

**Чураков Т. К.<sup>1,2</sup>, Никулин С. А.<sup>1</sup>, Качанов А. Б.<sup>1,2</sup>,  
Науменко В. В.<sup>1,2</sup>, Завьялов А. И.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский филиал МНТК «Микрохирургия глаза»  
им. акад. С.Н. Фёдорова»

<sup>2</sup>Северо-Западный государственный медицинский университет  
им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург

E-mail: pochta@mntk.spb.ru

## **ОПТИМИЗАЦИЯ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ РОГОВИЦЫ В НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**

**В работе представлены результаты исследования ультраструктуры роговицы с помощью конфокальной микроскопии. Приведены особенности интерпретации результатов, полученных с помощью этого диагностического метода. На примере изменений после LASIK изучены возможности послойной визуализации ткани роговицы и перспективы применения метода конфокальной микроскопии в научных исследованиях и клинической практике.**

**Ключевые слова:** конфокальная микроскопия, пахиметрия, толщина роговицы, рефракционная хирургия, LASIK

### **Актуальность**

Конфокальная микроскопия нашла широкое применение в офтальмологии, прежде всего для оценки состояния роговицы [1], [2], [4] – [10], [12], [14]. Существует несколько типов этих аппаратов – тандемно-сканирующие, щелевые, лазерные. В настоящее время чаще используют конфокальный микроскоп со щелевыми полевыми диафрагмами – «Confoscan 4» японской фирмы Nidek, имеющий разрешающую способность 1 мкм. Некоторые преимущества в сравнении с ним имеет аппарат компании Heidelberg Engineering – лазерный конфокальный микроскоп для переднего и заднего отдела HRT 3. Корнеальный модуль этого прибора – RCM (Rostock Cornea Module), в отличие от других аппаратов, дает возможность исследовать не только центральную зону роговицы, но и все поверхностные структуры, а также передний сегмент глаза [9].

Авторы первого атласа для интерпретации результатов конфокальной микроскопии отмечают широкие возможности применения этого метода для оценки результатов гипотензивных операций, диагностики инфекционных и аллергических заболеваний роговицы, метаболических расстройств, измерения толщины и послойной визуализации трансплантата после кератопластики [10].

Тем не менее, при использовании того или иного конфокального микроскопа спорным остается вопрос трактовки изображений, по-

лучаемых в ходе обследования пациентов. Существует несколько атласов, созданных зарубежными разработчиками, производителями приборов и отечественными исследователями [2], [10]. Однако анализ литературы и участие в научно-практических конференциях выявили расхождение точек зрения разных ученых в вопросах интерпретации снимков конфокальной микроскопии.

### **Цель**

Проанализировать возможные причины разных трактовок результатов конфокальной микроскопии. На примере изменений после LASIK изучить особенности интерпретации снимков различных слоев роговицы и оценить возможности использования метода в научных исследованиях и клинической практике.

### **Материалы и методы**

Под наблюдением находилось 22 пациента (44 глаза), из них 19 женщин и 3 мужчин. Средний возраст на момент обследования составил 31 год (от 23 до 39 лет). Всем пациентам был выполнен LASIK по стандартной технологии на установках MEL-60 (Aescular Meditec) и MEL-80 (Carl Zeiss) с формированием роговичного лоскута при помощи автоматических микрокератомов LSK Evolution M1 и LSK Evolution M2 (Moria)[3]. До операции пациенты имели миопию различной степени, срок наблюдения был от 4 до 10 лет. Кон-

трольная группа состояла из не оперированных волонтеров с эмметропией.

Для оценки ультраструктуры роговицы использовали щелевой конфокальный микроскоп «Confoscan 4», позволяющий визуализировать послеоперационные изменения на клеточном уровне и проводить пахиметрию различных субслоев с помощью Z-кольца.

Ранее мы сообщали о выраженном увеличении толщины роговицы через 10 лет после LASIK [4], [13]. Ряд ученых получили схожие результаты в более ранние сроки [11], [14]. В ходе исследования мы измеряли толщину нативных и вновь сформированных слоев роговицы.

Интерфейс между лоскутом и ложем роговицы распознавали благодаря дебрису, низкой оптической плотности и складкам роговичного лоскута – стриям.

Отдельно измеряли толщину эпителия и стромы. Оценивали плотность и рефлективность кератоцитов. Подсчитывали плотность эндотелиальных клеток, анализировали их форму и размер. При наличии жалоб на сухость глаз обращали внимание на состояние субэпителиального и суббазального нервных сплетений.

### Результаты и обсуждение

Типы конфокальных микроскопов различны (лазерные, тандемные, микроскопы со щелевыми полевыми диафрагмами и др.), но для точного послойного измерения толщины роговицы все они требуют контакта датчика с исследуемой поверхностью. При этом наличие иммерсионной среды между роговицей и датчиком даже при обследовании не оперированной здоровой ткани зачастую не предотвращает повреждения роговицы (эпителиальные эрозии). Это связано с тем, что сканирование в таком режиме чаще всего проводится автоматически. Кроме того, пациент не всегда адекватно следит за фиксационной меткой.

В этой связи значения общей толщины роговицы по данным конфокальной микроскопии сильно варьировали от измерения к измерению. Оценка толщины субслоев могла быть сделана лишь приблизительно, учитывая процентное соотношение общей толщины роговицы и исследуемой зоны. Применение Z-кольца и, соответственно, достаточно длительная аппланация роговицы в зоне исследования, с нашей точки

зрения, определяют разницу данных конфокальной пахиметрии и результатов, полученных с помощью других приборов [5]. Достоверные значения толщины эпителия могли быть получены только при хорошей фиксации пациентом метки при отсутствии боковых движений Z-кольца, которые могут вызывать эпителиальные эрозии. Снизить вероятность возникновения эрозий и исключить необходимость постоянной стерилизации контактного датчика позволяет использование одноразовой мягкой контактной линзы во время диагностической процедуры (заявка на патент РФ №2013134451 от 24.07.2013).

Гиперрефлективность и утолщение нервных волокон субэпителиального и суббазального нервного сплетения в разные сроки после LASIK, которые были выявлены рядом отечественных и зарубежных авторов, могут являться показателем активного регенерационного процесса [4], [12]. С нашей точки зрения, толщина и малое количество поперечных связей между нервными волокнами с большей достоверностью, чем рефлективность, отличаются нормальную нервную ткань от находящейся в процессе восстановления (рис. 1, 2, цветная вкладка) [4].

У всех пациентов после LASIK, независимо от времени, прошедшего после операции, в той или иной степени определялись высокорефлективные кератоциты – «стрессовые» клетки. По данным литературы, плотность кератоцитов прогрессивно уменьшается от передней части стромы к задней [2], [10]. В нашем исследовании рефлективность кератоцитов была одинакова высокой по всей толще стромы, что, возможно, является признаком продолжающегося восстановительного процесса. С другой стороны, существуют разные точки зрения на оценку рефлективности кератоцитов. Нет единого мнения о том, что означает гиперрефлективность – активный метаболический процесс, апоптоз кератоцитов, погрешность метода и т. д. Отметим, что при использовании конфокального микроскопа достаточно трудно визуализировать прозрачную боуменову и десцеметову мембраны. При фокусировке на них светового луча микроскопа может происходить сильное светорассеяние, что приводит к значительному увеличению рефлективности кератоцитов, нервных воло-

кон и клеток Лангерганса, находящихся вблизи этих мембран (рис. 3, цветная вкладка).

При исследовании эндотелия здоровых добровольцев и пациентов после LASIK патологических изменений выявлено не было. Нами проводилась визуальная оценка плеоморфизма и полимегатизма эндотелиальных клеток. При представлении результатов конфокальной микроскопии эти параметры не менее значимы, чем плотность эндотелиальных клеток, которая у одного пациента может сильно отличаться при проведении нескольких повторных исследований. При этом прибор не всегда оценивает достаточное количество клеток для того, чтобы делать вывод о состоянии всего эндотелиального слоя роговицы (рис. 4, цветная вкладка). В связи с этим визуальная оценка эндотелия и сравнение парных глаз с определением на исследуемом участке процентного соотношения гексагональных клеток и клеток, имеющих атипичную форму, а также их размера, представляется

важным диагностическим этапом (рис. 5, 6, цветная вкладка).

### **Заключение**

Конфокальная микроскопия роговицы открывает широкие возможности для научных исследований. Отсутствие стандартизации подходов к интерпретации результатов замедляет внедрение метода в клиническую практику. Применение конфокальной микроскопии для изучения структуры различных слоев роговицы после LASIK позволяет оценить ответ оперированной ткани на вмешательство, в том числе в отдаленном послеоперационном периоде. Дальнейшее накопление опыта использования конфокальной микроскопии при различных видах офтальмопатологии, а также проведение мультицентровых исследований дадут возможность выработать единый подход к трактовке снимков, получаемых с помощью данного диагностического метода.

3.10.2014

### **Список литературы:**

1. Конфокальная микроскопия роговицы. Сообщение 1. Особенности нормальной морфологической картины / С.Э. Аветисов [и др.] // Вестник офтальмологии. – 2008. – №3. – С. 3–5.
2. Лазерная сканирующая томография глаза: передний и задний сегмент / Б.М. Азнабаев [и др.]. – М.: Август Борг, 2008. – 221с.
3. Балашевич, Л.И. Хирургическая коррекция аномалий рефракции и аккомодации / Л.И. Балашевич. – СПб.: Человек, 2009. – 296 с.
4. К вопросу о регрессе рефракционного результата в отдаленном периоде после операции LASIK / Л.И. Балашевич [и др.] // Вестник Оренбургского Государственного университета. – 2012. – №12. – С. 12–14.
5. О методах пахиметрии после LASIK / Л.И. Балашевич [и др.] // Современные технологии катарактальной и рефракционной хирургии: Сб. тр. научно-практ. конф. с международным участием. – М., 2013. – С. 204–211.
6. Каримова, А.Н. Оптимизация кераторефракционных лазерных методов лечения пациентов с индуцированной аметропией после сквозной кератопластики : Автореф. дис. ... канд. мед. наук / А.Н. Каримова. – Москва, 2012. – 25 с.
7. Использование конфокальной микроскопии – метода прижизненной визуализации ультраструктуры роговицы в кераторефракционной хирургии / Г.Ф. Качалина [и др.] // Современные технологии катарактальной и рефракционной хирургии: Сб. тр. научно-практ. конф. с международным участием. – М., 2006. – С. 82–89.
8. Майчук, Н.В. Разработка клиничко-биохимической системы диагностики, прогнозирования и коррекции поражений роговицы, индуцированных кераторефракционными операциями: Дис. ... канд. мед. наук / Н.В. Майчук. – М., 2008. – 164 с.
9. Ткаченко, Н.В. Диагностические возможности конфокальной микроскопии при исследовании поверхностных структур глазного яблока / Н.В. Ткаченко, С.Ю. Астахов // Офтальмологические ведомости. – 2009. – №1. – С. 82–89.
10. Guthoff, R.F. Atlas of Confocal Laser Scanning In-vivo Microscopy in Ophthalmology / R.F. Guthoff, C. Baudouin, J. Stave. – Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 2006. – 200 p.
11. Ivarsen, A. Three-year changes in epithelial and stromal thickness after PRK or LASIK for high myopia / A. Ivarsen, W. Fledelius, J.O. Hjortdal // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2009. – No. 5. – P. 2061–2066.
12. Effect of myopic LASIK on corneal sensitivity and morphology of subbasal nerves / T.U. Linna [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2000. – No. 2. – P. 393–397.
13. Measurements of the corneal pachymetry and other ophthalmic characteristics in patients undergoing LASIK during a long period of time / S. Nikulin [et al.] // Congress of the ESCRS, 23-rd: Abstracts. – Lisbon, 2005. – P. 79.
14. Confocal microscopy changes in epithelial and stromal thickness up to 7 years after LASIK and photorefractive keratectomy for myopia / S.V. Patel [et al.] // J. Refract. Surg. – 2007. – No. 4. – P. 385–392.

Сведения об авторах:

**Чураков Тимур Касимович**, младший научный сотрудник отдела науки и обучения Санкт-Петербургского филиала МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Фёдорова,  
e-mail: timur-churakov@yandex.ru

**Никулин Сергей Александрович**, заведующий отделением рефракционной хирургии Санкт-Петербургского филиала МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Фёдорова

**Качанов Андрей Борисович**, врач отделения рефракционной хирургии Санкт-Петербургского филиала МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Фёдорова, кандидат медицинских наук

**Науменко Владимир Васильевич**, заведующий отделом науки и обучения Санкт-Петербургского филиала МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Фёдорова

**Завьялов Александр Игоревич**, врач отделения рефракционной хирургии офтальмологической клиники Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова,  
e-mail: ophthalmology@spbmapo.ru

192283, г. Санкт-Петербург, ул. Ярослава Гашека, 21, e-mail: pochta@mntk.spb.ru