

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«МЕЖОТРАСЛЕВОЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС
«МИКРОХИРУРГИЯ ГЛАЗА» ИМЕНИ АКАДЕМИКА С.Н.ФЕДЕРОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

КАФЕДРА ГЛАЗНЫХ БОЛЕЗНЕЙ
ИНСТИТУТ НЕПРЕРЫВНОГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

на правах рукописи

ДИБИНА ДАРЬЯ АНДРЕЕВНА

**ЛЕНТОВИДНАЯ КЕРАТОПАТИЯ: КЛИНИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА И РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ**

Научный доклад по направлению подготовки 31.06.01 Клиническая медицина
по направленности (профиль) 14.01.07 Глазные болезни

Научный руководитель:

д.м.н., профессор Малюгин Борис Эдуардович

Рецензенты:

к.м.н. Сороколетов Григорий Владимирович

к.б.н. Островский Дмитрий Сергеевич

Москва 2021

АКТУАЛЬНОСТЬ

Лентовидная кератопатия (ЛК) была впервые описана Диксоном в 1848 году как хроническое дегенеративное состояние роговицы, характеризующиеся отложением серо-белых помутнений в поверхностных слоях роговицы в интерпальпебральной области (G.R. O'Connor, 1972; J. Dixon, J. Churchill, 1848, D.M. Najjar, E.J. Cohen, C.J. Rapuano et al., 2004; J. Pavičić-Astaloš, V. Lacmanović-Lončar, 2012). Помутнения редко поражают слои роговицы глубже Боуменой мембраны и, как правило, формируются субэпителиально (J.W. Cursino, B.S. Fine, 1976). Они представляют собой депозиты кальция, который осаждается в виде гидроксиапатита. В свою очередь гидроксиапатит – это встречающиеся в природе кристаллы кальция и фосфата, которые составляет большую часть минерального состава дентина, эмали и костей, и имеют химические формы - ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$), ($\text{Ca}_3[\text{PO}_4]_2$) и (CaCO_3) (J.W. Berkow, B.S. Fine, L.E. Zimmerman, 1968; E. Bouyer, F. Gitzhofer, M.I. Boulos, 2000). Патогенез данного заболевания до конца и не изучен. Все теории, существующие на данный момент, сходятся во мнении, что в условиях повышенного pH слезной жидкости или избытка кальция и фосфата равновесие смещено в сторону образования и последующего отложения гидроксиапатита. Поскольку концентрация кальция и фосфата в слезной жидкости близка к насыщению, то относительно небольшие изменения в концентрации этих ионов, осмолярности слезной пленки и pH могут вызвать образование гидроксиапатита и последующее развитие лентовидной кератопатии (V. Jhanji, C. J. Rapuano, R.B. Vajpayee, 2011; W. Bernauer, M. A. Thiel, M. Kurrer, A. Heiligenhaus, 2014; N.F. Shrage, S. Abu Sabah et al, 2019). Повреждение эндотелия также может играть решающую роль в развитии ЛК, что связано со снижением содержания сульфатированных мукополисахаридов при отеке роговицы, которые ингибируют ионное связывание и кальцификацию (A.J. Quantock, K.M. Meek, P. Brittain, A.E. Ridgway, E.J. Thonar, 1969). Причиной образования

кальцификатов в интерпальпебральной области является большая склонность этого участка к испарению слезной жидкости, чем остальной поверхности глаза, с последующей вторичной гиперосмолярностью и увеличением концентрации кальция и фосфата (W. Mathers, 2004, V. Jhanji, C. J. Rapuano, R.B. Vajrayee, 2011). Более того, на поверхности роговицы наблюдается повышенная концентрация углекислого газа из-за преимущественно аэробного метаболизма. Это может привести к локальному увеличению pH по сравнению с задней поверхностью роговицы, где анаэробный метаболизм и выработка лактата объясняют снижение pH (D.J. Doughman, G.A. Olson, S. Nolan, 1969; M.A. Lemp, R.A. Ralph, 1977; K.D. Rosenberg, W.J. Feuer, J.L. Davis, 2004).

В литературе описано разделение ЛК на первичную и вторичную. К первичной ЛК относится идиопатическая и наследственная. Вторичная ЛК является проявлением системных заболеваний, связанных с нарушением кальциево-фосфорного обмена, и воспалительных процессов, развивающихся в глазном яблоке. Вторичная ЛК зачастую связана с хронически протекающим увеитом, длительной тампонадой силиконовым маслом и выходом масла в переднюю камеру глаза и соприкосновением с эндотелием роговицы. К высокой группе риска отложения депозитов кальция на поверхности роговицы относятся пациенты, имеющие сопутствующие системные заболевания, такие как миеломная болезнь, гиперпаратиреоз, остеопороз, ювенильный и ревматоидный артриты, болезнь Педжета, почечная недостаточность. (J.L. Federman, H.D. Schubert, 1988; V. Jhanji, C. J. Rapuano, R.B. Vajrayee, 2011; Morphis G, Irigoyen C, Eleuteri A, Stappler T, Pearce I, Heimann H., 2012; H. Nascimento, M.K.. Yasuta, M.C. Marquezan, 2012; K. Ramaesh, D. Lockington, 2019).

Как правило, ЛК обычно развивается в течение длительного периода времени, в начальной стадии биомикроскопически можно увидеть отложение депозитов на 3 и 9 часах в межпальпебральной области, затем депозиты

развиваются центростремительно, и центральная область роговицы остается прозрачной до поздней стадии. Зрительные симптомы, связанные с ЛК, включают светобоязнь, снижение остроты зрения в глазах, которые сохраняют зрительный потенциал, и чувство инородного тела. (D.G. Cogan, P.H. Henneman, 1957; E. Moisseiev, A.Gal, L. Addadi, D. Caspi, 2013).

Зачастую ЛК диагностируют уже на далекозашедших стадиях, поэтому на сегодняшний день данная патология лечится хирургически. Основным методом лечения ЛК является механическое удаление отложений кальция мануальной скарификацией или с помощью офтальмологического бора. Другим вариантом лечения является хелатирование осажденного кальция с помощью этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) различных вариантов концентрации. Основное преимущество хелатирования ЭДТА перед другими методами лечения состоит в том, что ЭДТА удаляет только кальцификат. Когда нижележащая роговица ровная, она остается ровная после лечения ЭДТА. Хелатирование ЭДТА является распространенным методом лечения случаев ЛК. Однако на сегодняшний день нет стандартизированных руководств и коммерчески доступного раствора ЭДТА для хелатирования кальция, протокол хелатирования широко варьируется от клинициста к клиницисту. В литературе существует большое количество вариаций в отношении методов разведения ЭДТА в диапазоне от 0.5. до 3,75% и времени экспозиции (от 30 сек до 45 мин) (M. E. Lee, D. P. Ouano, B. Shapiro et al., 2018; S. L. Percival, P. Kite, K. Eastwood, R. Murga, 2016; W. Kobayashi, S. Yokokura, T. Hariya, T. Nakazawa, 2015). За рубежом ЭДТА доступна только в специальных рецептурных аптеках, а в России не существует официального препарата на основе EDTA для офтальмологических целей.

Фототерапевтическая кератэктомия (ФТК) также используется как потенциальный метод первичного лечения ЛК. Преимущество ФТК в том, что он требует меньше времени и более стандартизирован по сравнению с

механическим удалением и хелатированием с помощью EDTA. Однако лазерные платформы не способны различать ткань роговицы и кальцификаты, что может привести к образованию неровной остаточной поверхности роговицы. Использование маскирующих агентов частично нейтрализует неравномерный профиль абляции. Кроме того, эксимерный лазер в значительной степени неэффективен при больших или нерегулярных отложениях кальция. (Stewart OG, Morrell AJ, 2003; Im S-K, Lee K-H, Yoon K-C. 2010, V. Jhanji, C. J. Rapuano, R.V. Vajpayee, 2011).

Несмотря на то, что лентовидная кератопатия описана и изучена уже много лет, и на сегодняшний момент представлен широкий выбор методов лечения данной патологии, в настоящее время не существуют четкого алгоритма действия и схемы лечения в зависимости от глубины залегания кальцификатов. Также не существуют четких концентраций и времени экспозиции раствора ЭДТА для хелатирования кальция с поверхности роговицы и все преимущества данной процедуры с точки зрения безопасности и отдаленных результатов до конца не изучены.

Исследование отечественной научной периодики и книжных изданий показало, что данная патология на территории России практически не изучена. В связи с чем, актуальной проблемой остается создание лечебно - диагностического алгоритма для ведения пациентов с данной патологией в зависимости от глубины поражения глаза.

Цель исследования

На основании комплексных теоретических, экспериментальных и клинических исследований провести сравнительный анализ методов лечения пациентов с лентовидной кератопатией и предоставить клиническую характеристику данной патологии

Задачи исследования

1. Провести сравнительный анализ клинико-функциональных результатов и оценить морфологическое состояние роговицы после различных методов лечения ЛК
2. Предоставить детальную клинико-диагностическую характеристику данной патологии
3. Разработать лечебно-диагностический алгоритм ведения пациентов с ЛК
4. Разработать прогностическую модель эффективности современных методов лечения ЛК с помощью оценки глубины поражения роговицы депозитами кальция посредством оптической когерентной томографии
5. Разработать оригинальный протокол хелатирования депозитов кальция с поверхности роговицы при ЛК с помощью водного раствора на основе ЭДТА
6. На основании результатов экспериментального исследования оценить предсказуемость и безопасность метода лечения ЛК посредством хелатирования кальцификатов водным раствором ЭДТА для структур глаза лабораторных животных (кролики породы «шиншилла»)

Научная новизна

- Был проведен сравнительный анализ существующих методов лечения ЛК и разработан лечебно-диагностический алгоритм тактики ведения пациентов с данной патологией в зависимости от глубины поражения структуры роговицы
- Были созданы экспериментальные модели лентовидной кератопатии *in vivo*, которые определили ключевые аспекты патогенеза данного заболевания
- Впервые экспериментально исследованы различные формы и степени абразивности алмазных офтальмологических боров, что определить

оптимальный вариант для восстановления ровной поверхности роговицы после механического удаления кальцификатов.

- Подготовлен протокол хелатирования депозитов кальция с поверхности роговицы при ЛК с помощью раствора на основе EDTA
- Впервые с помощью спектрометрии и электронно-сканирующей микроскопии изучена структура и состав депозитов кальция, состав и концентрация химических элементов слезной жидкости у пациентов с ЛК

Практическая значимость

- Использование в клинической практике лечебно-диагностического алгоритма ведения пациентов с ЛК позволяет получить эффективные клиничко-функциональные результаты в лечении данной патологии и восстановить регулярность поверхности роговицы
- Использование оптимальной формы и степени абразивности офтальмологического алмазного бора позволяет добиться более гладкой поверхности роговицы с захватом меньшей глубины ткани при шлифовании
- Разработанный протокол хелатирования депозитов кальция с поверхности роговицы при ЛК с помощью водного раствора $K_3ЭДТА$ и последующее внедрение его в клиническую практику позволит проводить лечение лентовидной кератопатии малоинвазивным способом

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанный лечебно-диагностический алгоритм ведения пациентов с ЛК в зависимости от глубины залегания кальцификатов позволяет выбрать оптимальный метод лечения, выявить и

устранить возможный фактор риска возникновения данного заболевания у пациента

Публикации

По теме диссертации опубликовано 2 печатные работы, 3 печатных работы поданы для публикации, из них 3 статьи - в журналах, рекомендованных ВАК РФ, подана заявка на 1 патент РФ на изобретение.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ **Материал и методы исследования**

Научная работа включает в себя клиническое и экспериментальные исследования.

Характеристика клинического материала

Была выполнена комплексная клинико-лабораторная диагностика 20 пациентов (21 глаз) с ЛК различной степени тяжести. Набор пациентов осуществляли сплошным методом. Критерием включения являлось наличие депозитов кальция в интерпальпебральной области. Критериями исключения служили тяжелая сопутствующая офтальмологическая патология, замедляющая эпителизацию роговицы.

Диагноз ЛК устанавливали по результатам комплексного обследования, включавшего наряду с традиционными методами спектральную оптическую когерентную томографию на аппарате Cirrus HD-OCT и OCT Visante (Carl Zeiss Meditec Inc.), кератотопографию и исследование пахиметрической карты (Oculus Optikgerate GmbH, Германия), гистологическое исследование скарифицированного эпителия и удаленных депозитов кальция, спектральный анализ слезной жидкости и депозитов кальция (X-MAX 50, Oxford Instruments, Великобритания).

Забор стимулированной слезной жидкости производили в объеме 100-200 мкл из нижнего конъюнктивального свода с помощью пипеточного дозатора до операции. Определение концентрации химических элементов в

изучаемых биологических жидкостях выполняли с помощью спектрометрии (X-MAX 50, Oxford Instruments, Великобритания).

Забор депозитов кальция производили интраоперационно после механического удаления и исследовали с помощью электронной сканирующей микроскопии (ЭСМ) (Zeiss EVO LS10, Германия).

Статистическую обработку проводили с использованием программ Excel (Microsoft) и MedCalc (MedCalc Software Inc.). Для оценки нормальности распределения использовали критерий Шапиро - Уилка. Методы описательной статистики для показателей с нормальным распределением представлены в формате $M \pm \sigma$, где M – среднее арифметическое, σ – стандартное отклонение. При выявлении распределений, отличных от нормального, данные представлялись в формате $Me (Q1, Q3)$, где Me – медиана, $Q1$ – верхний квартиль, $Q3$ – нижний квартиль. Сравнение количественных признаков в двух группах выполняли с применением W -критерия Уилкоксона совпадающих пар для зависимых выборок. Критический уровень значимости для принятия достоверных различий был принят $p < 0,05$.

Результаты

Средний возраст больных ПОУГ составил $45 \pm 25,0$ года (от 13 до 84 лет), из них 8 мужчин и 12 женщин. Сроки наблюдения составляли от 1 месяца до 12 месяцев. По распространенности этиологического фактора хронический увеит составил 35%, длительная силиконовая тампонада – 25%, псевдофакичная буллезная кератопатия – 15%, состояние после трансплантации роговицы – 15%, хронический увеит с длительной силиконовой тампонадой и состоянием после трансплантации роговицы – 5% и синдром лимбальной недостаточности – 5%. **(Рисунок №1)**

Предоперационно некорригированная отстрота зрения (НКОЗ) составила $0,065 \pm 0,12$. Средняя толщина депозитов кальция, измеренная с помощью

спектральной ОКТ (Cirrus HD-OCT (Carl Zeiss Meditec Inc.)) составила 112 ± 83 мкм (от 25 мкм до 269 мкм).



Рисунок №1. Этиологические факторы лентовидной кератопатии у пациентов, включенных в научную работу

Выбор тактики лечения пациентов зависел от глубины залегания депозитов кальция и наличия сопутствующей глазной патологии. В 13 случаях депозиты кальция были удалены механическим путем с помощью скребца (толщина кальцификатов составила $69,2 \pm 39,4$ мкм (от 21 до 156 мкм)), у 2 пациентов – механическое удаление с последующим проведением инвертированной топографически-ориентированной фоторефрактивной кератэктомии, в 3 случаях – механическое удаление с одновременным абразивным шлифованием поверхности роговицы офтальмологическим алмазным бором (толщина кальцификатов составила $209,6 \pm 23,2$ мкм (от

187 до 245 мкм)) . В 2 случаях была выполнена сквозная кератопластика из-за наличия в анамнезе выраженной сопутствующей псевдофакичной буллезной кератопатии (толщина кальцификатов составляла 252 и 100 мкм, соответственно. В 1 случае были выполнены одновременно механическое удаление лентовидной кератопатии совместно с задней автоматизированной послойной кератопластикой (толщина кальцификата составила 54 мкм). Интраоперационно осложнений не наблюдалось. В послеоперационном периоде через 1 месяц НКОЗ составила $0,09 \pm 0,12$, все пациенты отмечали субъективное улучшение зрительных функций. В среднем полная эпителизация наступала через $8,5 \pm 2,5$ дней, в 1 случае не было достигнуто полной эпителизации, у данного пациента развилась буллезная кератопатия. В 2 случаях было повторное образование лентовидной кератопатии.

Техники операции

1. Механическое удаление лентовидной кератопатии с поверхности роговицы

Под местной анестезией выполняли скарификацию эпителия совместно с поверхностно залегающими депозитами кальция с помощью скребца. После полного удаления лентовидной кератопатии накладывали мягкую контактную линзу до полной эпителизации в послеоперационном периоде.

2. Выравнивание поверхности роговицы с помощью абразивной шлифовки офтальмологическим алмазным бором

Под местной анестезией выполняли скарификацию эпителия совместно с поверхностно залегающими депозитами кальция с помощью скребца. После полного удаления лентовидной кератопатии и визуализации неровной поверхности использовали алмазный бор (Algerbrush, Alger, США), состоящий из наконечника и насадок имеющих разные диаметры, форму и абразивность. По окончании операции накладывали мягкую контактную линзу до полной эпителизации в послеоперационном периоде.

3. Инвертированная топографически- ориентированная фоторефрактивная кератэктомия

Данная операция проводилась на эксимерном лазере МикроСкан-Визум 1050 Гц (ООО «ОптоСистемы», Россия): 1 этапом выполнялась топографически ориентированная кератоабляция, параметры которой рассчитывали с помощью программы КераСкан (ООО «ОптоСистемы», Россия) по целевой кератометрии, 2 этапом - абляция плоским фронтом, конгруэнтным целевой поверхности, на глубину, эквивалентную остаточному помутнению и ранее измеренной толщины эпителия с сохранением резидуальной стромы в 300 мкм.

4. Вариант кератопластики выбирался в зависимости от глубины поражения роговой оболочки.

Консервативное ведение пациентов с лентовидной кератопатией:

До операции:

5. Антибактериальные глазные капли в течение 7 дней
6. Местные противовоспалительные глазные капли в течение 7 дней

После операции:

7. Мягкая контактная линза до полной эпителизации
8. Антибактериальные глазные капли в течение 7 дней
9. Местные противовоспалительные глазные капли в течение 7 дней
10. Увлажняющие глазные препараты в течение 1 месяца и более

Диагностическая характеристика лентовидной кератопатии

Скарифицированный с роговицы материал исследовали с помощью ЭСМ, спектрометрии и гистологического исследования.

При визуализации на растровом электронном микроскопе удаленное образование представляло собой объект, состоящий из нескольких частей, с четкими границами и плотным контактом между собой, в место поперечного разлома, визуализировалась неоднородная структура.

Чтобы определить элементный состав удаленного образования мы проводили спектральный анализ. Была получена информация об элементном составе с трех разных областей объекта, глубина анализа составляла 3-4мкм. По результатам спектроскопии были обнаружено, что в данном образовании содержится большое количество кальция (14,77%), фосфора (7,36%) и кислорода (55,99%). (Рисунок №2)

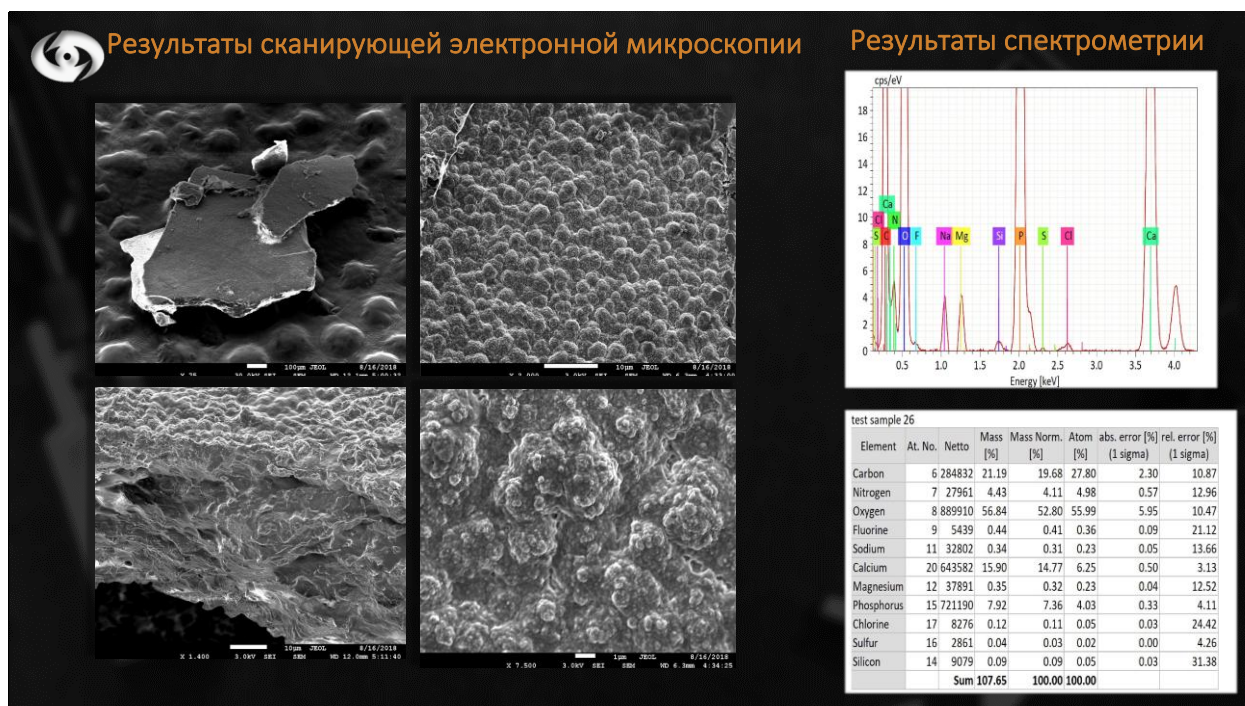


Рисунок 2. Результаты СЭМ и спектрометрического анализа депозита кальция

Первоначально гистологическое изменение, наблюдаемое в роговице при лентовидной кератопатии – это базофильное окрашивание базальной эпителиальной мембраны, отражающее ранние изменения, следующей стадией является видимое осаждение кальция на уровне слоя Боумена и самых передних слоев стромы. Более поздние изменения включают фрагментацию слоя Боумена и отложение гиалинового материала внутри, затем фиброз роговицы.



Гистологические изменения

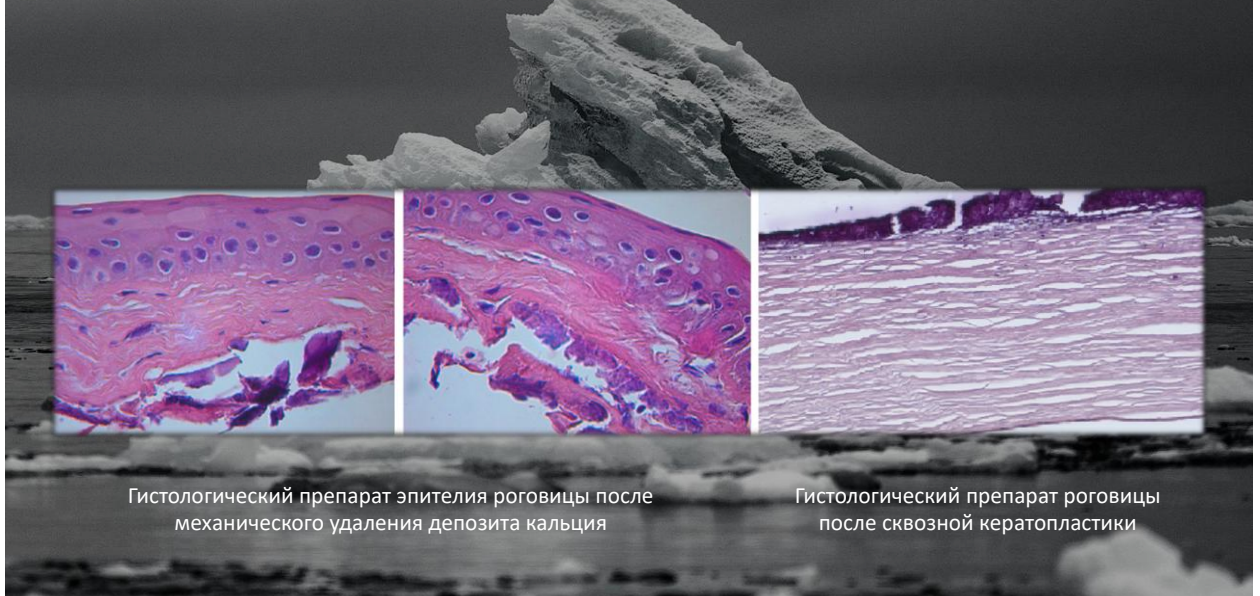


Рисунок №3. На первом рисунке представлен гистологический препарат после механического удаления депозита кальция: эпителий роговицы с выраженной субэпителиальной фиброплазией (волоконистая фиброзная ткань с упорядоченно расположенными волокнами и умеренным количеством фиброгистиоцитарных клеточных элементов, эозинофилов и наличием кальцификатов). На втором – гистологический препарат роговицы после сквозной кератопластики: в центральных отделах на поверхности определяются кальцификаты, в подлежащих слоях механо-дистрофическое фрагментарное разрушение Боуменовой мембраны без некротических изменений и без воспалительной инфильтрации стромы. На остальном протяжении эпителий роговицы отсутствует, боуменова мембрана сохранна. Строма умеренно отечна.

При проведении спектрального анализа слезной жидкости исследуемой группы (пациентов с ЛК) и сравниваемой группы во всех образцах условно нормальной слезы и в слезе пациентов с ЛК содержание кальция было на границе порога обнаружения метода ЭСМ-ЭДС. Повышенных содержаний выявлено не было. **(Рисунок №4)**



Спектральный анализ слезной жидкости

	C	N	O	Na	P	S	Cl	K	Ca
Обследуемая группа	1.84 ± 0.277	0.16 ± 0.035	0.3 ± 0.082	0.13 ± 0.009	0.00	0.004 ± 0.001	0.1200	0.018 ± 0.005	0.0007 ± 0.0001
Группа сравнения	2.06 ± 0.164	0.18 ± 0.029	0.33 ± 0.051	0.131 ± 0.01	0.00	0.005 ± 0.001	0.1200	0.019 ± 0.003	0.0006 ± 0.0002

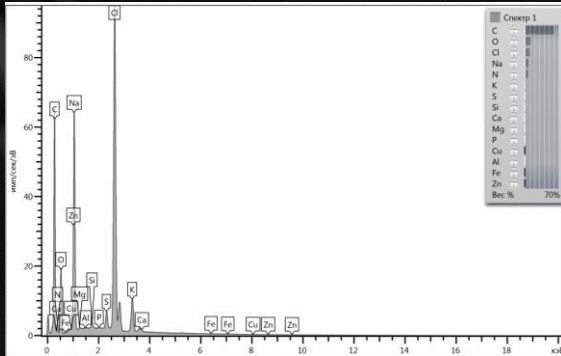


Рисунок №4. Спектральный анализ слезной жидкости методом СЭМ-ЭДС.

Сравнительный анализ клинично-функциональных результатов до и после лечения пациентов с лентовидной кератопатией

Были проанализированы минимальная, максимальная и средняя толщина роговицы в зона 0-2 мм, 2-5 мм, 5-7 мм и 7-10 мм до и через 1, 6 месяцев после лечения. В ходе сравнительного анализа между двумя зависимыми группами статистически достоверной разницы по показателям минимальная толщина роговицы во всех 4 зонах исследования до и через 1,6 месяцев после лечения выявлено не было. В то же время при сравнении средней толщины роговицы до и через 1 месяц в зонах 0-2 мм и 5-7 мм статистически достоверной разницы обнаружено не было, однако через 6 месяц было выявлена статистически значимое снижение толщины роговицы в этих зонах. При сравнение средней толщины роговицы в зонах 2-5 мм и 7-10 мм было выявлено статистически достоверное снижение данного показателя до и после проведенного лечения при всех сроках наблюдения. **(Рисунок №5)**

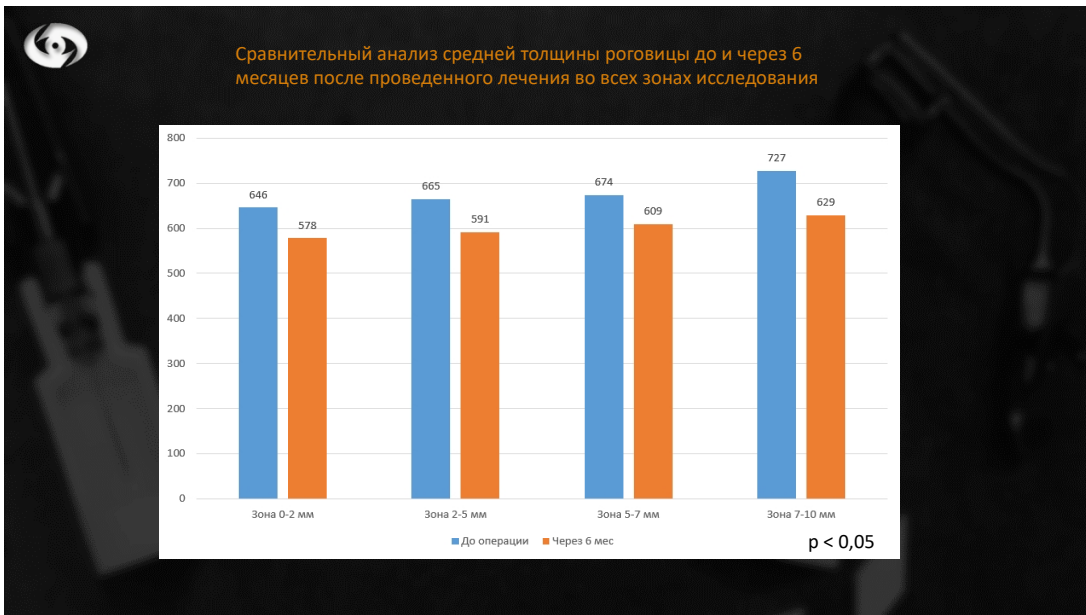


Рисунок №5. Сравнительная оценка показателей средней толщины роговицы до и через 6 месяц после лечения в 4 зонах наблюдениях

При оценке максимальной толщины роговицы было выявлено статистически значимое снижение толщины роговицы в зонах 0-2 мм, 5-7мм и 7-10 мм при всех сроках наблюдения, а в зоне 2-5 мм через 6 месяцев после лечения.

(Рисунок №6)

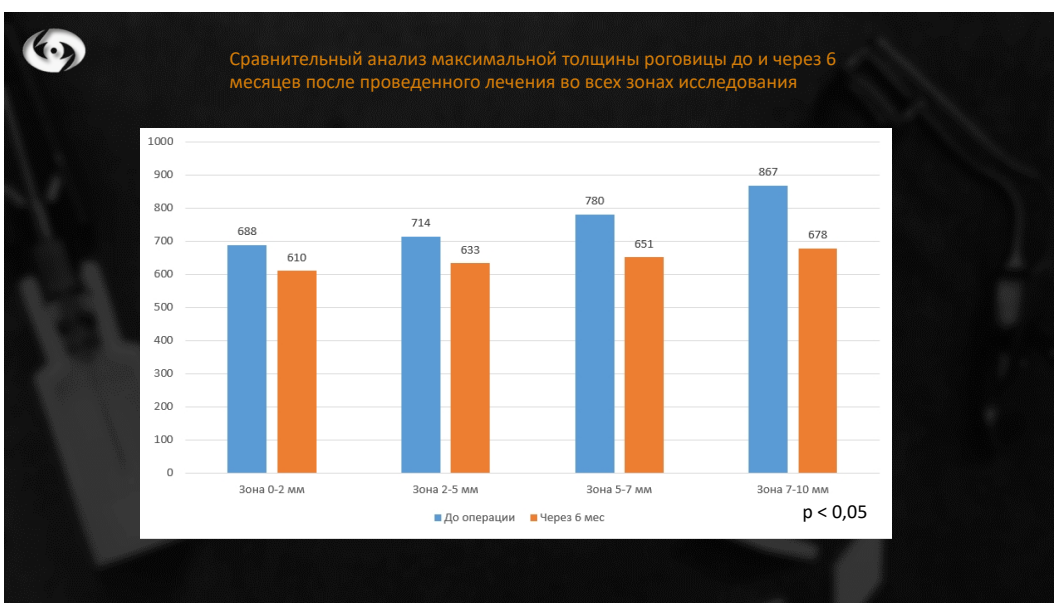


Рисунок № 6. Сравнительная оценка показателей максимальной толщины роговицы до и через 6 месяц после лечения в 4 зонах наблюдениях

При анализе представленных результатов можно сделать вывод, что значительная статистически достоверная разница между показателями толщины роговицы приходится в зоне 7-10 мм, что доказывает центростремительный рост лентовидной кератопатии, и большую деформации роговицы на периферических участках, чем в центральной зоне.

При исследовании кератометрических показателей в двух главных меридианах (K1 и K2) до и после проведенного лечения через 1 и 6 месяцев статистических достоверной разницы выявлено не было.

Было проведено исследование средней толщины эпителиального слоя роговицы до и через 1 и 6 месяцев после лечения в 4 зонах: 0-2 мм, 2-5 мм, 5-7 мм и 7-9 мм. При сравнительном анализе была выявлена статистически значимая разница между показателями и обнаружено, что при всех сроках наблюдения эпителизация была в пределах нормы. Из данного анализа можно сделать вывод, что депозиты кальция в большинстве случаев при ЛК локализуются субэпителиально, не деформируя и не нарушая эпителиальных слоев роговицы, и что после проведенных хирургических манипуляций при разных тактиках ведения данной патологии практически у всех пациентов наступала полная эпителизация. **(Рисунок № 7)**

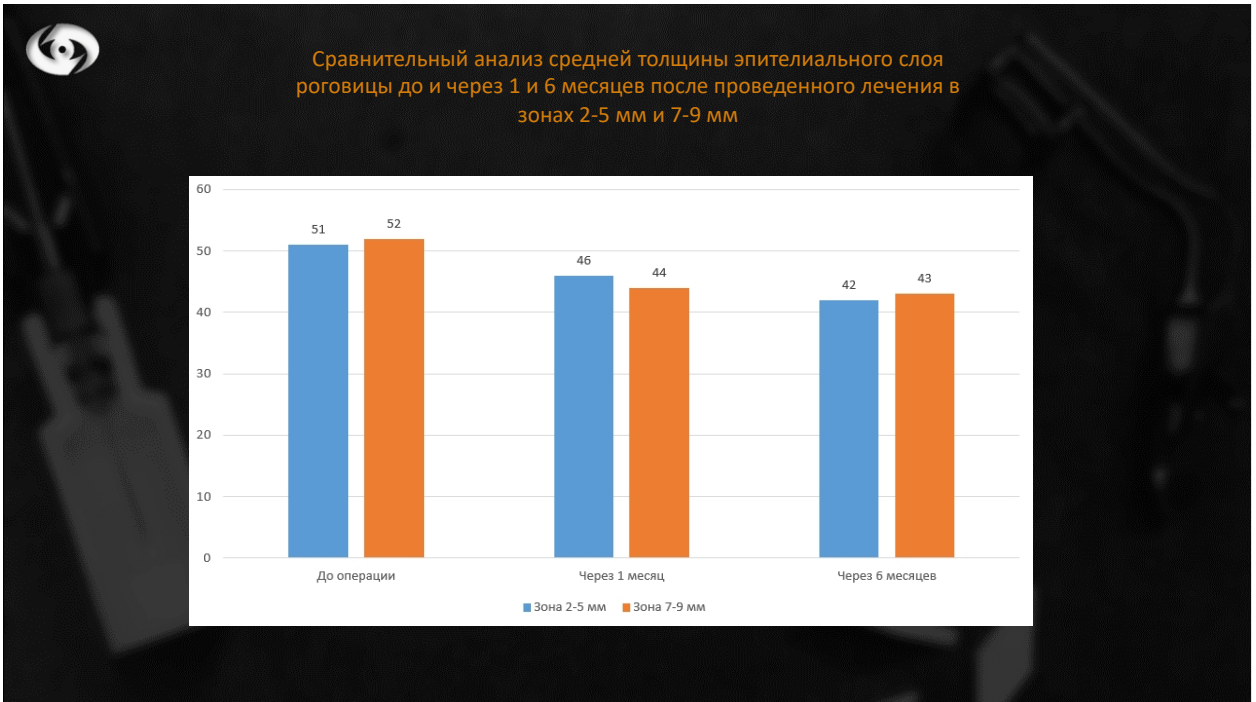


Рисунок № 7. Сравнительная оценка показателей средней толщины роговицы до и через 1 и 6 месяцев после лечения в 2 зонах наблюдениях

Экспериментальные исследования

Было проведено два экспериментальных исследования: первое исследование включало в себя создание экспериментальной модели лентовидной кератопатии *in vivo*, второе – эксперимент *in vitro* – определение оптимальной формы, размеров и абразивности микрохирургического бора, используемого для выравнивания поверхности роговицы после удаления депозитов кальция.

Первое исследование – создание экспериментальной модели ЛК *in vivo*

Экспериментальное исследование *in vivo* состоит из 3 этапов:

- 1 ЭТАП Создание лентовидной кератопатии *in vivo* для определения ключевых звеньев патогенеза данного заболевания
- 2 ЭТАП Разработка оригинального протокола хелатирования депозитов кальция с поверхности роговицы при лентовидной кератопатии с помощью EDTA

- 3 ЭТАП Выбор оптимальной модели лентовидной кератопатии *in vivo* и на основании результатов экспериментального исследования оценить предсказуемость и безопасность метода лечения лентовидной кератопатии посредством хелатирования кальцификатов раствором EDTA для структур глаза лабораторных животных (кролики породы «шиншилла»)

1 ЭТАП: Моделирование ЛК *in vivo*

Протоколы создания экспериментальных моделей лентовидной кератопатии *in vivo*

Модель №1. Создание механического дефекта поверхностных слоев роговицы и ожога щелочным раствором с последующей инстилляцией раствора, содержащего фосфатный буфер

Под местной анестезией на правом глазу кролика породы шиншилла был создан поверхностный дефект эпителия в центральной зоне роговицы механическим путем с помощью скребца, затем поврежденный участок обрабатывали тупфером, смоченным раствором 1N NaOH pH 12,0, в течение 20 сек, после чего поврежденную поверхность орошали раствором, содержащим фосфатный буфер (pH 7.4) в течение 5 мин. Затем глазную поверхность орошать данным раствором объемом 60 мл 3 раза в день до возникновения лентовидной кератопатии нужной степени тяжести.

Модель №2. Иммуногенный ятрогенный увеит с последующим внутривенным введением холекальциферола

- 1) Введение в витреальную полость правого глаза жидкого яичного белка объемом 0,5 мл
- 2) После появления у кролика ятрогенного увеита – внутривенное введение витамина холекальциферола (Дибас 300000, Abiogen pharma, Италия)

А) Дозировка кальциферола:

На 12 день эксперимента – 300000 ME

На 14 день эксперимента – 300000 ME

Модель №3. Механический дефект роговицы с последующим нанесением на поврежденную роговую оболочку силиконового масла

Под местной анестезией на правом глазу кролика породы шиншилла был создан поверхностный дефект эпителия роговой оболочки механическим путем с помощью скребца, затем на глазную поверхность наносили локально силиконовое масло 1 раз в день, используемое в витреоретинальной хирургии для тампонады витреальной полости, до возникновения лентовидной кератопатии нужной степени тяжести.

Модель №4. Механический дефект эндотелия роговицы с последующим введением силиконового масла в переднюю камеру глаза

Под местной анестезией на правом глазу кролика породы шиншилла выполнен парацентез на 11 часах, канюлей создан локальный дефект эндотелия роговицы и введено в переднюю камеру силиконовое масло до полного ее заполнения и контакта с задними слоями роговицы.

Диагностические методы, проводимые животным во время экспериментального исследования

Всем кроликам на 3-и, 7-ые сутки проводили: биомикроскопию, пахиметрию роговицы, оптическую когерентную томографию роговицы (ОСТ Optovue, США), кератотопографию роговицы (Oculus Optikgerate GmbH, Германия).

Результаты

В настоящее время проводится 1-ый этап эксперимента *in vivo*. В научном докладе представлены первые результаты на 3-и и 7-ые сутки наблюдения. Было создано 4 модели ЛК *in vivo* согласно предложенному протоколу на 4 кроликах породы шиншилла весом 2, 5 кг.

Модель №1. Создание механического дефекта поверхностных слоев роговицы и ожога щелочным раствором с последующей инстилляцией раствора, содержащего фосфатный буфер

При исследовании на 3-и сутки биомикроскопически визуализировалось помутнение белого цвета в межпальпебральной зоне, затрагивающее глубокие слои роговицы, отек стромы. (Рисунок №8)

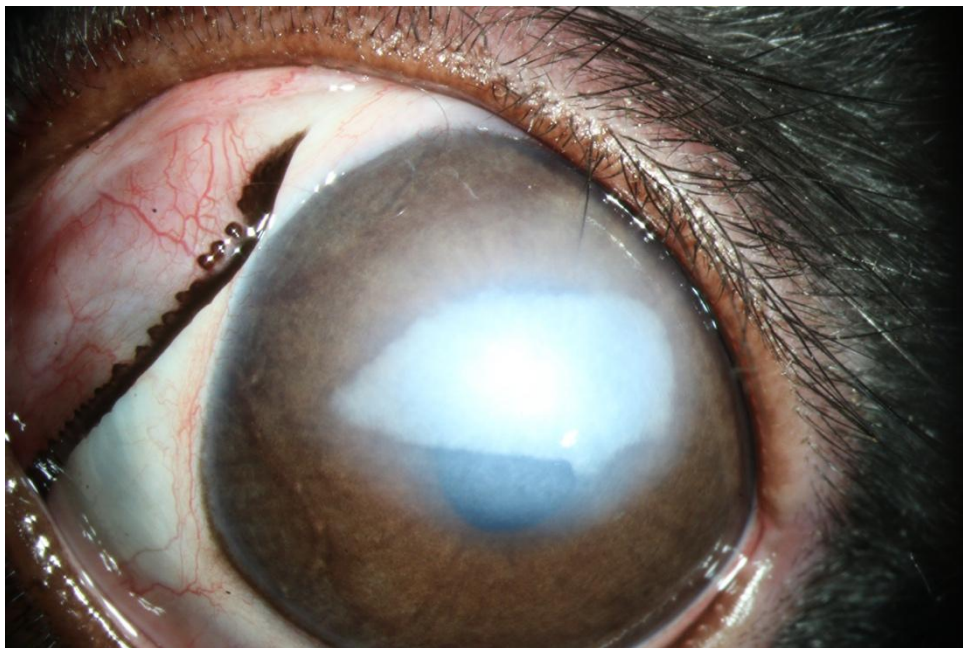


Рисунок №8. Фотоснимок глаза кролика на 3-и сутки (экспериментальная модель лентовидной кератопатии №1).

По данным ОКТ толщина роговицы в оптической зоне составляла 802 мкм визуализировалось разрежение и отек стромы, единичные складки десцеметовой мембраны. (Рисунок №9)

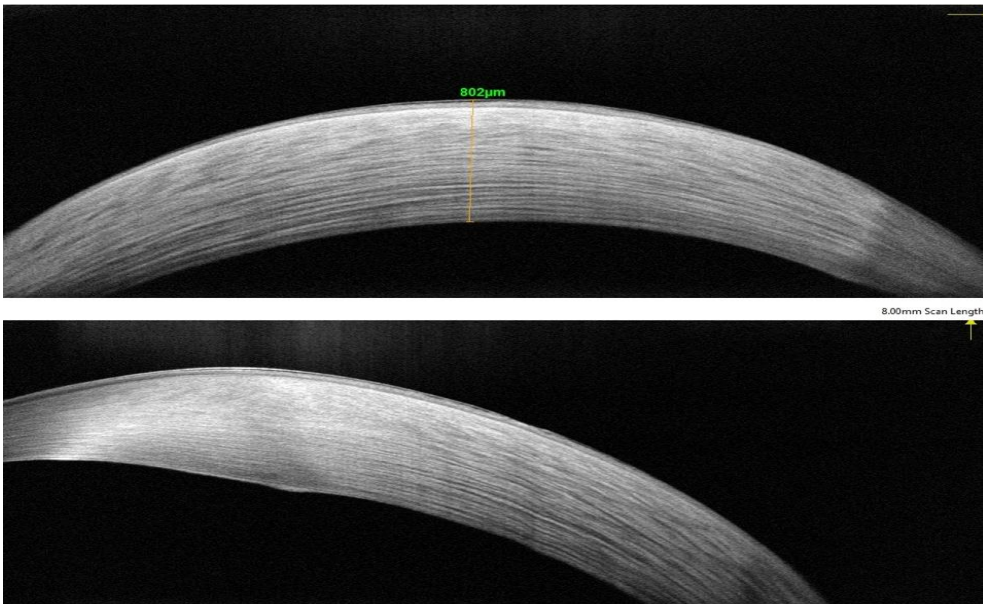


Рисунок № 9. Линейный срез в двух проекциях на ОКТ роговицы кролика модели №1 на 3-и сутки наблюдения

При исследовании на 7-ые сутки биомикроскопически визуализировалось значительное уменьшение помутнения белого цвета, вызванного ожогом, и появление поверхностных депозитов кальция в виде белых слоистых структур, локализованных в области ожога роговицы. **(Рисунок №10)**

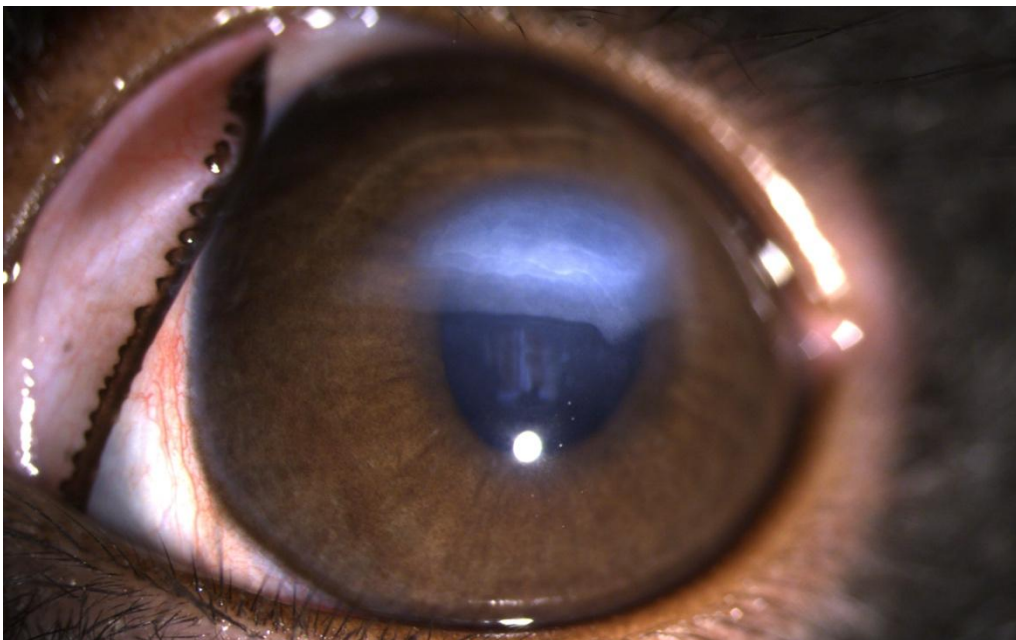


Рисунок №10. Фотоснимок глаза кролика на 7-ые сутки (экспериментальная модель лентовидной кератопатии №1).

По данным ОКТ отмечалась неровность эпителия, субэпителиальные отложения, толщина роговицы уменьшилась, отек стромы стал меньше

(Рисунок №11)

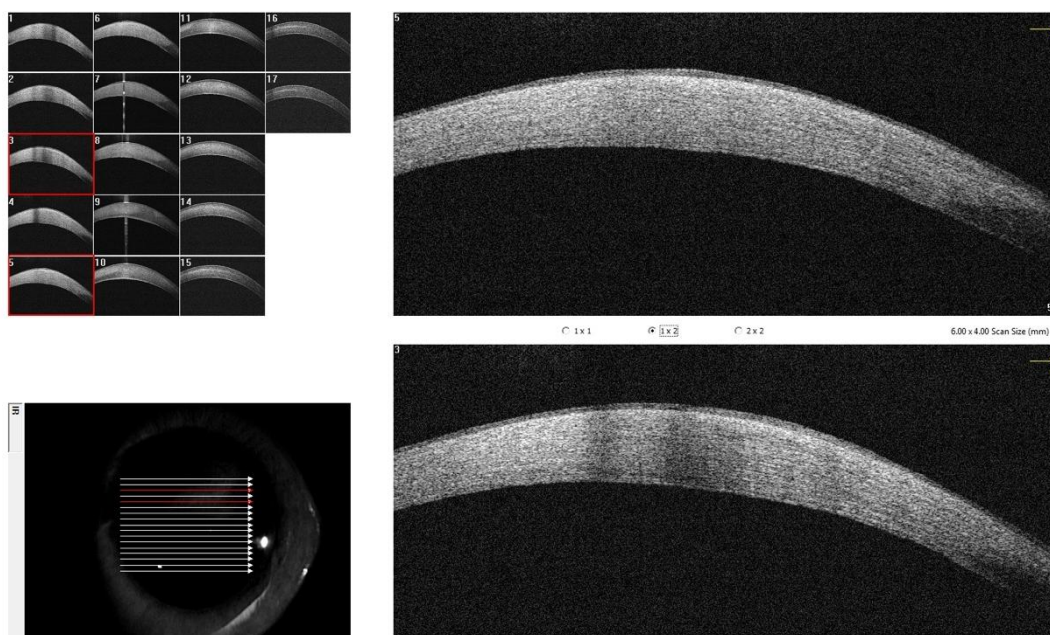


Рисунок № 11. 2 линейных среза в одинаковой проекции при растровом анализе на ОКТ роговицы кролика модели №1 на 7-ые сутки наблюдения

Модель №2. Иммуногенный ятрогенный увеит с последующим внутривенным введением холекальциферола

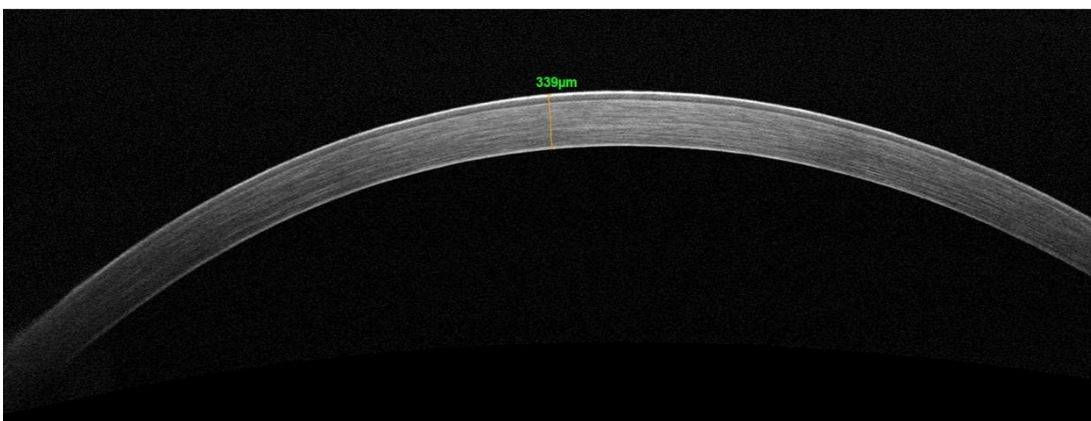
При исследовании на 3-и сутки при биомикроскопии на широком зрачке отмечалась прозрачная роговица, слегка сглаженный рисунок радужной оболочки, в витреальной полости визуализировалось помутнение стекловидного тела и остатки плавающего яичного белка. **(Рисунок №11)**



Рисунок №11. Фотоснимок глаза кролика на 3-и сутки (экспериментальная модель лентовидной кератопатии №2)

По данным ОКТ толщина роговицы в оптической зоне составляла 339 мкм, визуализировался утолщенный гиперрефлективный эндотелиальный слой (а). Для контроля представлен ОКТ снимок глаза интактного кролика (**Рисунок №12 а,б**)

а)



б)

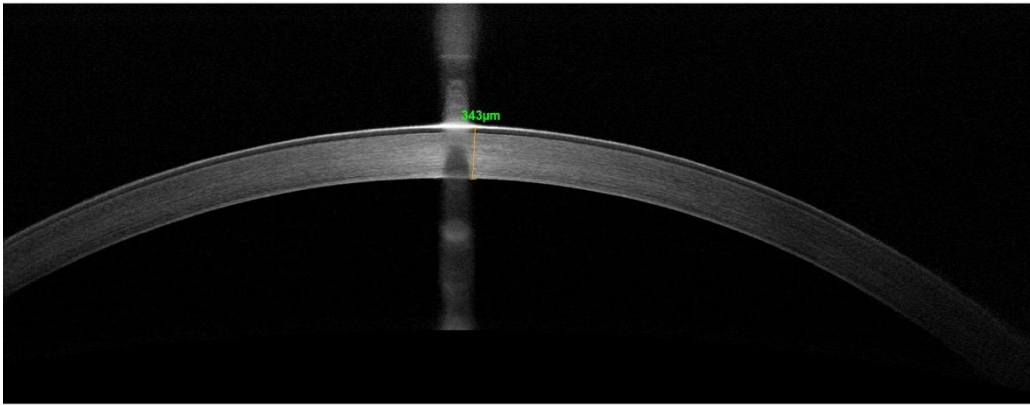


Рисунок №12 (а,б). а) Линейный срез роговицы с помощью ОКТ кролика модели №2 на 3-и сутки наблюдения. б) Линейный срез роговицы с помощью ОКТ интактного кролика

При исследовании на 7-ые сутки биомикроскопически визуализировалось локальное точечное помутнение роговицы в оптической зоне. (Рисунок №13) ОКТ подтверждает наличие данного дефекта (Рисунок №14)

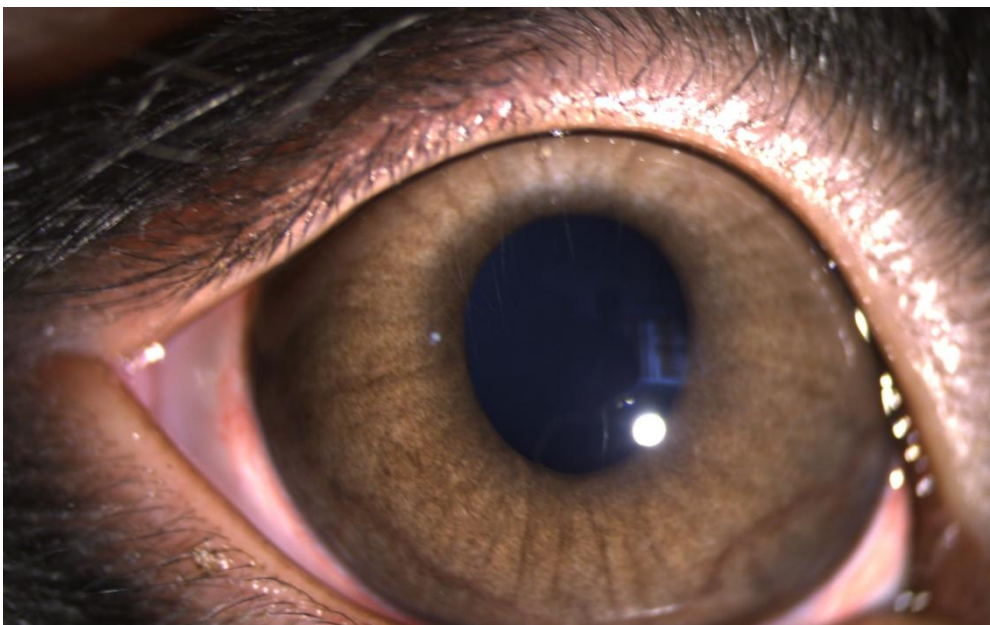


Рисунок №13. Фотоснимок глаза кролика на 7-ые сутки (экспериментальная модель лентовидной кератопатии №2)

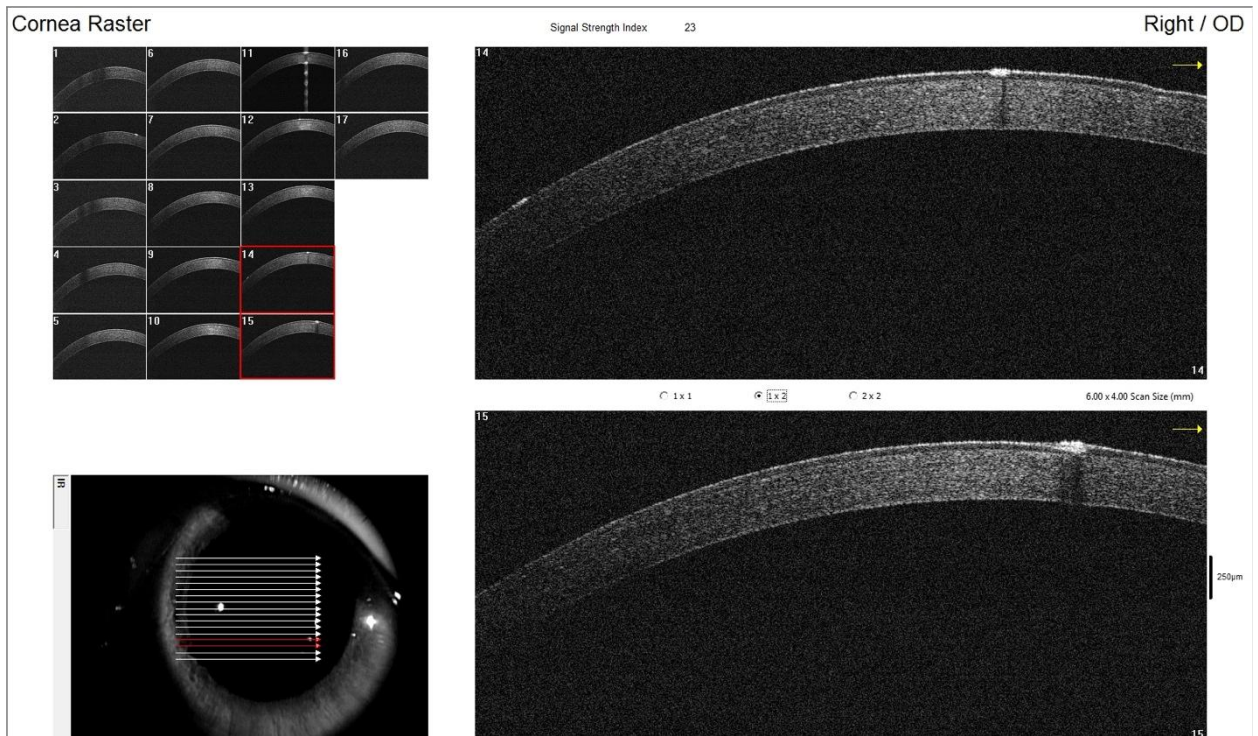


Рисунок № 14. 2 линейных среза в одинаковой проекции при растровом анализе на ОКТ роговицы кролика модели №2 на 7-ые сутки наблюдения

Модель №3. Механический дефект роговицы с последующим нанесением на поврежденную роговую оболочку силиконовое масло

При исследовании на 3-и сутки при биомикроскопии отмечался поверхностный дефект роговицы с едва заметным помутнением в области скарификации, неполная эпителизация. **(Рисунок №15)**

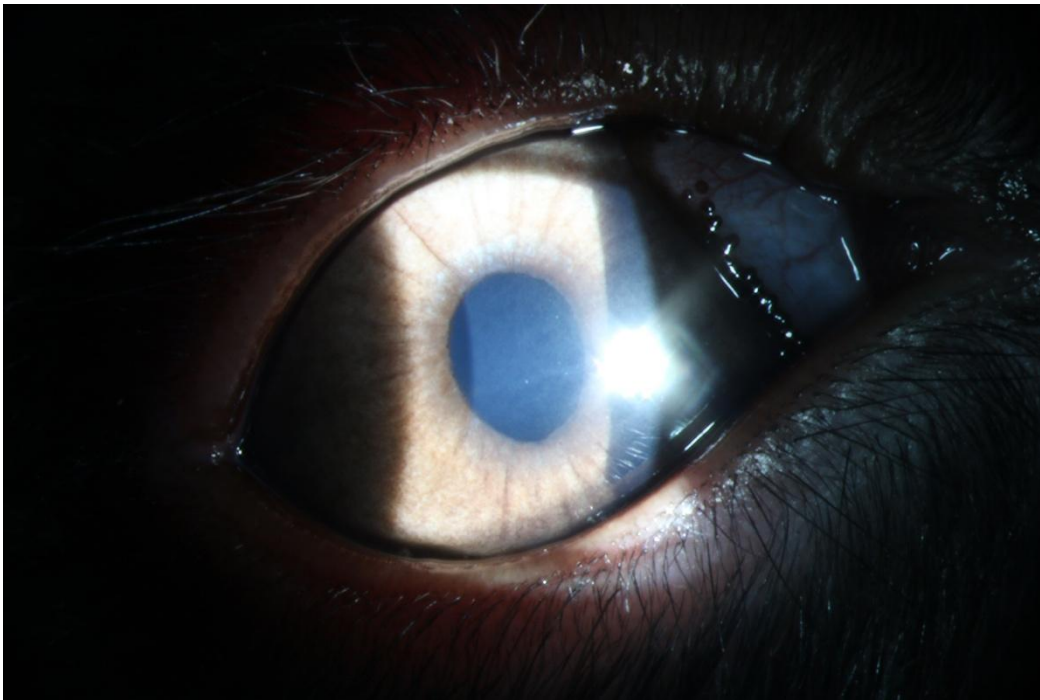


Рисунок №15. Фотоснимок глаза кролика на 3-и сутки (экспериментальная модель лентовидной кератопатии №3)

По данным ОКТ в зоне скарификации роговица утолщена, отмечается неровность ее поверхности с субэпителиальными помутнениями, затрагивающие глубже лежащие слои. На периферии отмечаются отложения толщиной 80 мкм, вероятнее всего это остатки силиконового масла. На периферии толщина роговицы в пределах нормы. **(Рисунок №16)**

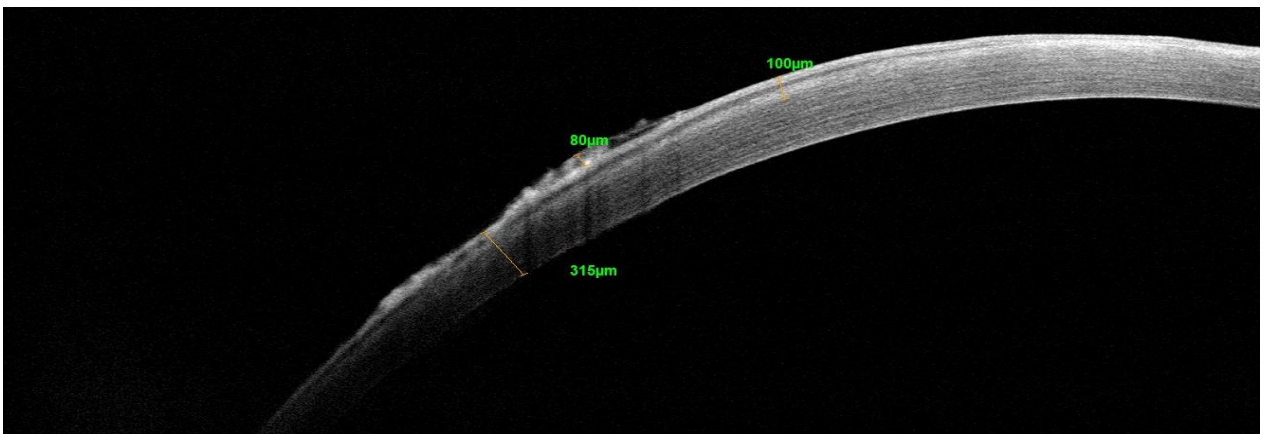


Рисунок №16. Линейный срез роговицы на ОКТ кролика модели №3 на 3-и сутки наблюдения

На 7-ые сутки биомикроскопическая картина представляла собой центральное поверхностное помутнение роговицы в области скарификации. **(Рисунок №17)**

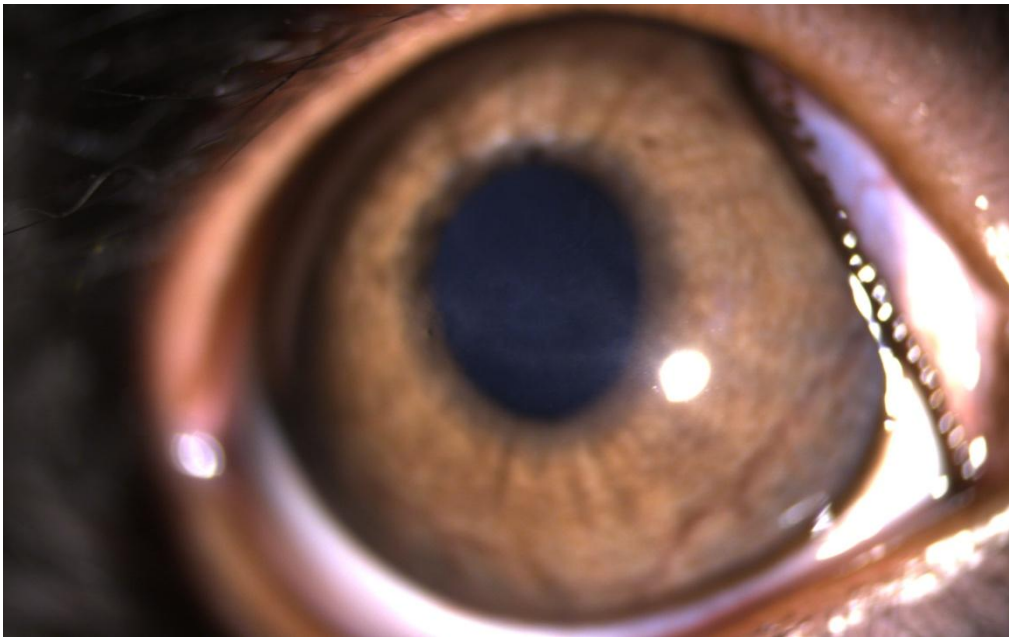


Рисунок №17. Фотоснимок глаза кролика на 7-ые сутки (экспериментальная модель лентовидной кератопатии №3)

По данным ОКТ отмечается поверхностных дефект в зоне скарификации, неполная эпителизация, с утолщением и помутнением глубже залегающих слоев в этой зоне (**Рисунок №18**)

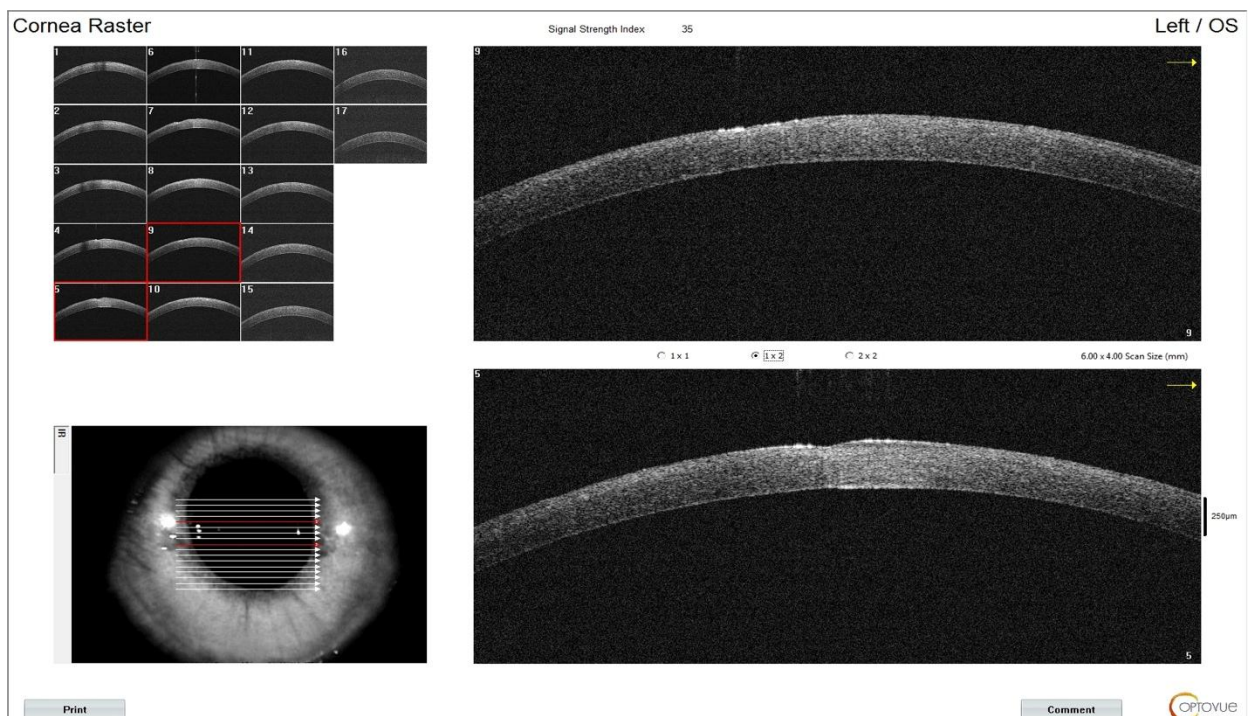


Рисунок №18. 2 линейных среза в одинаковой проекции при растровом анализе на ОКТ роговицы кролика модели №3 на 7-ые сутки наблюдения

Модель №4. Механический дефект эндотелия роговицы с последующим введением силиконового масла в переднюю камеру глаза

При исследовании на 3-и сутки биомикроскопически визуализировались единичные складки десцеметовой мембраны в области нанесенного дефекта, роговица прозрачная, в передней камере визуализировалась в области зрачка капля силиконового масла. (Рисунок №19)

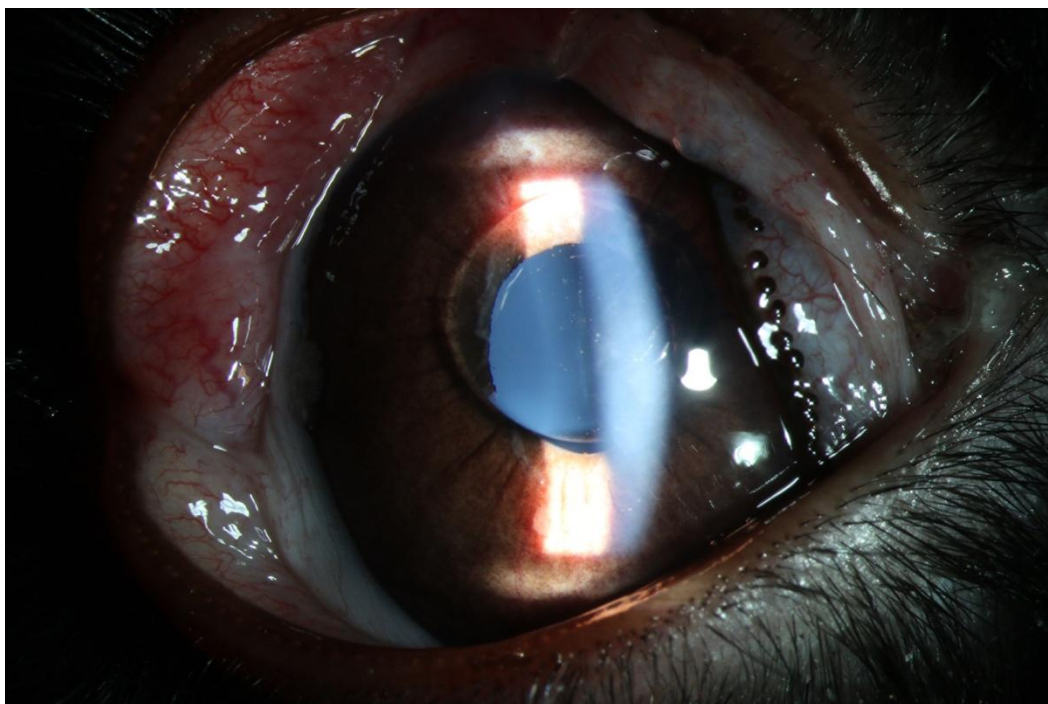


Рисунок №19. Фотоснимок глаза кролика на 3-и сутки (экспериментальная модель лентовидной кератопатии №4)

По данным ОКТ роговица незначительно утолщена, толщина в оптической зоне составляла 372 мкм, визуализируется плотный контакт силиконовой капли с эндотелием роговицы, утолщение и неровность эндотелиального слоя. (Рисунок №20)

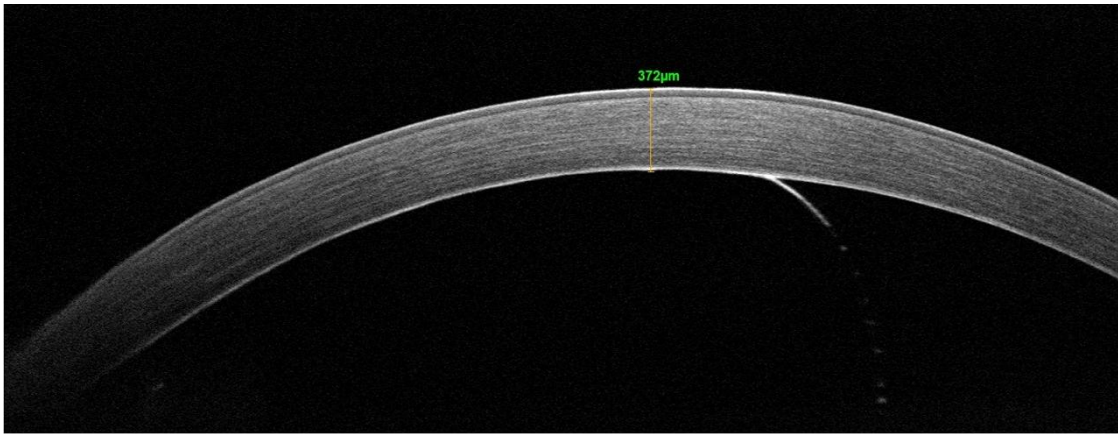


Рисунок №20. Линейных срез роговицы на ОКТ кролика модели №4 на 3-и сутки наблюдения

На 7-ые сутки биомикроскопически визуализируются единичные складки десцеметовой мембраны в области дефекта эндотелия, на остальных участках роговица прозрачная. В передней камере визуализируется капля силиконового масла в области зрачка. (Рисунок №21)



Рисунок №21. Фотоснимок глаза кролика на 7-ые сутки (экспериментальная модель лентовидной кератопатии №4)

По данным ОКТ визуализируется дефект эндотелия в оптической зоне роговицы в области нанесения механического дефекта эндотелия. (Рисунок №22)

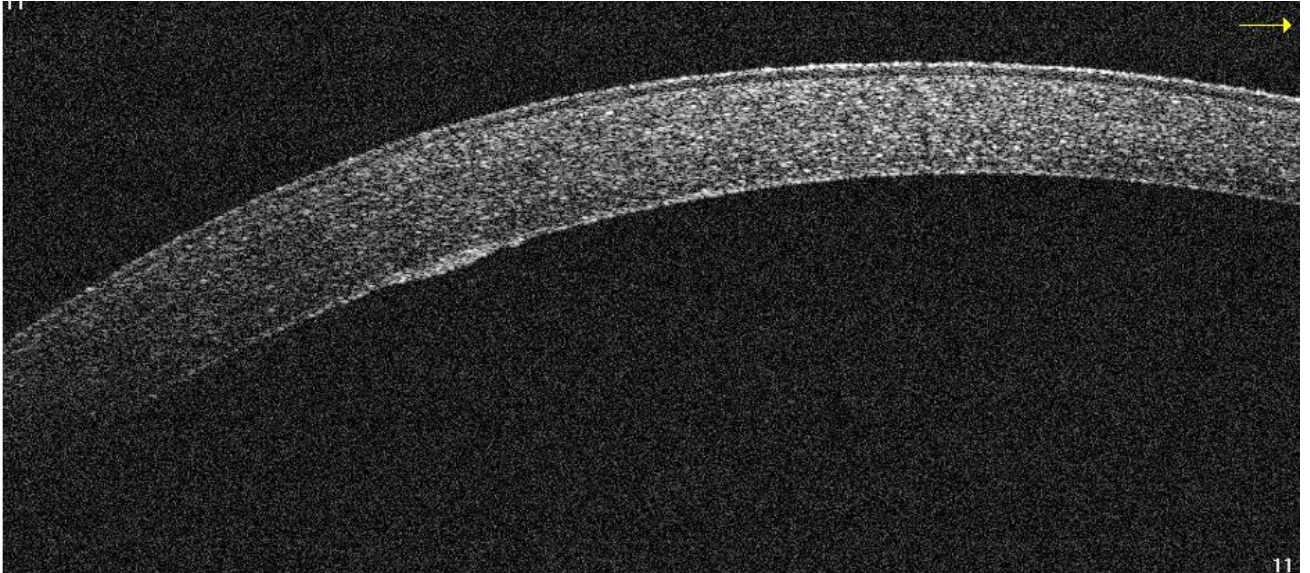


Рисунок №22. Линейный срез роговицы на ОКТ кролика модели №4 на 7-ые сутки наблюдения

2 ЭТАП: Разработан протокол хелатирования депозитов кальция при лентовидной кератопатии для проведения 3-его этапа эксперимента *in vivo*:

Для хелатирования кальцификатов с поверхности роговицы выбран 0,1% водный раствор K_3EDTA , содержащий 27 мг K_3EDTA , с $pH = 5,81$

Техника операции:

- 1) Под местной анестезии выполняется скарификация эпителия роговицы в области лентовидной кератопатии
- 2) Нанесение 0,3 мл раствора K_3EDTA с помощью смоченного в нем тупфера на поверхность роговицы локально в области депозитов кальция
- 3) Время экспозиции 1 минута тупфера в области лентовидной кератопатии
- 4) После полного удаления кальцификатов с поверхности роговицы выполняется удаление остатков K_3EDTA с помощью ирригационного раствора
- 5) Накладывание мягкой контактной линзы до реэпителизации в послеоперационном периоде

- б) **Консервативное ведение в послеоперационном периоде:** назначение инстилляций антибактериальных, противовоспалительных капель и увлажняющих препаратов в гелевой или жидкой форме.

Экспериментальное исследование *in vitro*

Определение наиболее щадящей абразивности и оптимальной формы рабочей поверхности бора для восстановления ровной поверхности роговицы

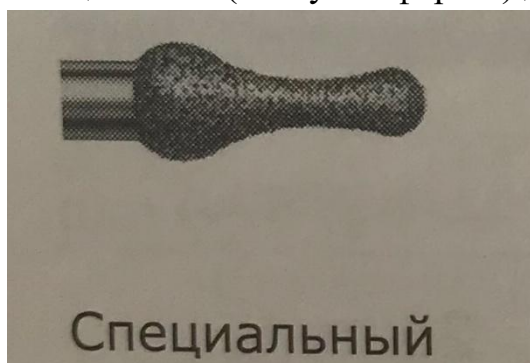
Материалы и методы

Используемые формы рабочей поверхности боров:

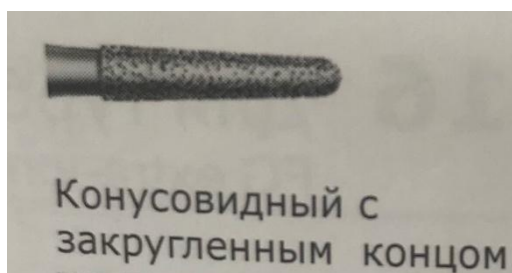
1. Шаровидная 2,5 мм с абразивностью 105-120 мкм

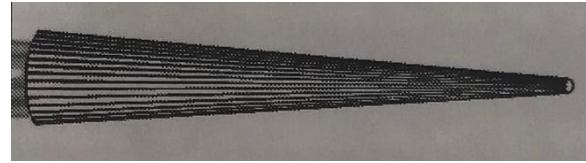


2. Специальная (вогнутой формы) длиной 5,0 мм с абразивностью 25 мкм



3. Конусовидная с закругленным концом длиной 6,0 мм с абразивностью 46 мкм





4. Твердосплавный с количеством экстрамелких лезвий 30

При выполнении абразивной шлифовки была использована система Algerbrush II (Alger, США), представляющая собой наконечник и переходник для крепления бора.



Для обеспечения равных условий для всех алмазных боров был собран штатив с креплением для бора, удерживаемый на пружинах растягивания, наконечник Algerbrush II крепился к специальной подвижной площадке в

горизонтальном положении, к площадке крепилась груз одинаковой массы для обеспечения надавливания на роговицу. (Рисунок № 23)



Рисунок №23. Штатив для крепления бора

В кадаверных глазах было создано одинаковое ВГД, измерение проводилось с помощью тонометрии по Шиотцу и равнялось 16,5 мм.рт.ст. (Рисунок №24)



Рисунок №24. Измерение ВГД на кадаверном глазе с помощью тонометра Шиотца

Всего было использовано 12 кадаверных глаз, каждым алмазным бором было обработано 3 роговицы: 1-ая - в горизонтальном направлении однократно, 2-ая – в вертикальном направлении однократно, 3-я – в горизонтальном направлении многократно (4 раза). Движения алмазным бором осуществляли по всей заранее дезэпителизированной поверхности роговицы кадаверного глаза. Далее корнеосклеральный диск удалялся и фиксировался с помощью 10% раствора формалина.

Результаты

В научном докладе представлены первые результаты экспериментального исследования *in vitro*. После многоэтапной фиксации ацетоном обработанная поверхность каждого образца была исследована с помощью ЭСМ. На рисунках ниже представлены фотоснимки образцов после 4-ех кратного воздействия алмазным бором по всей дезэпителизированной поверхности роговицы.

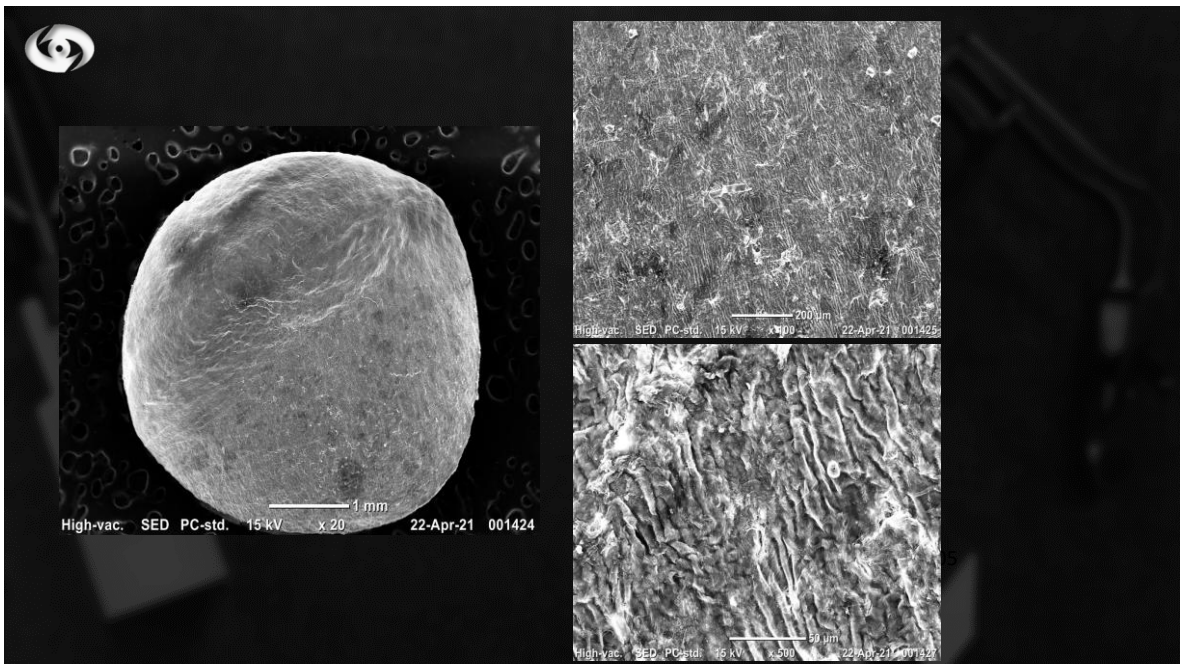


Рисунок №25. Образец после 4 - кратного воздействия алмазным бором шаровидной формы диаметром 2,5 мм с абразивностью 105-120 мкм

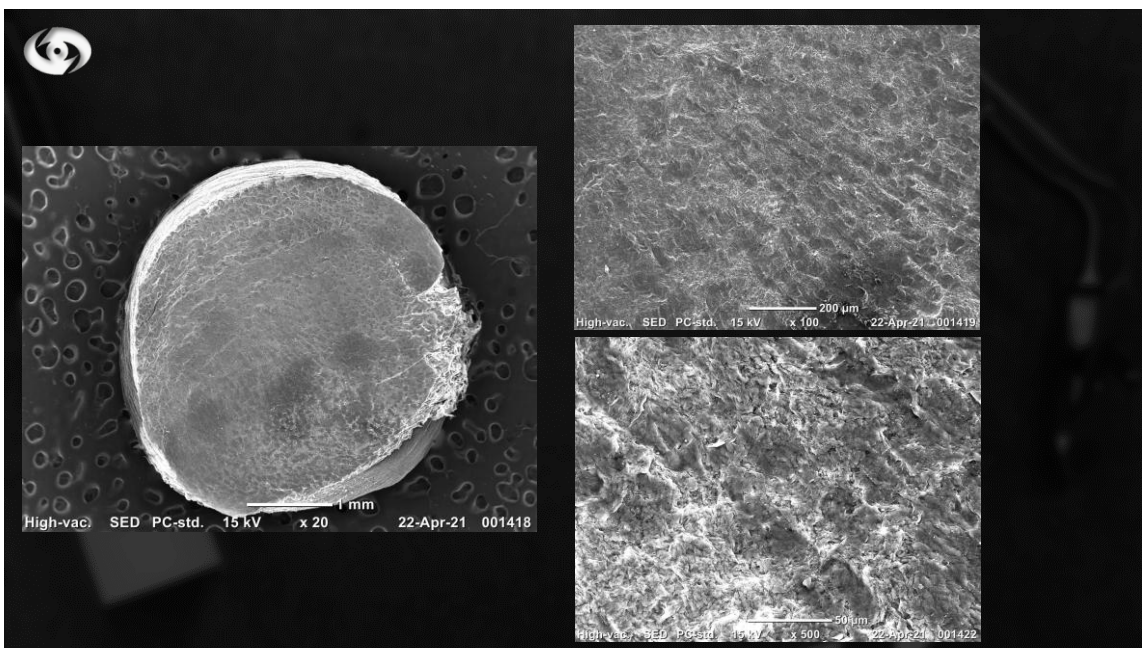


Рисунок № 26. Образец после 4- кратного воздействия алмазным бором специальной (вогнутой) формы диаметром 5,0 мм с абразивностью 25 мкм

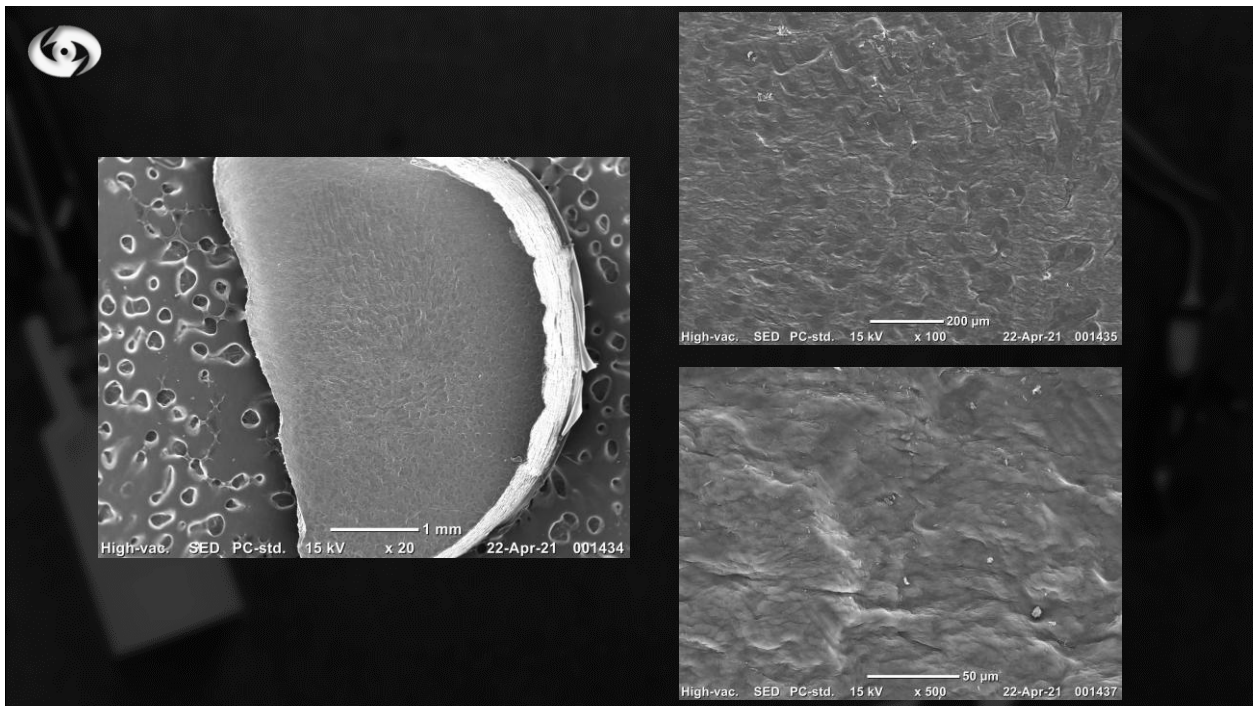


Рисунок № 27. Образец после 4 - кратного воздействия алмазным бором конусовидной формы с закругленным концом 6,0 мм с абразивностью 46 мкм

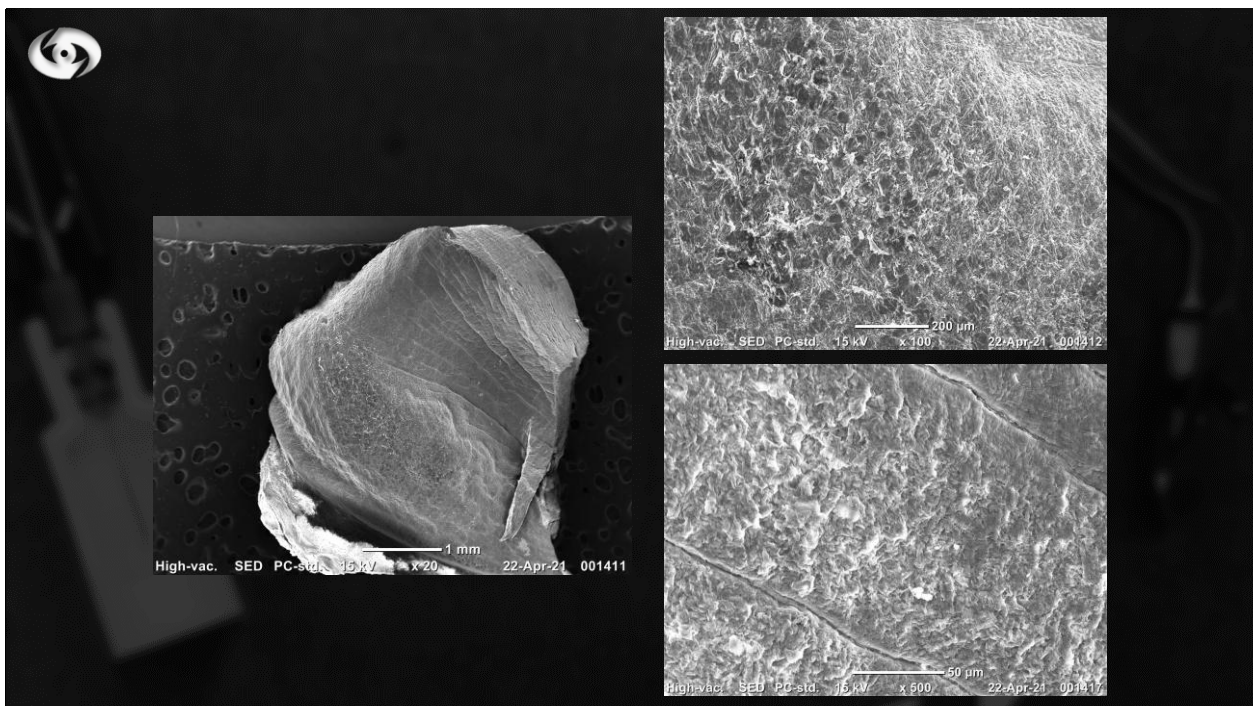


Рисунок №28. Образец после 4 - кратного воздействия твердосплавным бором с количеством экстрамелких лезвий 30.

Представленные данные показывают, что при многократном воздействии микрохирургическом бором любой формы, они в значительной степени деформируют структуру ткани роговицы, захватывая ее при шлифовании,

что доказывается повторением паттерна боров на ЭСМ снимках. Наиболее щадящим и оптимальным для восстановления поверхности роговицы, исходя из представленных результатов, является бор прямой конусовидной формы с закругленным концом длиной 6,0 мм и с абразивностью 46 мкм. (рисунок № 27). Наиболее грубые изменения наблюдаются при использовании твердосплавного бора с 30 экстрамелкими лезвиями 30. Однако Экспериментальное исследование *in vitro* для определения наиболее щадящей абразивности и оптимальной формы рабочей поверхности бора для восстановления ровной поверхности роговицы требует дальнейшего исследования.

Выводы

1. Выбор тактики ведения пациентов с ЛК зависит от толщины депозитов кальция: при толщине кальцификатов от 20 мкм до 156 мкм рекомендована механическая скарификация их с поверхности роговицы, при толщине кальцификатов более 156 мкм рекомендовано механическое удаление кальцификатов с последующим восстановлением регулярности роговицы методом шлифования микрохирургическим амазным бором или с помощью инвертированной топографически-ориентированной фоторефрактивной кератэктомии. При наличии у пациента сопутствующей псевдофакичной или афакичной буллезной кератопатии рекомендовано проведение кератопластики, вид которой определяется уровнем патологически измененных глубжележащих слоев роговицы.

2. Для полноценного диагностического исследования ЛК обязательным является проведение оптической когерентной томографии с оценкой толщины эпителиального слоя, толщины депозитов кальция, толщины роговицы во всех ее зонах для исключения залегания начальных депозитов кальция на периферических участках, качественная оценка структуры роговицы, оценка кератометрических показателей роговой оболочки и ее пахиметрической карты. Гистологическое исследование, электронная сканирующая микроскопия и спектрометрия являются методами выбора для верификации кальцификатов и их химического состава. При проведении спектрального анализа слезной жидкости содержание кальция было на границе порога обнаружения метода ЭСМ-ЭДС. Повышенных содержаний выявлено не было.
3. Возникновение лентовидной кератопатии на модели *in vivo* с химическим ожогом и интенсивной инстилляцией раствора, содержащего фосфатный буфер доказывает, что одними из ключевых звеньев патогенеза является наличие хронического воспаления, дефекта поверхностных слоев роговицы и изменение в концентрации фосфата могут вызвать образование гидроксиапатита и последующее развитие лентовидной кератопатии.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Малюгин Б.Э., Майчук Н.В., Дибина Д.А. Восстановление регулярной поверхности роговицы у пациента с лентовидной кератопатией методом инвертированной топографически-ориентированной фоторефрактивной кератэктомии (подана для публикации)

2. Малюгин Б.Э., Дибина Д.А., Анисимова Н.С., Киратов Р.В., Майчук Н.В. Хотеева М.А. Опыт лечения пациентов с лентовидной кератопатией (подана для публикации)
3. Малюгин Б.Э., Дибина Д.А. Лентовидная кератопатия. Обзор литературы (подана для публикации)
Прочие публикации
4. Малюгин Б.Э., Дибина Д.А., Анисимова Н.С. Опыт применения КЗ-ЭДТА при лечении лентовидной кератопатии // Современные технологии в офтальмологии. – 2020. – № 4. – С. 96-97.
5. Колесник А.И. Малюгин Б.Э., Педанова Е.К., Горшков И.М., Дибина Д.А. Лечение последствий длительной тампонады силиконовым маслом при рецидивирующей отслойке сетчатки у пациента с ретинопатией недоношенных (в печати)
Патенты РФ на изобретение по теме диссертации

Малюгин Б.Э., Калининкова С.Ю., Дибина Д.А., Герасимов М.Ю., Ткаченко И.С. Способ выравнивания поверхности роговицы микробором при хирургическом лечении синдрома лимбальной недостаточности (СЛН) и/или кальцификации роговицы (варианты). Подана заявка на Патент РФ на изобретение