АНАЛИЗ МИКРОМОРФОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ РОГОВИЦЫ И ТРАНСПЛАНТАТА IN VIVO В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ЭПИКЕРАТОПЛАСТИКИ

© М. М. Бикбов, А. А. Бикбулатова, Г. М. Бикбова, Е. М. Гарипова

ГУ «Уфимский НИИ глазных болезней» АН РБ, Уфа

♦ В статье представлены результаты исследования конфокальной лазерной сканирующей томографии роговицы и трансплантата у 25 пациентов в сроки от 10 до 17 лет после эпикератопластики, выполненной по поводу кератоконуса, миопии и гиперметропии. Ультраструктура эпителиальных и эндотелиальных клеток соответствовала норме. Наблюдалось прорастание поверхностных интрастромальных нервов в биолинзу. Биолинза имела низкую плотность кератоцитов и неоднородность экстрацеллюлярного матрикса, однако у всех пациентов она была жизнеспособной.

Ключевые слова: конфокальная лазерная сканирующая томография; роговица; трансплантат; эпикератопластика; кератоконус; аметропия.

В настоящее время, благодаря применению современных методов визуализации, возможна неинвазивная объективная оценка гистологической структуры роговицы *in vivo*. Внедрение в офтальмодиагностику световой и лазерной сканирующей конфокальной микроскопии позволило с высокой разрешающей способностью проводить детальное исследование морфологии всех слоев роговицы [1, 8, 9, 11, 13]. При сканировании роговицы на специальном модуле Rostock ретинотомографа HRT II, созданном в 2004 г. в Гейдельбергском университете, допустимо получение томограмм с индикацией точной фокусной глубины каждого снимка [15]. Прижизненное сравнительное исследование ультраструктуры роговицы в норме и при патологии послужило основанием для установления морфологических диагностических критериев некоторых заболеваний роговицы, в том числе кератоконуса [2, 6, 7, 12]. Помимо диагностической цели, конфокальная микроскопия дает возможность изучать гистологию роговицы *in vivo* после различных хирургических вмешательств в динамике, оценивая эффективность или, напротив, негативное влияние оперативного лечения на передний сегмент глаза [4, 10].

Мы имеем более, чем 20-летний опыт проведения рефракционной и лечебной эпикератопластики при аметропиях высокой степени и кератоконусе с использованием биолинз, изготовленных из роговицы без замораживания [3, 5]. Представляется важной и интересной витальная оценка микроморфологического состояния трансплантата и собственной роговицы в отдаленные сроки после эпикератопластики, что и явилось целью настоящего исследования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Нами обследовано 40 человек (41 глаз) в возрасте от 22 до 30 ($M\pm m=26,46\pm 0,35$) лет. Из них у

14 больных (14 глаз) с аметропией высокой степени проведена рефракционная эпикератопластика с пересадкой донорского роговичного трансплантата к собственной здоровой роговице реципиента (I группа), у 11 пациентов (12 глаз) с кератоконусом II-III стадии выполнена лечебная эпикератопластика с подшиванием трансплантата к дистрофически измененной истонченной роговице реципиента (II группа). Контрольную группу составили 15 пациентов (15 глаз) со здоровой интактной роговицей. При эпикератопластике в качестве трансплантата применяли биолинзы «отрицательной» (при миопии высокой степени и кератоконусе) и «положительной» (при гиперметропии высокой степени) оптической силы. Материалом для изготовления биолинз служила нативная незамороженная донорская роговица, соответствующая требованиям, предъявляемым к донорской роговице для сквозной кератопластики по качественным и лабораторным показателям. Биолинзы изготавливали непосредственно перед операцией по собственной запатентованной технологии (А. С. №1773400 от 8.07.1992; Патент РФ №2135135 от 27.08.1999; Патент РФ №2222295. Бюл. № 3 от 27.01.2004). При кератоконусе биолинзу подшивали с максимальным натяжением фиксирующих ее швов, выполняя шпателем одновременную компрессию собственной роговицы через биолинзу, и несколько уплощая, тем самым, профиль «выпячиваемой» роговицы. При проведении рефракционной эпикератопластики биолинзу подшивали без компрессионного воздействия на собственную роговицу. Крыло биолинзы вправляли в периферический «карман» роговицы.

Для прижизненной оценки ультраструктуры роговицы и биолинзы нами проведена лазерная сканирующая конфокальная микроскопия на ретино-

УДК 617.72-07 ГРНТИ 76.29.56 ВАК 14.01.07

Таблица 1

Плотность клеток	Слой биолинзы и роговицы	I группа (n=14)	II группа (n=12)	Контрольная группа (n=15)
Плотность эпителиоцитов	Поверхностный слой эпителия биолинзы	1225 ± 88 (823-1562)	1192 ± 65 (901-1438)	1000 ± 68 (710-1689)
	Промежуточный слой эпителия биолинзы	5789 ± 207 (3107-6289)	5571 ± 291 (4132-6329)	5129 ± 134 (3771-6386)
	Базальный слой эпителия биолинзы	9178 ± 715 (7042-12514)	$\begin{array}{c} 8357 \pm 291 \\ (6536 - 9130) \end{array}$	8598 ± 134 (6555-9223)
Плотность кератоцитов	Передняя строма биолинзы	$259,87 \pm 34$ (127-529)	$258,75 \pm 49$ (90-612)	_
	Задняя строма биолинзы	$227,71 \pm 37$ (64-569)	$205,80 \pm 34$ (67-342)	_
	Передняя строма собственной роговицы	$404, 18 \pm 31$ (287-441)	$382,10 \pm 28$ (282-516)	$398,15 \pm 18$ (294-463)
	Задняя строма собственной роговицы	$330,30 \pm 24$ (211-383)	$301,14 \pm 22$ (196-375)	$326,02 \pm 15$ (275-393)
Плотность эндотелиоцитов	Эндотелий	$2747,50 \pm 113$ (1817-3666)	$2697,15 \pm 180 \\ (2045 - 3425)$	$3015,06 \pm 129$ (1890-3680)
Плотность клеток Лангерганса	Уровень базального эпителия и боуменовой мембраны	$147,20 \pm 17$ (40-247)	$133,08 \pm 13$ (30-200)	$138,08 \pm 14$ (3-102)

Плотность клеток в оптической зоне эпитрансплантата и собственной роговицы в I, II и контрольной группах (M±m, min-max), клеток/мм²

томографе HRT II с использованием модуля Rostock (Heidelberg, Германия) в сроки от 10 до 17 ($M \pm m = 12,91 \pm 0,14$) лет после эпикератопластики. Исследование выполняли с применением иммерсионного геля. Морфологическое состояние роговицы и биолинзы изучали в оптической зоне, а также в области периферического «кармана». Помимо качественной оценки, проводили количественный подсчет плотности клеточных элементов изучаемых структур. Полученные гистологические данные сопоставляли с биомикроскопической картиной роговицы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение томограмм с индикацией глубины каждого снимка позволило определить толщину всей биолинзы и отлельно ее эпителиальных слоев и стромы, а также толщину собственной роговицы пациента. Суммарная толщина эпителия, покрывающего трансплантат, составляла в I группе пациентов $M \pm m = 44,78 \pm 6,70$ нм, во II группе — $M \pm m =$ $40,78 \pm 8,20$ нм и в контрольной группе $M \pm m =$ 46,89±10,01 нм. У всех пациентов наблюдалась нормальная архитектоника эпителия. Четко визуализировались слои эпителия: поверхностный, промежуточный и базальный с характерными отличительными особенностями клеток (рис. 1, 2, 3). Признаков увеличенного ороговения эпителиальных клеток не наблюдалось. Плотность эпителиальных клеток была в пределах границ нормы и практически не отличалась в обеих группах (табл. 1).

Микроморфологически строма эпитрансплантата состояла из основного вещества с коллагеновыми во-

локнами и клеточных структур. По данным Ү. D. Yoon et al. (1998), проводившего гистологический анализ удаленных биолинз в разные сроки после операции у пациентов, прооперированных методом эпикератопластики с использованием замороженной донорской роговицы, выявлено, что рост кератоцитов реципиента начинается с периферии биолинзы и первоначально выявляется в ее задней строме [14]. В нашем исследовании кератоциты выявлялись во всех слоях биолинзы. Плотность кератоцитов в различных участках биолинзы была неравномерной: наблюдались области как с высокой частотой встречаемости кератоцитов, так и с полным их отсутствием. В то же время, количество кератоцитов в передних слоях стромы биолинзы было выше, чем в задних (разница статистически не значима, p > 0,4). У всех пациентов плотность кератоцитов в биолинзе была достоверно ниже по сравнению с количественными показателями стромы собственной роговицы (p<0,05) и роговицы контрольной группы (p<0,01). Плотность кератоцитов биолинзы в I и II группах была сопоставимой (разница недостоверная, р>0,8) (табл. 1). По форме и размерам кератоциты биолинзы характеризовались разнообразием: наблюдались как правильные, овальные кератоциты, так и несколько удлиненные (в небольшом количестве). Отмечались различные по яркости и контрастности клетки. Кератоциты дифференцировались на неактивные (умеренные по интенсивности) и единичные активные (яркие) (рис. 4). Визуализировались участки апоптоза кератоцитов в виде «пчелиных сот» (рис. 5).

Экстрацеллюлярный матрикс биолинзы занимал основную массу стромы и был неоднородным.



Рис. 1. Томограмма: поверхностный слой эпителия биолинзы. Глубина 1 мкм



Рис. 3. Томограмма: базальный слой эпителия биолинзы. Глубина 45 мкм

Наряду с гомогенными аморфными участками, отмечались разнонаправленные гипо- и гиперрефлективные линии различной протяженности и толщины (рис. 6). Биомикроскопически выявляли дистрофические очажки в биолинзе в виде облачковидных помутнений, визуализируемых под большим увеличением микроскопа. Отмечалась прямая зависимость степени прозрачности биолинзы от выраженности изменений основного вещества ее стромы. При увеличении интенсивности помутнений в биолинзе на гистологическом уровне наблюдалась гомогенная бесклеточная фиброзированная строма (рис. 7). Таким образом, исходя из сравнительного анализа результатов лазерного сканирования выявлено, что



Рис. 2. Томограмма: промежуточный слой эпителия биолинзы. Глубина 11 мкм



Рис. 4. Томограмма: строма биолинзы. Визуализируются кератоциты. Глубина 207 мкм

микроморфологическое состояние биолинзы у пациентов, оперированных по поводу кератоконуса и аметропии высокой степени, являлось схожим.

На границе биолинзы и собственной роговицы визуализировались хаотично расположенные рефлектирующие точки и линии, различные по яркости, обусловленные инородными частицами, оставшимися на биолинзе при ее изготовлении и проведении операции (рис. 8). Предположительно, инородными включениями могли являться частицы металла лезвия, срезавшего биолинзу, и микрохирургического инструментария, кристаллы солей. Ориентируясь на глубину появления инородных частиц, определяли толщину эпитрансплантата, которая в центральной зоне колебалась от 269 нм до 517 нм



Рис. 5. Томограмма: строма биолинзы. Апоптоз клеток. Глубина 149 мкм



Рис. 6. Томограмма: строма биолинзы. Визуализируются кератоциты, линии кератодистрофии. Глубина 184 мкм



Рис. 7. Томограмма: строма биолинзы. Клетки отсутствуют. Строма фиброзирована, гомогенная. Глубина 46 мкм

 $(M \pm m = 361, 10 \pm 16$ нм). Не было выявлено зависимости плотности кератоцитов в биолинзе от ее толщины.

Результаты конфокального лазерного сканирования стромы собственной роговицы в исследуемых группах отличались. Толщина ее в центре у пациентов с исходной аметропией высокой степени не отличалась от нормы, составив в среднем $515,12 \pm 12$ нм. При кератоконусе толщина собственной роговицы в оптической зоне колебалась от 270 нм до 420 нм ($M \pm m = 368,08 \pm 14$ нм). В I группе пациентов (с исходной здоровой роговицей) плотность кератоцитов собственной стромы была несколько выше, чем во II группе пациентов (с изначально патологически измененной роговицей) (разница статистически не значима, p>0,4). В обеих группах средние



Рис. 8. Томограмма: граница биолинзы и роговицы. Визуализируются инородные включения. Глубина 376 мкм

показатели плотности кератоцитов стромы собственной роговицы входили в диапазон нормальных значений контрольной группы (табл. 1). При конфокальном сканировании роговицы на различной глубине наблюдалась смена областей нормальной и разреженной плотности кератоцитов. В целом, в I, II и контрольной группах отмечалась более высокая плотность кератоцитов в передней строме по сравнению с задней (разница достоверная, p<0,1). Визуализировались овальные и вытянутые, неактивные и активные (в меньшем количестве) клетки. У больных, оперированных по поводу кератоконуса, наблюдалась более выраженная неоднородность кератоцитов собственной роговицы по форме, размерам и контрастности, чем у пациентов по-



Рис. 9. Томограмма: строма роговицы пациента с аметропией. Визуализируются активные и неактивные кератоциты. Основное вещество прозрачное. Глубина 539 мкм



Рис. 11. Томограмма: строма роговицы в области вершины кератоконуса. Визуализируется гомогенизация стромы со сформированной бесклеточной рубцовой тканью. Глубина 368 мкм

сле рефракционной эпикератопластики. У пациентов I группы основную массу составляли кератоциты в спокойном состоянии, в меньшем количестве — активные кератоциты; основное вещество стромы характеризовалось прозрачностью (рис. 9). В II группе в строме собственной роговицы обнаруживались участки скопления активных кератоцитов; в эстрацеллюлярном матриксе выявлялись микрострии в виде разнородных тонких линий со сниженной отражательной способностью, что было обусловлено изменениями структуры и направленности коллагеновых фибрилл (рис. 10) [1].



Рис. 10. Томограмма: строма роговицы пациента с кератоконусом. Визуализируются кератоциты, микрострии в межклеточном веществе. Глубина 452 мкм



Рис. 12. Томограмма: строма роговицы в области периферического «кармана». Визуализируется рубцовая ткань. Глубина 95 мкм

У 2 пациентов, оперированных в далекозашедшей стадии заболевания, в области существовавшей вершины кератоконуса визуализировалась гомогенизация стромы со сформированной бесклеточной рубцовой тканью (рис. 11). Гистологические признаки кератодистрофии сопровождались наблюдаемыми биомикроскопически очаговыми помутнениями роговицы.

В зоне формирования периферического «кармана» у всех пациентов определялась высоко отражательная структура — сформировавшаяся рубцовая ткань (рис. 12). Биомикроскопически картина про-



Рис. 13. Томограмма: уровень базального эпителия биолинзы. Визуализируются клетки Лангерганса и волокна субэпителиального нервного сплетения. Глубина 38 мкм

являлась, как облачковидное помутнение стромы роговицы.

В толще трансплантата визуализировались клетки Лангерганса в виде одиночных клеточных телец с отростками и без них на уровне базального эпителия и боуменовой мембраны, а также тонкие волокна субэпителиального нервного сплетения с небольшим количеством разветвлений (рис. 13). Плотность клеток Лангерганса в исследуемых группах статистически значимо от контрольной не отличалась (разница недостоверная, р > 0,5) (табл. 1). Прорастание нервов поверхностного интрастромального сплетения в биолинзу позволило полноценно осуществлять нейротрофическую функцию и обеспечивать метаболизм ее центральной оптической зоны. Стромальные нервные волокна наблюдались, как единичные, толстые, высокорефлективные структуры, с четкими границами, часто с бифуркациями, в передних слоях стромы собственной роговицы (рис. 14). Мы не обнаруживали стромальных нервных волокон в эпитрансплантате.

Конфокальная микроскопия эндотелия показала нормальную плотность эндотелиальных клеток в обеих группах пациентов (табл. 1). Форма и размеры эндотелиоцитов после рефракционной кератопластики не отличались от таковых здоровой роговицы. У 2 пациентов с кератоконусом, оперированных в далекозашедшей стадии заболевания, выявлялся полиморфизм и полимегатизм эндотелиальных клеток.

Таким образом, проведенные с помощью лазерной сканирующей конфокальной томографии витальные гистоморфологические исследования собственной роговицы и трансплантата в сроки от 10 до 17 лет



Рис. 14.Томограмма: строма роговицы. Визуализируются Стромальные нервные волокна. Глубина 728 мкм

после эпикератопластики позволили сделать следующие выводы:

- Архитектоника и плотность клеток всех слоев эпителия биолинзы не отличались от показателей здоровой роговицы. Выявлено прорастание нервов поверхностного интрастромального сплетения в биолинзу, позволившее полноценно осуществлять нейротрофическую функцию и обеспечивать метаболизм ее центральной оптической зоны. Подшивание биолинзы не привело к снижению плотности кератоцитов и эндотелиальных клеток.
- В обеих исследуемых группах наблюдался жизнеспособный трансплантат, несмотря на более низкую плотность кератоцитов и неоднородность его экстрацеллюлярного матрикса, в сравнении со стромой собственной роговицы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аветисов С. Э., Егорова Г. Б. Возможности конфокальной микроскопии (предварительное сообщение) // Клиническая офтальмология. — 2006. — Т. 7, №2. — С. 45–49.
- Аветисов С. Э., Егорова Г. Б., Федоров А. А., Бобровских Н. В. Конфокальная микроскопия роговицы. Сообщение 2. Морфологические изменения при кератоконусе // Вестник офтальмологии. — 2008. — Т. 124, № 3. — С. 6–10.
- Азнабаев М. Т., Бикбов М. М., Бикбулатова А. А. Коррекция миопии высокой степени у детей методом рефракционной эпикератопластики // Офтальмохирургия. — 2004. — № 1. — С. 40–42.
- Алио Х. Л., Хавалой Х., Негри Э. П. и соавт. Качество интерфейса роговичного лоскута после ЛАСИК. Исследование с помощью конфокального микроскопа // Офтальмология. — 2004. — Том 1, № 3. — С. 12–24.

- 5. *Бикбов М. М., Бикбова Г. М.* Результаты хирургического лечения кератоконуса методами сквозной и эпикератопластики // Офтальмология. 2006. Т. З, № 3. С. 30–32.
- Майчук Д. Ю. Принцип работы и клиническое применение конфокального микроскопа Confoscan 3 при дифференциальной диагностике заболеваний роговицы // Рефракционная хирургия и офтальмология. — 2004. — Т.4, № 1. — С.35–38.
- Cavanagh D., Petroll M., Alizadeh H., et al. Clinical and diagnostic use of in vivo confocal microscopy in patient with corneal diseases // Ophthalmology. — 1993. — Vol. 100, N 10. — P. 1444–1453.
- Guthoff R. F., Baudouin C., Stave J. Atlas of confocal laser scanning in vivo microscopy in ophthalmology. Berlin, Heidelberg, New York: Springer — Verlag, 2006. — 200 p.
- Jalbert I., Stapleton F., Papas E., et al. In vivo confocal microscopy of the human cornea // Br. J. Ophthalmol. — 2003. — Vol. 87. — Nº 2. — P. 225–236.
- Latvala T., Barraquer-Coll C., Tervo K, Tervo T. Corneal wound healing and nerve morphology after excimer laser in situ keratomileusis in human eyes // Journal of Refractive Surgery. — 1996 — Vol. 12 — P.677–683.
- Mastropasqua L., Nubile M. Confocal microscopy of the cornea. Thorofare; New Jersey, 2002. — P.122.
- Mocan M. C., Yilmaz P. T., Irkes M., Orhan M. In vivo confocal microscopy for the evaluation of corneal microstructure in keratokonus // Curr Eye Res. — 2008. — Vol. 33, N5. — P.672–575.
- Mustonen R. K., McDonald M. B., Srivannaboon S., et al. Normal human corneal cell populations evaluated by in vivo scanning slit confocal microscopy // Cornea. 1998. Vol. 17, N5. P. 485–492.

- Yoon J. D., Warning G. O., Stulting L. D. et al. Keratocyte repopulation in epikeratoplasty specimens // Cornea. — 1998. — Vol.17, N 2. — P.180–184.
- *Zhivov A., Stachs O., Kraak R., et al.* In vivo confocal microscopy of the ocular surface // The Ocular Surface. — 2006. — Vol.4, N 2. — P.91–93.

ANALYSIS OF CORNEA AND TRANSPLANT MICROMORPHOLOGIC STATUS IN VIVO IN LATE POSTOPERATIVE PERIOD AFTER EPIKERATOPLASTY

Bikbov M. M., Bikbulatova A. A., Bikbova G. M., Garipova E. M.

♦ **Summary.** The article presents measurement results of confocal laser scanning tomography of the cornea and transplant in a period from 10 to 17 years after epikeratoplasty. Epikeratoplasty was performed in 25 patients with keratoconus, myopia and hyperopia. The ultrastructure of epithelial and endothelial cells was normal. We observed germination of superficial intrastromal nerves into the biolens. The biolens had low density of keratocytes and heterogeneity of the extracellular matrix. However all patients had viable transplants.

✤ Key words: confocal laser scanning tomography; cornea; transplant; epikeratoplasty; keratoconus; ametropia.

Сведения об авторах:

Бикбов Мухаррам Мухтарамович — д. м. н., профессор, директор ГУ «Уфимский НИИ глазных болезней» АН РБ. Главный офтальмолог Министерства здравоохранения Республики Башкортостан. 450077, Россия, Уфа, ул. Пушкина, 90. E-mail: bikbovmm@yandex.ru.

Бикбулатова Айгуль Ахтямовна — к. м. н., офтальмохирург 1 микрохирургического отделения ГУ «Уфимский НИИ глазных болезней» АН РБ. 450077, Россия, Уфа, ул. Пушкина, 90. Е-mail: aygulbik@yandex.ru.

Бикбова Гузель Мухаррамовна — к. м. н., офтальмохирург 1 микрохирургического отделения ГУ «Уфимский НИИ глазных болезней» АН РБ. 450077, Россия, Уфа, ул. Пушкина, 90. E-mail: Gbikbova@gmail.com.

Гарипова Елена Маратовна — заведующая отделением функциональной диагностики ГУ «Уфимский НИИ глазных болезней» АН РБ. 450077, Россия, Уфа, ул. Пушкина, 90. Е-mail: egaripova74@yandex.ru.

Bikbov Moukharram Mukhtaramovich — Doctor of Medical Sciences (M.D., Ph.D.) General Director "Ufa Eye Research Institute" Bashkortostan Academy of Sciences. Chief ophthalmologist of the Ministry of Health of the Republic of Bashkortostan. 450077, Russia, Pushkin Street, 90. E-mail: bikbovmm@yandex.ru.

Bikbulatova Aygul Akhtyamovna — M. D., Surgical ophthalmologist, "Ufa Eye Research Institute" Bashkortostan Academy of Sciences. 450077, Russia, Pushkin Street, 90. E-mail: aygulbik@yandex.ru.

Bikbova Guzel Mukharramovna — M. D., Surgical ophthalmologist,

"Ufa Eye Research Institute" Bashkortostan Academy of Sciences. 450077, Russia, Pushkin Street, 90. E-mail: Gbikbova@gmail.com.

Garipova Elena Maratovna — Head of Diagnostics department, "Ufa Eye Research Institute" Bashkortostan Academy of Sciences. 450077, Russia, Pushkin Street, 90. E-mail: egaripova74@yandex.ru.