

Научная статья

УДК 617.713

doi: 10.25276/0235-4160-2023-3-26-36

Экспериментальное обоснование использования 1% раствора гидроксипропилметилцеллюлозы для защиты эндотелия заднего послойного трансплантата роговицы при его выкраивании низкоэнергетическим фемтосекундным лазером по инвертированной методике

Б.Э. Малюгин^{1, 2}, С.А. Борзенко^{1, 2}, И.С. Ткаченко¹, Д.С. Островский¹, С.Ю. Калинникова¹

¹НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Москва

²Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова Минздрава России, Москва

РЕФЕРАТ

Цель. В эксперименте изучить степень повреждения эндотелия роговицы при инвертированном методе выкраивания заднего послойного трансплантата роговицы фемтосекундным лазером (ФСЛ) с или без использования вискоэластика (ВЭ) – 1% раствора гидроксиметилпропилцеллюлозы (ГПМЦ). **Материал и методы.** Использовали корнеосклеральные диски, выкроенные из свежезнуклеированных свиных глаз. Формировали задние послойные трансплантаты роговицы с помощью ФСЛ модели LDV Z8 (Ziemer, Швейцария). В контрольной группе (n=16) непосредственно перед аппланацией на эндотелий наносили несколько капель среды для хранения роговиц, а в опытной группе (n=16) – 1% раствор ГПМЦ. Проводили контроль качества аппланации и состояние зоны интерфейса при помощи оптического когерентного томографа, интегрированного в лазер (ФЛ-ОКТ). Далее определяли жизнеспособность эндотелиальных клеток (ЭК) методом окраски флуоресцентным красителем и исследовали трансплантаты на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе. Проводили подсчет живых и мертвых эндотелиальных клеток. Для оценки состояния коллагеновых волокон стромальной стороны трансплантата образцы исследовали на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ). **Результаты.** По данным ФЛ-ОКТ, в ходе аппланации

во всех образцах опытной и контрольной групп отмечали ровный профиль зоны контакта между головкой лазера и ЭК. Живых ЭК в контроле было 2854 [2819; 2879] кл/мм², а в опыте – 3477 [3426; 3719] кл/мм² (p<0,001). Количество мертвых ЭК в контрольной группе было на 9,92±1,11% больше, чем в опытной, и составляло 710 [649; 728] и 402 [366; 427] кл/мм² соответственно (p<0,001). При анализе изображений, полученных на СЭМ, отмечали сохранность архитектуры коллагеновых волокон с единичными их разволокнениями в обеих группах. **Заключение.** Нанесение слоя 1% раствора ГПМЦ обеспечивает защиту эндотелия роговичного трансплантата на этапе выкраивания его ФСЛ по инвертированной методике. В исследуемой группе количество ЭК было на 9,92% выше, чем в контрольной группе. Нахождение слоя ВЭ в интерфейсе между головкой ФСЛ и ЭК не влияло на формирование эффективного лазерного реза и не снижало качество стромальной поверхности трансплантата. Инвертированная методика заготовки трансплантата роговицы ФСЛ с использованием 1% раствора ГПМЦ на поверхности ЭК может быть рекомендована для использования в клинической практике.

Ключевые слова: эндотелий, кератоциты, трансплантация роговицы, кератопластика, задняя послойная кератопластика, фемтосекундный лазер, вискоэластик, конфокальная микроскопия, сканирующая электронная микроскопия, гидроксипропилметилцеллюлоза ■

Для цитирования: Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., Ткаченко И.С., Островский Д.С., Калинникова С.Ю. Экспериментальное обоснование использования 1% раствора гидроксипропилметилцеллюлозы для защиты эндотелия заднего послойного трансплантата роговицы при его выкраивании низкоэнергетическим фемтосекундным лазером по инвертированной методике. Офтальмохирургия. 2023;3: 26–36. doi: 10.25276/0235-4160-2023-3-26-36

Автор, ответственный за переписку: Иван Сергеевич Ткаченко, dr.ivan.tka@gmail.com

ABSTRACT

Original article

Experimental application of 1% hydroxypropylmethylcellulose for corneal endothelium protection during inverted posterior lamellar corneal graft preparation technique by low-energy femtosecond laser

B.E. Malyugin^{1, 2}, S.A. Borzenok^{1, 2}, I.S. Tkachenko¹, D.S. Ostrovskiy¹, S.Yu. Kalinnikova¹

¹S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow, Russian Federation

²A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation

© Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., Ткаченко И.С., Островский Д.С., Калинникова С.Ю., 2023



Purpose. To evaluate experimentally endothelial cell loss of animal's cornea during inverted posterior lamellar corneal graft preparation technique by low-energy femtosecond laser with and without ophthalmic viscosurgical device (OVD) – 1% hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) solution application.

Material and methods. Posterior lamellar corneal grafts were created using a femtosecond laser (FSL). In the control group (n=16), a few drops of corneal storage solution were applied to the endothelium just before applanation, in the experimental group (n=16) – 1% HPMC. The quality of the applanation were monitored using an integrated in laser OCT system. The endothelial viability was determined using live/dead cells assay and the grafts were examined on a confocal laser scanning microscope. The obtained images were analyzed to count live and dead endothelial cells (EC). To assess the state of collagen fibers of the stromal side of the graft, samples from the control and experimental groups were examined using a scanning electron microscope (SEM).

Results. According to the OCT, in all samples of both groups, a flat profile of the contact zone between the laser head and the endothelial monolayer was observed during applanation. The difference between the number of live and dead ECs was statistically significant between

both groups. There were 2854 [2819; 2879] live cells/mm² in the control group, and 3477 [3426; 3719] live cells/mm² in the experimental group (p<0.001). Thus, the number of dead ECs in the control group was 710 [649; 728] cells/mm². The number of dead ECs in the experimental group was 402 [366; 427] cells/mm² (p<0.001). When analyzing the images obtained on a SEM, the preservation of the architectonics of the graft collagen fibers with their single defibrations in both groups was observed.

Conclusion. Application of 1% HPMC provides protection for endothelial cells from damage during posterior laser dissection using an FSL. In the study group, the number of endothelial cells was 9.92% higher than in the control group. The presence of the OVD layer in the interface between the head of the FSL and the EC did not affect the formation of an effective laser cut and did not reduce the quality of the stromal surface of the graft. The inverted technique FSL cut using a 1% solution of HPMC on the surface of the endothelium may be recommended for use in clinical practice.

Key words: endothelium, keratocytes, corneal transplantation, keratoplasty, posterior lamellar keratoplasty, femtosecond laser, ophthalmic viscosurgical device, hydroxypropyl methylcellulose, confocal microscopy, scanning electron microscopy ■

For citation: Malyugin B.E., Borzenok S.A., Tkachenko I.S., Ostrovskiy D.S., Kalinnikova S.Yu. Experimental application of 1% hydroxypropylmethylcellulose for corneal endothelium protection during inverted posterior lamellar corneal graft preparation technique by low-energy femtosecond laser. *Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery*. 2023;3: 26–36. doi: 10.25276/0235-4160-2023-3-26-36
Corresponding author: Ivan S. Tkachenko, dr.ivan.tka@gmail.com

АКТУАЛЬНОСТЬ

Псевдофакичная буллезная кератопатия (ПБК) и первичная эндотелиальная дистрофия роговицы Фукса являются наиболее частыми показаниями к проведению кератопластики [1]. При отсутствии у пациентов стойкой и необратимой деструкции коллагенового остова роговицы хирурги предпочитают использовать селективные методы кератопластики, в частности эндотелиальную кератопластику. Последняя существует в двух модификациях: задняя послойная кератопластика (ЗПК) и трансплантация эндотелия с десцеметовой мембраной (ТЭДМ). За прошедшие полтора десятилетия оба метода, по существу, стали стандартом лечения пациентов с патологией эндотелиального слоя роговицы, обеспечивая высокие функциональные результаты на фоне минимального количества операционных и послеоперационных осложнений [2]. Наряду с этим стоит отметить, что, по данным Европейского регистра трансплантации роговицы и клеток, ЗПК является преобладающим методом трансплантации роговой оболочки глаза. На 2021 г. частота выполнения ЗПК составляет более 46% от всех выполненных трансплантаций роговицы в Европе [3]. При ЗПК заготовку заднего послойного трансплантата чаще всего осуществляют при помощи микрокератома по методу M. Gorovoy (2006). Однако в последние годы получил распространение метод заготовки трансплантатов с использованием различных моделей фемтосе-

кундных лазеров (ФСЛ) [4, 5]. Данная технология, осуществляемая со стороны эндотелиальной поверхности роговицы, в ряде исследований показала свои преимущества, обеспечив формирование очень тонкого и равномерного по толщине трансплантата, что, в свою очередь, дает профилактику гиперметропического сдвига послеоперационной рефракции пациента и более высокий функциональный результат [6]. Широкий диапазон настроек лазерного реза дает возможность хирургу заготовить трансплантат запланированных геометрических параметров (диаметр, толщина) и осуществить реальную персонализацию вмешательства для конкретного пациента [7]. Несмотря на вышеперечисленные преимущества лазерного выкраивания задних послойных трансплантатов, обращает на себя внимание ряд публикаций, отмечающих факт большей потери эндотелиальных клеток (ЭК) после операций, в ходе которых при формировании трансплантата использовали ФСЛ, в сравнении с микрокератомом [8–10]. При этом нами найдены лишь единичные работы, в которых обсуждается возможность применения различных технологий защиты эндотелия роговицы [11–14]. Последний, как известно, является монослоем высокодифференцированных специализированных клеток, которые крайне чувствительны к разным видам травматических воздействий (механических, гидравлических, лазерных, химических и пр.). В этой связи актуальной представляется проблема поиска оптимальных вариантов протекции эндотелиального слоя в ходе выкраивания роговицы ФСЛ для повыше-

ния результативности оперативных вмешательств данного типа.

ЦЕЛЬ

В эксперименте на изолированных роговицах свиней изучить степень повреждения эндотелия роговицы при выкраивании послойного трансплантата задних слоев роговицы ФСЛ с и без использования вископротекции раствором 1% гидроксиметилпропилцеллюлозы (ГПМЦ).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Нами использованы 32 корнеосклеральных диска, полученных из свежеезнуклеированных свиных глаз 16 особей. Следует подчеркнуть, что до забора глаза не подвергались термической или химической обработке. Время от забоя животного до энуклеации составило в среднем 5 мин, а от энуклеации до выкраивания корнеосклерального диска – 6 ± 2 ч. После заготовки полученный материал помещали во флаконы со средой для хранения роговицы (ТУ 9393-013-29039336-2007, производства ООО «НЭП Микрохирургии глаза», Россия). Время от начала консервации до начала эксперимента составляло в среднем 12 ± 3 ч. Роговицы были разделены на 2 группы. Один корнеосклеральный диск от каждого ксено-донора являлся контрольным, другой, парный, служил опытным образцом.

Дальнейшие манипуляции проводили в стерильных условиях операционной. Корнеосклеральный диск извлекали из флакона со средой для хранения роговицы и фиксировали в специальном держателе – искусственной передней камере (ИПК) производства компании Ziemer (Швейцария) эндотелиальной стороной вверх. Затем при непрерывной подаче сбалансированного солевого раствора заполняли ИПК под давлением 50 мм вод.ст., что было оптимальным для поддержания объема ИПК, разглаживания складок роговицы и распределения давления на эндотелий роговой оболочки при его контакте с интерфейсом лазера [15]. Для оценки целостности эндотелиального слоя на его поверхность наносили 1–2 капли 0,1% раствора трипанового синего (ТС) (Vision Blue, DORC, Нидерланды) с последующим его смыванием средой для хранения роговицы. Осуществляли фото/видеофиксацию степени окрашивания роговичного диска.

Послойный роговичный трансплантат формировали при помощи ФСЛ LDV Z8 (Ziemer, Швейцария) с эндотелиальной стороны. В контрольной группе аппланацию головки лазера проводили по стандартной методике, с предварительным нанесением 1–2 капель раствора для хранения роговицы. В опытной (основная) группе непосредственно перед аппланацией головки и ФСЛ на эндотелий донорской роговицы наносили дисперсивный вискоэластик (ВЭ) – 1% раствор ГПМЦ (ТУ 9398-008-29039336-

2009, ООО «НЭП Микрохирургии глаза») в количестве 2–3 капли. Выдерживали экспозицию 30 сек для равномерного растекания и распределения его по поверхности роговицы. Затем плавно осуществляли контакт интерфейса лазера и роговицы путем вращения резьбового аппланационного кольца на ИПК. Производили контроль и оценку аппланации посредством интегрированной в лазер системы оптической когерентной томографии (ОКТ) (рис. 1). Трансплантат формировали послойным и циркулярным лазерными резами по предварительно запрограммированным параметрам: глубина залегания горизонтального реза составляла 125 мкм, а диаметр – 8 мм. После останова лазера вращением кольца в обратном направлении плавно отсоединяли головку лазера от поверхности донорской роговицы. Роговицу, находящуюся в ИПК, помещали под операционный микроскоп Lumera 700 Rescan (Carl Zeiss Meditec, Германия), на ее поверхность наносили 1–2 капли ТС – тем самым осуществляли контроль нахождения остатков ВЭ на поверхности эндотелия роговицы. Затем окрашенный ВЭ смывали раствором для консервации роговиц. На поверхность роговицы дополнительно наносили несколько капель этого же красителя с целью оценки степени окрашивания эндотелиального слоя роговицы и, соответственно, его относительной жизнеспособности (при этом большая выраженность окрашивания свидетельствует о значительной потере клеток, так как прокрашиваются не сами клетки, а участки оголенной десцеметовой мембраны). На следующем этапе смывали ТС несколькими каплями среды для хранения роговицы. Дополнительно верифицировали состоятельность послойного реза ФСЛ при помощи ОКТ, интегрированного в операционный микроскоп. На каждом этапе выполняли фото/видеорегистрацию с помощью операционного микроскопа (рис. 2).

На финальных этапах выкрашенный трансплантат отделяли при помощи шпателя-расслаивателя от подлежащей стромы и переносили его в емкость со средой для хранения роговицы. В лабораторных условиях для определения жизнеспособности ЭК и кератоцитов трансплантат окрашивали флуоресцентным красителем Live and Dead Cell Assay (Abcam, Великобритания) по протоколу производителя который включал в себя 3-кратное промывание образцов стерильным раствором PBS, далее к каждому образцу добавляли 50 мкл готового красителя Live and Dead на 10 мин при комнатной температуре, с последующим однократным промыванием стерильным раствором PBS. Анализ образцов проводили на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе FluoView FV10i (Olympus, Япония), исследования проводили с обеих сторон: эндотелиальной (рис. 3) и стромальной (рис. 6). Далее образец фиксировали и дегидратировали в ацетоне восходящей концентрации, с последующей сушкой в критической точке в парах CO_2 (Quorum Technologies, Великобритания). Полученные дегидратированные образцы фиксировали на алюминиевом столике с помощью токопроводящего скотча, с последующим напылением золота в высоком ва-

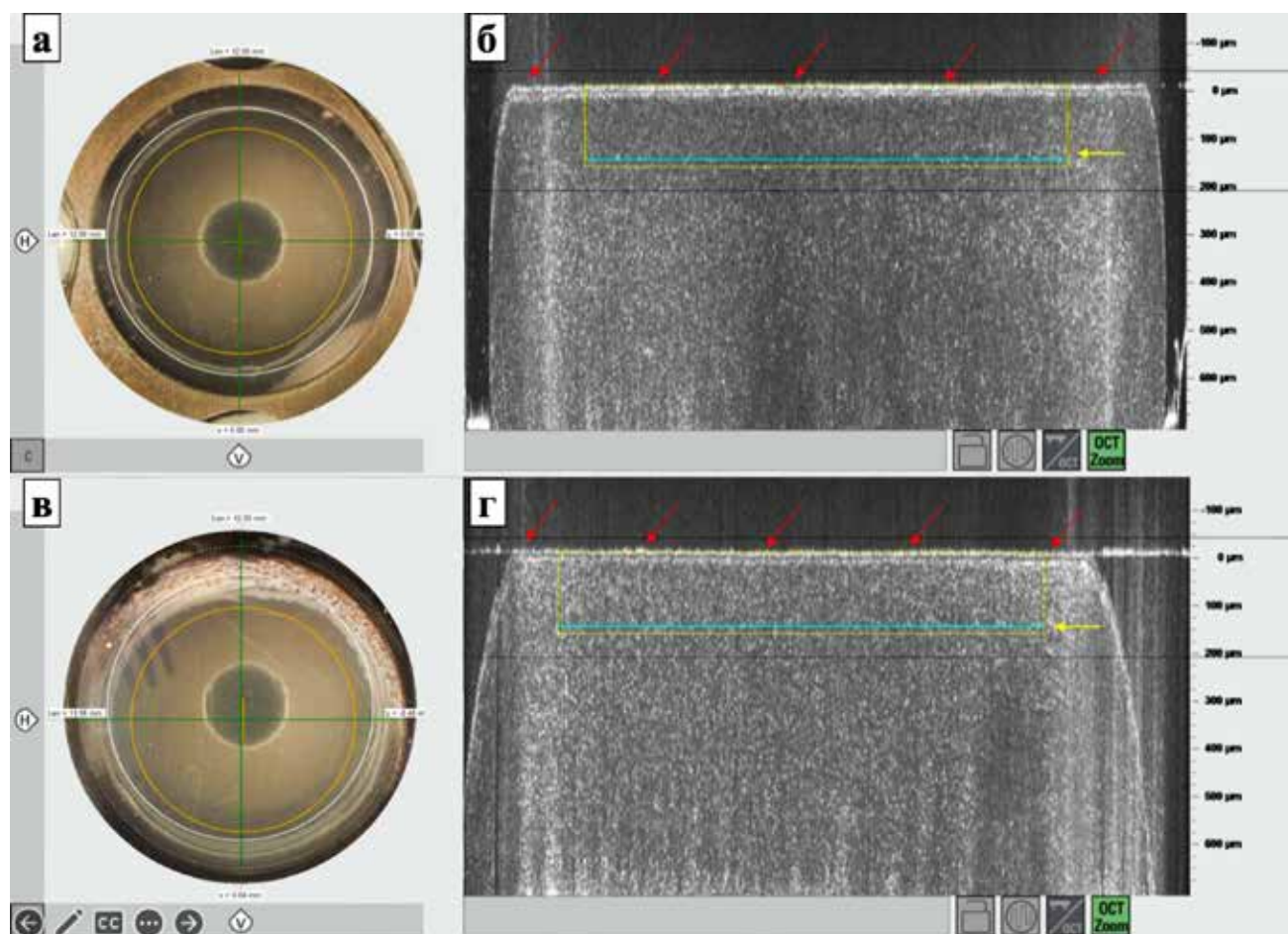


Рис. 1. Снимки экрана лазера (а, в) с интегрированным ОКТ в момент аппланации донорской роговицы опытной (а, б) и контрольной (в, г) групп. Настройки лазерного реза: глубина – 125 мкм, диаметр – 8 мм. На ОКТ роговиц опытной (б) и контрольной (г) групп виден плоский интерфейс и непрерывный плотный контакт эндотелиальной стороны донорской роговицы с лазером (указано красными стрелками), уровень горизонтального реза отмечен желтой стрелкой

Fig. 1. Screenshots of the laser (a, в) with integrated OCT at the time of applanation of the donor cornea of the experimental (a, б) and control (в, г) groups. Laser settings: depth – 125 μm , diameter – 8 mm. OCT of the cornea of the experimental (б) and control (г) groups show a flat interface and continuous tight contact of the endothelial side of the donor cornea with the laser (indicated by red arrows), the level of the horizontal cut marked with a yellow arrow

кууме в течение 30 сек (JEOL, Япония). Исследование образцов проводили на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) JCM-6000 Plus (JEOL, Япония).

Подсчет числа ЭК и кератоцитов послойных трансплантатов проводили с помощью программного обеспечения ImageJ (Fiji, США). Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программ Statistica 10 (StatSoft, США) и Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft, США). Характер распределения данных оценивали с использованием критерия Шапиро – Уилка. Данные представлены в формате $Me [Q_1; Q_3]$, где Me – медиана, Q_1 и Q_3 – нижний и верхний квартили соответственно. Сравнение данных между группами выполняли с использованием U-критерия Манна – Уитни). Статистическим значимым принимали уровень достоверности (p) менее 0,05 ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

По данным ОКТ ФСЛ в ходе аппланации во всех образцах опытной и контрольной групп отмечался ровный непрерывный профиль зоны контакта между головкой лазерного интерфейса и клетками эндотелия. Также мы не выявили складок эндотелия и стромы роговицы (рис. 1).

Использование ТС для исследования относительной потери плотности ЭК после выкраивания трансплантата не показало визуальных отличий в опытной и контрольных группах. На интраоперационном ОКТ в обеих группах визуализировали состоятельный и непрерывный горизонтальный лазерный разрез, который был параллелен относительно эндотелиальной поверхности трансплантата (рис. 2).

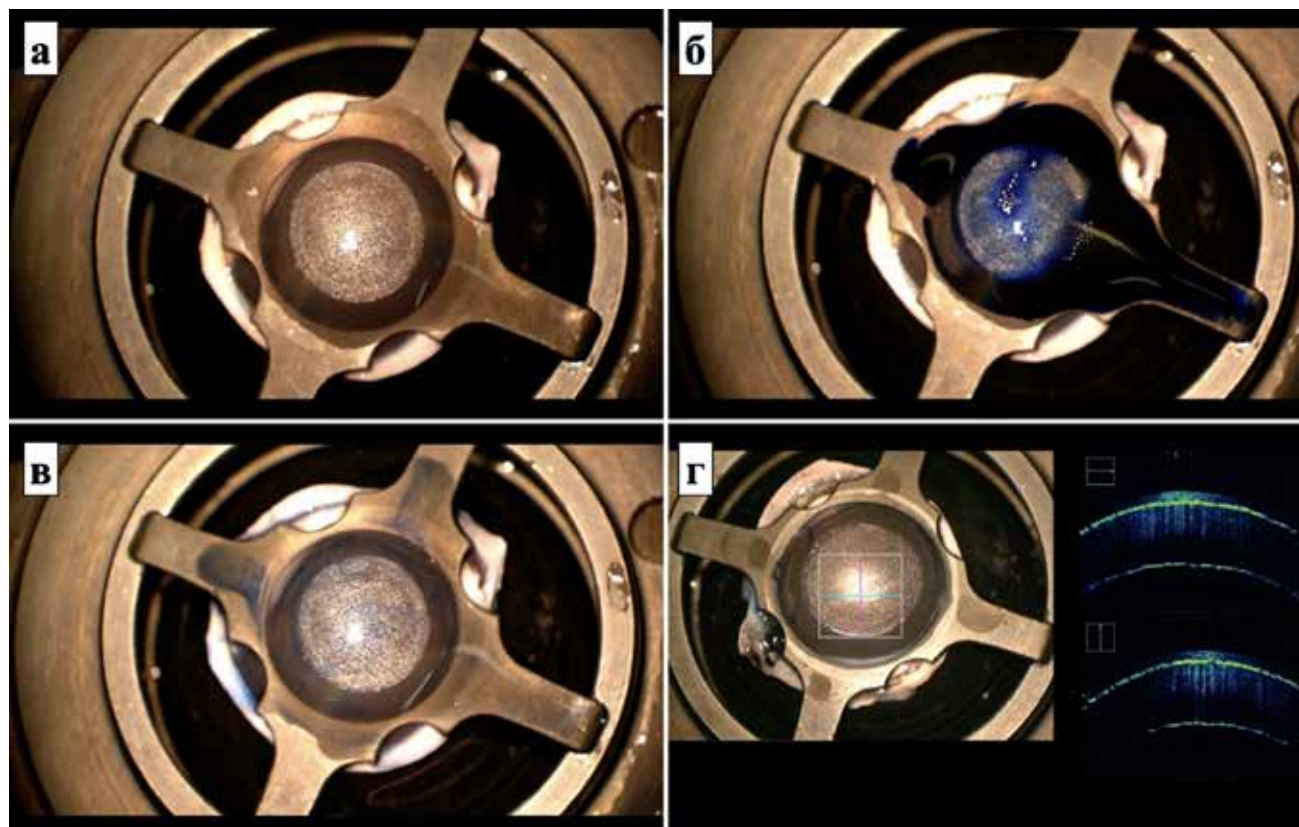


Рис. 2. Фотофиксация этапа окрашивания заднего послойного трансплантата опытной группы ТС и интраоперационное ОКТ после фемтодиссекции: а) фото трансплантата после работы ФСЛ, на котором видна пузырьковая зона – задний послойный трансплантат; б) фото прокрашивания ТС эндотелиальной поверхности трансплантата; в) фото после смыва ТС; г) фото сопоставления общего вида трансплантата с интраоперационным ОКТ микроскопа. На фото виден состоятельный и непрерывный горизонтальный лазерный разрез, который параллелен относительно эндотелиальной поверхности трансплантата

Fig. 2. Photofixation of the stage of staining of the graft of the experimental group with trypan blue and intraoperative OCT after femtodissection: а) photograph of the graft after FSL, which shows the bubble zone – the graft; б) photo of trypan blue staining of the endothelial surface of the graft; в) photo after flushing the trypan blue; г) photo comparison of the general view of the graft with the intraoperative OCT microscope. The photo shows a consistent and continuous horizontal laser cut, which is parallel to the endothelial surface of the graft

По данным конфокальной микроскопии общее количество ЭК в контрольной и опытной группах составляло 3570 [3486; 3613] и 3863 [3801; 4044] кл/мм² соответственно (*таблица*). При исследовании жизнеспособности ЭК в контрольной и опытной группах количество живых и мертвых ЭК статистически достоверно отличались (*рис. 4*). Живых ЭК было 2854 [2819; 2879] кл/мм², что составляет 80,35±0,88%; и 3477 [3426; 3719] кл/мм², что составляет 90,27±1,33% соответственно ($p<0,001$). Количество мертвых ЭК в контрольной группе было на 9,92±1,11% больше, чем в опытной, и составляло 710 [649; 728] кл/мм², что равняется 19,65±0,88%; и 402 [366; 427] кл/мм², что равняется 9,73±1,33% соответственно ($p<0,001$). Результаты сканирующей электронной микроскопии эндотелиальной стороны трансплантата демонстрируют сохранение гексагональной формы ЭК и целостности клеточных мембран в обеих группах, что подтверждает результаты флуоресцентного сканирующего

исследования живых и мертвых эндотелиоцитов (*рис. 5*).

При изучении повреждающего воздействия лазерного излучения на кератоциты трансплантата в момент выкраивания было выявлено, что в группе с ВЭ повреждение кератоцитов снизилось на 35% на нулевой глубине, что соответствует горизонтальному резу ФСЛ, на 27% на глубине 13 мкм, на 9% – на 26 мкм (*рис. 6*). Далее данные были сопоставимы в обеих группах и достоверных отличий не выявлено. При использовании 3D-моделирования в конфокальном микроскопе были построены карты исследуемых образцов, которые наглядно показывают повреждения кератоцитов на различной глубине трансплантата (*рис. 6*).

При анализе изображений сканирующей электронной микроскопии стромальной стороны трансплантата имела незначительные единичные разволокнения стро-мы в обеих группах (*рис. 5*).

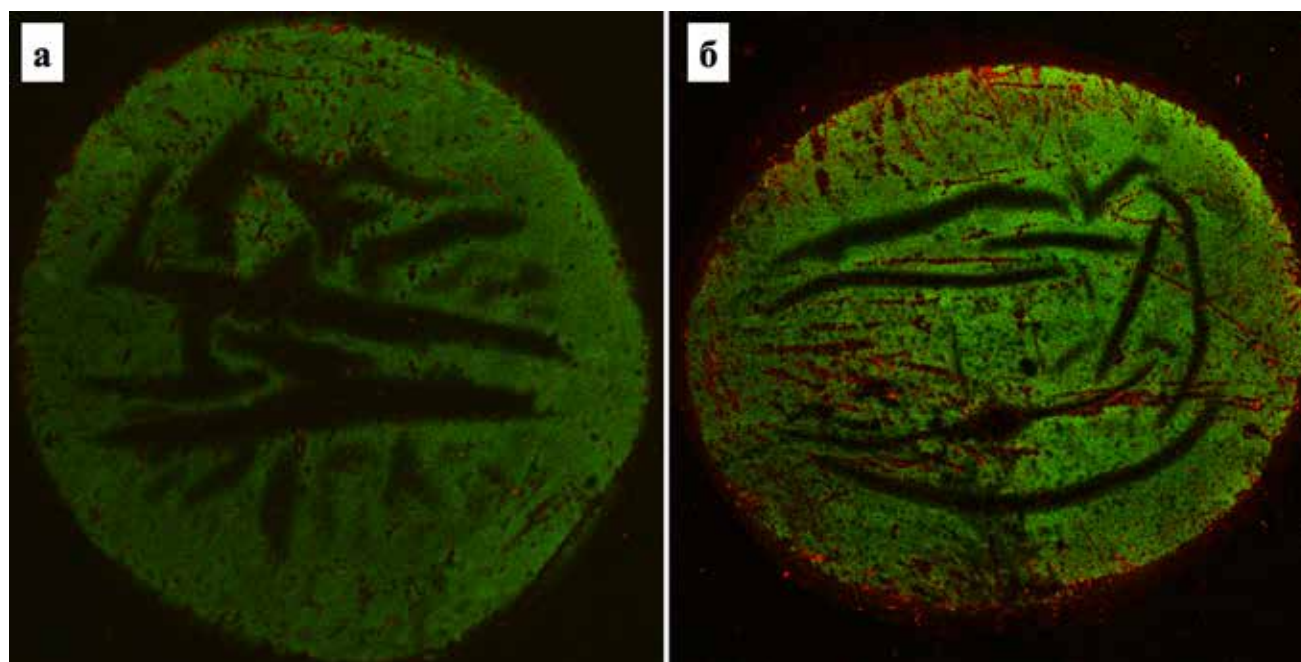


Рис. 3. Лазерная сканирующая микроскопия, флуоресцентный метод анализа, ув. 20. Жизнеспособность эндотелиальных клеток трансплантата зеленые клетки – живые, красные – мертвые: а) опытная группа с использованием 1% ГПМЦ; б) контрольная группа

Fig. 3. Laser scanning microscopy, fluorescent analysis method, x20 magnification. Viability of graft endothelial cells: green cells are alive, red cells are dead: а) experimental group using 1% HPMC; б) control group

Таблица

Плотность эндотелиальных клеток в опытной и контрольной группах (кл/мм²)

Table

Endothelial cell density in the experimental and control groups (cells/mm²)

Показатель Index	Опытная группа Experimental group			Контрольная группа Control group		
	живые клетки alive cells	мертвые клетки dead cells	всего клеток total cells	живые клетки alive cells	мертвые клетки dead cells	всего клеток total cells
Me	3477	402	3863	2854	710	3570
Q ₁	3426	366	3801	2819	649	3486
Q ₃	3719	427	4044	2879	728	3613
Min	3349	224	3741	2643	616	3272
Max	3934	440	4374	3070	775	3797

Примечание. Различие между группами статистически значимо ($p < 0.001$, критерий Манна – Уитни).

Note. The difference between the groups is statistically significant ($p < 0.001$, Mann – Whitney U test).

ОБСУЖДЕНИЕ

Заготовка заднего послойного трансплантата роговицы для ЗПК является важным этапом в достижении успешного хирургического лечения пациентов с ПБК

и различными видами эндотелиальных дистрофий. Идеальный трансплантат должен иметь минимальную толщину, равномерную форму, хорошее качество стромального интерфейса и оптимальную жизнеспособность эндотелиального слоя. Известно, что одним из ведущих механизмов сохранения долгосрочной про-

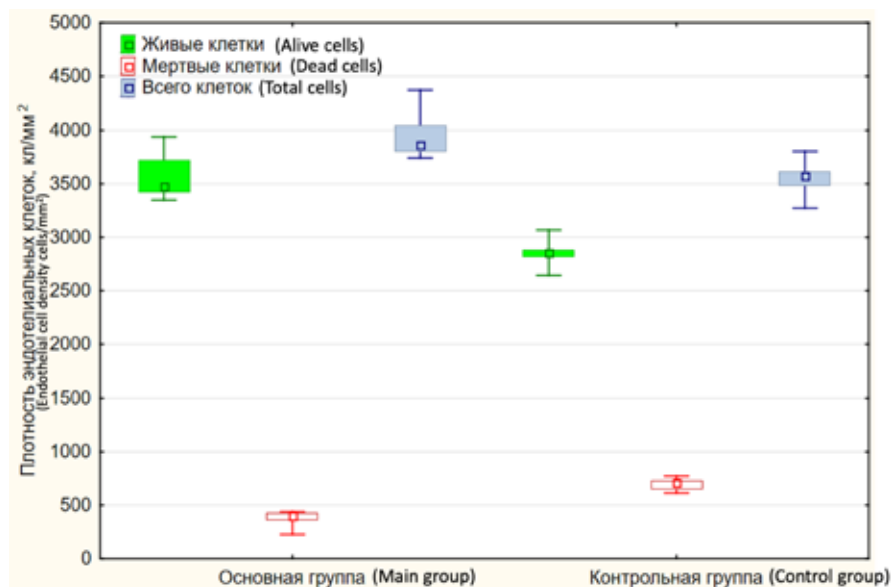


Рис. 4. График плотности эндотелиальных клеток после проведения выкраивания в опытной и контрольной группах. Зеленый квадрат – кол-во живых клеток, красный квадрат – кол-во мертвых клеток, синий квадрат – общее кол-во клеток

Fig. 4. Graph of endothelial cell density after FSL cutting in the experimental and control groups. The green square is the number of alive cells, the red square is the number of dead cells, the blue square is the total number of cells

зрачности трансплантируемой роговицы является плотность эндотелиальных клеток (ПЭК) и динамика ее потери. Известно, что снижение уровня ПЭК трансплантата носит прогрессирующий характер [16].

При выкраивании трансплантатов с помощью ФСЛ возможен ряд механизмов дополнительной травмы ЭК. В частности, играет роль толщина выкраиваемого трансплантата: чем она меньше, тем травма ЭК более выражена. Это в том числе связано с коллатеральным энергетическим повреждением ткани роговицы. Известно, что при повышении энергии лазера клетки страдают в большей степени. Другой механизм заключается в механической травме и связан с работой шпательем в интерфейсе для рассечения перемычек и тканевых мостиков, оставшихся после фемтолазерного реза. С нашей точки зрения, одним из наиболее существенных является аппланация, при которой происходит прямой контакт интерфейса лазера (выполненного из жесткого гидрофобного пластика) со слоем клеток [17]. Ряд авторов, с целью уменьшения потери ПЭК, перед этапом аппланации рекомендуют наносить на поверхность ЭК вискоэластик [12–14].

Однако использование вязких препаратов с высокой молекулярной массой (гиалуронат натрия, хондроитин сульфат или их комбинации) нарушает равномерность аппланации из-за неравномерного скопления ВЭ в интерфейсе. Так, С.С. Яковлева и соавт. в ходе экспериментальной работы обнаружили, что нанесение когезивного ВЭ на основе 1% гиалуроната натрия – Провиск (Алкон, США) на поверхность эндотелия сопровождается появлением складчатости роговицы при аппланации, что в дальнейшем после фемтодиссекции приводит к формированию неравномерного по толщине трансплантата и снижению качества его стромальной

поверхности. В то же время отсутствие вископротекции отрицательно сказалось на качестве эндотелиальной поверхности [11]. В другом исследовании Y. Liu и соавт. продемонстрировали, что в группе, в которой использовали 1% гиалуронат натрия Провиск («Алкон», США) на этапе фемтореза, повреждение ЭК было меньше, чем в группе контроля, и составляло $10,6 \pm 3,2$ и $23,4 \pm 7,6\%$ соответственно. При этом нахождение ВЭ на эндотелии в зоне интерфейса донорской роговицы и ФСЛ на этапе аппланации не повлияло на качество стромальной поверхности трансплантата. Все трансплантаты в группе с вископротекцией эндотелия имели однородную форму и высокую жизнеспособность эндотелиоцитов [14].

Использование менее вязких, адгезивных ВЭ препаратов, к которым относят ГПМЦ, дает возможность избежать вышеперечисленных проблем. Это подтверждается результатами нашего эксперимента, где в опытной группе с использованием ВЭ для защиты ЭК на этапе аппланации ПЭК трансплантатов была статистически достоверно выше, чем в контрольной группе. Также количество жизнеспособных клеток было больше в группе с ВЭ. Разница в потере ПЭК между группами была равна $9,92 \pm 1,11\%$ в пользу ВЭ. А сравнение данных СЭМ стромальных поверхностей трансплантатов обеих групп не выявило достоверных отличий в качестве стромального интерфейса, данные в группах были сопоставимы.

Наш выбор раствора ГПМЦ как протектора ЭК в момент аппланации основывался на экспериментальном исследовании S. Sikder и соавт. по применению различных видов ВЭ при аппланации головки лазера и донорской роговицы, с подсчетом потери ПЭК. Наиболее эффективно проявил себя в защите ЭК вискоэластик на

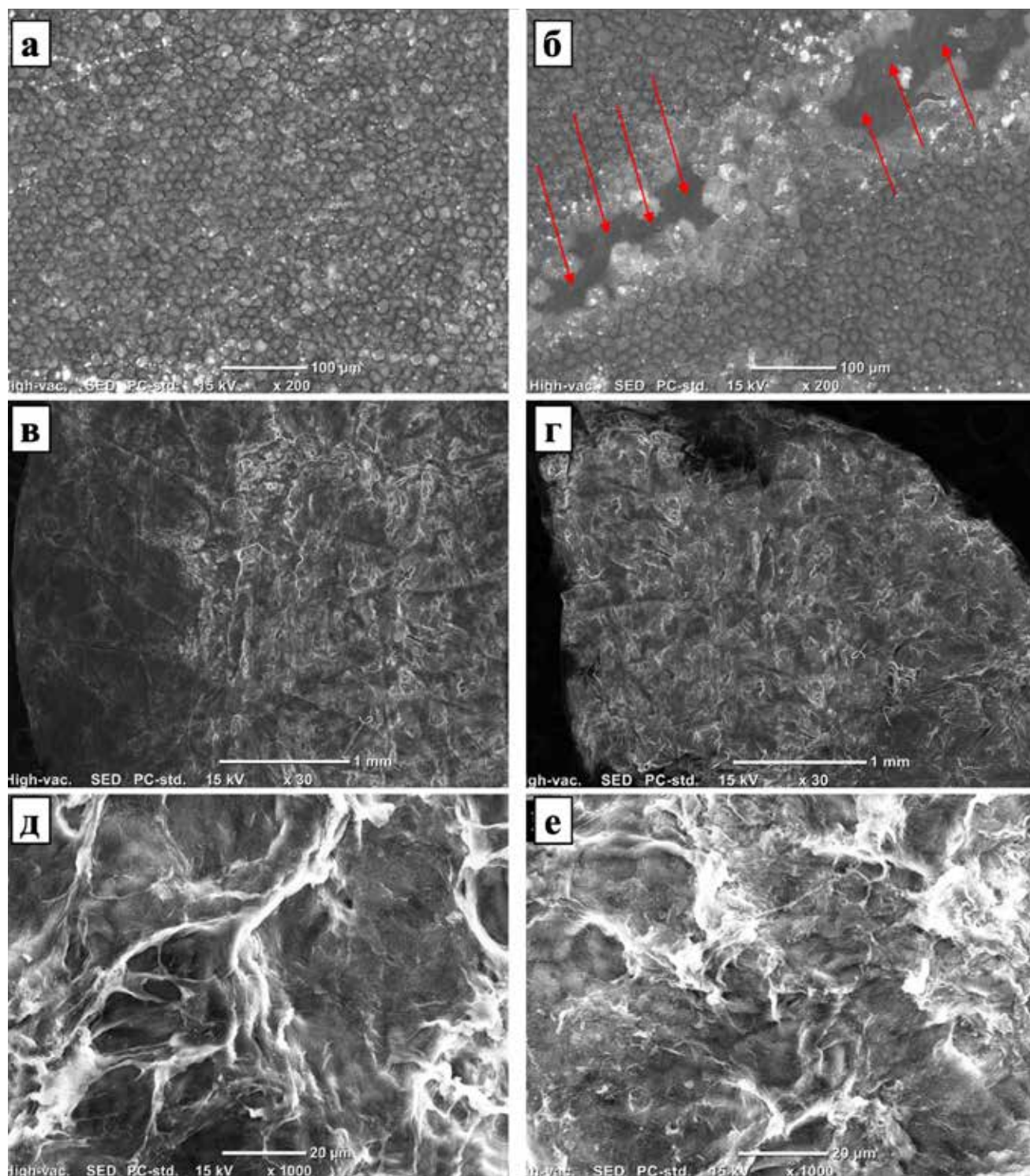


Рис. 5. Сканирующая растровая электронная микроскопия эндотелиальной (а, б) и стромальной (в-е) поверхностей трансплантата, высокий вакуум, напряжение 15 кВ. Сохранность морфологии и целостность клеточных мембран эндотелиальных клеток роговицы: опытная группа (а), контрольная группа (б) – красными стрелками показана зона оголенной десцеметовой мембраны, на снимках (в-е) видна сохранность стромальной стороны трансплантата после выкраивания и единичные разволокнения стромы в обеих группах. Масштаб: в) опытная группа, ув. 30; г) контрольная группа, ув. 30; д) опытная группа, ув. 1000; е) контрольная группа, ув. 1000

Fig. 5. Scanning electron microscopy of the endothelial (a, б) and stromal (в-е) surfaces of the graft, high vacuum, voltage 15 kV. Preservation of morphology and integrity of cell membranes of corneal endothelial cells: experimental group (а), control group (б) – red arrows show the area of the exposed Descemet's membrane. The photographs (в-е) show the preservation of the stromal side of the cornea after cutting out and single stroma fibrillations in both groups. Scale: в) experimental group, x30 magnification; г) control group, x30 magnification; д) experimental group, x1000 magnification; е) control group, x1000 magnification

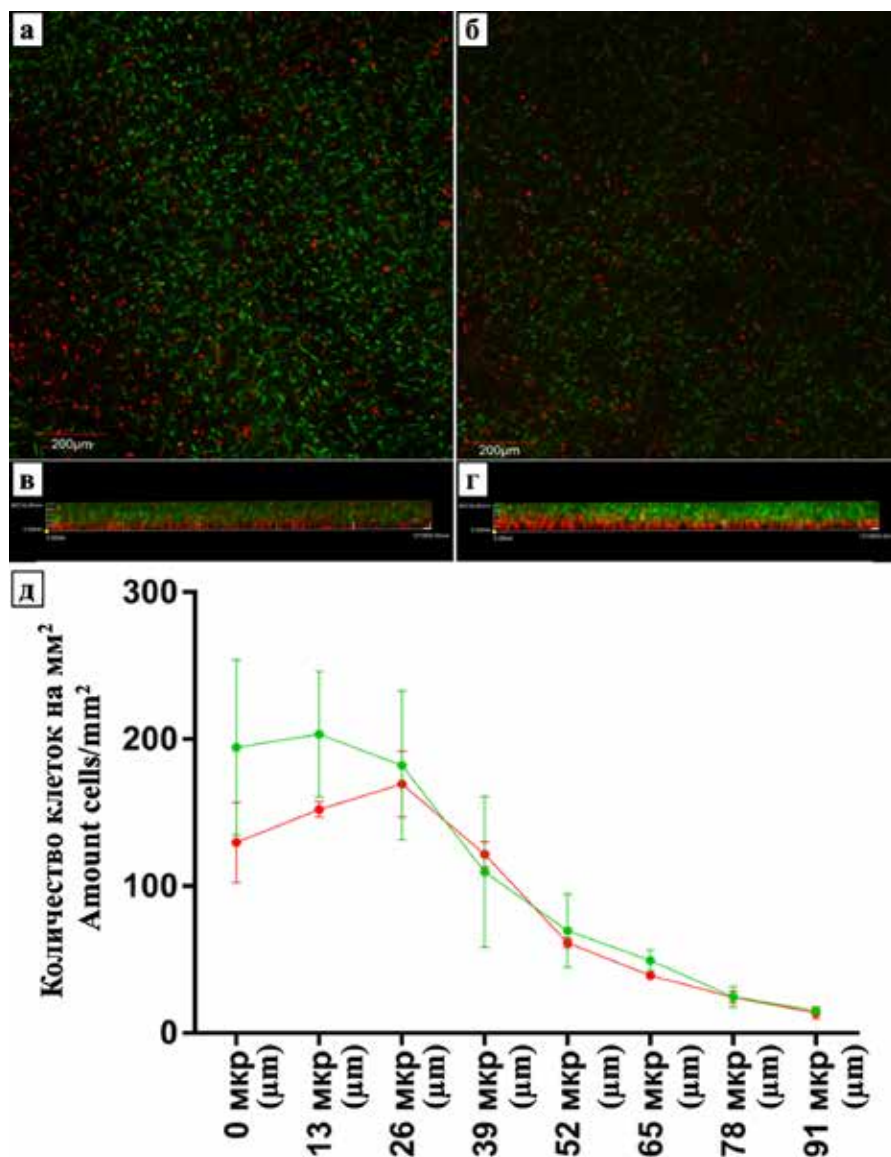


Рис. 6. Лазерная сканирующая микроскопия стромальной стороны трансплантата, флуоресцентный метод анализа (а-г). Жизнеспособность кератоцитов: окрашенные зеленым клетки – живые, красным – мертвые: опытная (а) и контрольная (б) группы, ув. 100, нулевой уровень. 3D-модель жизнеспособности кератоцитов трансплантата, ув. 100: опытная (в) и контрольная (г) группы. График плотности мертвых кератоцитов на глубине от 0 до 91 мкм (д): зеленый цвет – опытная группа, красный – контрольная

Fig. 6. Laser scanning microscopy of the stromal side of the graft, fluorescent method of analysis (a–g). Viability of keratocytes: stained green cells are alive, red cells are dead: experimental (a) and control (b) groups, $\times 100$ magnification, 0 level. 3D model of graft keratocyte viability, $\times 100$ magnification: experimental (v) and control (r) groups. Graph of the density of dead keratocytes at a depth of 0 to 91 microns (d): green – experimental group, red – control

основе 2% ГПМЦ, он показал наименьшую потерю ЭК в группе, равную 6%. В контрольной же группе, где не применялась защита ЭК и фемтодиссекция, потеря ПЭК только от аппланации рукоятки ФСЛ составила 9% [18].

Нами была сделана пилотная попытка применения 2% ГПМЦ отечественного производства (ООО НЭП Микрохирургия глаза) и при этом было отмечено неравномерное скопление ВЭ в интерфейсе. Исходя из этого в работе был использован раствор ВЭ пониженной концентрации – 1% ГПМЦ. Преимуществом данного ВЭ является его низкая вязкость, обеспечивающая равномерное распределение раствора по поверхности роговицы, что предотвращает образование складок в момент аппланации.

Таким образом, при выборе ВЭ следует соблюдать баланс между его вязкостью и эластичностью, при кото-

рых будет обеспечиваться достаточная защита ЭК и конгруэнтность поверхностей профиля роговицы и интерфейса ФСЛ в момент аппланации, которая влияет на качество фемтолазерного реза и, следовательно, на дальнейшие клиничко-функциональные результаты в постоперационном периоде.

Имеется ряд публикаций, в которых описаны появления так называемого «хейза» (клиническое помутнение) в зоне прилегания трансплантата к строме реципиента (зоне интерфейса), при выравнивании ФСЛ заднего послойного трансплантата [19]. Повышенная оптическая плотность этой зоны, по мнению ряда ученых, может быть связана с активацией стромальных кератоцитов и отложением в зоне интерфейса продуктов их активации, таких как: депозиты липофусцина и кристаллина при формировании трансплантата с использованием ФСЛ [20, 21].

В нашей работе при изучении влияния фемтолазерного излучения на строму и кератоциты в зоне горизонтального фемтореза показано, что на уровне фемтодиссекции имеются незначительные повреждения кератоцитов, далее ущерб от ФСЛ снижался до уровня 91 мкм, на котором были обнаружены единичные поврежденные кератоциты. Глубже, в сторону эндотелиальной части трансплантата, мертвых кератоцитов не было обнаружено. Следовательно, на этой глубине заканчивается негативное влияние лазерного воздействия на кератоциты трансплантата. В опытной группе использование ВЭ на этапе аппланации незначительно повлияло на работу ФСЛ и уменьшило степень повреждения кератоцитов пропорционально дальности от горизонтального фемтореза. Исходя из заложенной в настройки ФСЛ целевой толщины трансплантата в 125 мкм, после формирования горизонтального фемтореза, до эндотелиального слоя роговицы оставалось в среднем 34 мкм интактной стромы. Данная настройка, по нашему мнению, оптимальна с точки зрения безопасности коллатерального воздействия лазерной энергии на трансплантат.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты экспериментального исследования показали, что нанесение слоя вискоэластика (1% раствор ГПМЦ) обеспечивает защиту эндотелия роговичного трансплантата на этапе выкраивания его низкоэнергетическим ФСЛ по инвертированной методике. При отсутствии защитного слоя ВЭ количество жизнеспособных ЭК трансплантата составило 80,3%, при этом в исследуемой группе, где использовали ВЭ, количество ЭК было на 9,92% выше. Также применение ВЭ обеспечило большее количество сохранных, жизнеспособных кератоцитов на разных расстояниях от фемтореза. Нахождение слоя ВЭ в интерфейсе между головкой ФСЛ и ЭК не препятствовало работе лазера, не влияло на формирование эффективного лазерного реза и не снижало качество стромальной поверхности трансплантата. Инвертированная методика заготовки трансплантата роговицы ФСЛ с использованием защитного слоя 1% раствора ГПМЦ, нанесенного на поверхность эндотелиального монослоя, может быть рекомендована для использования в клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Tan DT, Mehta JS. Future directions in lamellar corneal transplantation. *Cornea*. 2007;26: S21–S28.
2. Рикс И.А., Папанян С.С., Астахов С.Ю., Новиков С.А. Новая клинико-морфологическая классификация эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы // Офтальмологические ведомости. 2017;10(3): 46–52.
3. Dunker SL, et al. Practice patterns of corneal transplantation in Europe: first report by the European Cornea and Cell Transplantation Registry. *J Cataract Refract Surg*. 2021;47(7): 865–869.
4. Dubord PJ, Evans GD, Macsai MS, Mannis MJ, Glasser DB, Strong DM, et al. Eye banking and corneal transplantation communicable adverse incidents: current status and project NOTIFY. *Cornea*. 2013;32(8): 1155–1166.
5. Gorovoy MS. Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea*. 2006;25(8): 886–889.
6. Shilova NF, et al. Refractive outcomes following cataract combined with lamellar keratoplasty: femtosecond-DSEK versus microkeratome-DSEK. *Int Ophthalmol*. 2021;41: 639–647.
7. Hjortdal J, Nielsen E, Vestergaard A, Søndergaard A. Inverse cutting of posterior lamellar corneal grafts by a femtosecond laser. *Open Ophthalmol J*. 2012;6: 19.
8. Погорелова С.С., Ченцова Е.В., Грдиканян А.А., Милаш С.В., Оганесян О.Г. Анализ плотности эндотелиальных клеток в среднесрочный период наблюдения после эндотелиальной кератопластики с формированием трансплантата фемтосекундным лазером со стороны эндотелия. *Российский медицинский журнал*. 2016;22(1): 10–13. [Pogorelova SS, Chentsova EV, Grdikanyan AA, Milash SV, Oganessian OG. Analysis of endothelial cell density in the medium-term follow-up period after endothelial keratoplasty with femtosecond laser graft formation from the endothelium. *Medical Journal of the Russian Federation*. 2016;22(1): 10–13. (In Russ.)]
9. Rosa AM, Silva MF, Quadrado MJ, Costa E, Marques I, Murta J. N. Femtosecond laser and microkeratome-assisted Descemet stripping endothelial keratoplasty: first clinical results. *Br J Ophthalmol*. 2013;97(9): 1104–1107.
10. Малугин Б.Э. и др. Сравнительный анализ клинико-функциональных результатов задней послойной кератопластики с использованием фемтосекундного лазера и микрокератома. *Офтальмохирургия*. 2019;1: 20–26. [Malyugin BE, et al. Comparative analysis of clinical and functional results of posterior layered keratoplasty using femtosecond laser and microkeratome. *Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery*. 2019;1: 20–26. (In Russ.)]
11. Оганесян О.Г. и др. Результаты сканирующей электронной микроскопии ультратонкого эндокератотрансплантата, сформированного фемтосекундным лазером со стороны эндотелия. *Российский медицинский журнал*. 2018;24(1): 19–24. [Oganessian OG, et al. The results of scanning electron microscopy of an ultrathin endokeratograft formed by a femtosecond laser from the endothelium. *Medical Journal of the Russian Federation*. 2018;24(1): 19–24. (In Russ.)]
12. Нероев В.В. и др. Первый опыт и краткосрочные результаты фемтолазерной задней кератопластики (DSEK) с формированием трансплантата с эндотелиальной стороны. *Российский медицинский журнал*. 2013;5: 43–46. [Neroev VV, et al. The first experience and short-term results of femtolaser posterior keratoplasty (DSEK) with graft formation from the endothelial side. *Medical Journal of the Russian Federation*. 2013;5: 43–46. (In Russ.)]
13. Погорелова С.С., Оганесян О.Г., Ченцова Е.В. Среднесрочные биологические и функциональные результаты эндотелиальной кератопластики (DSEK) с формированием трансплантата фемтосекундным лазером со стороны эндотелия. *Российский медицинский журнал*. 2015;21(4): 9–12. [Pogorelova SS, Oganessian OG, Chentsova EV. Medium-term biological and functional results of endothelial keratoplasty (DSEK) with femtosecond laser graft formation from the endothelium. *Medical Journal of the Russian Federation*. 2015;21(4): 9–12. (In Russ.)]
14. Liu Y, Teo E, Adnan K, Yam G, Peh G, Tan D, Mehta J. Endothelial approach ultrathin corneal grafts prepared by femtosecond laser for descemet stripping endothelial keratoplasty. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(12): 8393–8401.
15. Патент РФ на изобретение № 2758028/25.10.2021. Бюл. №30. Малугин Б.Э., Ткаченко И.С., Гелястанов А.М., Калининкова С.Ю. Способ проведения задней послойной кератопластики с помощью фемтосекундного лазера. Доступно по: https://patents.s3.yandex.net/RU2758028C1_20211025.pdf [Ссылка активна на 16.08.2023] [Patent RUS № 2758028/25.10.2021. Byul. №30. Malyugin BE, Tkachenko IS, Gelastanov AM, Kalinnikova SYu. Method of posterior layered keratoplasty using femtosecond laser. Available from: https://patents.s3.yandex.net/RU2758028C1_20211025.pdf [Accessed 16th August 2023] (In Russ.)]
16. Böhringer D, et al. Influencing factors on chronic endothelial cell loss characterized in a homogeneous group of patients. *Br J Ophthalmol*. 2002;86(1): 35–38.
17. Mehta JS, Shilbayeh R, Por YM, Cajucom-Uy H, Beuerman RW, Tan DT. Femtosecond laser creation of donor cornea buttons for Descemet-stripping endothelial keratoplasty. *J Cataract Refract Surg*. 2008;34(11): 1970–1975.
18. Sikder S, Snyder RW. Femtosecond laser preparation of donor tissue from the endothelial side. *Cornea*. 2006;25(4): 416–422.

19. Hjortdal J, Nielsen E, Vestergaard A, Søndergaard A. Inverse cutting of posterior lamellar corneal grafts by a femtosecond laser. *Open Ophthalmol J.* 2012;6: 19.

20. Cheng Y, et al. Quality of vision after femtosecond laser-assisted Descemet stripping endothelial keratoplasty and penetrating keratoplasty: a randomized, multicenter clinical trial. *Am J Ophthalmol.* 2011;152(4): 556–566.e1.

21. Kobayashi A, Mawatari Y, Yokogawa H, Sugiyama K. In vivo laser confocal microscopy after Descemet stripping with automated endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol.* 2008; 145(6): 977–985.

Информация об авторах

Борис Эдуардович Малюгин, д.м.н., профессор, зам. генерально-го директора по научной работе ФГАУ «НМИЦ «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова», boris.malyugin@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5666-3493>

Сергей Анатольевич Борзенко, д.м.н., зав. Центром фундаментальных и прикладных проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова», mdborzenok@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9160-6240>

Иван Сергеевич Ткаченко, врач-офтальмолог, аспирант, dr.ivan.tka@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-1756-7911>

Дмитрий Сергеевич Островский, к.б.н., зав. лабораторией трансплантологии и клеточной биологии Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова», dmitriyostrovskiy@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2817-7102>

Светлана Юрьевна Калининкова, врач-офтальмолог, аспирант, svkalinnikova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9109-2400>

Information about the authors

Boris E. Malyugin, Doctor of Sciences in Medicine, Professor, Deputy Director General for Scientific Work, boris.malyugin@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5666-3493>

Sergey A. Borzenok, Doctor of Science in Medicine, Head of the Center for Fundamental Science, mdborzenok@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9160-6240>

Ivan S. Tkachenko, Ophthalmologist, PhD Student, dr.ivan.tka@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-1756-7911>

Dmitriy S. Ostrovskiy, PhD in Biology, Head of the Laboratory of Transplantation and Cell Biology of the Center for Fundamental Science, dmitriyostrovskiy@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2817-7102>

Svetlana Yu. Kalinnikova, Ophthalmologist, PhD Student, svkalinnikova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9109-2400>

Вклад авторов в работу:

Б.Э. Малюгин: существенный вклад в концепцию и дизайн работы, редактирование, окончательное утверждение версии, подлежащей публикации.

С.А. Борзенко: существенный вклад в концепцию и дизайн работы, редактирование.

И.С. Ткаченко: существенный вклад в концепцию и дизайн работы, сбор, анализ и обработка материала, статистическая обработка данных, написание текста.

Д.С. Островский: существенный вклад в концепцию и дизайн работы, сбор, анализ и обработка материала, статистическая обработка данных, редактирование.

С.Ю. Калининкова: сбор, анализ и обработка материала, статистическая обработка данных.

Authors' contribution:

B.E. Malyugin: significant contribution to the concept and design of the work, editing, final approval of the version to be published.

S.A. Borzenok: significant contribution to the concept and design of the work, editing.

I.S. Tkachenko: significant contribution to the concept and design of the work, collection, analysis and processing of material, statistical data processing, writing.

D.S. Ostrovskiy: significant contribution to the concept and design of the work, collection, analysis and processing of material, statistical data processing, editing.

S.Yu. Kalinnikova: collection, analysis and processing of material, statistical data processing.

Финансирование: Авторы не получали конкретный грант на это исследование от какого-либо финансирующего агентства в государственном, коммерческом и некоммерческом секторах.

Согласие пациента на публикацию: Письменного согласия на публикацию этого материала получено не было. Он не содержит никакой личной идентифицирующей информации.

Конфликт интересов: Отсутствует.

Funding: The authors have not declared a specific grant for this research from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors.

Patient consent for publication: No written consent was obtained for the publication of this material. It does not contain any personally identifying information.

Conflict of interest: There is no conflict of interest.

Поступила: 18.07.2023

Переработана: 11.08.2023

Принята к печати: 16.08.2023

Originally received: 18.07.2023

Final revision: 11.08.2023

Accepted: 16.08.2023