

ФЕМТОСЕКУНДНЫЙ КРОССЛИНКИНГ РОГОВИЧНОГО КОЛЛАГЕНА В ЛЕЧЕНИИ ПАЦИЕНТОВ С ПРОГРЕССИРУЮЩИМ КЕРАТОКОНУСОМ I-II СТАДИИ

DOI: 10.17691/stm2016.8.1.17
УДК 617.73-007.64:615.849.19
Поступила 23.10.2015 г.



К.Б. Летникова, аспирантка отдела патологии сетчатки и зрительного нерва;
А.Т. Ханджян, к.м.н., научный сотрудник отдела патологии сетчатки и зрительного нерва;
О.Г. Оганесян, д.м.н., старший научный сотрудник отдела травматологии и реконструктивной хирургии;
А.В. Пенкина, к.м.н., врач-офтальмолог отдела патологии рефракции, бинокулярного зрения и офтальмоэргоники;
В.В. Нероев, д.м.н., профессор, директор

Научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца, Москва, 105062,
ул. Садовая-Черногрозская, 14/19

Цель исследования — оценить безопасность и эффективность метода кросслинкинга роговичного коллагена с формированием интрастромального кармана, выполняемого с помощью фемтосекундного лазера у пациентов с прогрессирующим кератоконусом.

Материалы и методы. 33 пациентам (34 глаза) с прогрессирующим кератоконусом I–II стадии был проведен фемтокросслиндинг роговичного коллагена. С помощью фемтосекундного лазера FEMTO LDV Z6 был сформирован интрастромальный роговичный карман диаметром 8,0 мм, глубиной 140 мкм. Раствор нормотонического рибофлавина (рибофлавин 0,1% и декстран 20%) вводили в сформированный карман каждые 2 мин в течение 30 мин (15 закапываний). Параллельно осуществляли УФ-облучение, для которого использовали систему OPTO-XLink (OPTO, Бразилия) с длиной волны 365 нм и мощностью излучения 3,0 мВт/см² (5,4 Дж/см²). Оценивали изменения некорригированной остроты зрения, биомеханических свойств роговицы, кератотопографические, пахиметрические и морфологические данные. Срок наблюдения за пациентами составил 6 мес.

Результаты. Дооперационный уровень остроты зрения восстановился на 3–5-й день. Через 6 мес после процедуры произошло уменьшение среднего значения роговичного астигматизма — с $4,35 \pm 0,19$ до $3,75 \pm 0,20$ дптр ($p < 0,05$). Толщина роговицы в зоне кератэктазии снизилась с $437,50 \pm 2,84$ до $405,0 \pm 2,99$ мкм ($p < 0,05$). Максимальная преломляющая сила роговицы уменьшилась с $52,15 \pm 0,23$ до $51,05 \pm 0,21$ дптр ($p < 0,05$). Отмечалось достоверное повышение показателей фактора резистентности роговицы — с $7,70 \pm 0,12$ до $8,25 \pm 0,10$ мм рт. ст. и корнеального гистерезиса — с $6,90 \pm 0,10$ до $7,30 \pm 0,11$ мм рт. ст. Конфокальная микроскопия показала увеличение плотности экстрацеллюлярного матрикса без признаков отека и складчатости, обусловленную эффектом «сшивания». Визуализировалась регенерация субэпителиальных и стромальных нервных волокон. Задняя часть стромы и эндотелий оставались интактными. Воздействие УФ-кросслинкинга с рибофлавином ограничивалось передней и средней стромой роговицы (до 320–330 мкм) и не затрагивало заднюю часть стромы и эндотелий. Через 6 мес при выполнении ОКТ-исследования наблюдалась демаркационная линия, глубина ее залегания составила 320–330 мкм.

Заключение. Кросслиндинг роговичного коллагена с формированием интрастромального кармана, выполняемого с помощью фемтосекундного лазера, является эффективной процедурой стабилизации прогрессирования кератоконуса. Сохранение эпителиального слоя при фемтосекундном кросслинкинге позволяет снизить риск инфекционных осложнений эрозированной поверхности роговицы, уменьшить зрительный дискомфорт, болевые ощущения у пациентов в раннем послеоперационном периоде, сократить реабилитацию.

Ключевые слова: фемтосекундный кросслиндинг; прогрессирующий кератоконус; кросслиндинг роговичного коллагена.

Как цитировать: Letnikova K.B., Khandjan A.T., Oganessian O.G., Penkina A.V., Neroyev V.V. Femtosecond corneal collagen crosslinking in treatment of patients with progressive keratoconus stages I–II. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2016; 8(1): 128–133, <http://dx.doi.org/10.17691/stm2016.8.1.17>.

English

Femtosecond Corneal Collagen Crosslinking in Treatment of Patients with Progressive Keratoconus Stages I-II

K.B. Letnikova, PhD Student, Department of Retina and Optic Nerve Pathology;
A.T. Khandjan, MD, PhD, Researcher, Department of Retina and Optic Nerve Pathology;

Для контактов: Летникова Ксения Борисовна, letnikova@inbox.ru

O.G. Oganessian, MD, DSc, Senior Researcher, Department of Traumatology and Reconstructive Surgery;
A.V. Penkina, MD, PhD, Ophthalmologist, Department of Pathology of Refraction, Binocular Vision
 and Ophthalmoeconomics;
V.V. Neroyev, MD, DSc, Professor, Director

Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, 14/19 Sadovaya-Chernogryazskaya St., Moscow, 105062,
 Russian Federation

The aim of the investigation was to assess safety and efficacy of corneal collagen crosslinking technique using femtosecond laser for intrastromal pocket creation in patients with progressive keratoconus.

Materials and Methods. Thirty-three patients (34 eyes) with progressive keratoconus stages I–II underwent femto-crosslinking of the corneal collagen. FEMTO LDV Z6 femtosecond laser was used to create an intrastromal pocket of 8.0 mm diameter and 140 μm depth. Normotonic riboflavin solution (0.1% riboflavin and 20% dextran) was instilled into the created pocket every 2 min during 30 min (15 instillations). At the same time UV-irradiation was performed using OPTO-XLink system (OPTO, Brasil) with 365 nm wavelength and an irradiance of 3.0 mW/cm^2 (5.4 J/cm^2). Changes in uncorrected visual acuity, corneal biomechanical properties, keratometric, topographic, pachymetric and morphological data were evaluated. The follow-up period amounted to 6 months.

Results. Preoperative visual acuity level recovered on day 3–5. Six months after the procedure the mean value of astigmatism decreased from 4.35 ± 0.19 to 3.75 ± 0.20 dioptres ($p < 0.05$). The corneal thickness in the area of keratoectasia descended from 437.50 ± 2.84 to 405.0 ± 2.99 μm ($p < 0.05$). Maximal corneal refractive power decreased from 52.15 ± 0.23 to 51.05 ± 0.21 dioptres ($p < 0.05$). Significant elevation of corneal resistance (from 7.70 ± 0.12 to 8.25 ± 0.10 mm Hg) and corneal hysteresis indexes (from 6.90 ± 0.10 to 7.30 ± 0.11 mm Hg) was reported. Confocal microscopy showed increase in extracellular matrix density without the signs of edema, and corrugation due to cross-linkage effect. Regeneration of subepithelial and stromal nerve fibers was visualized. The posterior stroma and endothelium remained intact. Exposure to UV-crosslinking with riboflavin was limited to the anterior and middle corneal stroma (to 320–330 μm) and did not involve the posterior stroma and the endothelium. Six months after the operation OCT examination confirmed the existence of the demarcation line which lay at the depth of 320–330 μm .

Conclusion. Corneal collagen crosslinking with creation of an intrastromal pocket using a femtosecond laser appears to be an effective technique for keratoconus progression stabilization. The epithelial layer preservation in femtosecond crosslinking makes it possible to lower the risks of infectious complications of the eroded corneal surface, to reduce the patients' visual discomfort and pain in the early postoperative period providing a faster recovery.

Key words: femtosecond crosslinking; progressive keratoconus; corneal collagen crosslinking.

Кератоконус — это двустороннее невоспалительное дистрофическое заболевание мультифакториальной природы, сопровождающееся деформацией, истончением и ослаблением биомеханических свойств роговицы [1]. На ранних стадиях данной патологии снижение остроты зрения происходит из-за миопии и нерегулярного астигматизма. Классический кератоконус, как правило, начинается и прогрессирует в пубертатном периоде, а после 40 лет стабилизируется, однако есть сообщения о дебюте заболевания в 3–5-м десятилетиях жизни [2]. Прогрессирующий характер заболевания может приводить к значительному снижению зрительных функций, а значит, и качества жизни.

Кросслинкинг роговичного коллагена — хирургическая манипуляция, проводимая с целью замедления прогрессирования кератоконуса [3]. Наиболее широко используемая техника кросслинкинга роговичного коллагена была разработана исследователями Дрезденского университета G. Wollensak, E. Spoerl, T. Seiler в конце 1990-х и получила название «стандартного протокола» [4]. Данный метод представляет собой фотополимеризацию стромальных волокон в результате воздействия на роговицу рибофлавина и ультрафиолетового (УФ) излучения. Как следствие, формируются дополнительные связи между молекулами роговичного коллагена, увеличивается его сопротивляемость к эндогенным протеазам, предполагаемой причине раз-

вития эктазий, повышается механическая прочность роговицы, стабилизируется процесс прогрессирования кератоконуса, предотвращается необходимость пересадки роговицы [5]. При выполнении кросслинкинга роговичного коллагена по стандартной методике в оптической зоне механически удаляется эпителий, инстиллируется раствор рибофлавина с последующим УФ-облучением роговицы. Однако дезэпителизация приводит к болезненному раннему послеоперационному периоду, медленному заживлению и риску развития инфекционного кератита [6]. Предлагаются различные методы для улучшения проникновения рибофлавина через интактный эпителий [7, 8]. К ним относится и метод фемтосекундного кросслинкинга, который был предложен офтальмологом John Kanellopoulos в 2007 г. Суть его заключается в формировании с помощью фемтосекундного лазера интрастромального кармана в роговице, в который затем вводится рибофлавин, с последующим УФ-облучением роговицы [9].

Фемтосекундный лазер позволяет контролировать размер и глубину расположения роговичного кармана, тем самым делая операцию технически более легкой, безопасной и предсказуемой. Ультракороткие импульсы фемтосекундного лазера позволяют создавать в фокусе оптической системы очень высокую плотность мощности, порядка 10^{10} $\text{Вт}/\text{см}^2$ и выше, поэтому они способны проводить высокоточное рассечение биотка-

ни без ее коллатерального повреждения [10]. В облучаемой ткани возникает оптический пробой, лежащий в основе плазмоиндуцированной абляции и фотодеструкции. При этом вероятность термического повреждения ткани практически исключена за счет ультракороткого импульса. Инфракрасное излучение фемтосекундного лазера не задерживается оптически прозрачными средами, поэтому оно может быть сфокусировано в любой точке как на поверхности, так и внутри ткани [11].

К неоспоримым преимуществам фемтосекундного кросслинкинга относятся селективный доступ рибофлавина в переднюю строму, сохранение эпителиального слоя роговицы, снижение риска инфекционных осложнений, менее болезненное заживление роговицы, как следствие — сокращение периода реабилитации пациентов [12, 13].

Цель исследования — оценить безопасность и эффективность метода кросслинкинга роговичного коллагена с формированием интрастромального кармана с помощью фемтосекундного лазера у пациентов с прогрессирующим кератоконусом I–II стадии.

Материалы и методы. В МНИИ ГБ им. Гельмгольца 33 пациентам (34 глаза) в возрасте от 16 до 35 лет с прогрессирующим кератоконусом I–II стадии был проведен кросслиндинг роговичного коллагена с формированием интрастромального кармана с помощью фемтосекундного лазера FEMTO LDV Z6 (Ziemer, Швейцария). В исследование вошли пациенты на ранних стадиях заболевания, у которых прогрессирование эктазии подтверждено клиническими и инстру-

ментально-диагностическими данными в динамике. Критерием прогрессирования дистрофического процесса служило увеличение максимальной преломляющей силы роговицы (Kmax) на 1 дптр и более при исследовании на Шаймпфлюг-анализаторе Galilei G6 (Ziemer, Швейцария) в течение 6 мес–1 года. В исследовании вошли пациенты без помутнений роговицы и с остротой зрения с максимальной коррекцией 0,4 и более. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией (принятой в июне 1964 г. (Хельсинки, Финляндия) и пересмотренной в октябре 2000 г. (Эдинбург, Шотландия)) и одобрено Этическим комитетом Научно-исследовательского института глазных болезней им. Гельмгольца. От каждого пациента получено информированное согласие.

До и после процедуры наряду со стандартными офтальмологическими методами обследования пациентам проводили исследования на Шаймпфлюг-анализаторе Galilei G6, определение биомеханических свойств роговицы на приборе ORA (Reichert Inc., США), конфокальную микроскопию на приборе Confoscan 4 (Nidek, Япония) и оптическую когерентную томографию (ОКТ) на приборе Visante OCT (Carl Zeiss, Германия). Все исследования выполняли до операции, через 1 нед, 3 и 6 мес после лечения (см. таблицу). В исследование не вошли пациенты с воспалительными заболеваниями роговицы, выраженным синдромом сухого глаза, беременные.

Под местной инстилляционной анестезией с помощью фемтосекундного лазера FEMTO LDV Z6 форми-

Результаты исследования клиничко-функциональных показателей после проведенного фемтокросслинкинга роговичного коллагена

Параметры	До операции	После операции		
		Через 1 нед	Через 3 мес	Через 6 мес
Цилиндрический компонент, дптр	4,35 ±0,19	4,85±0,19	3,97±0,18	3,75±0,20*
Толщина роговицы, мкм	437,50±2,84	415,25±3,33*	410,61±3,01*	405,0±2,99*
Преломляющая сила роговицы, дптр	52,15±0,23	53,15±0,19*	52,13±0,21	51,05±0,21*
Фактор резистентности роговицы, мм рт. ст.	7,70±0,12	8,10±0,11*	8,21±0,11*	8,25±0,10*
Корнеальный гистерезис, мм рт. ст.	6,90±0,10	7,12±0,11	7,24±0,12*	7,30±0,11*

* — $p < 0,05$ (сравнение проведено по критерию Стьюдента) — статистически значимая разница значений с показателями до лечения.

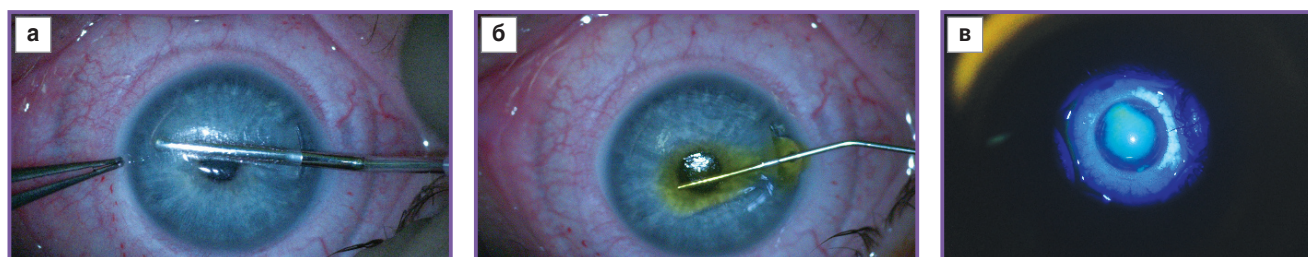


Рис. 1. Этапы фемтосекундного кросслинкинга перед УФ-облучением: а — расслоение интрастромального роговичного кармана, сформированного фемтосекундным лазером; б — введение рибофлавина в интрастромальный роговичный карман; в — желтое свечение рибофлавина, находящегося в интрастромальном роговичном кармане, в синем кобальтовом фильтре

ровали интрастромальный роговичный карман диаметром 8,0 мм, глубиной 140 мкм (ширина и глубина входного туннеля 3,0 и 5,04 мм). Раствор нормотонического рибофлавина (рибофлавин 0,1% и декстран 20%) вводили в сформированный карман (рис. 1) с помощью тупоконечной канюли по 1–2 капли каждые 2 мин в течение 30 мин (15 закапываний). Для УФ-облучения мы использовали систему OPTO-XLink (OPTO, Бразилия) с длиной волны 365 нм и мощностью излучения 3,0 мВт/см² (5,4 Дж/см²). УФ-воздействие проводили в течение 30 мин, параллельно инстилляцией рибофлавина. После окончания процедуры закапывали антибактериальный препарат и накладывали мягкую контактную линзу.

В послеоперационном периоде пациентам назначали инстилляцию антибактериальных препаратов, кортикостероидов, проводили слезозаместительную и репаративную терапию. Послеоперационных осложнений не выявлено.

Результаты и обсуждение. Исходная острота зрения с коррекцией составила 0,50±0,02. Дооперационная толщина роговицы — 437,50±2,84 мкм. В группу исследования вошли пациенты с Kmax=52,15±0,23 дптр. При формировании интрастромального кармана роговицы с помощью фемтосекундного лазера интраоперационных осложнений не наблюдалось. В течение первых 5–6 ч после операции пациенты жаловались на умеренные болевые ощущения в оперированном глазу, слезотечение, светобоязнь. Лечебные контактные линзы удаляли через 1 день после операции. При биомикроскопии роговицы через одну неделю после процедуры отмечался слабо выраженный стромальный отек, визуализировалась демаркационная граница в строме роговицы.

Дооперационный уровень остроты зрения восстановился на 3–5-й день. Послеоперационные осложнения не наблюдались. Через 6 мес после операции произошло уменьшение среднего значения роговичного астигматизма — с 4,35±0,19 до 3,75±0,20 дптр (p<0,05).

Толщина роговицы в зоне кератэктазии статистически значимо снизилась с 437,50±2,84 до 405,0±2,99 мкм (p<0,05). Значение Kmax уменьшилось с 52,15±0,23 до 51,05±0,21 дптр (p<0,05) (рис. 2).

Отмечалось статистически значимое повышение показателей фактора резистентности роговицы — с 7,70±0,12 до 8,25±0,10 мм рт. ст. (p<0,05). Корнеальный гистерезис увеличился с 6,90±0,10 до 7,30±0,11 мм рт. ст. (p<0,05).

Через 6 мес после кросслинкинга визуализировались единичные гиперрефлективные эпителиоциты (до 10 в поле зрения). Полиморфизм базального эпителия стал менее выраженным, границы клеток оставались четкими. Отмечалось увеличение плотности экстрацеллюлярного матрикса без признаков отека. Определялась складчатость, обусловленная эффектом «сшивания». Визуализировалась регенерация субэпителиальных и стромальных нервных волокон. Задняя часть стромы и эндотелий оставались интактными (рис. 3).

Демаркационную линию можно было наблюдать при выполнении ОКТ-исследования через 6 мес, глубина ее залеганий составила примерно 320–330 мкм (рис. 4).

Таким образом, кросслинкинг роговичного коллагена с формированием интрастромального кармана с помощью фемтосекундного лазера является эффективной процедурой стабилизации прогрессирования кератоконуса. Сохранение эпителиального слоя при фемтосекундном кросслинкинге позволяет снизить риск инфекционных осложнений эрозированной поверхности роговицы, уменьшить зрительный дискомфорт, болевые ощущения у пациентов в раннем послеоперационном периоде, сократить период реабилитации. К преимуществам кросслинкинга с формированием интрастромального кармана с помощью фемтосекундного лазера относятся быстрое проникновение рибофлавина и его высокая концентрация в строме, что обеспечивает выраженный и глубокий эффект от кросслинкинга за счет хорошей абсорбции ультрафиолето-

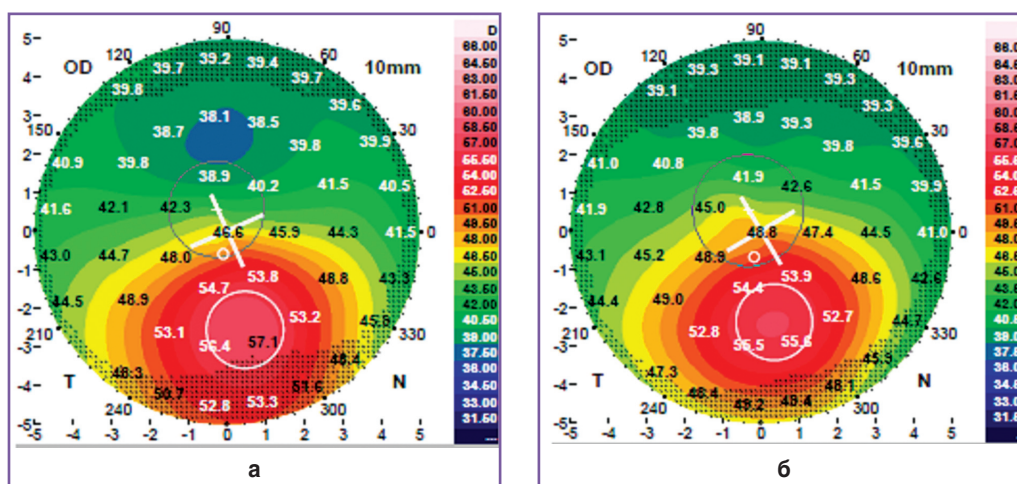


Рис. 2. Данные компьютерной кератотопографии пациента X.: а — до лечения; б — через 6 мес после фемтосекундного кросслинкинга

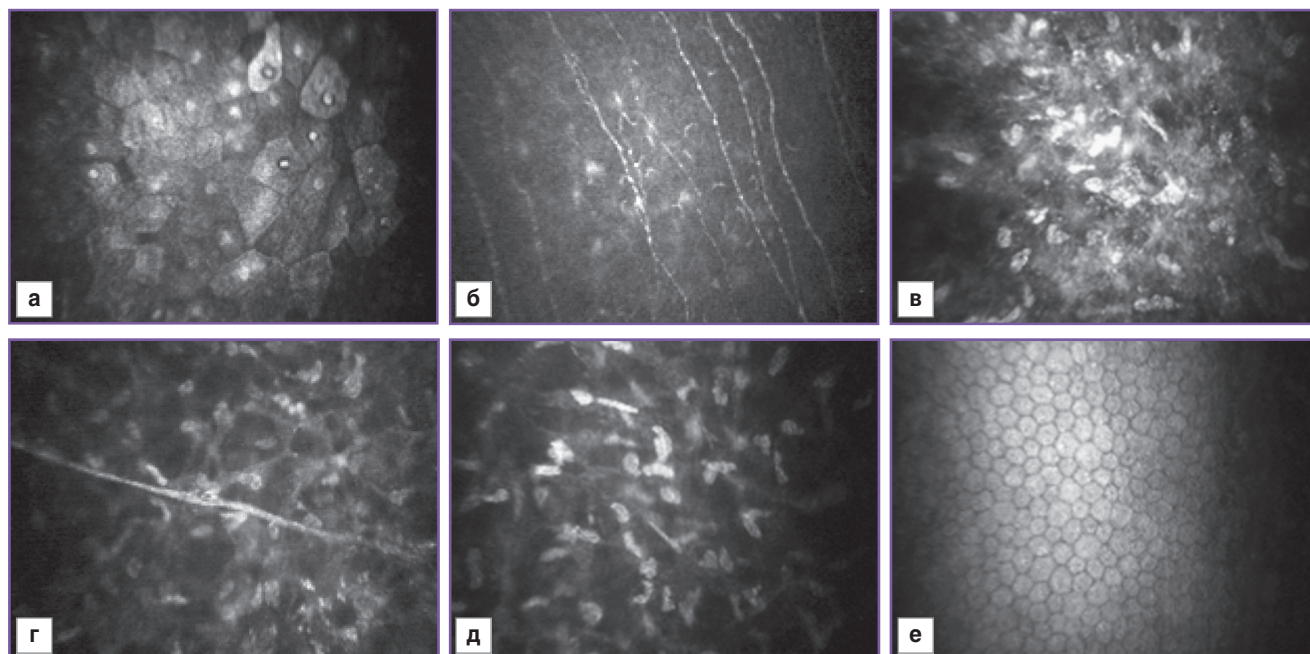


Рис. 3. Конфокальная микроскопия роговицы через 6 мес после кросслинкинга: а — клетки поверхностного эпителия; б — нервные волокна субэпителиального сплетения; в — поверхностная строма с «активными» кератоцитами; г — средняя строма; д — кератоциты задней стромы; е — эндотелий

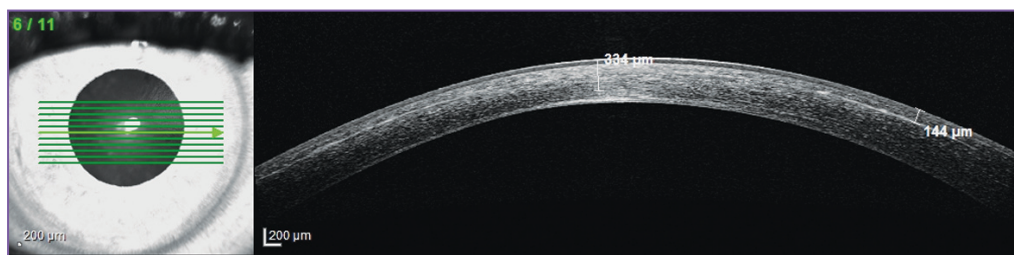


Рис. 4. ОКТ роговицы через 6 мес после фемтосекундного кросслинкинга, визуализируется интрастромальный карман глубиной 144 мкм и гиперрефлективность роговичной ткани на глубине до 334 мкм (подвергшейся эффекту «сшивания») с демаркационной линией

вого излучения, защиту эндотелия роговицы, хрусталика и сетчатки.

Заключение. Фемтосекундный кросслинкинг роговичного коллагена является процедурой, улучшающей функциональные показатели при кератоконусе, приводит к значительному замедлению его прогрессирования.

Финансирование исследования. Работа поддержана грантом РФФИ 15-29-03874.

Конфликт интересов. Конфликты интересов, связанные с данным исследованием, отсутствуют.

Литература/References

1. Randleman J.B., Dupps W.J. Jr, Santhiago M.R., Rabinowitz Y.S., Koch D.D., Stulting R.D., Klyce S.D. Screening for keratoconus and related ectatic corneal disorders.

Cornea 2015; 34(8): e20–e22, <http://dx.doi.org/10.1097/ico.0000000000000500>.

2. Naderan M., Shoar S., Kamaledin M.A., Rajabi M.T., Naderan M., Khodadadi M. Keratoconus clinical findings according to different classifications. *Cornea* 2015; 34(9): 1005–1011, <http://dx.doi.org/10.1097/ico.0000000000000537>.

3. Raiskup F., Spoerl E. Corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A. I. Principles. *Ocul Surf* 2013; 11(2): 65–74, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtos.2013.01.002>.

4. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2003; 135(5): 620–627, [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9394\(02\)02220-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9394(02)02220-1).

5. Beshtawi I.M., O'Donnell C., Radhakrishnan H. Biomechanical properties of corneal tissue after ultraviolet-A-riboflavin crosslinking. *J Cataract Refract Surg* 2013; 39(3): 451–462, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrs.2013.01.026>.

6. Alió J.L., Toffaha B.T., Piñero D.P., Klonowski P.,

Javaloy J. Cross-linking in progressive keratoconus using an epithelial debridement or intrastromal pocket technique after previous corneal ring segment implantation. *J Refract Surg* 2011; 27(10): 737–743, <http://dx.doi.org/10.3928/1081597x-20110705-01>.

7. Wollensak G., Hammer C.M., Spör E., Klenke J., Skerl K., Zhang Y., Sel S. Biomechanical efficacy of collagen crosslinking in porcine cornea using a femtosecond laser pocket. *Cornea* 2014; 33(3): 300–305, <http://dx.doi.org/10.1097/ico.0000000000000059>.

8. Kılıç A., Kamburoglu G., Akıncı A. Riboflavin injection into the corneal channel for combined collagen crosslinking and intrastromal corneal ring segment implantation. *J Cataract Refract Surg* 2012; 38(5): 878–883, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrs.2011.11.041>.

9. Kanellopoulos A.J. *Cornea collagen crosslinking with intralase assisted intracorneal riboflavin administration*. Paper presentation at the subspecialty day of the American Academy of Ophthalmology. New Orleans, LA.; 2007.

10. Sugar A. Ultrafast (femtosecond) laser refractive surgery. *Curr Opin Ophthalmol* 2002; 13(4): 246–249, <http://dx.doi.org/10.1097/00055735-200208000-00011>.

11. Juhasz T., Loesel F.H., Kurtz R.M., Horvath C., Bille J.F., Mourou G. Corneal refractive surgery with femtosecond lasers. *IEEE J Sel Top Quantum Electron* 1999; 5(4): 902–910, <http://dx.doi.org/10.1109/2944.796309>.

12. Dong Z., Zhou X. Collagen cross-linking with riboflavin in a femtosecond laser-created pocket in rabbit corneas: 6-month results. *Am J Ophthalmol* 2011; 152(1): 22–27, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajo.2011.01.010>.

13. Паштаев Н.П., Поздеева Н.А., Зотов В.В., Тихонов Н.М. Сравнительное исследование влияния фемто-кросслинкинга на биомеханические свойства роговицы в эксперименте. *Фундаментальные исследования* 2015; 1(6): 1217–1221. Pashtaev N.P., Pozdeeva N.A., Zotov V.V., Tihonov N.M. Comparative study of the biomechanical effect of femtocrosslinking in porcine cornea. *Fundamentalnie issledovaniya* 2015; 1(6): 1217–1221.