинилпиролидон вместо рибофлавина и время УФ облучения составляло всего 30 секунд при 4,2 мВт/см² [129]. Проведя измерения прочностных свойств роговицы с использованием эластометрии на свиных глаз ex vivo, авторы метода предположили, что «Flash-linking» и стандартный кросслинкинг (КРК) могут иметь сопоставимый эффект [39, 98, 101].

С помощью конфокальной биомикроскопии было выявлено разрежение кератоцитов в передних отделах стромы роговицы, что свидетельствует об их апоптозе и последующем некрозе под воздействием ультрафиолетового излучения заданной мощности [1, 94]. Степень гибели кератоцитов зависела от интенсивности ультрафиолетового излучения. При стандартных терапевтических дозах облучения в роговице человека гибель кератоцитов отмечалась в пределах передних отделов стромы толщиной около 300 мкм. Постепенное восстановление

популяции клеток происходило в течение 3 месяцев за счет миграции из зоны неповрежденной роговицы [150].

Кроме того, в первые дни после процедуры было обнаружено исчезновение субэпителиальных нервов. Однако, полная реиннервация роговицы с восстановлением ее чувствительности отмечалась уже через 1 месяц [150].

Ни в одном эксперименте не было выявлено помутнения роговицы, хрусталика или признаков воспалительной реакции в глазах животных после комбинированного воздействия рибофлавина и ультрафиолетового облучения [136, 139, 147, 148]. Дегенеративный эффект излучения подтверждается отсутствием воспалительной реакции в ткани роговицы. К настоящему времени в мировой практике накоплен достаточно большой опыт клинического применения метода кросслинкинга роговичного коллагена, подтверждающий эффективность и безопасность процедуры для приостановления прогрессирования кератоконуса и повышения остроты зрения.

Единственным побочным эффектом процедуры явился кратковременный отек ткани роговицы. Данный эффект отмечался приблизительно в 40% случаев, сопровождаясь транзиторным повышением среднего сферического коэффициента рефракции [89, 131].

В течение 4-х летнего периода наблюдения за пролеченными пациентами не было отмечено изменения прозрачности роговицы и хрусталика, плотности эндотелиальных клеток, изменений внутриглазного давления, поражения сетчатки по данным оптической когерентной томографии. В большинстве случаев не потребовалось проведения повторных процедур [85, 87, 131, 145].

Таким образом, многочисленные экспериментальные и клинические исследования показали эффективность и безопасность процедуры рибофлавин-UVA-индуцированного кросслинкинга роговичного коллагена.

Возможные сферы клинического применения процедуры кросслинкинга роговичного коллагена касаются профилактики прогрессии миопии и развития ятрогенной кератэктазии после рефракционной хирургии.

Имеются сообщения об успешном использовании процедуры кросслинкинга у пациентов с ятрогенной кератэктазией после операции Lasik. С помощью данной методики удалось повысить биомеханическую прочность роговицы и остановить прогрессирование данного осложнения [112].

В последнее время появились сообщения об успешном использовании метода в клинике при лечении больных с язвой роговицы за счет выраженного антимикробного действия. Данный метод лечения был эффективен в отношении золотистого стафилококка, пневмококка с множественной лекарственной устойчивостью и Candida Albicans [73,139].

Не исключено, что кросслинкинг склерального коллагена станет эффективной методикой повышения ригидности склеры с целью лечения прогрессирующей миопии.

Имеются единичные данные об использовании кросслинкинга после послойной кератопластики при рецидивирующем герпетическом кератите. Авторы отмечают противовирусный эффект кросслинкинга при отсутствии влияния на эпителизацию и адаптацию трансплантата [39]. Авторами изучены особенности морфологической характеристики роговичной ткани после послойной кератопластики в комбинации с кросслинкингом коллагена роговицы в эксперименте на глазах кроликов. Показано, что под влиянием кросслинкинга происходит преобразование фиброцеллюлярной ткани в полноценную строму с нормальными оптическими свойствами; интерфейс-пространство при проведении послойной кератопластики в комбинации с кросслинкингом становится практически невидимым уже с первого месяца в отличие от послойной кератопластики [39].

Анализ данных литературы показал, что описанная выше методика кросслинкинг позволяет усилить прочностные свойства роговицы, что делает ее возможной для использования в качестве одного из этапов в подготовке донорского материала для последующей кератопластики. Однако, остаются не изучены биофизические, биомеханические и биохимические свойства роговичной

консервированной ткани, а также возможность и эффективность применения кератопластики с использованием кросслинкинг модифицированного донорского материла у пациентов с глубокими язвами роговицы для снижения риска расплавления трансплантата. В связи с этим закономерной и логичной с методологической точки зрения явилась предпринятая попытка научного обоснования эффективности обработки донорского материала по методу кросслинкинг для последующей кератопластики у пациентов с глубокими язвами роговицы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Дизайн исследований

Дизайн исследования основан на проведении экспериментальных и клинических исследований эффективности метода обработки донорского материала по модифицированной методике кросслинкинг и анализе полученных результатов (таблица 1).

Таблица 1 - Дизайн исследований и общий расход материалов

Название исследования	Материалы исследования	Задачи исследования
Гистоморфологическое исследование донорской роговицы	2 роговичных диска, диаметр 10,5 мм.	Изучить гистологическую структуру донорской роговицы
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 кросслинкинг модифицированного донорского материала методами торсионного взвешивания и оптической когерентной томографии переднего отрезка глаза	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 кросслинкинг модифицированного 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	Оценить результаты различных видов кератопластики, выявить особенности и осложнения послеоперационного периода
	2 группа – 44 глаза, выполнена кератопластика с использованием кросслинкинг модифицированного донорского материала 1 подгруппа (32 глаза) - выполнена сквозная кератопластика 2 подгруппа (12 глаз) – выполнена глубокая послойная кератопластика	

2.2 Методы экспериментальных исследований

Все экспериментальные исследования выполнены на базе центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем (руководитель центра д.м.н., профессор, академик Борзенок С.А.). В качестве донорского материала во всех экспериментах использовали аллогенные кадаверные роговично-склеральные диски с показателем трансплантабельности 1С (по классификации трансплантабельности трупных роговиц человека Борзенка С.А., 2008), 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 МГ. Донорский материал не соответствовал критериям отбора для кератопластики, и потому использовался в экспериментальных целях. Возраст доноров составил от 38-и до 45-и лет. Интервал от момента смерти до энуклеации - не более 8-и часов. Срок консервации составил не более суток. Интервал от момента консервации до проведения эксперимента не более суток.

Все донорские роговично-склеральные диски были деэпителизированы, дополнительная скарификация эпителия не требовалась. Перед проведением

эксперимента, роговично-склеральные диски насыщали рибофлавином, после чего перекладывали в стерильную емкость эндотелием вниз, 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. Кросслинкинг донорского материала проводили в операционной не позднее суток после консервации.

Первым подготовительным этапом экспериментального блока явилась серия морфологических исследований для визуализации процессов, происходящих в донорской консервированной роговице под действием рибофлавина и ультрафиолета. Данное исследование впервые проводилось на консервированной роговице на базе лаборатории патологической анатомии и гистологии глаза МНТК МГ. Объектом исследования стали две донорские роговицы, консервированные по стандартной методике, выкроенные диаметром 10.5 мм, одна из роговиц была обработана по стандартной методике кросслинкинг. Для морфологических исследований материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, промывали проточной водой, обезжиривали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Выполняли серии гистологических срезов с применением окраски гематоксилин-эозином. Препараты изучали под микроскопом фирмы Leica DM при х50, х100, х200, х400 кратном увеличении с последующим фотографированием.

2.2.1. Экспериментальное изучение временных параметров насыщения раствором рибофлавина стромы донорской роговицы

Для изучения временных параметров насыщения стромы донорской роговицы рибофлавином в зависимости от способа нанесения раствора в ходе исследования применяли спектроскопию диффузного отражения, являющуюся одним из наиболее распространенных физико-химических методов исследования структуры химических веществ, который может использоваться для обнаружения их в биологических жидкостях и тканях.

Данное исследование проводилось на базе Химического факультета Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова. Исследование проводилось на 6-ти роговично-склеральных дисках, выкроенных по стандартной методике диаметром 16 мм. Роговично-склеральные диски были без признаков патологии роговицы, не соответствовали критериям отбора для кератопластики.

В эксперименте использовали мини спектрофотометр калибратор мониторов EyeOne Pro (рисунок 1), который серийно выпускает швейцарская фирма GretagMacbeth.

Рисунок 1 - Мини спектрофотометр калибратор мониторов

Устройство имело встроенный источник излучения типа D50, которым служила газонаполненная вольфрамовая лампа. Этот прибор позволял измерять коэффициенты диффузного отражения в интервале от 380 до 730 нм с шагом 10 нм, а также цветометрические характеристики образцов, такие как цветовые координаты в системах RGB, CMYK, Lab и другие.

Для проведения измерений мини спектрофотометр EyeOne Pro подключали к USB порту компьютера, в среде Windows запускали прилагающуюся программу EyeOne Share и осуществляли градуировку устройства по белой подложке (контроль), входящей в стандартный комплект. После этого измеряли образцы, помещая их на предметный столик прибора, а полученные данные в виде массива коэффициентов диффузного отражения для различных длин волн экспортировали в Excel.

В первой группе (n=3) 0,1 % раствор рибофлавина в среде Борзенка-Мороз капельно наносили на переднюю поверхность роговично-склерального диска в течение 30 минут с интервалом 5 минут, измерения проводились каждые 5 минут.

Во второй группе (n=3) роговично-склеральные диски помещались в емкость с раствором рибофлавина в среде Борзенка-Мороз в течение 30 минут с интервалом 5 минут, измерения также проводились каждые 5 минут.

Перед каждым измерением в обеих группах раствор рибофлавина смывали физиологическим раствором до получения прозрачных вод.

После этого проводили сравнение полученных коэффициентов диффузного отражения через 5, 10, 15, 20, 25, 30 минут роговиц первой и второй групп.

2.2.2. Экспериментальное исследование степени выраженности отека кросслинкинг модифицированного донорского материала

Для определения степени выраженности отека стромы консервированной роговицы после обработки по методике кросслинкинг в разные временные промежутки использовали метод торсионного взвешивания и метод оптической когерентной томографии. Все исследования проводились на базе Глазного тканевого банка Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова». Эксперимент выполнен с использованием 8 пар донорских роговично-склеральных дисков, выкроенных по стандартной методике, диаметром 16 мм. 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).

Вначале проводилось взвешивание и определение толщины роговично-склеральных дисков обеих групп, затем все диски помещали в физиологический раствор для набухания, результат оценивали методом оптической когерентной томографии (OCT Visante, Carl Zeiss, Германия) через 24 и 72 ч. и методом торсионного взвешивания (ВТ-500, Россия) через 24 ч. Оптическую когерентную томографию проводили после фиксации роговично-склерального диска в искусственной камере глаза (Barron, США), при этом затягивали ее крепление таким образом, чтобы тонус соответствовал нормальному тонусу глаза живого человека (20 мм.рт.ст. по Маклакову).

2.2.3. Экспериментальное исследование предела прочности кросслинкинг модифицированной донорской роговицы

Для исследования биомеханических свойств консервированной роговицы после кросслинкинга, изучали способность к растяжению образцов роговицы с помощью разрывной машины. Разрывная машина Instron 3382 (рисунок 2) предназначена для определения физико-механических свойств материалов. Исследование проводилось на базе Лаборатории прочности и пластичности металлических и композиционных материалов и наноматериалов Института Металлургии и Материаловедения им. А.А. Байкова.

Эксперимент выполняли на 6-ти роговичных дисках, выкроенных диаметром 10,5 мм. Были выделены 2 экспериментальные группы

Опытная группа – донорские консервированные роговичные диски (n=3), диаметр 10,5 мм, обработанные по методике кросслинкинг

Контрольная группа – донорские консервированные роговичные диски без кросслинкинга (n=3), диаметр 10,5 мм.

Для исследования биомеханических свойств роговицы с помощью лезвия и ножниц выкраивали корнеальные полоски размером 10,5 на 8 мм, которые закрепляли между лапками универсальной испытательной машины (рисунок 2).

Полученные результаты фиксировались программным управлением испытательной машины численно и графически.

Рисунок 2 - Разрывная машина Instron 3382

2.2.4. Исследование химической устойчивости кросслинкинг модифицированного донорского материала

Для изучения химической устойчивости консервированной донорской роговицы, обработанной по методике кросслинкинг к протеолитическим ферментам использовали метод сканирующей электронной микроскопии. Данное исследование проводилось на базе Межфакультетского центра биологических исследований Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова. Объектом исследования являлись донорские роговицы (n=24), выкроенные диаметром 10,5мм которые были распределены по 4 экспериментальным группам. Все роговицы консервировались в среде Борзенка-Мороз по стандартной методике [4]. 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).

Особенности подготовки препаратов к сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) заключались в том, что роговицы второй и четвертой групп обрабатывались по стандартной методике кросслинкинг. После этого роговицы переносили во флаконы с 5 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида и добавляли 25 ЕД раствора коллагеназы на 24 и 72 часа. Затем препараты фиксировались в 2,5% растворе глутарового альдегида, напылялись золотом и изучались методом сканирующей электронной микроскопии. Исследование проводилось на сканирующем электронном микроскопе S-3400N, Hitachi, Япония.

2.3 Клинико-функциональные методы исследования

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.

Критерии включения пациентов:

1. Язва роговицы различной этиологии.
2. Предварительно проведенное лечение:

   - консервативное (противовирусная, антибактериальная, противовоспалительная, метаболическая и слезозаместительная терапии);

   - хирургическое (устранение лагофтальма, устранение заворотов, выворотов, птоза, трихиаза).
3. Наличие дефекта эпителия и стромы роговицы неправильной формы, размером от 2,5 до 6,5 мм до глубоких слоев стромы, по данным ОСТ Visante толщина остаточной стромы роговицы в центральной зоне дефекта при неперфоративных язвах не превышала 80 мк.
4. Наличие дефекта стромы роговицы с угрозой или перфорацией ее.
5. Наличие остроты зрения не ниже светоощущения.
6. Отсутствие необратимых изменений сетчатки (по данным В-сканирования и ЭФИ).

Срок наблюдения составил до 4-х лет.

Клиническую часть работы выполняли на базе федерального государственного автономного учреждения «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации в отделе трансплантационной и оптико-реконструктивной хирургии переднего отрезка глазного яблока (заведующая отделом – доктор медицинских наук Измайлова С.Б.).

Среди пациентов было 59 женщин и 27 мужчин в возрасте от 31-го до 80-ти лет.

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 консервированного материала 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). Срок от момента консервации до кератопластики составил не более 2-х суток.

2.3.1. Методы обследования пациентов

Перед осмотром и обследованием глаз у пациентов проводили тщательный сбор анамнеза. Выясняли время, скорость, возможные причины снижения зрительных функций, наличие в анамнезе кератитов, язв, их этиологию, проводили ли консервативное лечение, частоту обострений, перенесенные хирургические вмешательства, в том числе кератопластики, их количество, течение раннего послеоперационного периода, особенности эпителизации, какие лекарственные препараты использовали, частота их применения, наличие сопутствующей патологии и аллергических заболеваний, травм органа зрения.

Клинико-диагностическое обследование проводили всем пациентам до операции, через 10 дней, 1, 3, 6, 12 месяцев, а затем через каждый год после операции. Внеплановое обследование проводилось в случае развития осложнений.

Биомикроскопию (прижизненная микроскопия тканей переднего и заднего отрезка глаза) осуществляли с помощью щелевой лампы SL 130 (Carl Zeiss, Meditec AG, Германия). Оценивали состояние век: кожу, положение (заворот, выворот, птоз, атония), рост ресниц (трихиаз), смыкание (полное, лагофтальм), край и ребра век (не изменены, утолщены, мейбомиит, халазион), состояние слезных органов, наличие и характер отделяемого (гнойное, слизистое). Проводили осмотр роговицы: состояние эпителия и роговичной стромы (отек; характер, размер и глубина расплавления), сохранность десцеметовой мембраны.

При возможности осмотра переднего отрезка глаза (ПОГ) оценивали равномерность и глубину передней камеры, наличие и протяженность передних синехий; величину угла передней камеры (УПК), состояние и положение радужки и хрусталика или интраокулярной линзы (ИОЛ).

Фильтрационную флюоресцеиновую пробу проводили с помощью тест-полосок с низкомолекулярным флюоресцеином натрия Bio Glo (Contacare Ophthalmics and Diagnostics, США) с осмотром участка глазного яблока представляющего наибольший интерес через кобальтовый фильтр щелевой лампы.

Офтальмоскопию (осмотр глазного дна) (по возможности) проводили в обратном виде при помощи щелевой лампы SL 130 (Carl Zeiss, Meditec AG, Германия) и асферических просветленных высокодиоптрийных линз.

Пробу Ширмера (величину суммарной слезопродукции) определяли с помощью тест-полосок фильтровальной бумаги (длиной 35 мм и шириной 5 мм) Tear Flo (Contacare Ophthalmics and Diagnostics, США). Исследование проводили в течение 5 мин. Результаты оценивали в миллиметрах, используя следующие критерии: более 25 мм за 5 минут - гиперсекреция, 15-25 мм за 5 минут - нормосекреция, 10-15 мм за 5 минут - пограничное состояние, менее 10 мм за 5 минут - гипосекреция слезной жидкости.

Пробу Норна (определение стабильности слезной пленки) определяли с помощью тест-полосок с низкомолекулярным флюоресцеином натрия Bio Glo (Contacare Ophthalmics and Diagnostics, США) и щелевой лампы SL 130 (Carl Zeiss, Meditec AG, Германия), в осветительную систему которой предварительно вводили кобальтовый фильтр. Отмечали время образования в окрашенной слезной пленке первого разрыва после последнего мигания пациента. При интерпретации результатов использовали нормативы: норма от 15 до 45 секунд, 10-15 секунд - пограничные значения, менее 10 секунд - нестабильность слезной пленки. При получении пограничных или сниженных значений пробу повторяли трехкратно, результатами считали усредненные значения.

Визометрию (оценка остроты центрального зрения) проводили на компьютеризированном фороптере CV-5000 компании «Topcon» (Япония). Определяли некоррегированную (НКОЗ) и коррегированную остроту зрения (КОЗ). При отсутствии предметного зрения, т. е. когда пациент не может считать

пальцы, проверяли способность различать движение кисти перед лицом или ощущать свет. Светоощущение и светопроекцию определяли с помощью прямого офтальмоскопа ОР-3Б-08 (Россия).

Кератотопографию выполняли на компьютерном кератотопографе «Tomey TMS-4» (Япония).

Периметрию (определение периферического зрения) проводили с использованием автоматического периметра АР-5000С (Kawa, Япония). Исследование проводили ручным или автоматизированным клиническим методом тестирования в программе Isopter с использованием объекта белого цвета различной площадью и яркостью в зависимости от остроты зрения (ОЗ) пациента в горизонтальном, вертикальном и четырех косых меридианах с интервалом в 30 градусов.

Б-метод сканирования (определение состояния стекловидного тела, собственно сосудистой оболочки глаза, сетчатки и орбиты) проводили на устройстве для ультразвукового обследования глаза EyeCubed (Ellex, Австралия). Обращали внимание на состояние сосудистой оболочки (наличие, высота, характер отслойки сосудистой оболочки (ОСО).

Офтальмотонометрия. Для определения внутриглазного давления использовали пальпаторную тонометрю, которую проводили бимануальным транспальпебральным методом. Обозначали полученный результат ВГД по W. Bowman (Уильяму Боумену) (TN, T+1, T+2, T+3, T-1, T-2, T-3) и использовали перевод полученного показателя в мм.рт.ст: нижней нормы TN↓ (диапазон от 10 до 15 мм рт.ст.), норма TN (диапазон от 16 до 21мм рт.ст.), верхняя норма TN↑ (диапазон от 22 до 26 мм рт.ст.), T+1 (27-30мм рт.ст.), T+2 (31-35мм рт.ст.), T+3 (35>мм рт.ст.), T-1 (8-9 мм рт.ст.), T-2 (6-7мм рт.ст.) [12].

Эхобиометрию (изменение глубины передней камеры глаза, толщины хрусталика и длины переднезаднего отрезка (ПЗО) глаза) выполняли на биопахиметре AL-3000 (Tomey, Германия) в различных режимах.

Электрофизиологические исследования (ЭФИ) производили на аппарате Phosphen- tester PT-01 (Micof, Россия) по признаку возникновения фосфена (электрическая чувствительность) и критической частоты исчезновения мелькающего фосфена (электрическая лабильность).

Оптическую когерентную томографию переднего отрезка глаза (ОКТ) выполняли на приборе Visante OCT model 1000 (Carl Zeiss, Meditec AG, Германия). Оценивали роговицу (равномерность, толщину, глубину перфорации, толщину остаточной стромы), равномерность и глубину передней камеры, величину УПК, наличие иридокорнеальных сращений, состояние и положение радужки и хрусталика. Определяли размеры структур переднего отрезка глаза.

Конфокальная микроскопия с целью оценки глубины и характера изменений роговицы проводили на приборе Confoscan-4 компании Nidek (Япония). Также на данном приборе проводили подсчет плотности и анализ морфологии эндотелиальных клеток.

Эндотелиальную микроскопию для исследования плотности и качественного состояния эндотелиальных клеток проводили с помощью бесконтактного эндотелиального микроскопа GEM-4 фирмы Product Research Organization (США).

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. Параметрические данные (приведены в формате $M \pm \sigma$) сравнивали с использованием t-теста Стьюдента, непараметрические – с помощью двустороннего варианта точного критерия Фишера путем анализа таблиц сопряженности 2x2, показатели информативности диагностических методов – посредством оценки их чувствительности (Se), специфичности (Sp), прогностичности положительного (PPV) и отрицательного результата (NPV) с определением доверительного интервала (ДИ). Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

Все средние значения в работе даны в формате M±σ, где M – среднее значение, а σ – стандартное (среднеквадратичное) отклонение. ДИ – в виде (95%) ДИ, где 95% – это доверительная вероятность.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Цель экспериментального блока: изучение свойств донорской консервированной в среде Борзенка - Мороз роговицы для разработки способа подготовки донорского материала для кератопластики на основе модификации метода кросслинкинг.

Задачи экспериментальных исследований:

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

2.Определить степень выраженности отека стромы роговицы после обработки по методике кросслинкинг в сравнении с необработанными роговицами методами торсионного взвешивания и оптической когерентной томографии переднего отрезка глаза.

3.Изучить биомеханические свойства кросслинкинг модифицированной донорской роговицы методом определения предела прочности с помощью разрывной машины.

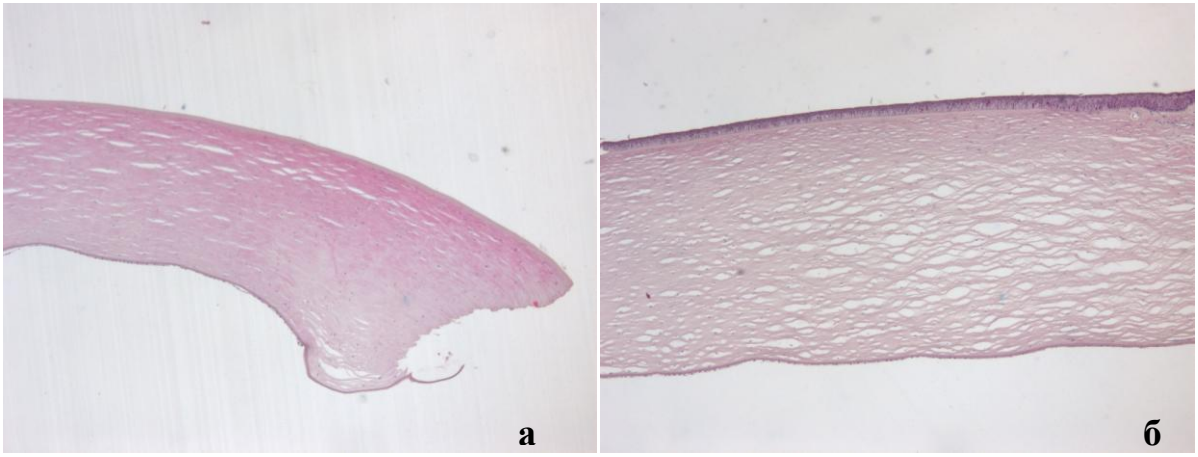
4.Изучить химическую устойчивость кросслинкинг модифицированной донорской роговицы к протеолитическим ферментам методом сканирующей электронной микроскопии.

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

3.1 Гистоморфологическое исследование донорской роговицы

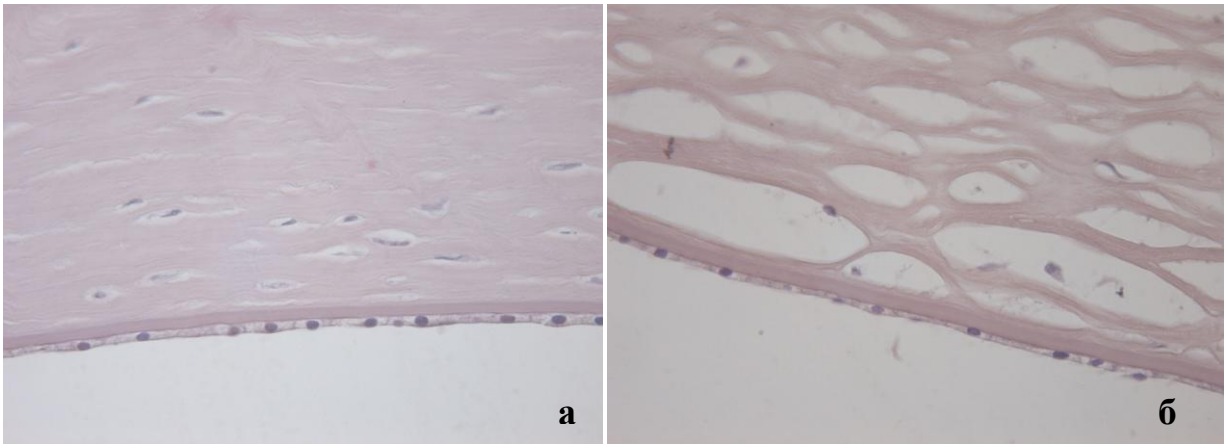
Для реализации вышепоставленных задач в качестве подготовительного этапа была проведена серия морфологических исследований для визуализации процессов, происходящих в консервированной донорской роговице под действием кросслинкинга.

При гистоморфологическом изучении результатов установлено, что после обработки донорской консервированной роговицы рибофлавином и ультрафиолетом наблюдаются изменения в стромальных слоях роговицы при сохранных клетках эндотелия и десцеметовой мембраны. Глубокие слои стромы роговицы - компактные, без признаков отека по сравнению с контрольным глазом (рисунок 3а-б, 4а-б).



а – роговичный диск после кросслинкинга, строма, десцеметова мембрана и эндотелий сохранены, отмечаются признаки слабовыраженного отека;
б – роговичный диск без обработки, отмечается выраженный отек стромы роговицы, на фоне сохранных эпителиальных и эндотелиальных структур

Рисунок 3 - Гистологические препараты человеческой кадаверной роговицы консервированной в среде Борзенка-Мороз. (Окраска гематокс. – эозин. Ув. х50)



а – роговичный диск после кросслинкинга, глубокие слои стромы роговицы компактные, практически без признаков отека, дифференцируется структура десцеметовой мембраны с сохранными, неизмененными клетками эндотелия;

б – роговичный диск без обработки, глубокие слои стромы роговицы с признаками выраженного отека, увеличено расстояние между стромальными волокнами, десцеметова мембрана и эндотелиальные структуры сохранны

Рисунок 4 - Гистологические препараты человеческой кадаверной роговицы консервированной в среде Борзенка-Мороз. (Окраска гематокс. – эозин. Ув. Х400)

Таким образом, можно заключить, что изменения, которые происходят под действием кросслинкинга в нативной роговице, происходят и в роговице, прошедшей консервацию в среде Борзенка-Мороз.

Это позволило перейти к дальнейшему изучению биомеханических и биохимических свойств донорской консервированной роговицы, обработанной по методике кросслинкинг.

3.2 Результаты изучения временных параметров насыщения раствором рибофлавина стромы донорской роговицы методом спектроскопии диффузного отражения

Полное пропитывание стромы роговицы рибофлавином необходимо для того, чтобы процедура кросслинкинга была успешной и безопасной. В общепринятом протоколе рибофлавин всегда закапывают в течение 30 минут, в результате чего наступает полное насыщение роговичной стромы веществом [42]. Задачей данного исследования стало изучение временных параметров насыщения стромы донорской роговицы рибофлавином в зависимости от способа нанесения раствора (закапывание или помещение в раствор). Для реализации поставленной задачи был использован метод спектроскопии диффузного отражения.

При анализе данных спектроскопии роговично-склеральных дисков первой группы выявили достоверное увеличение коэффициента отражения через 5 минут по сравнению с контролем (таблица 2). Такое же увеличение выявили и в роговицах второй группы. Через 10 минут происходило максимальное увеличение коэффициента отражения в обеих группах. К 15-ой минуте коэффициент отражения выходил на «плато» и в дальнейшем оставался неизменным в обеих группах (рисунок 5). Таким образом, к 15-ой минуте происходило полное насыщение стромы роговицы 0,1% раствором рибофлавина в среде Борзенка–Мороз как при закапывании, так и при помещении роговицы в емкость с раствором. Более продолжительное закапывание растворов было нецелесообразно, в виду полного насыщения роговицы. Роговица насыщалась рибофлавином с одинаковой скоростью независимо от способа закапывания или помещения роговицы в раствор.

Таблица 2 – Распределение коэффициента отражения в зависимости от времени насыщения стромы роговично-склеральных дисков рибофлавином

Время, мин.	Коэффициент отражения, M±σ	
	1-я группа (n=3)	2-я группа (n=3)
0	0,34±0,006	0,37±0,01
5	0,64±0,02	0,57±0,01
10	0,69±0,02	0,74±0,01
15	0,72±0,01	0,72±0,01
20	0,71±0,006	0,7±0,01
25	0,74±0,02	0,72±0,02
30	0,74±0,01	0,7±0,02

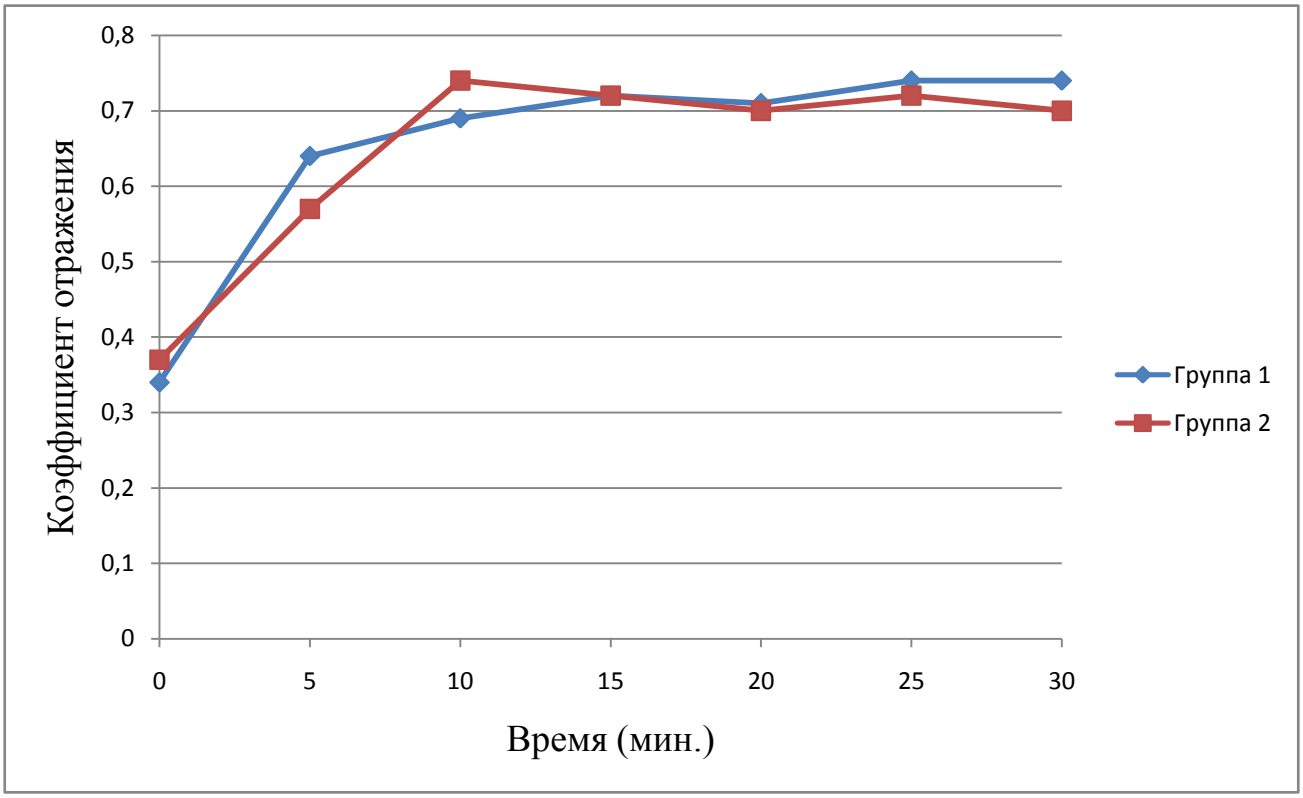


Рисунок 5 - Зависимость усредненного коэффициента отражения от времени насыщения стромы роговично-склеральных дисков рибофлавином

При проведении всех дальнейших экспериментов была использована выявленная в данном эксперименте закономерность, донорскую роговицу помещали в среду Борзенка-Мороз с добавлением рибофлавина на 15 минут, после чего ее обрабатывали ультрафиолетом.

Таким образом, выявлено, что полное насыщение роговичной стромы равнозначно как при закапывании, так и при помещении в раствор и наступает к 15 минуте процедуры, что может быть использовано в качестве модификации метода кросслинкинг при подготовке донорской роговицы к кератопластике.

3.3 Результаты исследования влияния метода кросслинкинг на степень выраженности отека стромы донорской роговицы методами торсионного взвешивания и оптической когерентной томографии переднего отрезка глаза

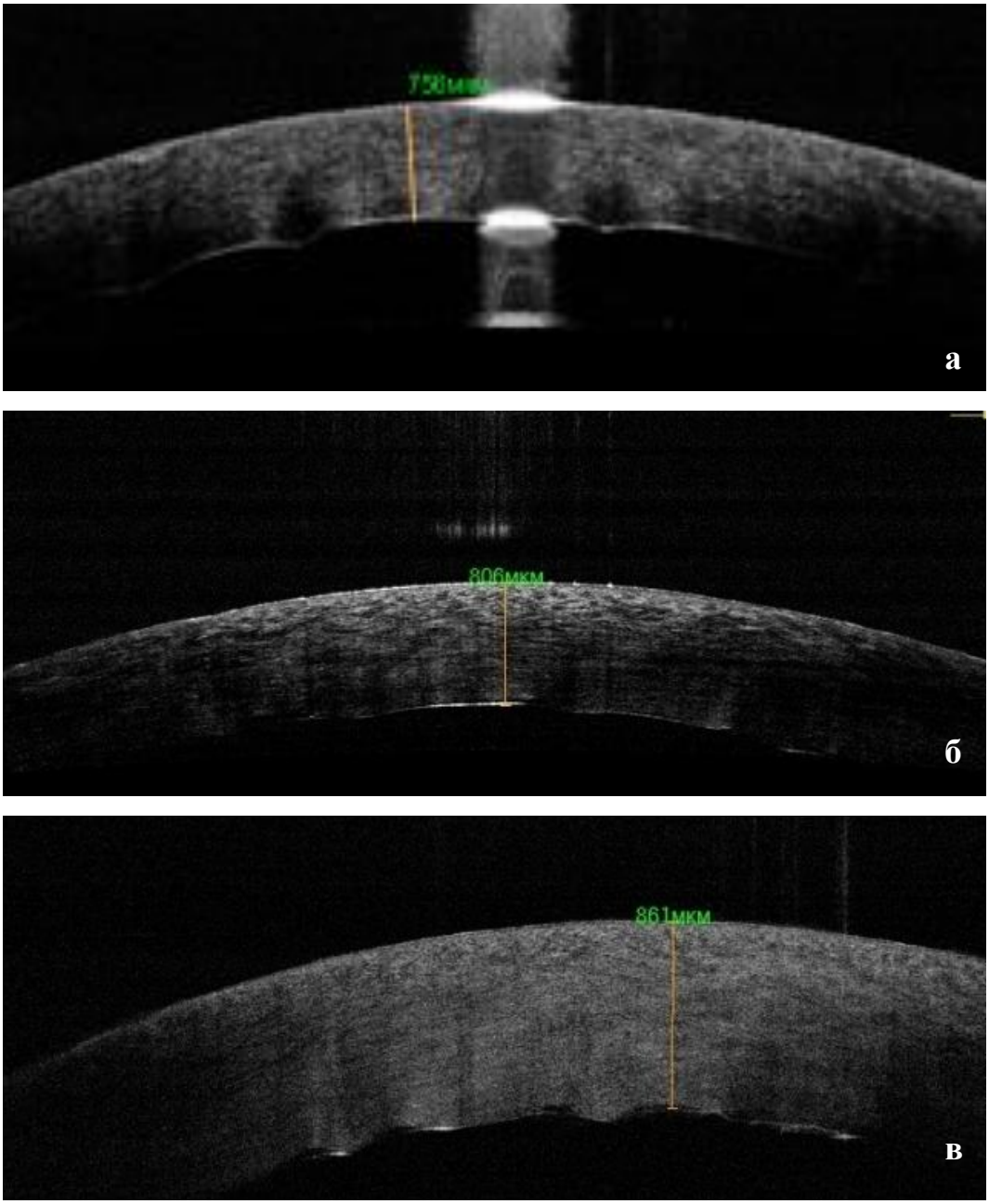
Роговица на 80% состоит из воды, не смотря на это, она легко отекает. Высокое содержание глюкозаминогликанов обусловливает это гидрофильное свойство роговицы. Роговичная ткань имеет определенное осмотическое давление и метаболический насос, которые могут рассматриваться как биофизический механизм, влияющий на оптические свойства ткани. Таким образом роговица представляет собой сложную биофизическую структуру, характер изменений которой зависит от воздействия различных факторов[14, 17]. Оценка изменения биофизических свойств донорской роговицы под действием кросслинкинга является критерием эффективности данного метода. Задачей данного исследования стало определение степени выраженности отека стромы роговицы после обработки по методике кросслинкинг в сравнении с необработанными роговицами методами торсионного взвешивания и оптической когерентной томографии переднего отрезка глаза.

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.

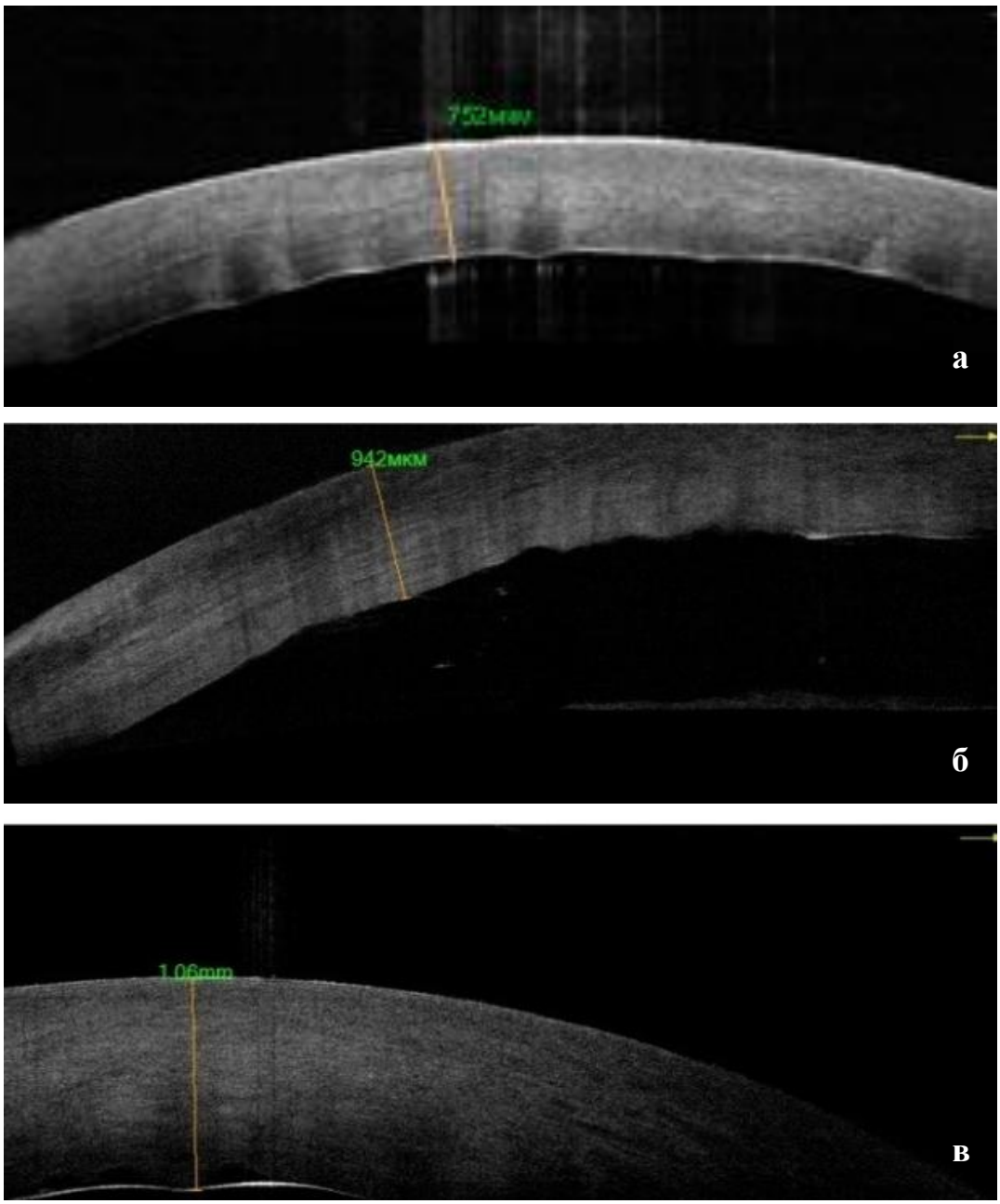
Таким образом, учитывая данные оптической когерентной томографии, можно увидеть, что роговицы опытной группы отекают меньше (средний процент прироста веса составил 6,0±1,2% и 14,0±0,4% через 24 и 72 часа соответственно) в сравнении с роговицами контрольной группы (средний процент прироста веса составил 25,4±0,6% и 37,8±2,0% через 24 и 72 часа соответственно). При анализе данных оптической когерентной томографии переднего отрезка глаза (рисунок 6а-в, 7а-в) выявлено, что прирост толщины стромы в опытной группе был меньше, чем в контрольной группе, что отражено в таблицах (таблица 3, 4). 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) (таблица 5, 6). Доказано, что роговицы, обработанные по методике кросс линкинг пропитываются физиологическим раствором меньше в сравнении с роговицами, консервированными в среде Борзенка–Мороз.



а - ОСТ донорского роговично-склерального диска до помещения в физиологический раствор, толщина роговичной стромы в центре 756 мкм;
б - ОСТ этого же роговично-склерального диска через 24 ч после помещения в физиологический раствор, толщина роговичной стромы в центре 806 мкм;
в - ОСТ этого же роговично-склерального диска через 72 ч после помещения в физиологический раствор, толщина роговичной стромы в центре 861 мкм

Рисунок 6 - ОСТ Visante донорских роговично-склеральных дисков опытной группы



а - ОСТ донорского роговично-склерального диска до помещения в физиологический раствор, толщина роговичной стромы в центре 752 мкм;
б – ОСТ этого же роговично-склерального диска через 24 ч после помещения в физиологический раствор, толщина роговичной стромы в центре 942 мкм;
в – ОСТ этого же роговично-склерального диска через 72 ч после помещения в физиологический раствор, толщина роговичной стромы в центре 1060 мкм (1,06мм)

Рисунок 7 - ОСТ Visante донорских роговично-склеральных дисков контрольной группы

Таблица 3 - Толщина донорских роговично-склеральных дисков опытной группы по данным ОСТ Visante

№ опыта	Толщина, мкм				
	До экспер.	24 ч.	72 ч.	прирост через 24 ч.	прирост через 72 ч.
1	756	806	861	50 (6,6%)	105 (13,9%)
2	743	789	846	46 (6,2%)	103 (13,9%)
3	741	785	845	44 (5,9%)	104 (14,0%)
4	750	803	852	53 (7,1%)	102 (13,6%)
5	744	799	846	55 (7,4%)	102 (13,7%)
6	726	759	833	33 (4,5%)	107 (14,7%)
7	751	796	857	45 (6,0%)	106 (14,1%)
8	723	752	828	29 (4,0%)	105 (14,5%)
M±σ	741,8± 11,7	786,1± 20,2	846,0±11,2	44,4±9,2* (6,0±1,2%)	104,3±1,8* (14,0±0,4%)

Таблица 4 - Толщина донорских роговично-склеральных дисков контрольной группы по данным ОСТ Visante

№ опыта	Толщина, мкм				
	До экспер.	24 ч.	72 ч.	прирост через 24 ч.	прирост через 72 ч.
1	752	942	1060	190 (25,3%)	308 (41,0%)
2	741	938	1027	197 (26,6%)	286 (38,6%)
3	733	917	993	184 (25,1%)	260 (35,5%)
4	749	940	1036	191 (25,5%)	287 (38,3%)
5	747	932	1018	185 (24,8%)	271 (36,3%)
6	720	906	982	186 (25,8%)	262 (36,4%)
7	755	941	1058	186 (24,6%)	303 (40,1%)
8	738	926	1007	188 (25,5%)	269 (36,4%)
M±σ	741,9±11,5	930,3±13,1	1022,6±28,4	188,4±4,2** (25,4±0,6%)	280,8±18,2** (37,8±2,0%)

Различия между средними значениями, отмеченные знаками * и ** статистически достоверны ($p < 0,05$)

Таблица 5 - Масса донорских роговично-склеральных дисков опытной группы

№ опыта	Вес, мг		
	До экспер.	24 ч.	Прирост
1	204	244	40(19,6%)
2	192	220	28(14,6%)
3	190	244	54(28,4%)
4	201	245	44(21,9%)
5	198	230	32(16,2%)
6	189	219	30(15,9%)
7	203	244	41(20,2%)
8	188	234	46(24,5%)
M±σ	195,6±6,6	235,0±11,0	39,4±8,9*(20,2±4,7%)

Таблица 6 - Масса донорских роговично-склеральных дисков контрольной группы

№ опыта	Вес, мг		
	До экспер.	24 ч.	Прирост
1	187	264	77(41,2%)
2	174	228	54(31,0%)
3	190	253	63(33,2%)
4	209	264	55(26,3%)
5	202	251	49(24,3%)
6	193	250	57(29,5%)
7	203	256	53(26,1%)
8	192	252	60(31,3%)
M±σ	193,8±11,0	252,3±11,2	59,0±8,6** (30,4±5,3%)

Различия между средними значениями, отмеченные знаками * и ** статистически достоверны ($p < 0,05$)

Как видно из результатов исследования представленных в таблицах, под воздействием рибофлавина и последующего ультрафиолетового облучения происходит процесс более плотной укладки коллагеновых волокон, в результате чего процесс гидратации стромы роговицы значительно замедляется, что подтверждено методами ОСТ переднего отрезка и торсионным взвешиванием.

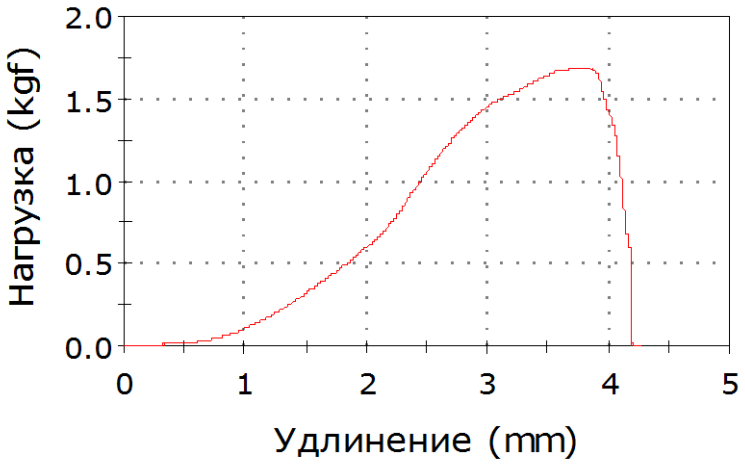
Таким образом, после воздействия кросслинкинга консервированные донорские роговицы пропитываются физиологическим раствором в 1,5 раза меньше и утолщаются в 2,7 раз меньше в сравнении с контрольной группой, что подтверждает факт усиления биофизических свойств роговицы за счет формирования уплотнений пластов коллагена.

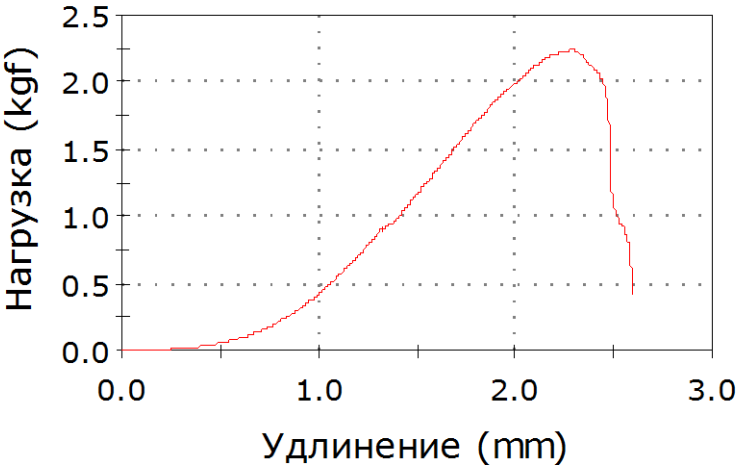
3.4 Результаты исследования влияния кросслинкинга на биомеханические свойства донорской роговицы

Биомеханические свойства роговицы играют важную роль при оценке устойчивости данной ткани к воздействию внешних факторов. Усиление этих свойств является важным этапом на пути формирования донорского трансплантата устойчивого к расплавлению. Задачей данного исследования стало изучение биомеханических свойств кросслинкинг модифицированной донорской роговицы методом определения предела прочности с помощью разрывной машины.

Сравнение нагрузки при растяжении образцов позволило установить различие в деформационных кривых, показывающих зависимость нагрузки, приложенной к испытываемому образцу, от удлинения этого образца (рисунок 8). Так, нагрузка при растяжении образцов на 2 мм в группе без обработки по методу кросслинкинг составила 0,5±0,03 kgf, в группе с обработкой при таком же растяжении нагрузка возросла до 2,0±0,09 kgf. Таким образом, для растяжения кросслинкинг обработанной донорской роговицы на 2 мм требуется нагрузка в 4 раза большая, чем для растяжения необработанной роговицы.

Разрыв необработанной роговицы происходит при нагрузке в 1,7±0,08 kgf, кросслинкинг модифицированная донорская роговица рвется при нагрузке в 2,3±0,09 kgf, что в 1,4 раза больше (рисунок 8)





а- График зависимости удлинения консервированной донорской роговицы обработанной по методу кросслинкинг от нагрузки

б- График зависимости удлинения консервированной донорской роговицы от нагрузки

Рисунок 8-График зависимости удлинения консервированной роговицы от прилагаемой нагрузки

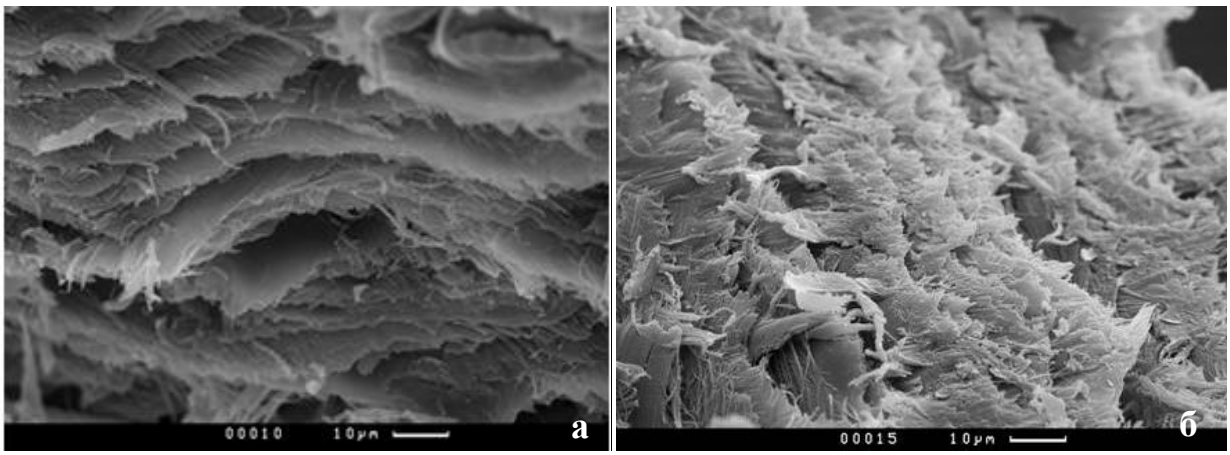
Возрастание нагрузки на строму роговицы в 4 раза при одинаковом растяжении и усилие необходимое для разрыва большее в 1,4 раза расценивали как значительное увеличение ее прочности, произошедшее в результате достижения эффекта кросслинкинга с формированием новых ковалентных связей «сшивок» между фибриллами коллагена.

Проведя анализ полученных результатов, становится очевиден эффект кросслинкинга, в результате которого происходит усиление прочностных свойств стромы роговицы, что делает ее устойчивой к воздействию внешних факторов.

3.5 Результаты изучения влияния кросслинкинга на химическую устойчивость донорской роговицы к протеолитическим ферментам методом электронной микроскопии

Протеолитические ферменты слезы могут проявлять свои агрессивные свойства в послеоперационном периоде и оказывать негативное влияние на эпителизацию и приживление донорского трансплантата. Усиление биохимической устойчивости роговичной ткани к воздействию агрессивных факторов является важным фактором снижения количества расплавлений трансплантата. На примере коллагеназы была создана модель протеолитических ферментов in vitro. Задачей данного исследования стало изучение химической устойчивости кросслинкинг модифицированной донорской роговицы к протеолитическим ферментам методом сканирующей электронной микроскопии.

По результатам СЭМ следует, что строма роговиц 1-ой контрольной группы была представлена пластинами строго ориентированных волокон белка коллагена (рисунок 9а). В строме роговиц 2-ой группы отмечались утолщение коллагеновых фибрилл, уменьшение расстояния между пластинами коллагена, более компактная укладка пластин под воздействием рибофлавина и ультрафиолета по сравнению с контрольной группой (рисунок 9б).

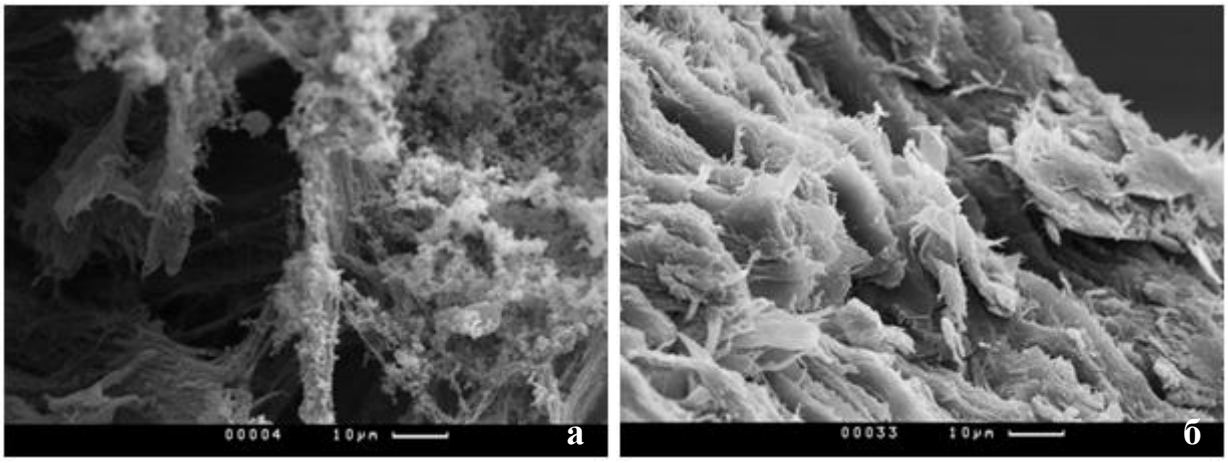


а – строго ориентированные волокна коллагена;

б – компактные утолщенные фибриллы коллагена после кросслинкинга

Рисунок 9 - Сканирующая электронная микроскопия стромы донорской роговицы консервированной в среде Борзенка-Мороз, (х1000)

Роговицы 3-ей группы после воздействия коллагеназы через 24 часа также сравнивались с контрольной группой: отмечалось разрушение коллагеновых фибрилл, нарушение продольной направленности пластин коллагена, нарушение структуры белка, визуализировались оставшиеся коагулированные части белковой фракции (рисунок 10а). Через 24 часа фибриллы коллагена роговиц 4-ой группы, обработанные рибофлавином, ультрафиолетом и коллагеназой, сохраняли свою структуру и направленность, прослеживалась более компактная укладка пластин коллагена по сравнению с роговицами из 3-ей группы (рисунок 10б).

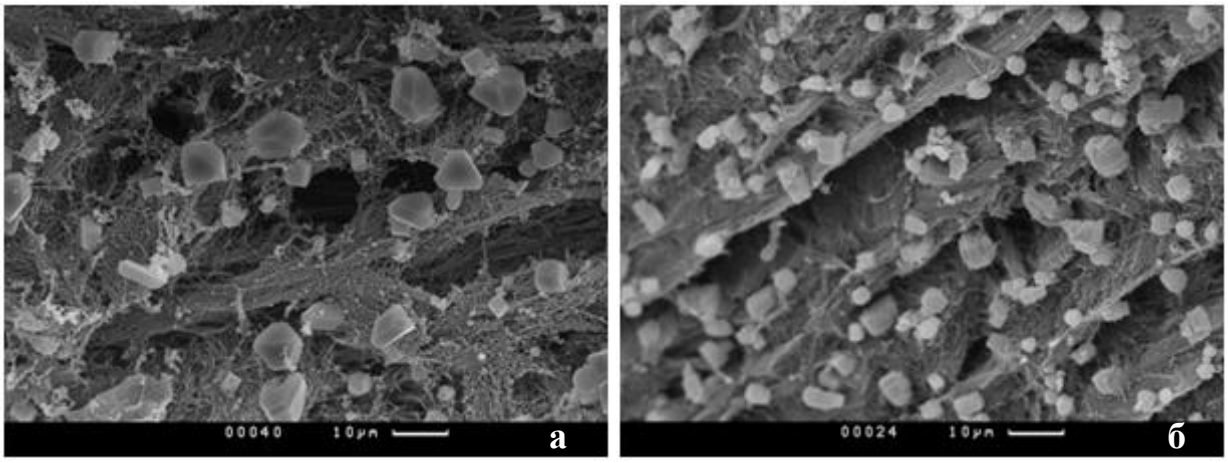


а – разрушенные коллагеновые фибриллы;

б – фибриллы коллагена сохранившие свою структуру после кросслинкинга

Рисунок 10 - Сканирующая электронная микроскопия стромы донорской роговицы консервированной в среде Борзенка-Мороз после воздействия коллагеназы через 24 часа, (х1000)

Динамическая оценка действия коллагеназы в 3-ей и 4-ой группах через 72 часа показала, что в 3-ей группе наблюдалось отчетливое разрушение коллагена стромы, отсутствие какой-либо направленности волокон, визуализировались оптические пустоты в зонах разрушенного коллагена (рисунок 11а), в то время как в 4-ой группе воздействие коллагеназы было минимальным с сохранением структуры и направленности пластов коллагена (рисунок 11б).



а – оптические пустоты в зонах разрушенного коллагена;
б – пласты коллагена, сохранившие свою структуру и направленность после кросслинкинга

Рисунок 11 - Сканирующая электронная микроскопия стромы донорской роговицы консервированной в среде Борзенка-Мороз после воздействия коллагеназы через 72 часа, (х1000)

При анализе изображений СЭМ подтвержден факт «склеивания» фибрилл и утолщения коллагеновых волокон в роговице под воздействием рибофлавина и ультрафиолетового излучения, более плотная упаковка пластин коллагена, уменьшение щелевых пространств между пластинами. Такая архитектоника приводила к усилению биохимической устойчивости ткани. При воздействии коллагеназы терялась четкая направленность волокон, а через некоторое время происходило разрушение структуры белка коллагена, что отчетливо было видно при воздействии коллагеназы на нативную роговицу через 24 и особенно через 72 часа. После обработки донорской роговицы по методу кросслинкинг воздействие коллагеназы становилось не столь разрушительным, сохранялась поперечная направленность пластин коллагена без признаков разрушения, с более компактной упаковкой и минимальными межщелевыми пространствами.

Таким образом, созданная модель протеолитических ферментов на основе коллагеназы продемонстрировала большую ферментативную устойчивость

кросслинкинг подготовленной роговицы с сохранением поперечной направленности и более компактной упаковкой пластин коллагена.

3.6 Способ подготовки донорского трансплантата для кератопластики

Проведя анализ результатов серии экспериментальных работ по изучению свойств кросслинкинг модифицированной донорской роговицы, сделаны выводы о том, что процедура кросслинкинг оказывала стабилизирующее физико-химическое воздействие на коллагеновые фибриллы роговичной ткани, увеличивала биомеханические свойства и биохимическую устойчивость к действию протеолитических ферментов, а также являясь безопасным и эффективным методом могла быть использована для кератопластики у пациентов с повышенным риском расплавления донорского трансплантата.

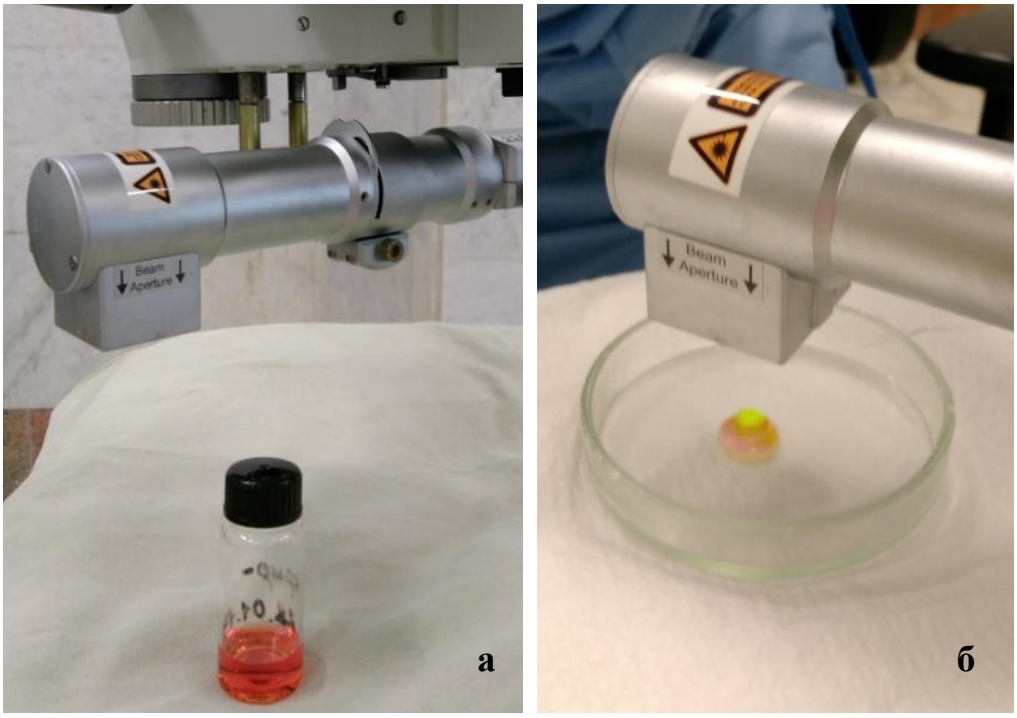
Учитывая данные всех исследований, была сформулирована задача: разработать способ подготовки донорского материала на основе модификации метода кросслинкинг для кератопластики у пациентов с язвами роговицы различной этиологии.

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 помещались в среду Борзенка-Мороз с добавлением 1 мл. 1% раствора рибофлавина на 15 минут (рисунок 13а).
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) (рисунок 12). В процессе обработки ультрафиолетом на донорскую роговицу каждые 5 минут капали по 1 капле декстралинка. Интраоперационно проводили контроль пахиметрии (рисунок 13б) (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.

Рисунок 12 - Прибор UV-X s/n 1000-401-39



а – донорский консервированный роговично-склеральный диск, помещенный в среду Борзенка-Мороз с добавлением 0,1% раствора рибофлавина;

б – облучение роговично-склерального диска

Рисунок 13 – Способ подготовки донорского трансплантата по методу кросслинкинг

Таким образом, в данной работе разработан новый способ подготовки донорского трансплантата для кератопластики с усиленными прочностными свойствами, что явилось важным этапом на пути решения проблемы хирургического лечения пациентов с повышенным риском расплавления донорской роговицы. Эффективность предложенной методики заключалась в снижении количества повторных кератопластик за счет повышения его биофизических, биомеханических свойств, а также усиление биохимической устойчивости, что стало возможным после воздействия кросслинкинга.

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Задачей данной главы явилась оценка результатов различных видов кератопластики с использованием донорского материала, обработанного по модифицированной методике кросслинкинг в сравнении со стандартной техникой без обработки донорского материала. Для реализации задачи обследовано 86 глаз (86-ти пациентов) с глубокими язвами роговицы. Все пациенты были разделены на две группы в зависимости от метода подготовки донорского материала и вида хирургического вмешательства.

Критериями отбора пациентов служили: наличие язвы роговицы различной этиологии с/без перфорации, без признаков активного воспалительного процесса, стерильные по данным бактериологического исследования.

В 1-ую контрольную группу вошли 42 глаза 42-х пациентов, которым была выполнена сквозная кератопластика с использованием донорского консервированного материала.

Во 2-ю опытную группу вошли 44 глаза 44-х пациентов, которым выполнена кератопластика с использованием донорского материала консервированного в среде Борзенка-Мороз и обработанного методом кросслинкинга. Из них на 12-ти глазах (12 пациентов) выполнена глубокая послойная кератопластика, на 32-х глазах (32 пациента), выполнена сквозная кератопластика.

В качестве донорского материала во всех случаях использовали аллогенные кадаверные роговицы с показателем трансплантабельности роговицы не ниже 2 В, (по классификация трансплантабельности трупных роговиц человека Борзенка С.А., 2008), консервированные в «Растворе для хранения» (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». Донорский материал соответствовал критериям отбора для кератопластики, ПЭК составляла 2300- 2950 кл/ кв.мм. (в среднем 2478 кл/ кв.мм.). Возраст доноров составил от 26-ти до 63-х лет. Интервал от момента смерти до энуклеации - не более 8-ми часов. Срок от момента консервации до проведения операции не более 2-х суток.

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

Срок наблюдения после операции составил 4 года.

Все операции выполняли в первую очередь с лечебной целью. Критериями оценки результатов операции явились: степень выраженности послеоперационной воспалительной реакции, наличие осложнений и их лечение, биологические результаты приживления трансплантата, оценка рисков расплавления трансплантата.

4.1 Результаты дооперационного обследования пациентов

В исследование последовательно были включены 59 женщин и 27 мужчин в возрасте от 31 до 80 лет (в среднем 61,0±10,2 лет) (таблица 7). В обеих группах было значительное преимущество женщин пенсионного возраста. Статистически значимой разницы в возрасте между пациентами 1-й и 2-й групп не выявлено. Также не было выявлено статистически значимой разницы в возрасте между пациентами мужского и женского пола в 2-х клинических группах.

Таблица 7 - Распределение пациентов по возрасту и полу (n=86)

Возраст (лет)	1-я группа (n=42), n (%)			2-я группа (n=44), n (%)			Всего (n=86), n (%)
	Мужчины	Женщины	Всего	Мужчины	Женщины	Всего	
31-40	1 (2,4%)	1 (2,4%)	2 (4,8%)	-	-	-	2 (2,3%)
41-50	2 (4,8%)	1 (2,4%)	3 (7,2%)	2 (4,6%)	4 (9,1%)	6 (13,7%)	9 (10,5%)
51-60	4 (9,5%)	9 (21,4%)	13 (30,9%)	6 (13,5%)	10 (22,7%)	16 (36,2%)	29 (33,7%)
61-70	3 (7,1%)	10 (23,8%)	13 (30,9%)	2 (4,6%)	12 (27,3%)	14 (31,9%)	27 (31,4%)
71-80	2 (4,8%)	9 (21,4%)	11 (26,2%)	1 (2,3%)	7 (15,9%)	8 (18,2%)	19 (22,1%)
Всего	12 (28,6%)	30(71,4%)	42 (100%)	11 (25%)	33 (75%)	44 (100%)	86 (100%)
M±σ	57,5±11,6	63,3±10,0	61,7±10,8	56,8±8,3	61,7±9,4	60,5±9,4	61,0±10,2

Примечание: «-» отсутствие рассматриваемого признака/параметра
Различие групп по возрасту и полу недостоверно (p>0,05)

Этиология язвенного процесса у исследуемых пациентов была различной и представлена в таблице 8 (рисунок 14-18).

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%)

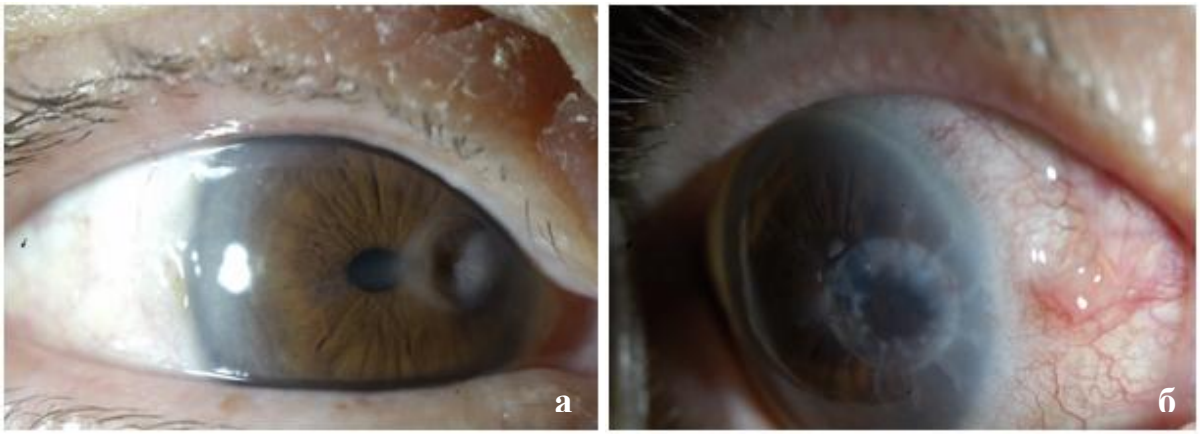
В обеих группах превалировали язвы роговицы, которые развились в исходе кератита: 20 пациентов (47,6%) в 1-й группе и 21 пациент (47,7%) во 2-й. Из них наиболее часто встречались вирусные кератиты герпетической этиологии (рисунок 14а, б). Бактериальные язвы (рисунок 17а, б) обычно развивались на фоне травмы эпителия роговицы инородным телом или при нарушении режима использования контактных линз. В 4-х случаях бактериальная язва развилась на фоне энтропиона нижнего века. По этиологии язв статистически значимой разницы между двумя клиническими группами выявлено не было.

В анамнезе у пациентов обеих групп были выполнены различные оперативные вмешательства. На 27-ми оперируемых глазах ранее была выполнена кератопластика по поводу глубокой язвы роговицы (рисунок 18 а, б). У этих пациентов этиология первичных язв также была различной: вирусные кератиты стали причиной расплавления роговицы в 9-ти случаях, бактериальные кератиты - в 7-ми случаях, в остальных случаях язвы роговицы возникли на фоне выраженного ревматоидного артрита (6 глаз) и ксероза на фоне нейропаралитической кератопатии (5 глаз). Всем пациентам при первичном обращении была проведена консервативная терапия основного заболевания, а в случае с ревматоидным артритом все пациенты консультированы у ревматолога и подобрана сопровождающая терапия. Однако в сроки от 1-го до 6-ти месяцев произошло расплавление донорского трансплантата, что потребовало выполнения рекератопластики.

Из анамнеза выявлено, что на 24-х глазах кроме кератопластики были выполнены различные операции: на 12-ти глазах проведена экстракапсулярная экстракция катаракты с имплантацией заднекамерной модели ИОЛ, на 8-ми глазах - антиглаукоматозная операция непроникающего типа (6 глаз) и проникающего типа (2 глаза), у 4-х пациентов была выполнена операция по устранению лагофтальма и трихиаза.

Между пациентами 2-х клинических групп по количеству проведенных хирургических манипуляций статистически значимых различий не выявлено.

При биомикроскопии у всех пациентов было правильное положение век, полное смыкание (особое внимание обращали при наличии в анамнезе лагофтальма), рост ресниц был правильный (особенно при наличии трихиаза в анамнезе). Во всех случаях прозрачность роговицы была снижена, срез неравномерной толщины, отмечали наличие дефекта эпителия и стромы роговицы неправильной формы, размером от 2,5 до 6,5 мм до глубоких слоев стромы роговицы. По локализации язвы роговицы располагались как в оптической зоне (71 глаз), так и на периферии роговицы (15 глаз). Передняя камера была неравномерная и измельчена на 8-ми глазах за счет формирования передних синехий и частичной тампонады фистулы радужкой. На 45-ти глазах отмечали положительную фильтрационную пробу с флюоресцеином, при этом передняя камера отсутствовала или была щелевидной. На 8-ми глазах диагностировали помутнение хрусталика разной степени выраженности. Осмотр глубжележащих структур глаза был затруднен.

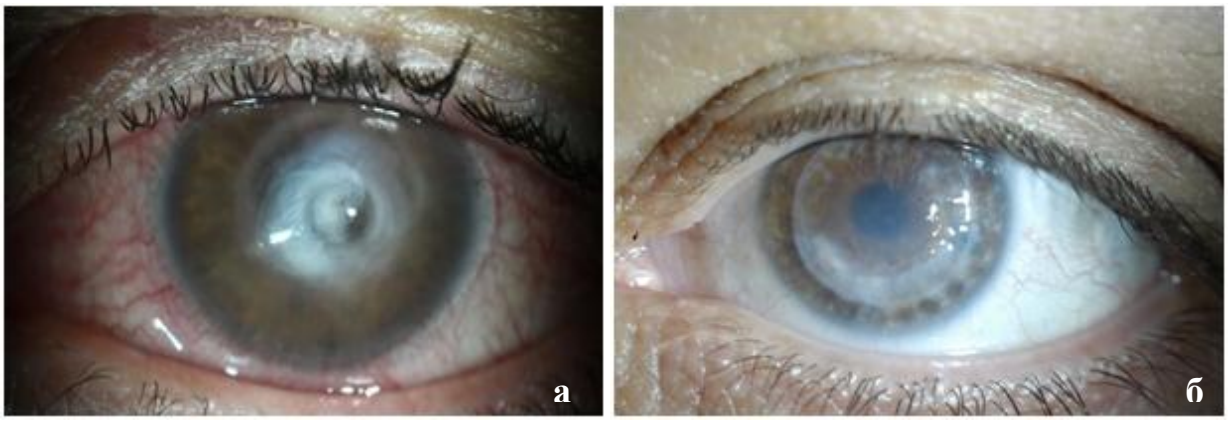


а – парацентральная язва роговицы, исход герпетического кератита;
б – 15 месяцев после СКП с использованием кросслинкинг модифицированного материала, эпителизация полная, прозрачное приживление трансплантата

Рисунок 14 - Глаз пациента В., 54 года

а – периферическая язва роговицы на фоне ревматоидного артрита;
б – 18 месяцев после сквозной кератопластики, эпителизация полная, полупрозрачное приживление трансплантата

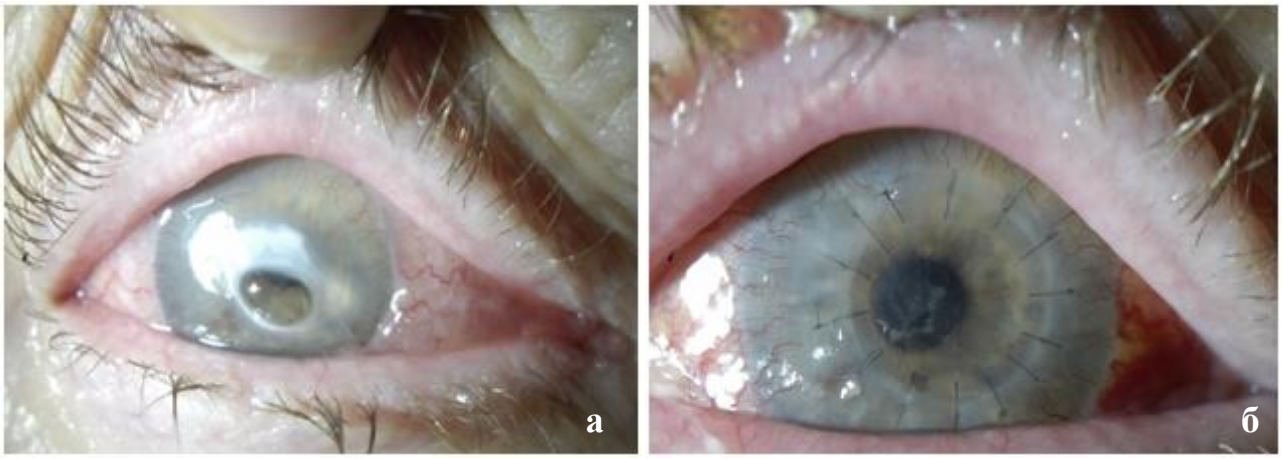
Рисунок 15 - Глаз пациента М., 65 лет



.

а – язва роговицы, исход нейропаралитической кератопатии;
б – 12 месяцев после глубокой послойной кератопластики с использованием кросслинкинг модифицированного донорского материала, эпителизация полная, полупрозрачное приживление трансплантата

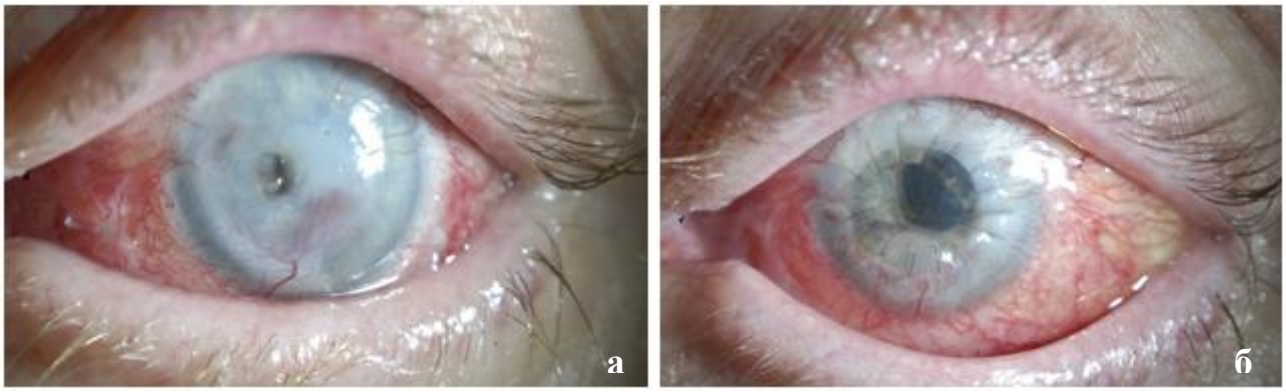
Рисунок 16 - Глаз пациента Ю., 68 лет



а – язва роговицы, исход бактериального кератита;

б – 2 месяца после СКП, рецидивирующая эрозия трансплантата, выраженный десцеметит, прозрачное состояние трансплантата

Рисунок 17 - Глаз пациента Ш., 75 лет



а – расплавление донорского трансплантата через 2 месяца после СКП по поводу центральной язвы бактериальной этиологии;

б – 3 месяца после сквозной кератопластики с использованием кросслинкинг модифицированного донорского материала, эпителизация полная, прозрачное состояние донорского трансплантата

Рисунок 18 - Глаз пациента К., 73 года

Большое диагностическое значение в оценке состояния переднего отрезка глаза имел метод ОСТ Visante. Оценивали не только состояние роговицы, ее толщину, зону истончения, перфорацию, но и состояние угла передней камеры, в частности степень его закрытия, наличие синехий, глубину и равномерность передней камеры. По данным ОСТ 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, у всех остальных пациентов расположение язвы было центральным или парацентральным.

Для подтверждения роговично-конъюнктивального ксероза проводили количественную оценку суммарной слезопродукции (проба Ширмера) и пробу Норна. Снижение показателей от нормальных значений наблюдали на 22-х глазах. На 6-ти глазах имелись макропризнаки ксероза и тяжелая степень угнетения слезопродукции.

Острота зрения до операции у пациентов обоих групп была снижена и колебалась от 1/∞ pr. certa до 0,3 (таблица 9). Степень снижения остроты зрения было обусловлено локализацией язвы, ее размерами, наличием сопутствующей патологии.

Таблица 9 – Некоррегируемая острота зрения до операции (n=86)

Острота зрения	1-я группа (n=42), (%)	2-я группа (n=44), (%)	Всего (n=86), (%)
1/∞ pr. certa - 0,01	30 (71,4%)	35 (79,6%)	65 (75,6%)
0,01-0,1	8 (19,1%)	6 (13,6%)	14 (16,3%)
0,1-0,3	4 (9,5%)	3 (6,8%)	7 (8,1%)
M±σ	0,03±0,009*	0,02±0,008*	0,03±0,006*

Инструментально измерить внутриглазное давление не представлялось возможным. Поэтому был использован метод пальпаторной транспальпебральной тонометрии. На 13-ти из 86-ти глаз пальпаторно отмечали гипотонию. На 5-ти глазах выявлено повышение ВГД, при этом на 2-х глазах ВГД удалось компенсировать медикаментозно, на 3-х глазах повышение ВГД было стойким. По данным ОСТ Visante на этих глазах было диагностировано закрытие УПК на всем протяжении за счет иридокорнеальных сращений и отека радужки, что потребовало проведения антиглаукоматозной операции с имплантацией дренажа Ahmed одномоментно с кератопластикой. У всех остальных пациентов отмечалась пальпаторно нормотония. На 9-ти глазах по данным Б-сканирования были выявлены отек или отслойка сосудистой оболочки от 1,5 до 3 мм. Признаков отслойки сетчатки ни в одном случае выявлено не было. На 47-ми глазах наблюдали деструкцию стекловидного тела разной степени выраженности. Статистических различий по состоянию стекловидного тела и сетчатки между пациентами обеих клинических групп выявлено не было.

Выполнение биометрии было ориентировочным. Конфокальная микроскопия выполнялась только после хирургического вмешательства при прозрачном приживлении трансплантата в сроки 1 месяц.

4.2 Техника хирургического лечения пациентов

Каждому пациенту перед операцией разъясняли характер исходной патологии роговицы, суть предстоящего хирургического вмешательства, вероятные послеоперационный результаты, а также степень риска возникновения послеоперационных осложнений. Пациенты подписывали информационное согласие. Все операции проводились в первую очередь с лечебной целью для профилактики развития инфекционных осложнений угрожающих гибелью глаза, субатрофии глазного яблока.

Оперативное вмешательство производили под регионарной анестезией, включающей ретробульбарную блокаду, блокаду лицевого нерва, внутримышечную и внутривенную седацию. За 30 мин до операции проводили ретробульбарную анестезию с введением Sol. Marcaini 0,5% - 1,5 ml или Sol. Naropini 0,75% - 1,5 ml и Sol. Lidocaini 10% - 1 ml. Блокаду лицевого нерва производили Sol. Lidocaini 10% - 5 ml по О'Брайену. Внутримышечно вводили Sol. Relanii 0,5% - 1 ml, Sol. Nalbuphini 1% - 1 ml, Sol. Ketoroli 3% - 1 ml. Во время операции проводили дробную внутривенную седацию Sol. Nalbuphini 1% - 1 ml.

После обработки операционного поля 0,5% раствором хлоргексидина биглюконата, инстилляции в конъюнктивальную полость раствор витабакта веки фиксировали блефаростатом.

4.2.1. Особенности проведения сквозной кератопластики у пациентов

Операция выполнена на 74-х глазах (86,1%).

1. Для фиксации глазного яблока эписклерально подшивали фиксирующее кольцо диаметром 16-17 мм.

2. С поверхности роговицы удаляли эпителий, чтобы максимально локализовать зону повреждения стромы роговицы реципиента.

3. При выборе диаметра трепана руководствовались размером зоны дефекта роговичной ткани и ее локализацией. При небольших дефектах, локализующихся на периферии, использовали трепаны диаметром от 3-х до 4-х мм. При локализации зоны дефекта в центральной или парацентральной зонах использовали трепаны от 4,5 до 7,5 мм. Разметку наносили трепаном с помощью метиленового синего.

4. Трепанацию роговицы реципиента проводили по разметке с особой осторожностью. При отсутствии перфорации роговицы после удаления эпителия, сохранном тонусе глазного яблока, использовали одноразовые вакуумные трепаны фирмы Baron (США) диаметром 6,5-7,5 мм. При меньшем диаметре необходимого трепана или выраженной гипотонии глазного яблока применяли многоразовые трепаны фирмы Geuder (Германия).

5. При наличии сопутствующей патологии проводили имплантацию дренажа Ahmed (3 глаза), реконструкцию переднего отрезка глаза, которая включала синехиотомию (8 глаз), экстракцию катаракты (10 глаз), имплантацию ИОЛ (4 глаза), пластику радужки (12 глаз), переднюю витрэктомию (3 глаза). Экстракцию катаракты проводили экстракапсулярно (8 глаз). После проведения капсулорексиса, ядро хрусталика удаляли компрессионно, хрусталиковые массы вымывали канюлей Симко. На 2-х глазах с подвывихом хрусталика 3-ей степени проводили интракапсулярную экстракцию катаракты.

6. Всем больным производили не менее 2-х иридэктомий с целью профилактики развития зрачкового блока в послеоперационном периоде.

7. Выкраивание сквозного роговичного трансплантата донора проводили трепаном того же диаметра, что и у реципиента.

8. Фиксацию донорского трансплантата осуществляли узловыми швами нейлон 10-0. Узловая фиксация проводилась с целью профилактики провисания и прорезывания швов в послеоперационном периоде.

9. Операцию завершали введением 0,3 мл дексазона под конъюнктиву и наложением монокулярной повязки.

4.2.2. Особенности проведения глубокой послойной кератопластики

Проведение глубокой послойной кератопластики было возможно на глазах с истончением роговицы, но при отсутствии перфорации Десцеметовой мембраны и сохранной передней камере (21 глаз). Операция выполнена на 12 глазах (13,9%).

1. Проводили несквозную трепанацию на 2/3 толщины роговицы после деэпителизации и разметки роговицы.

2. На периферии роговицы делали парацентез для профилактики пролапса и спонтанного разрыва Десцеметовой мембраны в момент ее отделения от стромы роговицы.

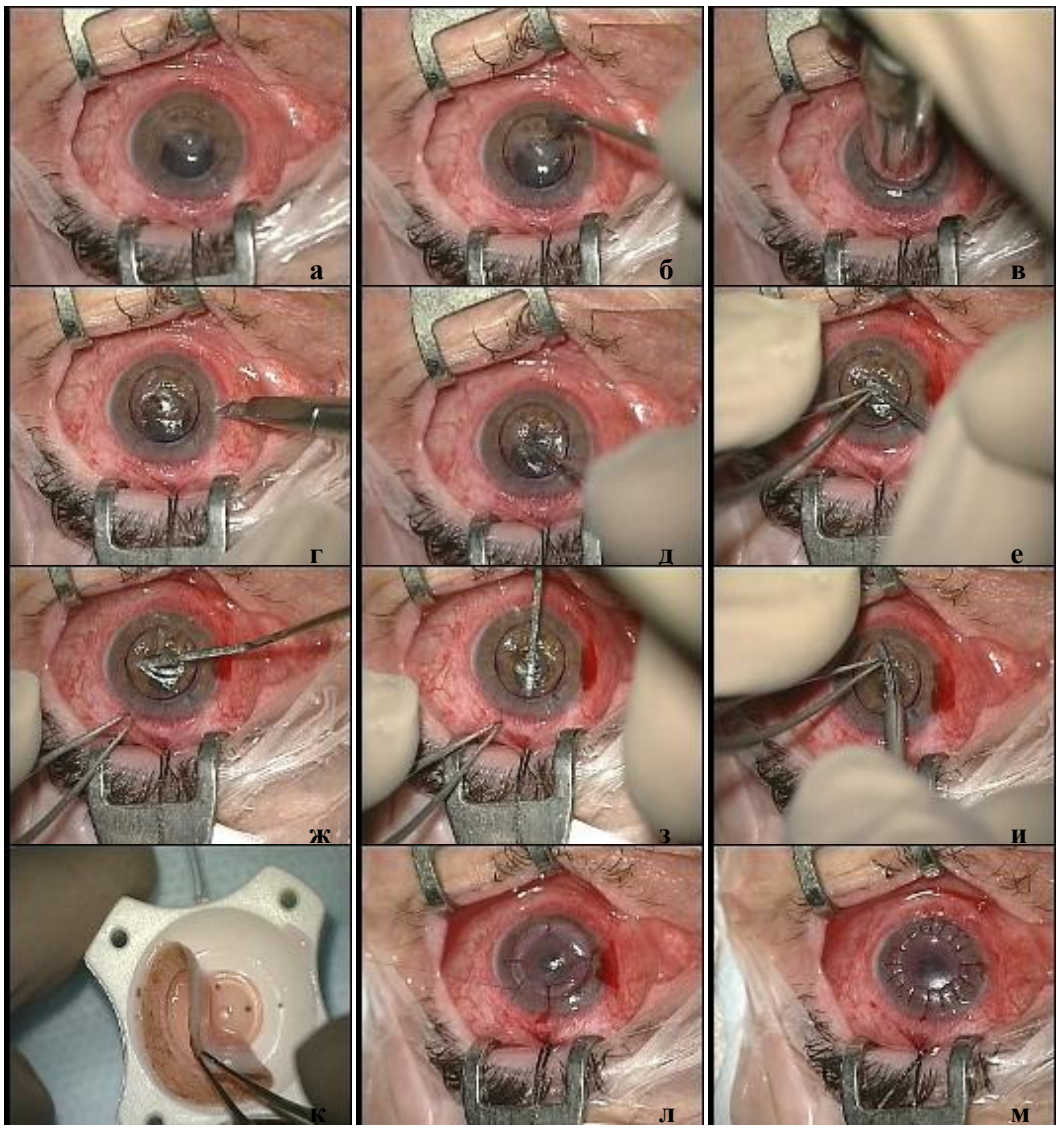
3. Периферию роговицу расслаивали в пределах зоны несквозной трепанации.

4. Шпателем из зоны обнажения Десцеметовой мембраны очень аккуратно отслаивали Десцеметову мембрану в пределах зоны несквозной трепанации. В случае перфорации десцеметовой мембраны (9 глаз) переходили на сквозную кератопластику.

5. Лезвием под страховкой шпателя введенного в сформированный карман проводили рассечение стромы роговицы от зоны истончения к зоне трепанации. Ножницами иссекали строму роговицы в зоне трепанации. Таким образом, формировали ложе в роговице реципиента.

6. После выкраивания сквозного донорского трансплантата соответствующего размера механически удаляли Десцеметову мембрану и эндотелий.

7. Полученный донорский трансплантат фиксировали в подготовленном ложе на глазу реципиента узловыми швами нейлон 10-0.



а- глаз пациента с язвой роговицы, Десцеметова мембрана сохранена; б- удаление роговичного эпителия и разметка; в- несквозная трепанация на 2/3 толщины роговицы; г- парацентез на периферии роговицы; д,е,ж,з- отслаивание Десцеметовой мембраны ; и- иссечение отслоенной стромы роговицы; к- выкраивание сквозного донорского трансплантата; л,м- фиксация донорского трансплантата узловыми швами

Рисунок 19 - Этапы проведения глубокой послойной кератопластики

4.3 Факторы, осложняющие хирургические манипуляции.

Интраоперационным фактором, зависимым напрямую от исходного состояния глаза, стал разрыв Десцеметовой мембраны в ходе выполнения глубокой послойной кератопластики, который был отмечен в 9-ти случаях. Во всех случаях переходили на сквозную трепанацию и выполняли сквозную кератопластику с использованием кросслинкинг модифицированного донорского материала. Прогнозировать разрыв Десцеметовой мембраны не представлялось возможным. Чаще разрыв отмечали при синдроме сухого глаза, дефекте эпителизации, который приводил к дегидратации остаточной стромы и Десцеметовой мембраны. При этом мембрана становилась хрупкой и отделить ее от стромы не представлялось возможным.

При наличии перфорации роговицы, гипотонии глазного яблока, отсутствии передней камеры проведение сквозной трепанации роговицы было затруднено. Это связывали с высоким риском повреждения радужки и хрусталика в момент трепанации роговицы в условиях отсутствия передней камеры и риска получения неправильной формы трепанационного отверстия (овал, неправильный край трепанационного отверстия). В таких случаях выполняли несквозную трепанацию роговицы, а дорезание проводили лезвием и роговичными ножницами.

При сопутствующей вторичной глаукоме, наличии мутной роговицы, мелкой передней камеры и иридокорнеальных сращений техническое проведение имплантации клапана Ахмед было затруднено. Это имело высокий риск повреждения радужки, капсулы хрусталика или имплантации дренажной трубки дренажа в стекловидное тело. Дренаж Ахмед имплантирован пациентам при наличии стойкого повышения ВГД (3 глаза).

Показанием к одномоментному удалению хрусталика в ходе кератопластики явились: наличие катаракты с признаками набухания (6 глаз), подвывих хрусталика 3-ей степени (2 глаза), фибропластические процессы в

передней камере глаза (заращение зрачка, иридохрусталиковые синехии) (2 глаза).

7-ми пациентам (7 глаз) обеих клинических групп, у которых расплавление роговицы возникло на фоне выраженного ксероза, что являлось фактором высокого риска расплавления трансплантата, дополнительно проведена амниопластика с профилактической целью. Фиксацию амниона проводили узловыми эписклерально-конъюнктивальными швами викрил 8-0.

4.4 Ведение послеоперационного периода

Терапевтические мероприятия проводились в послеоперационном периоде и были направлены на профилактику возможных инфекционных осложнений, стимуляцию эпителизации трансплантата, уменьшение степени выраженности послеоперационной воспалительной реакции.

Всем пациентам проводили:

1. Местную антибактериальную терапию. Использовали антибиотик широкого спектра действия группы фторхинолонов последнего поколения (Levofloxacinum 0,5%) в течение 1 месяца.
2. Иммунодепрессивную и противовоспалительную терапию. Назначали синтетический глюкокортикоид 1 раз в день - местное введение Sol. Dexamethasoni 0,4% - 0,5 мл подконъюнктивально на 10 дней. При выявлении признаков опалесценции водянистой влаги в передней камере кратность подконъюнктивального введения дексаметазона увеличивали до 2 раз в день, к лечению добавляли инъекции под конъюнктиву Sol. Gentamicini 4% - 0,5 мл до купирования воспалительного процесса.
3. Местную репаративную терапию. Использовали препарат низкой вязкости (Sol. Balarpanum 0,01%), глазной гель (Corneregelum 5%) в течение длительного времени (6 месяцев).

4. Антиглаукоматозную терапию использовали у пациентов с вторичной глаукомой для профилактики повышения ВГД. Назначали препараты ингибитора карбоангидразы (Sol. Brinzolamidi 1%) или комбинированные препараты β-блокатор+ингибитор карбоангидразы (Sol. Azargum) с последующим контролем внутриглазного давления.
5. Слезозаместительная терапия. В отдаленном послеоперационном периоде больные постоянно получали слезозаменители (Хило-Комод, видисик, систейн, систейн ультра) от 4 до 6 раз в день.

13 пациентам (13 глаз) обеих клинических групп с замедленной эпителизацией дополнительно использовали мягкие контактные линзы.

4.5 Результаты хирургического лечения пациентов

Осмотр пациентов проводили ежедневно в течение всего периода пребывания в стационаре, через 1, 3, 6 и 12 месяцев после операции, затем каждый год, а также в случаях возникновения осложнений.

При биомикроскопическом осмотре в раннем послеоперационном периоде (1-14 сутки) у пациентов обеих групп, которым была выполнена сквозная кератопластика, отмечали умеренную инъекцию сосудов глазного яблока, умеренные слезотечение, светобоязнь. Следует отметить, что у всех пациентов 2 - ой группы, которым была выполнена глубокая послойная кератопластика, послеоперационная реакция и признаки роговичного синдрома (слезотечение, светобоязнь) были менее выражены.

Состояние роговичного трансплантата в обеих группах было удовлетворительным: прозрачный трансплантат был отмечен на 81-ом из 86-ти глаз, умеренно выраженная складчатость Десцеметовой мембраны преобладала у большинства больных (71 глаз). Снижение прозрачности трансплантата отмечено на 5-ти глазах больных после сквозной кератопластики за счет грубых складок десцеметовой мембраны. Статистически значимых различий в обеих группах

больных отмечено не было. Динамическое наблюдение за этими больными свидетельствовало о улучшении прозрачности роговицы.

У 10-ти пациентов (10 глаз) 1-ой группы и 7-ми пациентов (7 глаз) 2-ой группы на 1 сутки после выполнения сквозной кератопластики была выявлена опалесценция влаги передней камеры. У 3-х из этих пациентов (3 глаза) 1-ой группы на 2-ые сутки отмечены признаки фибринозного экссудата, что потребовало назначения дополнительного антибактериального лечения. К 7-ым суткам фибрин рассосался. У всех пациентов, которым была проведена глубокая послойная кератопластика, признаков воспаления в передней камере отмечено не было.

Степень выраженности послеоперационного воспалительного процесса, определяемая интенсивностью инъекции глазного яблока, наличием роговичного синдрома, опалесценции в передней камере свидетельствовала о ареактивном течении послеоперационного периода у пациентов после выполнения глубокой послойной кератопластики по сравнению с пациентами после сквозной кератопластики. Фильтрационная флюоресцеиновая проба в раннем послеоперационном периоде у всех пациентов была отрицательная, отсутствие провисания швов указывало на полную адаптацию трансплантата. Состояние структур передней камеры (глубокая передняя камера, открытый угол передней камеры) также подтверждали хорошую адаптацию донорского трансплантата.
Уровень внутриглазного давления определялся пальпаторно. У всех пациентов отмечали нормотонию.

Контроль за состоянием стекловидного тела и сетчаткой в послеоперационном периоде осуществляли методом Б-сканирования. У 7-ми пациентов (7 глаз), которым в дооперационном периоде была диагностирована отслойка сосудистой оболочки, отмечалась положительная динамика, величина ОСО составила не более 2-х мм с полным прилеганием к 10-ым суткам после операции. Признаков гемофтальма, отслойки сетчатой оболочки ни у одного пациента обеих клинических групп отмечено не было.

Наряду со степенью выраженности воспалительной реакции в раннем послеоперационном периоде, особое значение в плане профилактики помутнения и расплавления роговичного трансплантата имела эпителизация трансплантата. На 30-ти глазах 1-ой клинической группы и на 34-ти глазах 2-ой клинической группы эпителизация роговичного трансплантата начиналась со 2-х суток и заканчивалась к 7-ым суткам. У 22-х пациентов (22 глаза) обеих клинических групп была выявлена замедленная эпителизация, потребовавшая применения, в первую очередь, мягкой контактной линзы.

На 7-ми из 22-х глаз обеих групп выполнена амниопластика в сроки от 20-ти до 30-ти дней после кератопластики. Показанием к проведению амниопластики явилась замедленная эпителизация трансплантата.

ОСТ переднего отрезка глаза проводилось всем пациентам в сроки 10 дней, 1 месяц, 3 месяца, 6 месяцев и 1 год после операции. Оценивали состояние роговичной поверхности, адаптацию трансплантата, наличие отека или истончения стромы роговицы, наличие ретрокорнеальных мембран, состояние передней камеры, угла передней камеры, радужки, хрусталика.

Стабилизация остроты зрения у пациентов обеих групп происходила к концу 1-го месяца со статистически достоверным повышением его среднего значения до 0.3 (таблица 10).

Таблица 10 - Некоррегированная острота зрения через месяц после операции (n=86)

Острота зрения	1-я группа (n=42), (%)	2-я группа (n=44), (%)	Всего (n=86), (%)
0,001(движение руки у лица)	9(21,4)	8 (18,2)	17 (19,8)
0,005 (счет пальцев у лица)	4 (9,5)	3 (6,8)	7 (8,2)
0,01	4(9,5)	6 (13,6)	10 (11,6)
0,05	5(11,9)	5 (11,4)	10 (11,6)
0,1	12 (28,6)	12 (27,3)	24 (27,9)
0,3	8 (19,1)	10 (22,7)	18(20,9)
M±σ	0,09±0,02*	0,1±0,01*	0,1±0,01

*отличия групп от дооперационных значений достоверны p<0,05

У 5-ти пациентов (5 глаз) 1 группы и 3-х пациентов (3 глаза) 2-ой группы после СКП через 3-6 месяцев после операции произошло достоверное прогрессирование снижение остроты зрения вследствие развития помутнения хрусталика. Всем пациентам выполнена факоэмульсификация катаракты с имплантацией интраокулярной линзы (рисунок 20,21). У всех 8-ми пациентов отмечалось повышение остроты зрения от 0,1 до 0,3. При этом прозрачность роговичного трансплантата сохранялась, потеря ПЭК не превышала 10,2%.

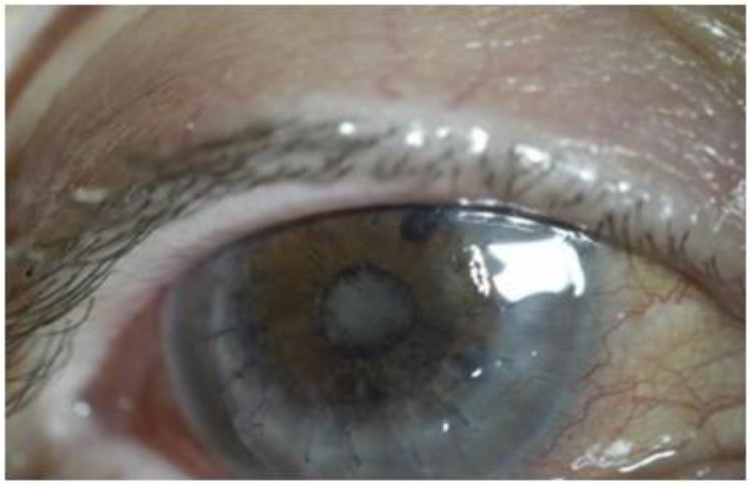


Рисунок 20 - Глаз пациента М. 65 лет, 5 месяцев после СКП. Осложненная катаракта.

Рисунок 21 - Глаз того же пациента, 2 недели после факоэмульсификации катаракты с ИОЛ и пластикой радужки, острота зрения 0,3.

У 2-х пациентов (2 глаза) из 1-ой клинической группы через 3 месяца были выявлены фибропластические процессы в передней камере с формированием ретрокорнеальной мембраны, биомикроскопически был выявлен синдром мелкой передней камеры с частичным заращением зрачка. Эти данные были подтверждены методом ОСТ Visante. У 1-го пациента (1 глаз) первой группы развилась стафилома роговичного трансплантата (рисунок 22) вследствие стойкого неконтролируемого повышения внутриглазного давления, что потребовало проведения дополнительного хирургического лечения с имплантацией дренажа Ahmed.

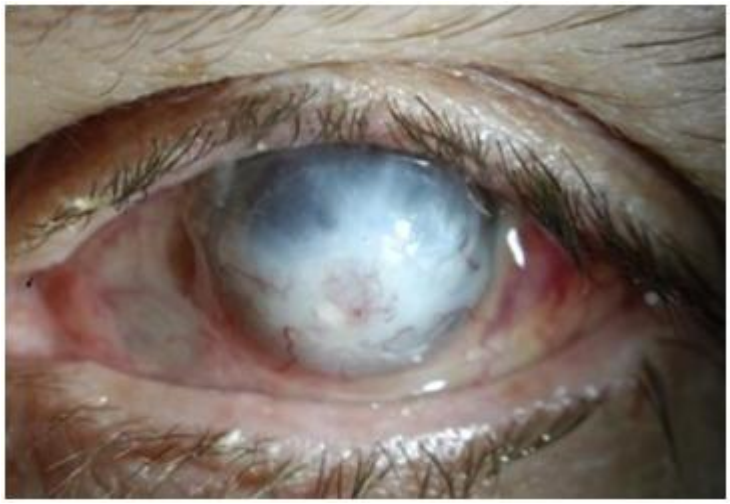


Рисунок 22 - Глаз пациента О. 70 лет. Стафилома роговицы на фоне вторичной закрытоугольной глаукомы.

Через 1-6 месяцев после операции у 12-ти пациентов (12 глаз) 1 группы и у 9-ти пациентов (9 глаз) 2-ой группы после СКП были выявлены признаки нарушения эпителизации (рисунок 23 а,б,в) на фоне слезозаместительной и репаративной терапии. Лечение было дополнено назначением контактной линзы. 10-ти из этих пациентов (10 глаз) из 1-ой группы и 8-ми пациентам (8 глаз) из 2-ой группы проведена дополнительная амниопластика, однако, процесс истончения роговичного трансплантата прогрессировал у 10-ти пациентов (10 глаз) 1-ой группы и у 3-х пациентов (3 глаза) 2-ой группы, что привело, не смотря на интенсивное лечение, к истончению трансплантата и развитию глубокой язвы в сроки до 6 месяцев (рисунок 24).

а- язва роговицы герпетической этиологии, расплавление всех слоев стромы до десцеметовой мембраны, десцеметова мембрана сохранена; б- эрозия донорского трансплантата через 2 месяца после глубокой послойной кератопластики с использованием кросслинкинг модифицированного донорского материла; в- полупрозрачное приживление трансплантата через 18 месяцев после проведенного лечения, помутнение поверхностных слоев стромы, эпителизация полная

Рисунок 23 - Глаз пациента И. 55 лет

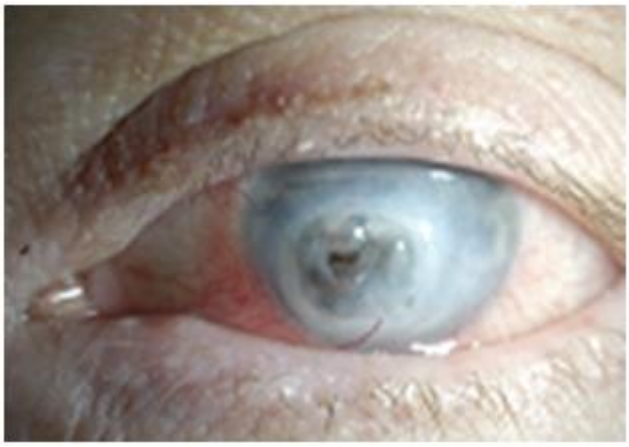


Рисунок 24 - Глаз пациента А. 67 лет Расплавление донорского трансплантата через 6 месяцев после сквозной кератопластики по поводу центральной язвы роговицы бактериальной этиологии, отмечается бомбаж радужки, синдром мелкой передней камеры.

До 6-ти месяцев после операции у всех остальных пациентов (65 глаз) обеих групп биомикроскопически отмечали полную эпителизацию и адаптацию трансплантата, эти данные были подтверждены методом ОСТ Visante переднего отрезка глаза.

Также по данным биомикроскопии и ОСТ Visante через 1 месяц после операции у 9-ти пациентов (9 глаз) 1-ой клинической группы отмечалось полупрозрачное состояние трансплантата с нежным помутнением эпителия и поверхностных слоев стромы роговицы, у 13-ти пациентов (13 глаз) отмечено помутнение всех слоев роговичного трансплантата без признаков его истончения, полная эпителизация, что также было оценено как благоприятный исход кератопластики.

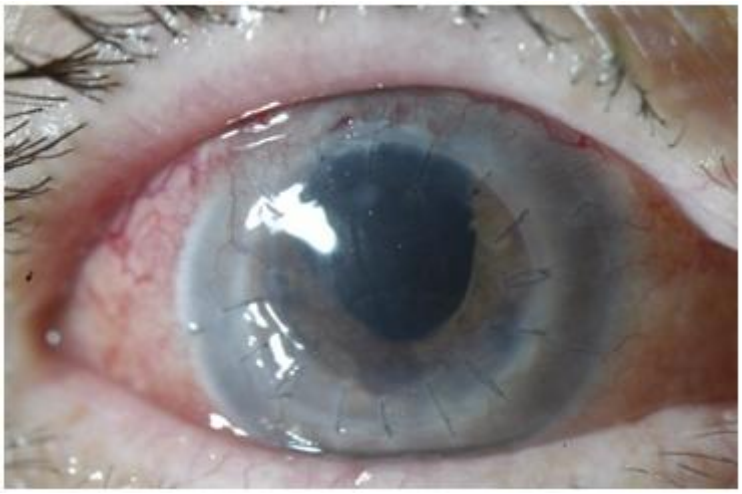


Рисунок 25 - Глаз пациента Р. 61 год, 20 дней после СКП с использованием кросслинкинг модифицированного донорского материала. Прозрачное состояние трансплантата, эпителизация полная.

У 10-ти пациентов (10 глаз) 2-ой клинической группы после СКП и у 4-х пациентов (4 глаза) после ГПК состояние трансплантата было полупрозрачным, у 5-ти и 3-х пациентов(5 и 3 глаза) соответственно мутным (таблица 11).

У всех остальных пациентов обеих клинических групп отмечали прозрачное состояние трансплантата (рисунок 25).

Таблица 11 - Результаты состояния донорской роговицы через 1 месяц после операции (n=86)

Состояние трансплантата	1-я группа (n=42), (%)	2-я группа (n=44), (%)	Общее кол-во (n=86), (%)
Прозрачное приживление	20 (47,6)	22 (50,0)	42 (48,8)
Полупрозрачное приживление	9 (21,4)	14 (31,8)	23 (26,8)
Мутное приживление	13 (31,0)	8 (18,2)	21 (24,4)

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

Через 1 месяц после оперативного вмешательства при прозрачном состоянии трансплантата (рисунок 26,27) для визуализации процессов, происходящих в донорском трансплантате после обработки по методике кросслинкинг in vivo проведена конфокальная микроскопия у пациента 2-ой группы (рисунок 28,29,30).

Рисунок 26 - Глаз пациента М., 75 лет, глубокая язва роговицы

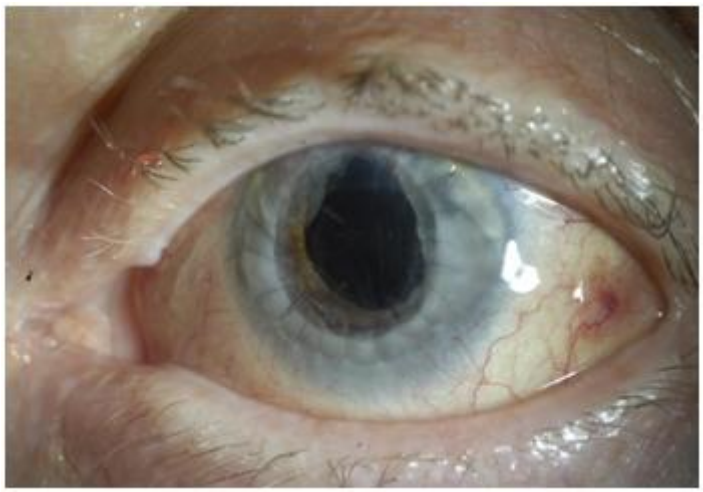


Рисунок 27 - Глаз того же пациента через 6 месяцев после сквозной кератопластики с использованием кросслинкинг модифицированного донорского материала и реконструкцией передней камеры.

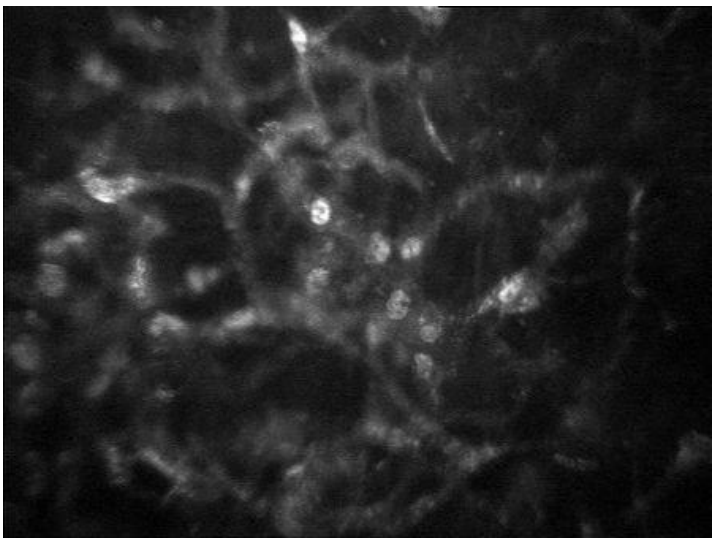


Рисунок 28 - Конфокальная микроскопия передней (200 мкм) стромы роговицы того же пациента через 1 месяц после сквозной кератопластики с использованием донорской роговицы обработанной по методике кросслинкинг. Наблюдается сетчатость роговичной стромы, гипоцеллюлярность с незначительным количеством вновь активированных кератоцитов. Ув. х 500

Глубина послеоперационных изменений определялась в пределах 300 мкм, задние слои стромы оставались без выраженных изменений, визуализировался лишь переход гипоцеллюлярных слоев к слоям с нормальной плотностью кератоцитов.

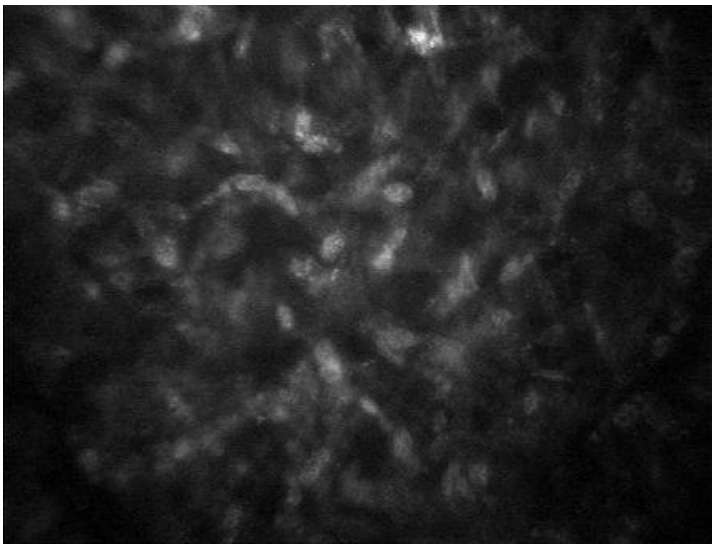


Рисунок 29 - Конфокальная микроскопия стромы роговицы того же пациента, более глубокие слои, плотность кератоцитов повышается. Ув. х 500

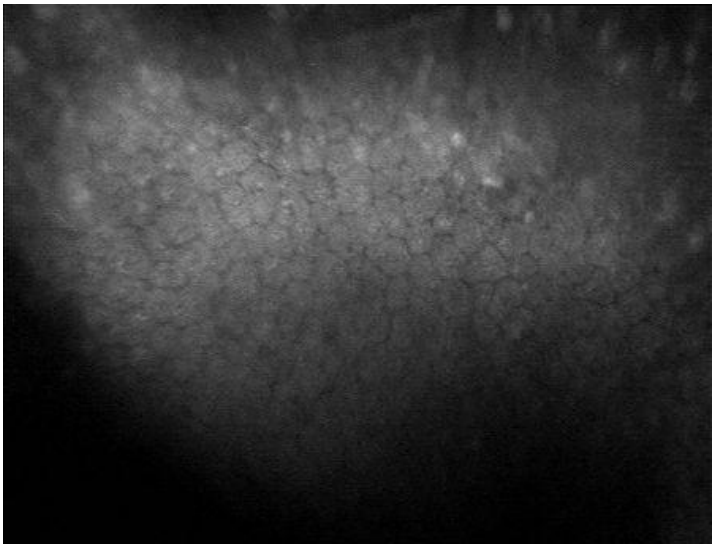


Рисунок 30 - Конфокальная микроскопия эндотелия того же пациента. Структура клеток эндотелия сохранена. Ув. х 500

Результаты конфокальной микроскопии донорской роговицы подтвердили данные о локализации изменений после воздействия кросслинкинга в передних и средних слоях стромы, при этом наблюдалась сетчатость роговичной стромы и гипоцеллюлярность с незначительным количеством активированных кератоцитов, задние слои и эндотелий оставались интактными, что позволило говорить о безопасности метода.

При обследовании через 6 месяцев в зоне УФ облучения отмечали полную репопуляцию роговицы активированными кератоцитами.

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 (8,1%) , на остальных глазах было непрозрачное приживление (91,9%) (таблица 12,13, рисунок 31,32).

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 $p<0,05$

Таблица 13 - Некоррегируемая острота зрения после операции (первая/вторая группа)

Острота зрения	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, (%)
1/∞ pr. certa - 0,01	17/20 (40,5/45,5)	15/21 (46,9/53,8)	14/22 (51,9/59,5)	16/23 (64,0/63,9)	16/24 (66,7/66,7)	17/25 (70,8/69,5)
0,01-0,1	16/13 (38,1/29,5)	10/10 (31,3/25,7)	8/9 (29,6/24,3)	6/8 (24,0/22,2)	6/8 (25,0/22,2)	6/8 (25,0/22,2)
0,1-0,3	9/11 (21,4/25,0)	7/8 (21,8/20,5)	5/6 (18,5/16,2)	3/5 (12,0/13,9)	2/4 (8,3/11,1)	1/3 (4,2/8,3)
M±σ	0,06*±0,01/ 0,07*±0,01	0,06*±0,01/ 0,06*±0,01	0,05*±0,01/ 0,05*±0,01	0,04*±0,01/ 0,04*±0,009	0,03±0,01/ 0,04±0,01	0,02±0,009/ 0,03±0,009

*отличия групп от дооперационных значений достоверны $p<0,05$

Рисунок 31 - Глаз пациента С., 35 лет, 10 месяцев после глубокой послойной кератопластики с использованием кросслинкинг модифицированного донорского материала по поводу центральной язвы роговицы герпетической этиологии, эпителизация полная, прозрачное приживление донорского трансплантата, острота зрения 0,3

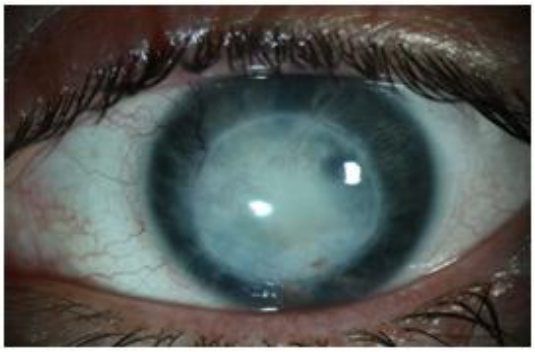


Рисунок 32 - Глаз пациента Х., 46 лет, 2 года после сквозной кератопластики с использованием кросслинкинг модифицированного донорского материала по поводу центральной язвы роговицы бактериальной этиологии, эпителизация полная, мутное приживление трансплантата, острота зрения 1/∞ pr. certa

Рисунок 33 - Глаз пациентки В., 75 лет, расплавление донорского трансплантата через 6 месяцев после сквозной кератопластики по поводу центральной язвы роговицы герпетической этиологии, расплавление стромальных слоев в центре трансплантата, десцеметова мембрана частично сохранена, бомбаж радужки, передняя камера отсутствует, острота зрения 0,05

Однако, ни в одном случае не было функциональной и анатомической гибели глаза. Все операции выполнялись, в первую очередь, с лечебной целью. При этом следует отметить, что выполнение глубокой послойной кератопластики при неперфоративных глубоких язвах роговицы позволило получить лучший результат за счет минимизации операционной травмы и снижения воспалительной реакции глаза в раннем послеоперационном периоде. Наиболее частыми причинами помутнения роговичного трансплантата являлись рецидивирующие эрозии трансплантата, которые чаще наблюдались у пациентов с первичными язвами на фоне вирусного кератита, в основном герпетической этиологии, и ревматоидного артрита; наличие ретрокорнеальной мембраны; синдрома мелкой передней камеры; болезнь трансплантата иммунного характера; постепенная 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 грубого 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.

Проведя анализ полученных результатов, следует отметить, что частота расплавлений или несостоятельности роговичных трансплантатов на глазах 1-ой группы была значительно выше (18 глаз), чем на глазах 2-ой группы (6 глаз). Наиболее часто расплавления трансплантата отмечали в течение первого года после кератопластики (рисунок 33). Через 6 месяцев после кератопластики количество расплавлений трансплантата в 1-ой группе составило 10 глаз, во 2-ой группе 3 глаза, через 1 год количество расплавлений изменилось до 5-ти случаев в 1-ой группе и до 2-х случаев во второй, через 2 года после операции в 1-ой группе расплавилось 2 трансплантата, во 2-ой 1 трансплантат, через 3 года после хирургического лечения было выявлено 1 расплавление роговицы в 1-ой группе, при дальнейшем наблюдении расплавлений ни в одной группе не было.

Таким образом, подводя итог анализу результатов выполненных исследований, считаем возможным заключить, что разработанный способ подготовки донорского материала, основанный на модификации методики кросслинкинг, позволил усилить прочностные свойства донорской роговицы за счет воздействия на коллагеновые фибриллы стромальных слоев донорского материала и сделал его устойчивым к воздействию агрессивных факторов, что может быть рекомендовано к использованию при проведении кератопластики у больных с повышенным риском лизиса донорского трансплантата. 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Глубокие язвы роговой оболочки являются прогностически неблагоприятной в плане лечения патологией, приводящей к тяжелым последствиям вплоть до гибели глаза. Единственным способом сохранения глазного яблока и в ряде случаев повышения зрительных функций является кератопластика. По мнению ряда авторов основной целью лечебной кератопластики является сохранение глазного яблока путем удаления патологического участка роговицы и восстановление ее целостности [43]. Исходы кератопластики различны. Однако, непрозрачное приживление донорского трансплантата при полной эпителизации и состоятельности послеоперационного рубца у пациентов с тяжелыми глубокими язвами роговицы различной этиологии должно рассматриваться как благоприятный результат хирургического лечения ввиду высокого риска расплавления трансплантата в послеоперационном периоде на фоне рецидива язвы роговицы. Для того чтобы добиться максимально благоприятного при данной патологии исхода кератопластики и уменьшить количество повторных пересадок роговицы необходимо было разработать технологию операции и подготовки донорского материала.

Таким образом, целью данного исследования стала разработка технологии лечения пациентов с глубокими язвами роговицы методом кератопластики на основе модификации способа подготовки донорского трансплантата. Для достижения цели были сформулированы задачи: изучить временные параметры насыщения стромы донорской роговицы рибофлавином методом спектроскопии диффузного отражения в зависимости от способа нанесения раствора; изучить биомеханические свойства кросслинкинг модифицированной донорской роговицы методами торсионного взвешивания, оптической когерентной томографии и с помощью разрывной машины; изучить химическую устойчивость кросслинкинг модифицированной донорской роговицы к протеолитическим ферментам методом сканирующей электронной микроскопии; разработать способ

подготовки донорского материала для кератопластики у пациентов с язвами роговицы различной этиологии; разработать и обосновать оптимальную технику кератопластики с использованием кросслинкинг модифицированного донорского трансплантата у пациентов с язвами роговицы; оценить результаты различных видов кератопластики с использованием донорского материала, обработанного по модифицированной методике кросслинкинг в сравнении со стандартной техникой без обработки донорского материала.

Изучение изменения свойств донорской консервированной роговицы, обработанной по известной методике кросслинкинг, явилось важным этапом на пути реализации данной цели.

T. Seiler и E. Spoerl в 2003 году провели первые экспериментальные исследования метода кросслинкинг и показали, что биомеханическая устойчивость роговицы может быть увеличена при применении рибофлавина под действием ультрафиолетового излучения [145]. Авторами подробно описана классическая методика кросслинкинг. Таким образом, использование метода усиления прочностных свойств роговицы явилось основным в создании трансплантата способного противостоять агрессивным факторам при высоком риске расплавления роговичной ткани после кератопластики. Несмотря на то, что метод кросслинкинга широко известен и используется в лечении прогрессирующего кератоконуса, болящей форме буллезной кератопатии и другой патологии роговицы, при обзоре литературы по данной теме не было найдено работ, в которых изучались бы свойства консервированной донорской роговицы после воздействия рибофлавина и ультрафиолета, а также доказана эффективность применения данного метода при кератопластике [128, 136].

В настоящее время для кератопластики используют донорские роговицы консервированные в среде Борзенка-Мороз [4,5,42]. Одной из задач исследования явилось проведение серии экспериментов по изучению эффекта кросслинкинга на донорской роговице. При этом оценивали морфологические, биомеханические и

биохимические свойства роговичного коллагена, стабильность полученного эффекта после проведения ультрафиолетового кросслинкинга в донорской роговице в сравнении с необработанной роговицей. Комплекс экспериментальных мероприятий включал в себя ряд методов: спектроскопия диффузного отражения, торсионное взвешивание и оптическая когерентная томография, изучение предела прочности с помощью разрывной машины, а также световая и электронная микроскопии.

Первым подготовительным этапом экспериментального блока явилась серия морфологических исследований для визуализации процессов, происходящих в консервированной донорской роговице под действием рибофлавина и ультрафиолета. Установили, что после обработки донорской консервированной роговицы рибофлавином и ультрафиолетом происходят изменения в поверхностных и средних слоях стромы роговицы при сохранных клетках эндотелия и десцеметовой мембраны. Визуализация процессов, происходящих в донорской консервированной ткани под действием кросслинкинга, позволили нам удостовериться в положительном эффекте данной процедуры и при соблюдении предложенных авторами методики параметров и отсутствии губительного воздействия на глубокие слои роговицы, в частности десцеметову мембрану и эндотелий. Это позволило перейти к изучению биомеханических и биохимических свойств донорской консервированной роговицы, обработанной по предложенной методике.

До настоящего времени остается до конца невыясненным вопрос оптимальных параметров кросслинкинга для достижения полноценного эффекта сшивания коллагена роговицы. Полное пропитывание стромы роговицы рибофлавином является необходимым условием успешного и безопасного проведения кросслинкинга.

Принятым стандартом считается закапывание раствора рибофлавина в течение 30-ти минут, в результате чего возникает полное насыщение стромы роговицы рибофлавином. В зависимости от толщины роговицы применяют

различные растворы рибофлавина с добавлением глюкозы или физиологического раствора, но время и способ инстилляции остается неизменным и составляет 30 минут [138]. В данной работе предложена модификация технологии кросслинкинга с созданием нового раствора для донорской роговицы. Это 0,1% раствор рибофлавина в среде Борзенка-Мороз, в который помещается донорская роговица.

При изучении временных параметров насыщения раствором рибофлавина донорской консервированной роговицы методом спектроскопии диффузного отражения было выявлено, что к 15-ой минуте происходит полное насыщение стромы роговицы 0,1% раствором рибофлавина в среде Борзенка–Мороз как при закапывании, так и при помещении донорской роговицы в емкость с раствором. Выявленная закономерность позволила внести корректировки в признанную стандартную методику кросслинкинг и использовать полученные параметры в дальнейшем не только в эксперименте, но и в клинике.

Следующим этапом стало изучение биофизических (степень развития отека роговицы), биомеханических (предел прочности роговицы) и биохимических (химическая устойчивость роговицы к коллагеназе) свойств донорской консервированной роговицы. При изучении 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, что подтверждает факт усиления биофизических свойств за счет формирования связей между пластинами коллагена. Исследование биомеханических свойств продолжено в эксперименте с использованием универсальной испытательной машины Instron 3382, проведен анализ прочностных характеристик образцов роговицы. При этом выявлено, что 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.

Эффект кросслинкинга с формированием новых ковалентных соединений и усилением межфибриллярных коллагеновых связей обеспечивает увеличение ее прочности.

Таким образом, проанализировав серию экспериментов по изучению биофизических и биомеханических свойств донорской консервированной роговицы, стал очевиден эффект кросслинкинга, в результате которого происходило усиление прочностных свойств стромы роговицы, что сделало ее устойчивой к воздействию внешних факторов.

Задачей следующего исследования стало изучение химической устойчивости донорской роговицы, обработанной по методике кросслинкинг в сравнении с роговицей, консервированной в среде Борзенка-Мороз к протеолитическим ферментам методом 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 создана модель протеолитических ферментов in vitro. При анализе изображений СЭМ подтвержден факт «склеивания» фибрилл и утолщения коллагеновых волокон в роговице под воздействием рибофлавина и ультрафиолетового излучения, более плотная упаковка пластин коллагена, уменьшение щелевых пространств между пластинами. Такая архитектоника приводила к повышению биохимической устойчивости ткани. При воздействии коллагеназы терялась четкая направленность волокон, а через некоторое время происходило разрушение структуры белка коллагена, что отчетливо видно при воздействии коллагеназы на нативную роговицу через 24 и особенно через 72 часа. После обработки донорской роговицы по методу кросслинкинг воздействие коллагеназы становилось не столь разрушительным, сохранялась поперечная направленность

пластин коллагена без признаков разрушения, с более компактной упаковкой и минимальными межщелевыми пространствами.

Таким образом, сравнивая полученные результаты с результатами, представленными при анализе литературы [138, 145, 148, 149], можно заключить, что изменения, которые происходят под действием кросслинкинга в нативной роговице, происходят и в роговице, прошедшей консервацию в среде Борзенка-Мороз.

Подробное изучение свойств донорской консервированной обработанной по методике кросслинкинг роговицы позволило разработать способ подготовки донорского материала на основе модификации метода кросслинкинг, который является безопасным и эффективным методом и может быть использован в клинике для кератопластики у пациентов с глубокими язвами роговицы с целью снижения количеств расплавления донорского трансплантата.

Способ подготовки донорского материала для кератопластики:

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 помещались 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) (рисунок 12). 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.

В литературе последних лет появились единичные сообщения о возможности проведения кросслинкинга на донорском трансплантате либо сразу после проведения кератопластики, либо в раннем послеоперационном периоде после нее. Авторами использовался неконсервированный донорский материал. Кросслинкинг проводили по общепринятой методике [45,46,47]. Однако, такая тактика проведения лечения увеличивает сроки проведения хирургического вмешательства или требует деэпителизации трансплантата в раннем послеоперационном периоде, что у пациентов с замедленной эпителизацией роговицы может явиться причиной рецидивирующей эрозии роговицы.

Кроме того, сам процесс кросслинкинга как по данным литературы, так и по данным, полученным в данной работе, не влияет на эпителизацию донорского трансплантата [136,137,138].

Клиническая часть работы выполнена на основе проведения и анализа результатов 86-ти операций кератопластики с выполнением диагностических мероприятий до операции, через 10 дней, 1, 3, 6, 12 месяцев, а затем каждый год после хирургического вмешательства и в случае развития осложнений. Максимальный срок наблюдений составил до 4 лет.

Клинико-функциональные результаты проанализированы на основе хирургического лечения пациентов с глубокими язвами роговицы различной

этиологии, которые были разделены на 2 группы в зависимости от проводимого хирургического вмешательства.

1-ю контрольную группу составили 42 глаза 42-х пациентов, которым была выполнена сквозная кератопластика по стандартной методике.

Во 2-ю опытную группу вошли 44 глаза 44-х пациентов, которым выполнена кератопластика с использованием кросслинкинг модифицированного донорского материала. Из них 12-ти пациентам (12 глаз) выполнена глубокая послойная кератопластика с использованием кросслинкинг модифицированного донорского материала.

У 32-х пациентов (32 глаза) опытной группы, в ходе проведения операции был выявлен глубокий дефект стромы роговицы, сопровождающийся нарушением целостности Десцеметовой мембраны, что явилось показанием к выполнению сквозной кератопластики с использованием кросслинкинг модифицированного донорского материала.

Этиология язвенного процесса была различна, однако, в обеих группах превалировали язвы, возникшие в результате вирусного и бактериального кератитов. 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 трансплантата, что потребовало проведения рекератопластики. Все операции выполнены одним хирургом, группы были сопоставимы по нозологическим, возрастным, половым характеристикам. Всем пациентам был проведен стандартный перечень пред- и послеоперационных исследований. Дополнительно проводилась фильтрационная флюоресцеиновая проба, пробы Ширмера и Норна, оптическая когерентная томография (Visante OCT model 1000) и конфокальная микроскопия в послеоперационном периоде (Confoscan-4).

Особенности проведения хирургического лечения у пациентов 1-ой группы заключались в правильном выборе трепана в зависимости от размера и локализации язвенного дефекта. При наличии перфорации роговицы, гипотонии

глазного яблока проведение полной трепанации роговицы было трудновыполнимо. Это связано с высоким риском повреждения радужки и хрусталика в момент трепанации роговицы в условиях отсутствия передней камеры и риска получения неправильной формы трепанационного отверстия (овал, неправильный край трепанационного отверстия). При наличии сопутствующей патологии проводили реконструкцию переднего отрезка глаза, которая включала синехиотомию (8 глаз), экстракцию катаракты (10 глаз), имплантацию ИОЛ (8 глаз), пластику радужки (12 глаз), переднюю витрэктомию (3 глаза).

Хирургическое лечение пациентов 2-ой группы включало проведение сквозной и глубокой послойной кератопластики. Проведение глубокой послойной кератопластики было возможно на глазах с истончением роговицы, но при отсутствии ее перфорации, т.е. сохранной Десцеметовой мембраной. Интраоперационным осложнением, зависимым напрямую от исходного состояния глаза стал разрыв Десцеметовой мембраны в 9-ти случаях (9 глаз). Во всех случаях переходили на сквозную трепанацию и выполняли сквозную кератопластику с использованием кросслинкинг модифицированного донорского материала по стандартной методике с наложением узловых швов нейлон 10-0. Прогнозировать разрыв Десцеметовой мембраны не представляется возможным. Чаще разрыв отмечали при синдроме сухого глаза, дефекте эпителизации, который приводил к дегидратации остаточной стромы и Десцеметовой мембраны. При этом мембрана становилась хрупкой и отделить ее от стромы не представлялось возможным.

Ранний послеоперационный период характеризовался выраженностью воспалительного процесса, определяемого интенсивностью инъекции глазного яблока, выраженностью роговичного синдрома, наличием складок Десцеметовой мембраны, наличием опалесценции в передней камере. Статистически значимых различий при оценке воспалительной реакции у пациентов обеих групп после сквозной кератопластики выявлено не было, однако отмечено, что после

выполнения глубокой послойной кератопластики отмечается более ареактивное течение послеоперационного периода. Аналогичные данные приводятся в единичных литературных источниках на небольшом примере пациентов, пролеченных по поводу помутнений роговицы в результате герпетического кератита [133,134].

Важным признаком в раннем послеоперационном периоде являлись сроки эпителизации. На 30-ти глазах 1-ой клинической группы и на 34-х глазах 2-ой клинической группы эпителизация роговичного трансплантата начиналась со 2-х суток и заканчивалась к 7-ым суткам. У 22-х пациентов (22 глаза) обеих клинических групп была выявлена замедленная эпителизация, потребовавшая применения, в первую очередь, мягкой контактной линзы.

На 7-ми из 22-х глаз обеих групп была выполнена амниопластика в сроки от 20-ти до 30-ти дней после кератопластики. Показанием к проведению амниопластики явилась замедленная эпителизация трансплантата. Не выявлено статистически значимой разницы по срокам эпителизации у пациентов обеих групп. Таким образом, процесс кросслинкинга как по данным литературы, так и по нашим данным не влияет на эпителизацию донорского трансплантата [136,137,138].

Через 1-6 месяцев после операции у 12-ти пациентов (12 глаз) 1 группы и у 9-ти пациентов (9 глаз) 2-ой группы после СКП были выявлены признаки нарушения эпителизации на фоне слезозаместительной и репаративной терапии. Лечение было дополнено назначением контактной линзы. 10-ти из этих пациентов (10 глаз) из 1-ой группы и 8-ми пациентам (8 глаз) из 2-ой группы проведена дополнительная амниопластика, однако, процесс истончения роговичного трансплантата прогрессировал у 10-ти пациентов (10 глаз) 1-ой группы и у 3-х пациентов (3 глаза) 2-ой группы, что привело, не смотря на интенсивное лечение, к истончению трансплантата и развитию глубокой язвы в сроки до 6 месяцев.

Через 1 месяц после проведенного хирургического лечения у пациента 2-ой группы с прозрачным состоянием трансплантата стало возможным проведение конфокальной микроскопии, результаты которой подтверждают данные о локализации изменений после воздействия кросслинкинга в передних и средних слоях стромы, задние слои и эндотелий остаются интактными, что позволяет говорить о безопасности метода.

Основным критерием оценки эффективность предложенного метода стала оценка приживления донорского трансплантата у пациентов двух групп. Так в сроки наблюдения до 4 лет отмечали прозрачное приживление у 8,3% пациентов 1 группы и у 13,9% второй группы, полупрозрачное приживление у 50% пациентов 1 группы и 52,8% пациентов 2 группы, мутное приживление трансплантата у 41,7% пациентов 1 группы и 33,3% пациентов 2 группы. Наиболее частыми причинами помутнения роговичного трансплантата, как уже было отмечено выше, являлись рецидивирующие эрозии трансплантата, которые чаще наблюдались у пациентов с первичными язвами на фоне вирусного кератита, в основном герпетической этиологии, и ревматоидного артрита; наличие ретрокорнеальной мембраны; синдрома мелкой передней камеры; болезнь трансплантата иммунологического характера; постепенная декомпенсация эндотелия трансплантата на фоне прогрессирующего снижения ПЭК. 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.

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. Наиболее часто расплавления трансплантата отмечали в течение первого года после кератопластики. Все кератопластики, в первую очередь, выполнялись с лечебной целью.

Таким образом, подводя итог анализу результатов выполненных исследований, считаем возможным заключить, что разработанный метод обработки донорского материала для кератопластики является эффективным и безопасным методом лечения глубоких язв роговицы с повышенным риском лизиса донорского 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 СОКРАЩЕНИЙ

ВГД	внутриглазное давление
ГПК	глубокая послойная кератопластика
ДИ	доверительный интервал
ЕД	единица действия
ИОЛ	интраокулярная линза
КП	Кератопластика
КРК	Кросслинкинг
КОЗ	Коррегированная острота зрения
НКОЗ	Некоррегированная острота зрения
мк	микрон
мкм	микрометр
МНТК МГ	Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза»
ОЗ	острота зрения
ОСО	отслойка сосудистой оболочки
ПЗО	переднезадняя ось
ПОГ	передний отрезок глаза
ПЭК	плотность эндотелиальных клеток
РКМ	ретрокорнеальная мембрана
СКП	сквозная кератопластика
СЭМ	сканирующая электронная микроскопия
УПК	угол передней камеры
УФ	Ультрафиолет
ЭКА	экстракция катаракты
ЭФИ	электрофизиологическое исследование
Sp	Специфичность
Se	чувствительность
RGB	красный, зеленый, синий
PPV	прогностически положительный результат
ОСТ	оптическая когерентная томография
NPV	прогностически отрицательный результат
kgf	килограмм-сила

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аветисов, С.Э. Конфокальная микроскопия роговицы при кератоконусе // Вестн. офтальмол. – 2008. - № 3. – С. 6-10.

2. Батманов Ю.Е., Слонимский А.Ю., Мурзабекова Ф.А. и др. Применение двойного кератоамниопокрытия при язвенных процессах роговицы // Федоровские чтения. Новые технологии в лечении заболеваний роговицы: материалы всерос. науч.практ. конф. — М., 2004. - С. 52-55.

3. Бобкова Т.Г., Маурер Н.В. Структура язвенных поражений роговицы, их диагностика и лечение по данным 3 ВХО ГУЗ КОКОБ за 3 года. Российский общенациональный форум. Сборник научных трудов. М., 2008. – С. 279-82.

4. Борзенок С.А. Медико-технологические и методологические основы эффективной деятельности глазных тканевых банков России в обеспечении операций по сквозной трансплантации роговицы: Дис. д-ра мед.наук. –М., 2008.- С.160-165

5. Борзенок С. А., Комах Ю. А. Сравнительные результаты консервации донорской роговицы для сквозной кератопластики в жидких средах (Мак-Кери-Кауфмана и перфторуглеродах) // Офтальмохирургия и применение лазеров в офтальмологии Материалы 2-й Всерос. научно-практ. конф молодых ученых –М., 1991. –С. 27-28

6. Бржеский, В.В., Сомов Е.Е. Роговично-конъюнктивальный ксероз (диагностика, клиника, лечение) // -СПб., 2003. - 120 с.

7. Бржеский, В.В. Синдром "сухого глаза" // — СПб., 1998.- 96 с.

8. Бржеский, В.В., Сомов Е.Е. Диагностика и лечение больных с синдромом «сухого глаза»: краткое руководство для врачей //— СПб., 2005.-20 с.

9. Бржеский, В.В., Сомов Е.Е. Синдром «сухого глаза»: современные аспекты диагностики и лечения. Синдром «сухого глаза» // Специализированное издание московской ассоциации офтальмологов. М., 2002. - № 1.- С. 3-9.

10. Бржеский, В.В., Сомов Е.Е. Продолжительность действия некоторых препаратов «искусственной слезы» после однократного применения // Клинич. офтальмология. — 2004. — Т. 5, № 4.- С. 170-173.

11. Волкова О.С., Мороз З.И., Калинников Ю.Ю. и др. Реконструкция переднего отдела глаза на базе сквозной кератопластики // Федоровские чтения. Новые технологии в лечении заболеваний роговицы: материалы всерос. науч.-практ. конф. — М., 2004. — С. 86-90.

12. Волова Л.Т., Золотарев А.В., Россинская В.В., Милюдин Е.С., Ахмерова Ю.М. Сб. тр. науч.–практ. конф. «Регенеративная медицина и трансплантация тканей в офтальмологии». – М., 2005. – Стр.14 – 17.

13. Власова В.А. Медико-технологические аспекты реконструкции переднего отрезка глаза на базе пересадки роговично-протезного комплекса у пациентов с сосудистым бельмом IV категории: Дис. ... канд. мед. наук. – Москва, 2015; - 189с.

14. Вэндер Д.Ф., Голт Д.А. Секреты офтальмологии. Перев. с англ. Под ред. Ю.С.Астахова. – М., «Медпресс–информ», 2005. – 462с.

15. Гундорова Р.А., Бордюгова Т.П., Травкин А.Г. Реконструктивные операции на глазном яблоке. — М.: Медицина, 1983. — 223 с.

16. Гундорова Р.А., Ким А.Э., Федоров А.А., Оганесян О.Г. Экспериментальное обоснование возможности проведения передней послойной инвертной кератопластики // Офтальмология– 2008 – Т. 5, № 4 – С. 23 – 26.

17. Деев Л.А., Ярцева Н.С. Заболевания роговой оболочки глазного яблока.// Учеб.-метод. пособие. Смоленск: Изд-во СГМА, 2006. – 57 с.

18. Дин Р. Процессы распада в клетке. – М., 1981- С.7

19. Дронов М.М. Руководство по кератопластике. — СПб: Влазипресс, 1997. — 130 с.

20. Журова С.Г., Бржеский̆ В.В., Калинина И.В., Ефимова Е.Л. Лечение язвы роговицы ксеротическо̆й этиологии // Клиническая офтальмология. - 2010. - Т.11.- №2.- С.49–52.

21. Журова С.Г., Бржеский̆ В.В., Калинина И.В., Ефимова Е.Л. Лечение язвы роговицы ксеротическо̆й этиологии // Клиническая офтальмология. - 2010. - Т.11. - №2. - С.49–52

22. Иванов Д.В. Матер. науч.–практ. конф. «Актуальные вопросы офтальмологии», часть II. – Москва, 2000. – С. 24 – 26.

23. Измайлова С.Б. Медико-технологическая система хирургического лечения прогрессирующих кератэктазий различного генеза // Дис. д-ра. мед. наук – Москва, 2014; - 314 с.

24. Ильина, С.Н., Солодовникова Н.Г., Кринец Ж.М. Анатомия органа зрения. Неотложные состояния в офтальмологии // Пособие для студентов лечебного и педиатрического факультетов . - Гродно: ГрГМУ, 2013- 180 с.

25. Каспаров А. А., Труфанов С. В. // Вестник офтальмологии, - 2001. - том 117. - N 3. - С. 45–47.

26. Каспарова Е.А. Гнойные язвы роговицы: этиология, патогенез, классификация // Вестник офтальмологии, -2015.- том 5. - С. 87-97.

27. Ким А.Э, Оганесян О.Г., Гундорова Р.А., Макаров П.В. Передняя послойная инвертная кератопластика в лечении рецидивирующих язв роговицы // Материалы IV Всероссийской научной конференции молодых учёных, М., 2009. - С. 377 – 379.

28. Копаева В.Г., Федоров С.Н. Микрохирургическая реконструкция передней камеры и переднего отрезка глаза на основе сквозной субтотальной кератопластики // Метод. реком. МЗ РСФСР. — М., 1981. — С. 21.

29. Краснов М.М. с соавт. (1989)

30. Кудряшова Ю.И. Иммунологические язвы роговицы: клиника, диагностика, лечение // Автореф. дисс. канд. мед. наук . – Челябинск, 1998; – 20 с.

31. Курбангалеев С.М. Гнойная инфекция в хирургии. – М., 1985. – 271 с.

32. Майчук Н.В. Разработка клинико-биохимической системы диагностики, прогнозирования и коррекции поражений роговицы, индуцированных кераторефракционными операциями //Диссертация кандидата медицинских наук. - Москва, 2008; - 164 с.

33. Майчук Д.Ю. Патогенетическое обоснование лечения и профилактики вторичных нарушений слезообразования // Автореф. дисс. д-ра мед. наук. - М., 2005; - 36 с.

34. Майчук Ю.Ф. Материалы науч. – практ. конф. «Актуальные вопросы Воспалительных заболеваний глаз». – Москва, 2001. – С. 7 – 17.

35. Майчук Ю.Ф. Выбор и дозирование антибиотиков при бактериальных язвах роговицы // Офтальмол. Журнал.- 1990.- № 8- С.502-506.

36. Майчук Ю.Ф. Алгоритмы терапии бактериальных конъюнктивитов и кератитов // Справочник поликлинического врача.- 2005.- № 4 – С.73- 76.

37. Малов В.Н., Степанов В.К., Иванов Д.В. Современное состояние эффективности современной терапии гнойных язв // Труды Всероссийской конференции «Геронтологические аспекты офтальмологии». – Самара, 2002. – С.237-240.

38. Малюгин, Б. Э. Глубокая передняя послойная кератопластика с использованием фемтосекундного лазера Intralase 60 kHz: первый опыт // Практическая медицина. – 2012. – т.1. - № 4. – С. 100-103.

39. Медведев М.А., Тургунбаев Н.А., Поляк А.С., Дикамбаева М.К. Первый опыт применения фотомодификации при глубокой послойной пересадке роговицы в лечении рецедивирующего герпетического кератита // Вестник Кыргызско-Российского славянского университета. – 2013. – т.13.- № 6. – С. 160-161.

40. Милюдин Е.С. Сб. трудов научно–практической конференция «Новые технологии в лечении заболеваний роговицы». – Москва, 2004. – С.473–479.

41. Мороз З. И., Калинников Ю. Ю., Ковшун Е. В., Борзенок С. А., Комах Ю. А. Достижения школы С. Н. Федорова в области кератопластики и кератопротезирования // Офтальмохирургия – 2007. - №1 – С.22-25.

42. Мороз З.И., Борзенок С.А., Комах Ю.А., Ковшун Е.В., Волкова О.С. Отдаленные результаты клинико-экспериментального исследования среды Борзенка-Мороз для консервации жизнеспособной донорской роговицы // Актуальные проблемы современной офтальмологии Материалы Российской конф. научно-мед. общества офтальмологов. - Смоленск, 1995 – С. 82-83.

43. Мороз З.И., Тахчиди Х.П., Калинников Ю.Ю. и др. Современные аспекты кератопластики // Федоровские чтения. Новые технологии в лечении заболеваний роговицы: материалы всерос. науч. -практ. конф. — М., 2004. — С. 280-287.

44. Мороз З.И., Ковшун Е.Д., Волкова О.С. Лечение вторичной эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы // Офтальмохирургия. — 1990. — № 1. — С. 34-39.

45. Мурзабекова Ф.А. Сравнительные результаты лечения язв роговицы различными способами кератопокрытия // Вестник ОГУ. — 2006. — № 12. — С. 119-124.

46. Оганесян О.Г., Ким А.Э., Гундорова Р.А., Макаров П.В. Новый способ передней послойной кератопластики // Российский общенациональный офтальмологический форум: Сборник научных трудов. – М., 2008. – С. 208 – 211.

47. Оганесян О.Г., Гундорова Р.А., Ким А.Э. Передняя послойная инвертная кератопластика. Результаты применения в эксперименте и клинике // Материалы научно-практической конференции «Актуальные проблемы офтальмологии». – Уфа, Башкортостан, 2009. – С. 282 – 284.

48. Полеченков С.В., Котович В.О., Личко Л.И. и др. Опыт применения лечебно-реконструктивной аллокератопластики при ургентных состояниях глаза // Федоровские чтения. Новые технологии в лечении заболеваний роговицы: материалы всерос. науч. -практ. конф. — М., 2004. — С. 318-321.

49. Полянская Н.К. Тактика лечения пациентов с язвами роговицы на фоне тяжелой соматической патологии // Клиническая офтальмология. — 2007. — Т. 8.- № 1. — С. 14-16.

50. Проценко А.А., Оприжко В.В., Нестеров Е. Н и др.// Фармакол. и токсикол. - 1981.- №5.- С.593-598

51. Пучковская Н.А. Биологическое покрытие как метод лечения тяжелых патологических процессов роговой оболочки. Эффективные методы

диагностики и лечения при тяжелой патологии органа зрения // Тез. докл. междунар. конф. — Одесса, 1985. — С. 3-4.

52. Пучковская Н.А. Лечебная кератопластика и возможности стимуляции регенеративной способности роговой оболочки // Офтальмологический журнал. — 1983. — № 2. — С. 69-71.

53. Пучковская Н.А. Основы пересадки роговой оболочки. — Киев, 1971. — 280 с.

54. Сельский, Н.Е., Кадыров Р.З., Камалова Л.Р. Опыт хирургического лечения синдрома «сухих глаз» // Офтальмохирургия. -2000.-№ 1.-С. 33-36.

55. Слонимский А.Ю. Материалы науч. – практ. конф. «Актуальные вопросы Воспалительных заболеваний глаз». – Москва, 2001. – С. 349 – 351.

56. Слонимский А.Ю. Возможности сквозной кератопластики при разной стадии гнойных процессов роговицы // Актуальные вопросы воспалительных заболеваний глаз. — М., 2001. — С. 349-351.

57. Сомов, Е.Е., Бржеский В.В. Современные методы лечения больных с синдромом «сухого глаза // Сборник научных трудов, посвящ. 10-летию Санкт-Петербургского филиала МНТК «Микрохирургии глаза». СПб., 1997. - С. 307-316

58. Старков Г.Л., Соколова Р.С. Об эпидемиологии, профилактике и диспансеризации офтальмологических больных с наружными воспалительными заболеваниями. // Вестник офтальмологии. – 1988.- № 1. – С. 3

59. Сухина Л.А., Перекрестов М.Б., Голубов К.Э. и соавт. Новые подходы к хирургическому лечению гнойной язвы роговицы. // VI Российский общенациональный офтальмологический форум. Сборник трудов научно-

практической конференции с международным участием. – М. 2011. – С. 174-178.

60. Тарасова Л.Н., Кудряшова Ю.И. Клиника чистых язв роговицы различной локализации // Вестн. офтальмологии. - 1999. - № 1. - С. 29–31.

61. Тарасова Л.Н., Кудряшова Ю.И. Новые технологии в лечении заболеваний роговицы // Науч.-практ.конф. – М., 2004. – С. 673-678

62. Тарасова Л.Н., Кудряшова Ю.И. Хирургическое лечение чистых язв роговицы при синдроме «сухого глаза» на фоне системных заболеваний // Федоровские чтения. Новые технологии в лечении заболеваний роговицы: материалы всерос. науч.-практ. конф. — М., 2004. — С. 673-678.

63. Труфанов С.В. Использование консервированной амниотической оболочки человека в реконструктивно–восстановительной хирургии глаза // Автореф дис канд. мед. наук. М., 2004; – 24 стр.

64. Федоров С.Н., Копаева В.Г. Неконсервированная донорская роговица при субтотальной кератопластике //Офтальмол. журн. - 1977. - № 4. - С. 258-262.

65. Федоров С.Н., Копаева В.Г. Определение жизнеспособности заднего эпителия трупной роговицы глаза человека. Методические рекомендации.- М., 1981.- С. 20.

66. Федоров С.Н., Копаева В.Г. Роль жизнеспособности эндотелия роговицы донора при сквозных субтотальных пересадках роговицы //Вестн. офтальмол. 1974. - № 5. - С. 21-26.

67. Федоров С. Н., Мороз З. И., Борзенок С. А., Комах Ю. А. Медико-технологическая система Глазного банка МНТК «Микрохирургия глаза» // Офтальмохирургия. -1993. - № 3. – С. 64-66.

68. Федорова Е.А. Применение лиофилизированной амниотической оболочки в лечении воспалительных заболеваний роговицы // Автореф дис канд. мед. наук. М., 2004; – 24 стр.

69. Филатов В.П. Роговица трупа как материал для пересадки //Сов. вестн. офтальмологии. — 1934. — № 2. - С. 222-224.

70. Филатов В.П., Скородинская В.В. Гетеротрансплантация консервированной роговицы //Научн. матер. Укр. института экспериментальной офтальмологии.-1938. - С. 55-56.

71. Цветков А.Л., Терещенкова Т.Ф. Хирургическая реабилитация больной с перфорацией роговой оболочки при синдроме сухого кератоконъюнктивита // Вестн. офтальмологии. - 2001. - № 1. - С. 48

72. Черныш В.Ф., Э.В. Бойко «Ожоги глаз. Состояние проблемы и новые подходы» Санкт-Петербург, 2008 - С.17-22

73. Ченцова Е.В., Вериго Е.Н., Хазамова А.И., Яни Е.В. Современные аспекты лечения язвенных поражений роговицы // Евразийский союз ученых.-2016.-№2-2. – С.99-105

74. Чеснокова Н.Б. , Касавина Б.С., Майчук Ю.Ф. и др. // Вопр. мед. химии. -1981. - №5. - С. 663-665.

75. Чупров А.Д., Подыниногина В.В. Опыт лечения язвенных кератитов с угрозой перфорации роговицы методом послойно-сквозной кератопластики // Ижевские родники. — 2008: Российская науч.-практ. конф. офтальмологов. — Ижевск, 2008. — С. 319-321.

76. Шаимова В.А. Тез. докл. регион. науч.–практ. конф. «Актуальные проблемы клинической офтальмологии». – Челябинск. – 1999. – С. 104 –106.

77. Шаимова В.А. Гнойная язва роговицы (клиника, этиология) // Новое в офтальмологии.- 2001. - № 4 – С.34-36.

78. Шевалев В.Е. Рубцовый ксероз глаза // Киев: Госмедиздат УССР, 1959, -175 с.

79. Шипунова А.В. Медико-биологические аспекты конструирования биокератопротезного комплекса с использованием культивированных фибробластов.// Дисс. канд. мед. наук . – Москва , 2012.- 135 с.

80. Alccalde I., Inigo-Portugues A., Carreno N. et al. Effects of new biomimetic regenerating agents on corneal wound healing in an experimental model of post-surgical corneal ulcers // Arch. Soc. Esp. Oftalmol. - 2015. - Vol. 90. - № 9. – P. 112.

81. Alvarez B.Y. Cicatrical conjunctivitis // Ocular surface. Anatomy and physiology, disorders and therapeutic care / Ed. R.M. Herranz, R.M.C. Herran. Boka Raton, etc.: CRC Press, 2013. - P. 127–137.

82. Baiza-Duran L., Medrano-Palafox J., Hernandez-Quintela E. et al. Comparative clinical trial of the efficacy of two different aqueous solutions of cyclosporine for the treatment of moderate to severe dry eye syndrome // Brit. J. Ophthalmol. - 2010. - Vol. 94. - P. 1312–1315.

83. Barabino St., Rashid S., Dana M.R. Modulation of inflammation and immunity in dry eye disease // Dry eye disease: the clinician’s guide to diagnosis and treatment / Ed by: P.A.Asbell, M.A.Lemp. New York; Stuttgart: Thieme. - 2006. - P. 95–100.

84. Buzzonetti L, Petrocelli G. Transepithelial corneal cross-linking in pediatric patients: early results/ L. Buzzonetti , G. Petrocelli //J Refract Surg. - 2012– Vol. 28 № 11. – P. 763-767

85. Braun E., Kanellopoulos J., Pe L., Jankov M. Riboflavin/Ultraviolet-A-Induced Collagen Crosslinking in the Management of Keratoconus // ARVO 2005.

86. Brown M.M., Brown G.C., Brown H.C. et al. Value-based medicine, comparative effectiveness, and cost-effectiveness analysis of topical cyclosporine for the treatment of dry eye syndrome // Arch. Ophthalmol. - 2009. - Vol. 127. - № 2. - P. 146–152.

87. Brian S. Boxer Wachler. Corneal Collagen Crosslinking with Riboflavin // Cataract and Refract. Surg. Today. - Jan. 2005 – P. 73-74.

88. Burgalassi S., Panichi L., Chetoni P. et al. Development of a simple dry eye model in the albino rabbit and evaluation of some tear substitutes // Ophthalmic Res. - 1999. - Vol. 31. - P. 229–235.

89. Caporossi A., Baiocchi S., Mazzotta C., Traversi C. Parasurgical Therapy of Keratoconus by Riboflavin–UVA–Induced Crosslinking of Corneal Collagen: Preliminary Refractive Results in Italian Study // J. Cataract Refract. Surg. – 2006. – Vol. 32, № 5. – P. 837-845.

90. Caporossi, A. Age-related long-term functional results after riboflavin UV A corneal cross-linking // J. Ophthalmol. - 2011. - Epub Aug 4. – P. 435.

91. Cheng E.L., Maruyama I., Sundar Raj N., Sugar J., Feder R.S., Yue B.Y.J.T. Expression of Type XII Collagen and Hemidesmosomeassociated Proteins in Keratoconus Corneas // Curr. Eye Res. – 2001. - Vol. 22. – P. 333-340.

92. Chu W. The past twenty-five years in eye banking // Cornea. - 2000. - Vol. 19. - N5. - P. 754-765.

93. Critchfield, J. W. Keratoconus I. Biochemical studies / J. W. Critchfield, A. J. Calandra, A. B. Nesburn, M. C. Kenney // Exp. Eye Res. - 1988. - Vol. 46, № 6. - P. 953-963.

94. Croxatto, J. O. Sequential in vivo confocal microscopy study of corneal wound healing after cross-linking in patients with keratoconus / J. O. Croxatto, A. E. Tytiun, C. J. Argento // J. Refract. Surg.-.2010. – Vol. 26, № 9. - P. 638–645.

95. De Paiva C.S., Corrales R.M., Villarreal A.L. et al. Apical corneal barrier disruption in experimental murine dry eye is abrogated by methylprednisolone and doxycycline // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.- 2006. - Vol. 47. - P. 2847–2856.

96. De Paiva C.S., Schwartz C.E., Gjorstrup P., Pflugfelder S.C. Resolvin E1 (RX-10001) reduces corneal epithelial barrier disruption and protects against goblet cell loss in a murine model of dry eye // Cornea. - 2012. - Vol. 31. - P. 1299–1303.

97. Doxer A., Misof K., Grabner B., Etti A., Fratzi P. Collagen Fibrils in the Human Corneal Stroma: Structure and Aging // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 1998. - Vol. 39. – P. 644-648.

98. Dunn S.P., Heidemann D.G., Chow C.Y. et al. Treatment of chronic non-healing neurotrophic corneal epithelial defects with thymosin beta 4 // Arch. Ophthalmol. - 2010. - Vol. 128. - P. 636–638.

99. Dursun D., Kim M.S., Solomon A., Pflugfelder S.C. Treatment of recalcitrant recurrent corneal erosions with inhibitors of matrix metalloproteinase-9, doxycycline and corticosteroids // Amer. J. Ophthalmol. - 2001. - Vol. 132. - P. 8–13.

100. Foulks G.N., Borchman D., Yappert M., Kakar S. Topical azithromycin and oral doxycycline therapy of meibomian gland dysfunction: a comparative clinical and spectroscopic pilot study // Cornea. - 2013. - Vol. 32, № 1. - P. 44–53.

101. Filippello, M. Transepithelial corneal collagen crosslinking: bilateral study / M. Filippello, E. Stagni, D. O'Brart // J. Cataract. Refract. Surg. – 2012. – Vol. 38, № 8. - P. 283–291.

102. Fujimori E. Cross-linking and Fluorescence Changes of Collagen by Glycation and Oxidation // Biochimica et Biophisica Acta, 998. – 1989.- P. 105-110.

103. Fujishima H., Fuseya M., Ogata M., Murat D. Efficacy of bromfenac sodium ophthalmic solution for treatment of dry eye disease // Asia Pac. J. Ophthalmol. - 2015. - Vol. 4, № 1. - P. 9–13.

104. Geremicca W., Fonte C., Vecchio S. Blood components for topical use in tissue regeneration: evaluation of corneal lesions treated with platelet lysate and considerations on repair mechanisms // Blood Transfus. - 2010. - Vol. 8. - P. 107–112.

105. Guillon M., Maissa C., Ho S. Evaluation of the effects on conjunctival tissues of Optive eyedrops over one month usage // Contact Lens Ant. Eye. 2010. - Vol. 33, №2. P. – P. 93–99.

106. Holly F.J. Physical chemistry of the normal and disordered tear film // Trans Ophthalmol. Soc. UK. - 1985. - Vol. 104. - P. 374–380.

107. Johnson M., Allen J. // Amer. J. Ophthalmol. - 1975. - Vol.80, №3. - P.518-521.

108. Kato M., Hagiwara Y., Oda T. et al. Beneficial pharmacological effect of selective glucocorticoid receptor agonist in external eye // J. Ocul. Pharmacol. Ther. - 2011. - Vol. 27. - P. 368–373.

109. Kaufman H.E. Strengthening the Cornea // Cornea. - Jul.2004. - Vol. 23, №.5. – P. 432.

110. Kenney M.C., Nesburn A.B., Burgeson R.E., Butkowski R.J., Ljubimov A.V. Abnormalities of the Extracellular Matrix in Keratoconus Corneas // Cornea. – 1997. – Vol. 16, №.3. – P. 345-351.

111. Khaderm J., Truong T., Ernest J.T. Photodynamic Biologic Tissue Glue // Cornea. - 1994. – Vol. 13. – P. 406-410.

112. Kohlhaas M., Spoerl E., Speck A., Schilde T., Sander D., Pillunat L.E. A New Treatment of Keratectasia after LASIK by Using Collagen with Riboflavin/UVA Light Crosslinking // Klin. Monatsbl. Augenheilkd. – 2005. – Vol. 222, №5. – P. 430-436.

113. Krachmer J.H., Mannis M.J., Holland E.J. Cornea. Fundamentals, Diagnosis and Management: 2nd Edition. Elsevier-Mosby, 2005. - Vol. 1. - 1409 P.

114. Levey S.B., Katz H.R., Abrams D.A. The role of cultures in the management of ulcerative keratitis // Cornea. – 1997. – P. 383 - 386.

115. Li J., Roubeix Ch., Wang Y. et al. Therapeutic efficacy of trehalose eye drops for treatment of murine dry eye induced by an intelligently controlled environmental system // Molec. Vis. - 2012. - Vol.18. - P. 317 – 329.

116. Mannucci L.L., Fregona I., Di Gennaro A. Use of a new lachrymal substitute (TS Polysaccharide) in Contactology // J. Med. Contactology and Low Vision. - 2000. - Vol. 1. - P. 6 – 9.

117. Meek K.M., Tuft S.J., Huang Y. et al. Changes in Collagen Orientation and Distribution in Keratoconus Corneas // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2005. - Vol. 46 , №.6. – P. 1948 - 1956.

118. Menter J.M., Patta A.M., Sayre R.M., Dowdy J., Willis I. Effect of UV Irradiation on Tipe I Collagen Fibril Formation in Neural Collagen Solutions // Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. – 2001. - Vol. 17. – P. 114 - 120.

119. Messmer, E.M. Morphological and Immunohistochemical Changes After Corneal Cross-Linking. / E. M. Messmer, P. Meyer, M. C. Herwig // Cornea. - 2013. – Vol. 32. - № 2. - P. 111 - 117.

120. Miljudin E.S, Zolotaryov A.V., Volova L.T., Ahmerova U.M. U.M. Cell and Tissue Banking, 2004. – Vol.5. – P. 271 –275.

121. Mishima, S. Clinical investigations on the corneal endothelium // Amer. J. Ophthalmol. – 1982. - Vol. 93, № 1. - P. 129.

122. Muller L.J., Pels E., Vrensen G.F. The Specific Architecture of the Anterior Stroma Accounts for Maintenance of Corneal Curvature // Br. J. Ophthalmol. 2001; Vol. 85; 437- 443.

123. Nakamura M., Nashida T.// JPN J . Ophthalmol. - 1994. -Vol.38, №3 - P. 246 -251.

124. Noble B.A., Loh R.S., MacLennan S. et al. Comparison of autologous serum eye drops with conventional therapy in a randomised controlled crossover trial for ocular surface disease // Brit. J. Ophthalmol. - 2004. - Vol. 88. - P. 647 – 652.

125. Paulsen F., Langer G., Hoffmann W., Beny M. Human lacrimal gland mucins // Cell Tissue Res. - 2004. - Vol. 316. - P. 167 – 177.

126. Perry H.D., Solomon R., Donnenfeld E.D. et al. Evaluation of topical cyclosporine for the treatment of dry eye disease // Arch. Ophthalmol. - 2008. - Vol. 126, № 8. - P. 1046–1050.

127. Radner W., Zehemayer M., Skorpik Ch., Mallinger R. Altered Organization of Collagen in Apex of Keratoconus Corneas // Ophthalmic Res. – 1998. – Vol. 30. –P. 327 - 332.

128. Raiskup-Wolf, F. Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: long-term results // J. Cataract. Refract. Surg. - 2008. – Vol. 34. - P.796 – 801.

129. Rocha G.A., Silva R.F., Lopes M.F., Pereira N.C., Sousa L.B. Main pathogens and in vitro antimicrobial susceptibility in bacterial keratitis: 5-year study, 2005-2009 //

Arq Bras Oftalmol. – 2011. – Vol.1. – P. 28 - 32.

130. Sall K., Stevenson O.D., Mundorf T.K. et al. Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of cyclosporine ophthalmic emulsion in moderate to severe dry eye disease. CsA Phase 3 Study Group // Ophthalmology. - 2000. - Vol. 107. - P. 631 – 639.

131. Sanders D., Spoerl E., Kohlhaas M., Unger G., Pillunat L.E. Collagen Crosslinking by Combined Riboflavin/Ultraviolet-A (UVA) Treatment Stop Progression of Keratoconus // ARVO 2006.

132. Scroggs M.W., Proia A.D. Histopathological Variation in Keratoconus // Cornea. - 1992. – Vol. 11. – P. 553 - 559.

133. Seiler T., Huhle S., Spoerl E., Kunath H. Manifest Diabetes and Keratoconus: a Retrospective Case-Control Study // Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. – 2000. - Vol. 238. – P. 822 - 825.

134. Sheppard J.D., Shah N.S., DiSandro G., Anthony B. Anti-inflammatory therapy for dry eye disease: rationale and strategy // Benitez-del-Castillo J.M., Lemp M.A. Ocular surface disorders. London etc., JP Medical Publishers, 2013. - P. 243 – 256.

135. Slansky H., Dohlman C., Berman M. // Tr. Amer. Acad. Ophtalmol. Etalar. - 1971.- Vol.75. - P. 1208 - 1211.

136. Spoerl E., Schreiber J., Hellmund K., Seiler T., Knuschke P. Crosslinking Effects in the Cornea of Rabbits // Ophthalmologe. – 2000. - Vol. 97. – P. 203 - 206.

137. Spoerl E., Wollensak G., Dittert D., Seiler T. Thermomechanical Behavior of Collagen-Cross-Linked Porcine Cornea // Ophthalmologica. – 2004. - Vol. 218. – P. 136 - 140.

138. Spoerl, E. Induction of cross-links in corneal tissue / E. Spoerl, M. Huhle, T. Seiler // Exp. Eye Res. - 1998. – Vol. 66, № 1. - P. 97-103.

139. Spoerl, E. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion / E. Spoerl, G. Wollensak, T. Seiler // Curr. Eye Res. - 2004. – Vol. 29, № 1. - P. 35–40.

140. Tsubota K., Tseng S.C.G., Nordlund M.L. Anatomy and physiology of the ocular surface // Ocular surface disease: medical and surgical management / Ed. E.J. Holland, M.J. Mannis. New York, etc.: Springer-Verlag, 2002. - P. 3 – 15.

141. Tuori A.J., Virtanen I., Aine E., Kalluri R., Miner J.H., Uusitalo H.M. The Immunohistochemical Composition of Corneal Basement membrane in Keratoconus // Curr. Eye Res. – 1997. – Vol. 16. – P. 792 - 801.

142. Versura P., Profazio V., Giuseppe Giannaccare G. et al. Discomfort symptoms reduction and ocular surface parameters recovery with Artelac Rebalance treatment in mild–moderate dry eye // Europ. J. Ophthalmol. - 2013. - Vol. 23, № 4. - P. 488 – 495.

143. Vinciguerra, R. Comparative stress strain measurements of human corneas after transepithelial UVA induced cross-linking: impregnation with iontophoresis, different riboflavin solutions and irradiance power // Paper presented The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, 7th May, 2012; Fort Lauderdale, Florida.

144. Wilson S.E., Kim W.G. Keratocyte Apoptosis: Implication on Corneal Wound Healing, Tissue Organization and Disease // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 1998. – Vol. 39. – P. 220 - 226.

145. Wollensak G., Spoerl E., Seiler Th. Riboflavin/Ultraviolet-A Induced Collagen Crosslinking for the Treatment of Keratoconus // Am. J. Ophthalmol. – 2003. - Vol. 135. – P. 620 - 627.

146. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Behandlung von Keratokonus Durch Kollagenvernetzung // Ophthalmologe. – 2003. – Vol. 100. – P. 44 - 49.

147. Wollensak, G. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin / UVA // Cornea. - 2004. – Vol. 23, № 5. - P. 503 - 507.

148. Wollensak, G. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking // J. Cataract. Refract. Surg. - 2003. - Vol. 29, № 9. - P. 1780 - 1785.

149. Wollensak, G. Biomechanical and histological changes after corneal crosslinking with and without epithelial debridement // J. Cataract. Refract. Surg. - 2009. - Vol. 35, № 3. - P. 540 - 546.

150. Wollensak, G., E. Spoerl E., Wilsch M., Seiler T. Keratocyte apoptosis after corneal collagen cross-linking using riboflavin / UVA treatment // Cornea. - 2004. - Vol. 23. № 1. - P. 43 - 49.

151. Zaldaway R.M., Wagner J., Ching S., Seigel G.M. Evidence of Apoptotic Cell Death in Keratoconus // Cornea. – 2002. – Vol. 21. – P. 206 - 209.

152. Zhou, L. Expession of wound healing and stress-related protein in keratoconus corneas / L. Zhou, B. Y. Yue, S. S. Twining et al. // Curr. Eye Res. - 1996. - Vol. 15, № 11. - P. 1124 - 1131.

153. Zimmermann, D. R. Type VI collagen is a major component of the human cornea / D. R. Zimmermann, B. Trueb, K.H. Winterhalter et al. // FEBS Letters. - 1986. - Vol. 197, № 1-2. - P. 55 - 58.

154. Zolotaryov A.V., Miljudin E.S., Volova L.T. 12th International congress of the European Association of Tissue Banking. Brugge, Belgium. - 2003. –P.76 – 7.