

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ОФТАЛЬМОЛОГИИ EXPERIMENTAL STUDIES IN OPHTHALMOLOGY

Научная статья

УДК 617.713

doi: 10.25276/0235-4160-2024-1-66-77

Сравнительный анализ механического и фемтолазер-ассистированного методов выкраивания лимбальных мини-трансплантатов в эксперименте

Б.Э. Малюгин^{1, 2}, С.А. Борзенко^{1, 2}, О.Н. Нефедова¹, Д.С. Островский¹, М.Ю. Герасимов¹, А.В. Шацких¹

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. Подобрать оптимальные параметры фемтосекундного лазера (ФСЛ) (Femto LDV Z8, Ziemer, Швейцария) для выкраивания мини-трансплантатов с целью последующей трансплантации лимбальных стволовых клеток (ЛСК) и изучить влияние лазерной энергии на лимбальную зону в сравнении с традиционной методикой выкраивания с помощью микрохирургических инструментов. **Материал и методы.** На первом этапе, проведенном на 3 свиных и 3 кадаверных глазах, были подобраны оптимальные энергетические параметры работы ФСЛ, обеспечивающие иссечение и отделение фрагментов лимба. На втором этапе эксперимента использовали 8 глаз 4 посмертных доноров. В нижней и верхней частях лимба производили выкраивание фрагментов лимба с их последующим делением на 8 мини-трансплантатов ФСЛ (опытная группа). На симметричных участках каждого исследуемого глаза также формировали мини-трансплантаты вручную с использованием дозированного алмазного лезвия и металлического расслаивателя (контрольная группа). Структуру лимбального ложа после удаления мини-трансплантатов изучали методами световой и сканирующей электронной микроскопии. Влияние энергии ФСЛ на жизнеспособность ЛСК определяли методом прижизненной окраски с помощью красителя Live & Dead. На третьем этапе производили оценку обратимого и необратимого апопто-

за путем культивирования участков корнеосклеральных дисков, содержащих не отделенные от лимбального ложа мини-трансплантаты. Культивирование полученных образцов осуществляли в среде DMEM/F12.

Результаты. Оптимальными и обеспечивающими формирование целостных, легко отделяющихся от подлежащих тканей лимба мини-трансплантатов определены уровни энергии ФСЛ в 100, 110 и 120%. Анализ гистологических срезов и данные сканирующей электронной микроскопии в зоне выкраивания продемонстрировал наиболее ровную поверхность лимбального ложа при уровнях энергии 110 и 120%. При окраске Live & Dead выявлено повреждение клеток по боковой и внутренней сторонам лимбального мини-трансплантата преимущественно в опытной группе. Спустя 7 дней культивирования в обеих группах не наблюдали экспрессии маркеров апоптоза. **Заключение.** Выкраивание фрагментов лимба с помощью ФСЛ относительно безопасно и позволяет получить лимбальные мини-трансплантаты, содержащие жизнеспособные ЛСК. Подобраны оптимальные параметры работы лазера в лимбальной зоне – плоскостной рез на глубине 250 мкм с использованием 110% уровня энергии лазера.

Ключевые слова: фемтосекундный лазер, лимбальные стволовые клетки, апоптоз, синдром лимбальной недостаточности, сканирующая электронная микроскопия, световая микроскопия, культивирование, гистология

Для цитирования: Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., Нефедова О.Н., Островский Д.С., Герасимов М.Ю., Шацких А.В. Сравнительный анализ механического и фемтолазер-ассистированного методов выкраивания лимбальных мини-трансплантатов в эксперименте. Офтальмохирургия. 2024;142(1): 66–77. doi: 10.25276/0235-4160-2024-1-66-77

Автор, ответственный за переписку: Ольга Николаевна Нефедова, dr.olganefedova@gmail.com

ABSTRACT

Original article

Experimental study of manual and femtosecond laser-assisted methods for cutting limbal mini-transplants

B.E. Malyugin^{1, 2}, S.A. Borzenok^{1, 2}, O.N. Nefedova¹, D.S. Ostrovskii¹, M.Yu. Gerasimov¹, A.V. Shatskikh¹

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

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

Purpose. To define optimal parameters of femtosecond laser (FSL) (Femto LDV Z8, Ziemer, Switzerland) for cutting limbal mini-transplants

to be further used for limbal stem cells (LSC) transplantation and compare the results with manual cutting technique using microsurgical

blade. **Material and methods.** At first step, performed on 3 porcine and 3 cadaveric eyes, the optimal energy parameters of FSL were selected, which ensured the excision of limbal mini-transplants. At the second step, 8 eyes from 4 postmortem donors were used. In the lower and upper parts of the limbus, limbal fragments were cut out into 8 mini-transplants with a FSL (experimental group). Mini-grafts were also formed manually in symmetrical areas of each eye using dosed diamond blade (control group). The structure of the limbal bed after removing mini-transplants was studied by light and scanning electron microscopy. The effect of FSL energy on the viability of LSC was determined by intravital staining using Live & Dead dye. Finally, on the third step, the assessment of reversible and irreversible apoptosis was performed by culturing corneoscleral discs containing mini-transplants not separated from the limbal bed. The obtained samples were cultivated in a medium DMEM/F12 for 7 days followed by immunohistochemical examination.

Results. The optimal parameters of FSL operation are determined by energy levels- 100, 110 and 120%. Histological analysis of the limbal residual bed zone showed that the smoothest surface was obtained at energies 110 and 120%. This fact was also confirmed by scanning electron microscopy. When stained with the Live & Dead dye, damage on the lateral and inner sides of limbal mini-transplants was revealed, mainly in the experimental group. After 7 days of cultivation in the cut area in both groups, no expression of apoptosis markers was observed. **Conclusion.** Cutting out the limbal zone containing LSCs using FSL is safe and allows obtaining limbal mini-grafts. The most optimal parameters of laser operation in the limbal zone were selected – a planar cut at depth of 250 μm using 110% laser energy.

Key words: femtosecond laser, limbal stem cells, apoptosis, limbal stem cell deficiency syndrome, scanning electron microscopy, light microscopy, cultivation, histology ■

For citation: Malyugin B.E., Borzenok S.A., Nefedova O.N., Ostrovskii D.S., Gerasymov M.Yu., Shatskikh A.V. Experimental study of manual and femtosecond laser-assisted methods for cutting limbal mini-transplants. *Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery*. 2024;142(1): 66–77. doi: 10.25276/0235-4160-2024-1-66-77

Corresponding author: Ol'ga N. Nefedova, dr.olganefedova@gmail.com

АКТУАЛЬНОСТЬ

Стабильная глазная поверхность предполагает наличие состоятельного эпителиального слоя роговицы как неперемного фактора, обеспечивающего сохранение ее прозрачности [1]. Это актуально и для случаев, связанных с проведением хирургических вмешательств на роговой оболочке глаза, включая кератопластику [1]. Хорошо известен факт крайне низкой эффективности оптической трансплантации роговицы у пациентов с синдромом лимбальной недостаточности (СЛН) [2], при котором существенно нарушается регенераторный потенциал лимбальных стволовых клеток (ЛСК) [3].

Целью простой трансплантации лимбального эпителия (англ. simple limbal epithelial transplantation, SLET) является восстановление поврежденного эпителиального слоя роговицы, возникающего в результате дефицита ЛСК либо разрушения места их локализации (ниши Вогта), путем трансплантации фрагментов лимба со здорового глаза на поврежденный [4]. Следует подчеркнуть, что данная операция возможна только у пациентов с односторонним СЛН [4, 5]. Выбор хирургической тактики лечения пациентов с СЛН в первую очередь должен быть основан на корректной диагностике данного заболевания [6]. В Российской Федерации наиболее распространенным методом трансплантации ЛСК является технология бесклеевой простой трансплантации лимбального эпителия (англ. glueless simple limbal epithelial transplantation, G-SLET). Она предполагает отсутствие необходимости использования фибринового клея для фиксации лимбальных фрагментов к поверхности стромы роговицы поврежденного глаза. При этом фрагмен-

ты лимба имплантируются в несквозные радиальные микронадрезы на периферии роговицы, которые в последующем служат депо для ЛСК [7].

В описанной ранее оригинальной технологии G-SLET фрагменты лимба выделяют в ходе операции механическим путем при помощи микрохирургического лезвия. Однако при этом не исключены технические погрешности и ошибки, приводящие к повреждению ЛСК. В связи с чем мы предположили, что использование фемтосекундного лазера (ФСЛ) на этом этапе обладает потенциалом повысить безопасность и эффективность операции G-SLET. Это позволит преодолеть практические ограничения хирургии и улучшить результативность вмешательств у пациентов с односторонним СЛН.

ЦЕЛЬ

Изучить возможность применения низкоэнергетического ФСЛ Femto LDV Z8 (Ziemer, Швейцария) на этапе выкраивания лимбального трансплантата, подобрать оптимальные параметры работы лазера и оценить эффективность данной методики в сравнении с традиционной, предполагающей механическое иссечение ткани.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Данное экспериментальное исследование состояло из нескольких этапов. Первый заключался в исследовании возможности работы ФСЛ в условиях полупрозрачной ткани лимба и определении минимального уровня энергии ФСЛ, при котором возможно получить полноценный по составу лимбальный трансплантат с его фрагмента-

цией на отдельные части (мини-трансплантаты). Второй этап был направлен на определение оптимальных, безопасных и эффективных энергетических параметров ФСЛ для выкраивания лимбальных мини-трансплантатов путем гистологического исследования, включавшего проведение световой и сканирующей электронной микроскопии. Третий этап заключался в оценке жизнеспособности ЛСК, содержащихся в мини-трансплантатах, а также в изучении обратимого и необратимого апоптоза ЛСК при работе ФСЛ с выбранными параметрами.

Первый этап. Подбор энергетических параметров ФСЛ для формирования и эффективного отделения лимбального трансплантата от подлежащих тканей

Известно, что эффективность реза тканей ФСЛ существенно снижается при снижении прозрачности ткани, в частности роговицы [8]. Зона лимба, представляющая переход от прозрачной ткани роговицы к непрозрачной склере, ранее не изучалась на предмет выполнения плоскостных и вертикальных разрезов при помощи ФСЛ. Нами была поставлена задача определения оптимальных параметров энергии лазера LDV Z8, которые бы обеспечили свободное отделение фрагментов ткани, вырезанных при помощи лазера. Эксперименты в данном этапе были выполнены с использованием свиных (n=3) и донорских (n=3) изолированных глазных яблок. Последние не были пригодны для целей трансплантации роговицы в клинике по причине низкой плотности эндотелия либо наличия дефектов стромы. Время от момента констатации биологической смерти до выделения тканевых фрагментов составило $18,8 \pm 0,5$ ч. Исследования с использованием донорского материала проводили в соответствии с законодательными и нормативно-правовыми документами РФ.

Эксперимент проводили в условиях операционного блока с соблюдением правил асептики и антисептики. Глазные яблоки закрепляли в стерильном механическом держателе. Верхний участок лимба роговицы локализовали по остаткам сухожилия верхней прямой мышцы. В соответствии с этим проводили разметку места выполнения разрезов.

Формирование трансплантатов осуществляли в верхней и нижней зонах лимба каждого глаза с использованием низкоэнергетического ФСЛ LDV Z8. Для данной работы инженеры компании Ziemer разработали оригинальное программное обеспечение и траектории работы ФСЛ. Они позволяют осуществить диссекцию от 4 до 8 фрагментов лимба прямоугольной формы со следующими размерами: ширина 1,5 мм, длина 2,5 мм.

В ходе эксперимента использовали переменные уровни энергии ФСЛ, начальный из которых был равен 90%, согласно рекомендации производителя. На каждом этапе производили повышение уровня энергии ФСЛ минимум на 5%. Каждый выбранный уровень энергии ФСЛ использовали для выкраивания лимбального трансплантата

дважды. Время работы лазера и траектория реза были одинаковы для всех случаев.

Под контролем операционного микроскопа Lumera Rescan-700 (Carl Zeiss, Германия) хирург вручную отсепаровывал остаточную конъюнктиву для освобождения зоны лимба. После аппланации рукоятки ФСЛ на верхнюю зону лимба производили точное позиционирование будущей траектории. С помощью встроенной в ФСЛ системы интраоперационного оптического когерентного томографа устанавливали глубину горизонтального реза для захвата зоны ниши ЛСК. Глубина реза во всех случаях была равна 250 мкм [4]. Производили активацию ФСЛ, время работы которого составляло 38–40 с.

Критериями качества реза ФСЛ были: легкость отделения фрагмента от подлежащих тканей лимбального ложа, зависящая от наличия «тканевых» мостиков, и сохранение целостности вырезанного фрагмента ткани после его отделения. Также в условиях операционной визуальной оценки оценивали качество сформированного лазером ложа лимбальных трансплантатов после их удаления. Оценку поверхности ложа лимбального трансплантата проводили при помощи интраоперационной оптической когерентной томографии (ОКТ) с применением микроскопа Lumera Rescan-700 (C. Zeiss, Германия). После удаления мини-трансплантатов корнеосклеральные диски исследовали на предмет оценки глубины расположения горизонтального реза ФСЛ и его воздействия на ткань лимба с помощью световой микроскопии.

По результатам данного этапа, отделение мини-трансплантатов, отсепарированных ФСЛ от лимбального ложа на свиных глазах, во всех случаях было невозможно выполнить в зоне перехода роговицы в склеру. При этом как со стороны роговицы, так и со стороны склеры мини-трансплантаты отделялись без усилий.

При работе ФСЛ на кадаверных донорских глазах (n=3) отделение мини-трансплантатов, начиная с 90% уровня энергии ФСЛ, происходило с значительным усилием вследствие наличия «тканевых мостиков», затрудняющих их отделение от лимбального ложа. Путем перебора вариантов энергии выявлено, что сформированные мини-трансплантаты начинают относительно легко отделяться, начиная с уровня энергии, равного 100%. От данного уровня проводили повышение уровня энергии на 10% для выполнения каждой последующей серии эксперимента.

В результате было отмечено, что при уровнях энергии, равных 130 и 140%, отделение части мини-трансплантатов от лимбального ложа было затруднено из-за избыточной мацерации тканей. Исходя из этого, был сделан вывод, что уровни энергии ФСЛ в 100, 110 и 120% являются оптимальными.

Второй этап. Оценка безопасных энергетических параметров фемтосекундного лазера для выкраивания фрагментов лимба

На втором этапе в качестве источника ЛСК использовали лимбальные трансплантаты, полученные из глазных

яблок (n=4) 2 посмертных доноров мужского пола в возрасте 55 и 69 лет. Трансплантаты выкраивали с использованием ФСЛ в меридианах от 12 до 2 и с 4 до 6 часов условного циферблата (опытная группа) на уровнях энергии, равных 100, 110 и 120%. После чего в меридианах с 10 до 12 и от 6 до 8 часов вручную выкраивали мини-трансплантаты при помощи дозированного алмазного и металлического одноразового ножей (контрольная группа).

После предварительной разметки вертикальные разрезы проводили дозированным алмазным ножом, выставленным на глубину 250 мкм. Длина прямоугольного фрагмента ткани составила 2,5 мм, ширина – 1,5 мм. После чего одноразовым металлическим полукруглым ножом (Mani, Япония) расслаивали ткань в горизонтальной плоскости, затем образовавшиеся фрагменты лимба полностью отделяли от подлежащих слоев (рис. 1). Фрагменты помещали в раствор для консервации роговицы (рег. уд. № 9398-013-29039336-2008, ООО НЭП «Микрохирургия глаза», Москва).

В правой части лимба (как сверху, так и снизу) формирование лимбального трансплантата и его одномоментное деление на 4 мини-трансплантата проводили с использованием ФСЛ. Для этого после аппланации рукоятки лазера к кадаверному глазу позиционировали траекторию реза; глубину горизонтального реза, равную 250 мкм, контролировали с помощью ОКТ. Время работы лазера для формирования одного лимбального трансплантата с его фрагментацией составляло 40 с. Для оценки влияния ФСЛ на ткани лимба и жизнеспособность ЛСК выкраивание лимбальных мини-трансплантатов производили с выбранными на первом этапе уровнями энергии (100, 110 и 120%). Всего для эксперимента были получены 64 мини-трансплантата.

Гистологическое исследование

Участки корнеосклеральных дисков, содержащих лимбальное ложе после удаления лимбального мини-трансплантата, выкроенного при разных уровнях энергии лазера в 100, 110 и 120% (опытная группа) и механически (контрольная группа), фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, затем промывали проточной водой, производили обезвоживание в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Далее выполняли серии гистологических срезов толщиной 2–3 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином по стандартному протоколу. Препараты изучали на инвертированном микроскопе ix81 (Olympus, Япония) при 40- и 100-кратном увеличении с фотографированием.

Оценка ультраструктуры коллагеновых волокон методом сканирующей электронной микроскопии

Образцы участков корнеосклерального диска с лимбальным ложем после удаления мини-трансплантатов в обеих группах обезвоживали в растворе ацетона по восходящей концентрации 10, 30, 50, 70, 90, 100% (трижды) по 10 мин в каждом. Далее образцы подвер-

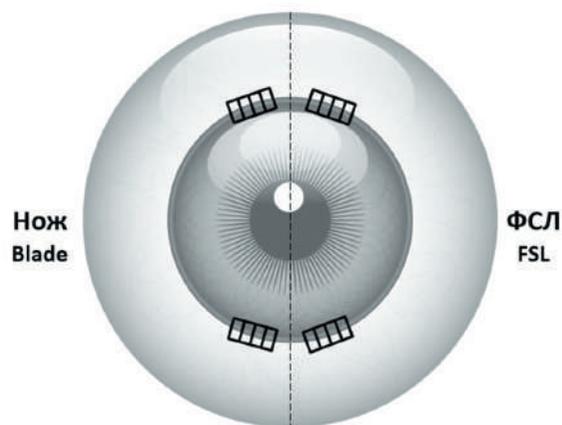


Рис. 1. Схема выкраивания лимбальных мини-трансплантатов из донорской роговицы

Fig. 1. Scheme of cutting limbal mini-grafts from the donor cornea

гали критической сушке с использованием осушителя (Critical Point Dryer Qurum k850, Quorum Technologies, Великобритания). Затем образцы напыляли золотом (толщина слоя 5 нм, проба 999) с помощью установки Smart Coater SPI (SPI Supplies, США) и анализировали посредством сканирующего электронного микроскопа модели 6000 plus (Jeol, Япония). Анализ образцов производили в 10 случайно выбранных точках и осуществляли в режиме высокого вакуума $\times 1000$ (мощность 10 kV).

Третий этап. Оценка жизнеспособности ЛСК методом флуоресцентной окраски красителем Live & Dead

После того как были подобраны оптимальные энергетические параметры лазера для формирования фрагментов лимба, на третьем этапе эксперимента использовали 8 кадаверных глаз (n=8) посмертных доноров (n=4). В нижней и верхней частях лимба проводили выкраивание прямоугольного фрагмента лимба с последующим его делением на 8 мини-трансплантатов ФСЛ. Аналогично предыдущему (второму) этапу, на симметричных участках каждого глаза формировали мини-трансплантаты вручную (контрольная группа), но вертикальный рез со стороны склеры в обеих группах не проводили с целью сохранения фиксации мини-трансплантатов в лимбальном ложе для дальнейших исследований. При этом величина энергии ФСЛ была равна 110% (при данном уровне энергии ФСЛ мини-трансплантаты отделялись от лимбального ложа легче по сравнению с уровнем энергии ФСЛ, равным 100%, при котором «тканевые мостики» наблюдали на всем протяжении лимбального ложа, а отделение сформированных мини-трансплантатов требовало использования дополнительных микрохирургических инструментов) горизонтальный рез в обеих группах находился на глубине 250 мкм. Влияние энергии ФСЛ на жизнеспособность

ЛСК определяли методом прижизненной окраски изъятых после выкраивания мини-трансплантатов флуоресцентным красителем в первые 20 мин.

Для определения жизнеспособности ЛСК роговицы применяли флуоресцентный краситель Live & Dead (Ab 115347, Abcam). Перед окрашиванием из каждого сформированного лимбального трансплантата один выделенный мини-трансплантат трижды отмывали от консервационной среды по 5 мин стерильным раствором BSS (Balanced Salt Solution, pH 7,4, Abbot). Затем чашку Петри заполняли раствором красителя Live & Dead – 5 мкл в 1 мл стерильного раствора PBS (Phosphate-Buffered Saline, pH 7,4, Thermo Fisher Scientific) так, чтобы жидкость полностью покрывала мини-трансплантат, и инкубировали в течение 10 мин в темноте при комнатной температуре. После чего исследуемые образцы промывали троекратно по 5 мин стерильным раствором BSS. Для визуализации и изучения результатов окрашивания применяли лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Olympus Fluoview 10i (Olympus, Япония). Живые клетки окрашивались в зеленый цвет, мертвые – в красный. Выполняли по 3 снимка каждого полученного образца для изучения жизнеспособности клеток. Площадь каждого снимка составляла 1,63 мм².

Оценка обратимого и необратимого апоптоза

Методом иммуногистохимического (ИГХ) исследования оценивали наличие экспрессии маркеров обратимого и необратимого вариантов апоптозов ЛСК после выкраивания мини-трансплантатов в опытной и контрольной группах. Для этого образцы ткани корнеосклерального диска, содержащие выкроенные и не отделенные от лимбального ложа мини-трансплантаты, сначала помещали в среду DMEM/F12 с 1,05 мМ Са⁺⁺ с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки, антибиотика-антимикотика, инсулина (5 мкг/мл), гидрокортизона (5 мкг/мл) и эпидермального фактора роста (10 нг/мл) (D6421, Sigma Aldrich, США), и культивировали на протяжении 7 суток при температуре 37 °С. Далее, спустя 7 дней, образцы замораживали при температуре –30 °С в криостате HM525 NX (Thermo Scientific, Великобритания). Затем выполняли криостатные срезы толщиной 10 мкм и переносили их на слайды Polysine (Thermo Scientific, Великобритания), из расчета три среза на один слайд. Для окраски срезов использовали следующие первичные антитела: для определения активации каспазного пути апоптоза изучали Каспазы –3 и –8, для митохондриального пути – цитохром С и BAX (Abcam). Для идентификации вышеперечисленных маркеров использовали вторичные антитела Alexa Fluor 488 (1:250, ab150077, Goat Anti-Rabbit IgG, Abcam) и Alexa Fluor 594 (1:250, ab150116, Goat Anti-Mouse IgG, Abcam). После удаления вторичных антител для контрастирования ядер использовали краситель Hoechst (O150, «ПанЭко»). Оценку результатов проводили с использова-

нием лазерного сканирующего конфокального микроскопа Olympus Fluoview 10i (Olympus, Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе эксперимента при сравнении различных вариантов энергии ФСЛ установлено, что формирование необходимых по качеству мини-трансплантатов происходит при минимальном уровне энергии в 100% и максимальном в 120%. При 90% энергии наблюдали большое количество «тканевых мостиков», за счет чего приходилось использовать дополнительные микрохирургические инструменты, такие как лезвие-расслаиватель, алмазный нож либо шпатель, для отделения мини-трансплантатов. В противном случае отделение мини-трансплантата сопровождалось нарушением его целостности.

Гистологическая оценка поперечных срезов лимбального ложа

При проведении гистологического исследования в сравнении двух способов выкраивания выявлено, что при выкраивании лимбального трансплантата микрохирургическими инструментами ровную поверхность лимбального ложа и необходимую глубину горизонтального реза на уровне 250 мкм наблюдали лишь в 37,5% случаев. В 62,5% поверхность лимбального ложа была неровной, что предполагает также неравномерную толщину лимбального трансплантата. При выкраивании лимбального трансплантата с использованием ФСЛ горизонтальный рез во всех случаях располагался на уровне 250 мкм. При сравнении различных уровней применяемой энергии (100, 110 и 120%) наблюдали явления «оплавления» поверхности лимбального ложа с разной интенсивностью (рис. 2). Вертикальный разрез во всех случаях и при всех уровнях применяемой энергии был со ступенчатыми контурами, что, вероятно, является характерным для воздействия лазера на лимб роговицы. Нами также отмечены различия в равномерности горизонтальной поверхности лимбального ложа и степени т.н. «оплавления» ткани. Наиболее выраженное изменение поверхности наблюдали при 100% уровне энергии. Ложе лимбального трансплантата после воздействия 110% энергии лазера было более равномерным, однако также наблюдали «оплавление» поверхности лимбального ложа. При уровне затраченной энергии 120% горизонтальная поверхность во всех случаях была ровной, без изменения поверхности.

При оценке гистологической картины лимбального ложа с расположенным в нем мини-трансплантатом при аналогичных уровнях энергии ФСЛ отмечено, что использование 100% уровня энергии сопровождалось неполным отделением мини-трансплантата ввиду наличия большого количества «тканевых мостиков», по сравнению с использованием 110 и 120% уровня энергии (рис. 3).

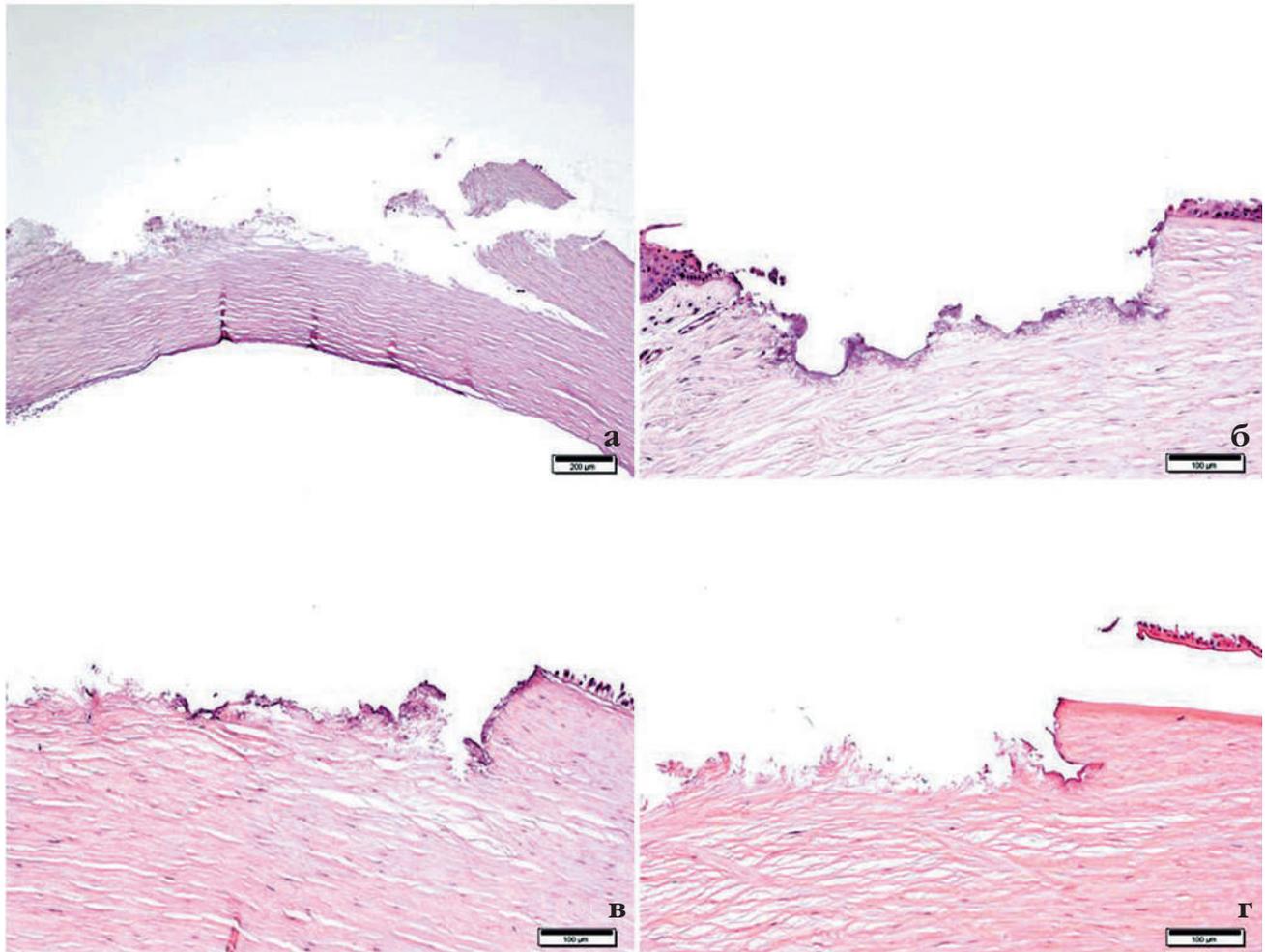


Рис. 2. Гистологическая картина поверхности лимбального ложа после удаления мини-трансплантата, полученного разными способами. Усиление базофильной краски может свидетельствовать об «оплавлении» ткани после воздействия ФСЛ. Окраска гематоксилином и эозином: а) неровная поверхность лимбального ложа после удаления мини-трансплантата, выкроенного микрохирургическими инструментами; б) неровная поверхность лимбального ложа после удаления мини-трансплантата, выкроенного ФСЛ с энергией 100%, участки «оплавления» ткани на всем протяжении лимбального ложа; в) поверхность лимбального ложа после удаления мини-трансплантата, выкроенного ФСЛ с энергией 110% более ровная, встречаются участки «оплавления» ткани; г) наиболее ровная поверхность лимбального ложа после удаления мини-трансплантата, выкроенного ФСЛ с энергией 120%. Световая микроскопия. $\times 40$

Fig. 2. Histological picture of the surface of the limbal bed after removal of the mini-graft obtained by different methods. Strengthening of the basophilic dye may indicate tissue «melting» after exposure to FSL. Hematoxylin-eosin staining: a) uneven surface of the limbal bed after removal of a mini-graft cut with microsurgical instruments; б) uneven surface of the limbal bed, after removal of the mini-graft cut by FSL with 100% energy, areas of tissue «melting» throughout the limbal bed; в) the surface of the limbal bed, after removal of the mini-graft cut out by FSL with an energy of 110%, is more even, there are areas of tissue «melting»; г) the smoothest surface of the limbal bed, after removal of a mini-graft cut with FSL at 120% energy. Light microscopy. $\times 40$

Оценка ультраструктуры коллагеновых волокон ложа методом сканирующей электронной микроскопии

При проведении сканирующей электронной микроскопии при увеличении $\times 50$ поверхность ложа лимбального трансплантата выглядела умеренно бугристой после воздействия ФСЛ, но отличалась четкими контурами боковых резов. В образцах ткани после выкраивания лимбального

трансплантата при помощи микрохирургических инструментов визуализировали лоскуты тканей, располагаемых более поверхностно, боковые и горизонтальный разрезы выглядели неровно, поверхность лимбального ложа была неравномерной в 37,5% случаев. На увеличении в $\times 1000$ визуализировали более выраженное разрежение тканевых структур с образованием округлых конгломератов на образцах, полученных при использовании ФСЛ (рис. 4).

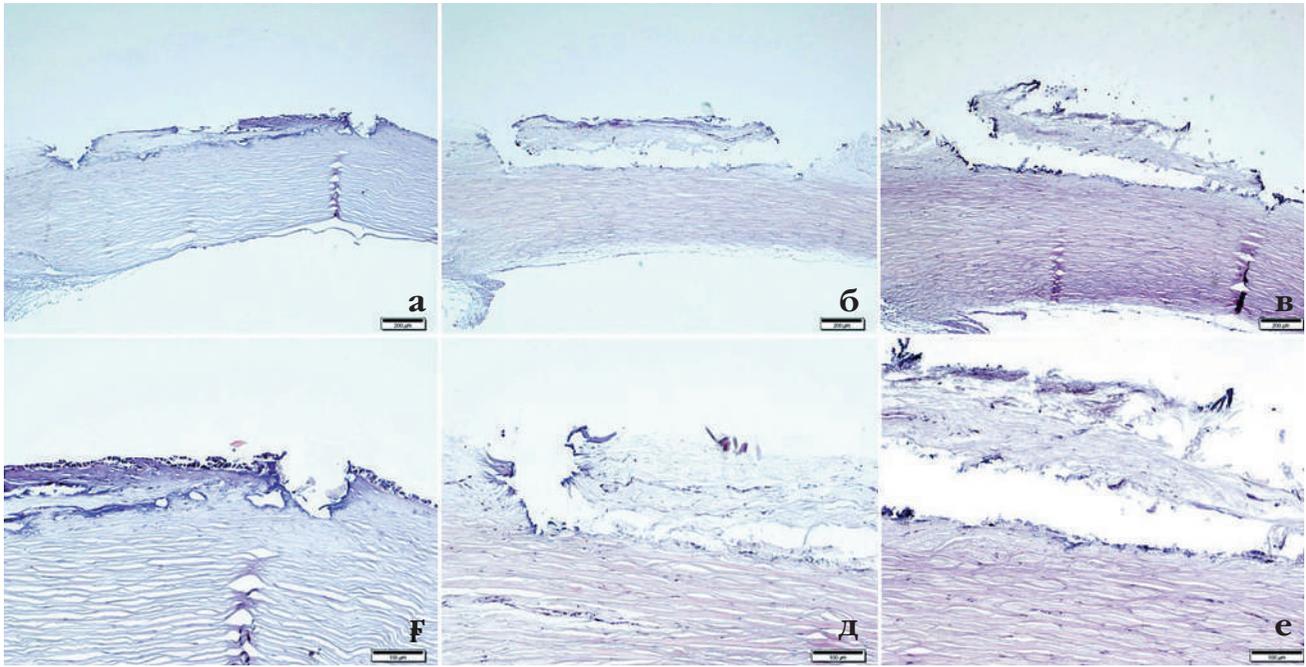


Рис. 3. Гистологическая картина лимбального ложа с неудаленными мини-трансплантатами, полученными на уровнях энергии: 100% (а, г) – визуализируются множественные «тканевые мостики» на протяжении всей поверхности лимбального ложа, из-за чего мини-трансплантат фиксирован в лимбальном ложе; 110% (б, д) – встречаются единичные «тканевые мостики», мини-трансплантат отделен от лимбального ложа; 120% (в, е) – полное отсутствие «тканевых мостиков», мини-трансплантат отделен от лимбального ложа. Окраска гематоксилин-эозином. Световая микроскопия. $\times 40, \times 100$

Fig. 3. Histological picture of the limbal bed with non-removed mini-grafts obtained at 100% energy levels (a, r) – multiple «tissue bridges» are visualized throughout the entire surface of the limbal bed, due to which the mini-graft is fixed in the limbal bed; 110% (б, д) – there are single «tissue bridges», the mini-graft is separated from the limbal bed; 120% (в, е) – complete absence of «tissue bridges», the mini-graft is separated from the limbal bed. Hematoxylin-eosin staining. Light microscopy. $\times 40, \times 100$

Оценка жизнеспособности лимбальных стволовых клеток

Для определения жизнеспособности ЛСК лимба роговицы применяли флуоресцентный краситель Live & Dead (Ab 115347, Abcam), позволяющий оценить некроз тканей в первые минуты после воздействия повреждающего фактора на ткани.

В опытной и контрольной группах по боковым поверхностям каждого мини-трансплантата, т.е. непосредственно в зоне прохождения лезвия либо ФСЛ, визуализировали мертвые клетки, дающие красную флуоресценцию. Однако в опытной группе мертвые клетки встречались чаще в сравнении с контрольной группой (рис. 5).

Оценка обратимого и необратимого апоптоза

Оценка обратимого и необратимого апоптоза проводилась в обеих группах после 7 дней культивирования выделенных мини-трансплантатов в среде DMEM/F12. Флюорохромирование ядер красителем Hoechst показало, что зоны лимба в обеих группах, в области которых был произведен разрез и подвергшиеся в дальнейшем обработке, экспрессии маркеров апоптоза выявля-

но не было, что подтверждает безопасность применения ФСЛ (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

Этап выкраивания лимбальных трансплантатов при проведении операции G-SLET является одним из ключевых, обеспечивающих успех операции. В ходе выделения фрагментов лимба они могут подвергаться механическому воздействию, а при использовании для этих целей ФСЛ дополнительным фактором повреждения является энергетический. Важным моментом является соблюдение геометрических параметров трансплантата, так как необходимо полностью захватить нишу ЛСК в зоне палисад Вогта. Последние, по данным литературы, располагаются на глубине в среднем $80,4 \pm 19,8$ мкм от поверхности роговицы [9]. Важность такого полноценного забора лимбальной ниши с ее микроокружением объясняется ее сложно организованной структурой, поскольку помимо клеток-предшественников лимбального эпителия – лимбальных эпителиальных стволовых клеток, в лимбальной нише располагаются мезенхимальные мульт-

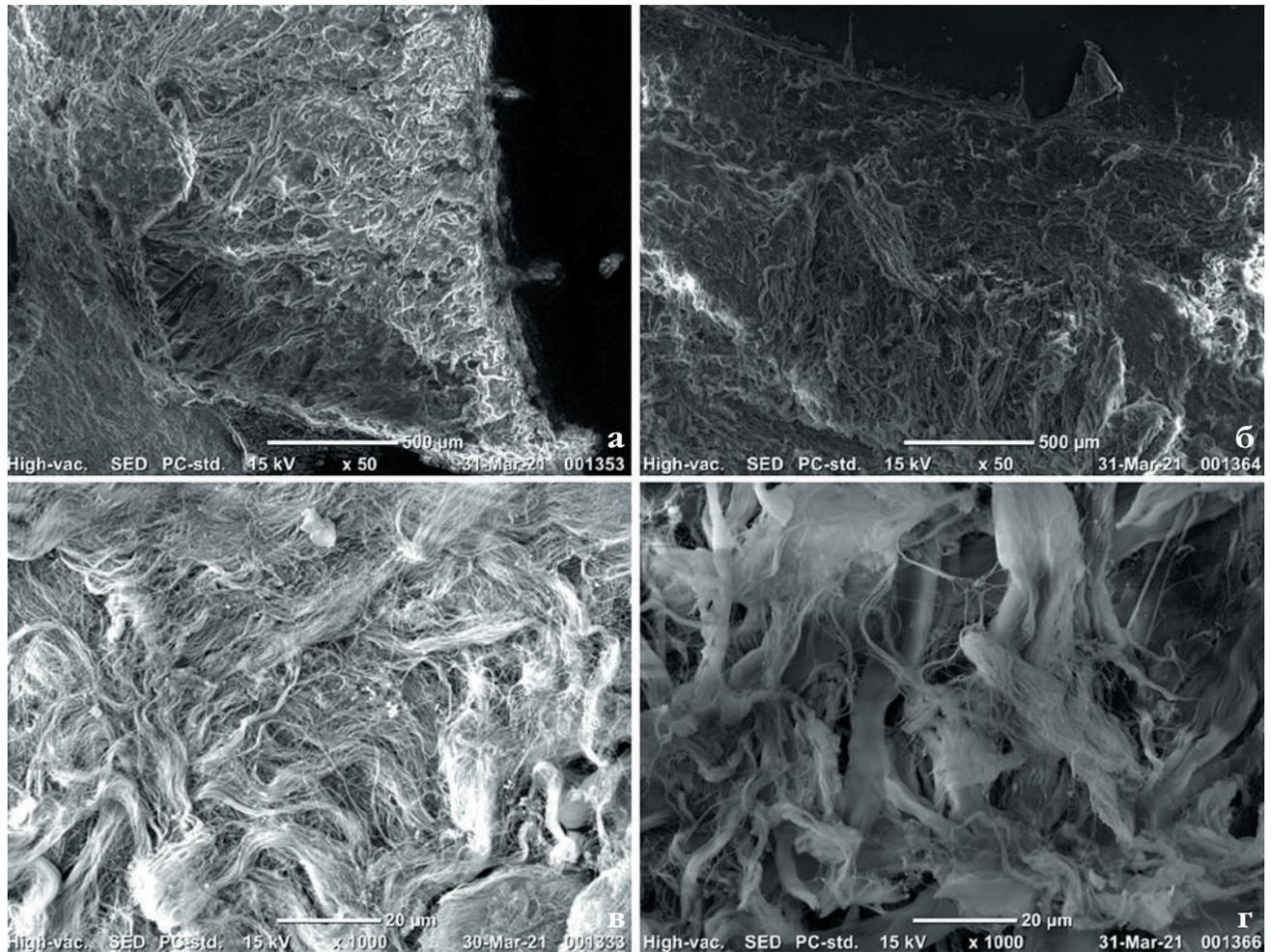


Рис. 4. Фото поверхности лимбального ложа после удаления мини-трансплантатов, полученных разными способами: а) поверхность лимбального ложа после удаления мини-трансплантата, выкроенного микрохирургическими инструментами; б) поверхность лимбального ложа после удаления мини-трансплантата, выкроенного ФСЛ. Сканирующая электронная микроскопия. $\times 50$; в) поверхность лимбального ложа после удаления мини-трансплантата, выкроенного микрохирургическими инструментами, – визуализируется сохранение нативности архитектоники структуры коллагеновых волокон; г) поверхность лимбального ложа после удаления мини-трансплантата, выкроенного ФСЛ, – структура коллагеновых волокон изменена, визуализируются нарушение архитектоники коллагеновых волокон, а именно образование спаянных коллагеновых волокон и образование тканевых конгломератов. Сканирующая электронная микроскопия. $\times 1000$

Fig. 4. Photo of the surface of the limbal bed after removal of mini-grafts obtained by various methods: а) the surface of the limbal bed after removal of a mini-graft cut with microsurgical instruments; б) the surface of the limbal bed after removal of the FSL-cut mini-graft. Scanning electron microscopy. $\times 50$; в) the surface of the limbal bed after removal of the mini-graft cut out with microsurgical instruments, the preservation of the native architectonics of the structure of collagen fibers is visualized; г) the surface of the limbal bed, after removal of the mini-graft cut out by FSL, the structure of collagen fibers is changed, a violation of the architectonics of collagen fibers is visualized, namely the formation of soldered collagen fibers and the formation of tissue conglomerates. Scanning electronic microscopy. $\times 1000$

типотентные стволовые клетки, меланоциты, иммунные клетки, сосудистые и нервные клетки, внеклеточный матрикс и сигнальные молекулы (факторы роста и цитокины) [10–15].

Очевидно, что получение равномерного по толщине и полноценного по структуре лимбального трансплантата, выкраиваемого вручную при помощи расслаивателя либо микрохирургического лезвия, более затруднительно, поскольку хирург на данном этапе работает бук-

вально «на глаз». Ряд практических ограничений, технические трудности и временные затраты, связанные в том числе с выкраиванием лимбального трансплантата и его фрагментацией на 8–10 фрагментов, делают операцию G-SLET сложной и для опытного хирурга.

Известно, что ФСЛ способен производить диссекцию тканей роговицы точно и равномерно [16, 17]. Изначально ФСЛ нашли широкое применение в области рефракционной хирургии и пришли на замену ми-

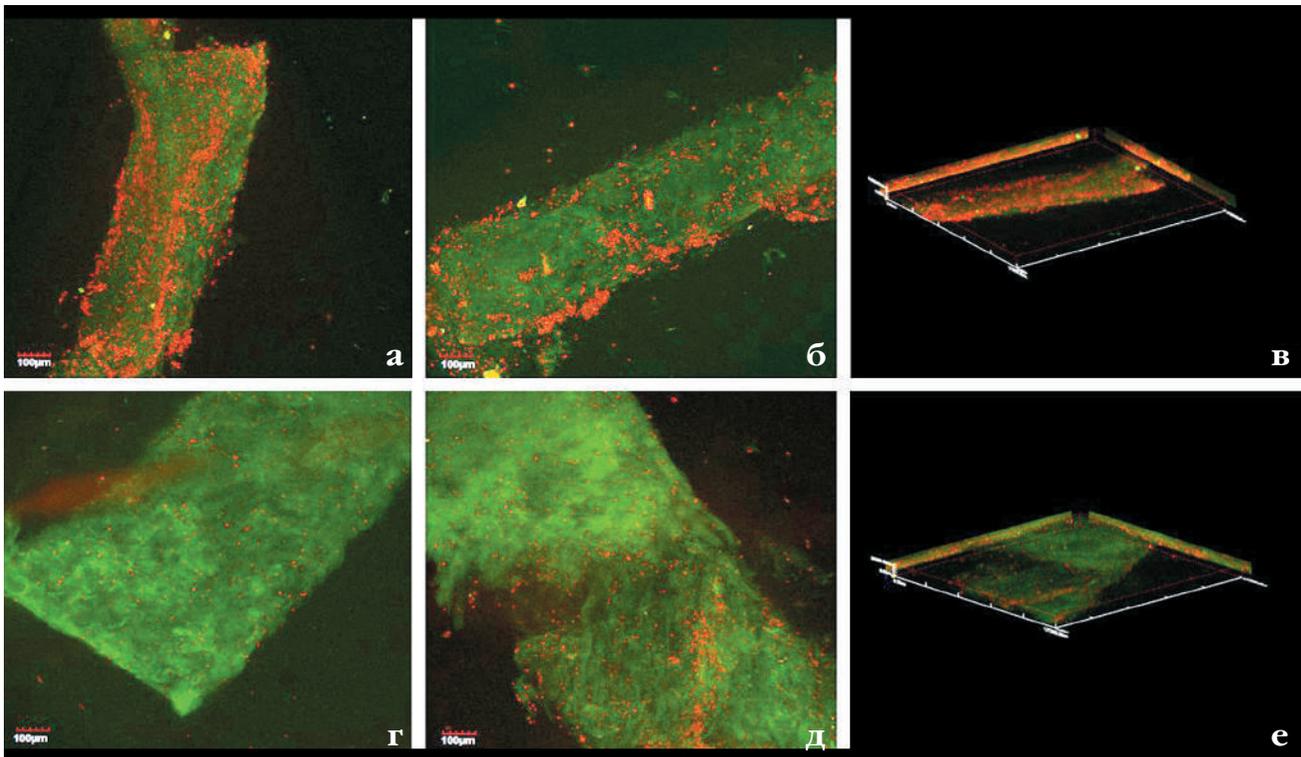


Рис. 5. Лимбальные мини-трансплантаты после окраски флуоресцентным красителем Live & Dead, полученные с применением ФСЛ (а, б, в) и с помощью микрохирургических инструментов (г, д, е). Живые клетки представлены зеленым цветом, мертвые – красным. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. $\times 100$

Fig. 5. Limbal mini-grafts after staining with Live & Dead fluorescent stain, obtained using FSL (a, б, в) and microsurgical instruments (г, д, е). Live cells are shown in green, dead cells in red. Confocal laser scanning microscopy. $\times 100$

крокератому при операции ЛАЗИК (лазерный *in situ* кератомилез). Согласно проведенным сравнениям двух технологий операции ЛАЗИК и фемто-ЛАЗИК (при котором формирование клапана роговицы производится ФСЛ), не выявило существенной разницы между ними. Обе операции были сравнимы по параметрам безопасности, эффективности и получению функционального результата. Тем не менее многие хирурги отмечают преимущества операции фемто-ЛАЗИК по предсказуемости формирования поверхностного клапана и получения меньшего количества осложнений [18, 19].

Современные ФСЛ используются при проведении различных видов кератопластики, для формирования роговичных туннелей, при хирургии птеригиума, удалении катаракты [20–25]. Недавние работы выявили потенциальную возможность использования ФСЛ у пациентов с непрозрачными роговицами [8].

В офтальмохирургии распространен целый ряд фемтолазерных систем, генерирующих импульсы с низкой энергией в диапазоне от мили- до нано-Джоулей (нJ). Особенность лазера LDV Z8 в том, что для рассеечения ткани в нем используется низкая энергия в диапазоне нJ и при этом генерация импульсов происхо-

дит с высокой частотой (до 10 МГц). Более низкие импульсы энергии, создаваемые LDV Z8, позволяют производить диссекцию с меньшей ответной реакцией ткани на воздействие лазера и меньшим количеством апоптических клеток, окружающих зону реза [26]. К преимуществам LDV Z8 мы также компактные размеры и мобильность лазера, а также встроенную систему интраоперационной визуализации на основе ОКТ.

В ходе проведения исследований *in vitro* нами установлено, что ФСЛ возможно применить в технологии трансплантации ЛСК. При этом значительно облегчается этап выкраивания и фрагментации лимбального трансплантата. Оптимальной энергией ФСЛ, при которой возможно выполнение горизонтального реза на глубине 250 мкм и получение полноценных лимбальных мини-трансплантатов, определена величина, равная 110%. Равномерность поверхности лимбального ложа и выполнение реза точно на заданной глубине подтверждены нами данными гистологического исследования и сканирующей электронной микроскопии.

Результаты прижизненной окраски красителем Live & Dead мы рассматривали как дополнительный, но не основной метод в оценке жизнеспособности клеток

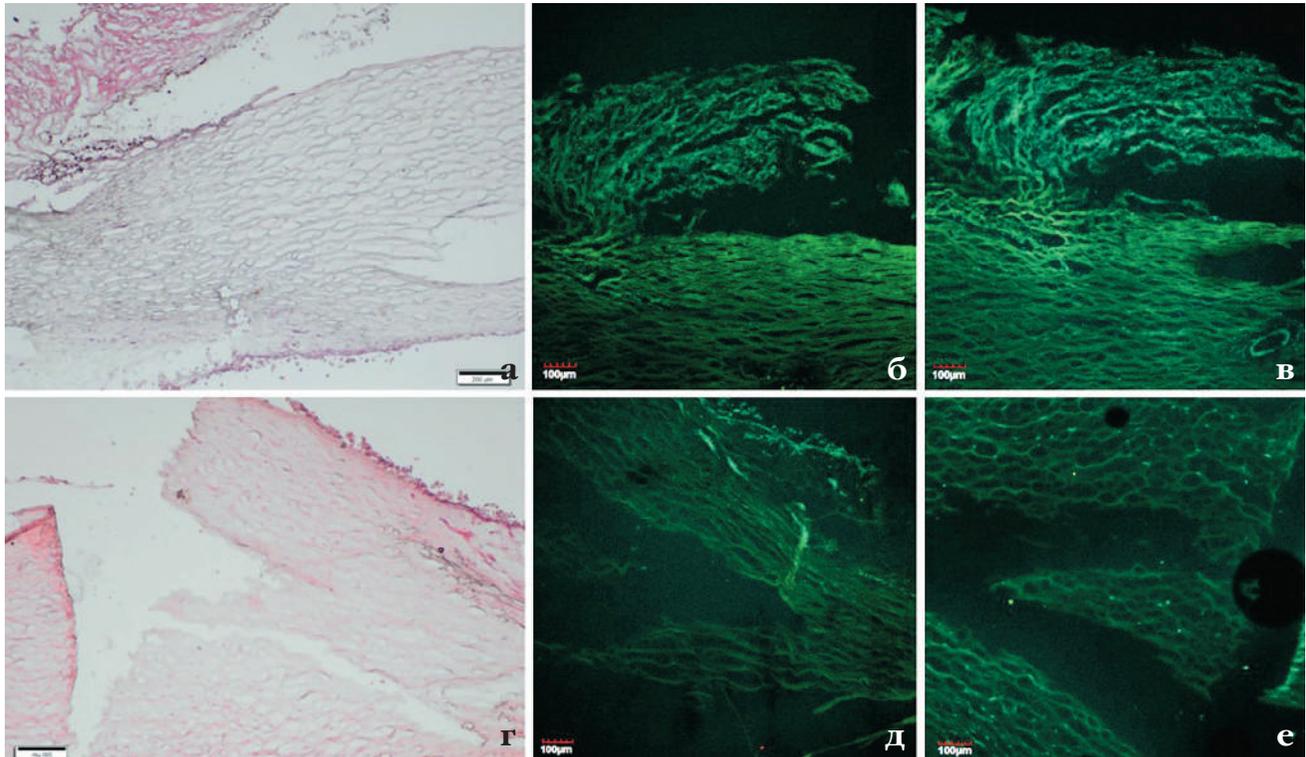


Рис. 6. Иммуногистохимическое окрашивание лимбального ложа с фиксированным мини-трансплантатом, полученных с применением ФСЛ (а, б, в) и с помощью микрохирургических инструментов (г, д, е). б, д – экспрессия цитохрома С (красный цвет) и BAX (зеленый цвет); в, е – экспрессии каспазы 8 (зеленый цвет) и каспазы 3 (красный цвет). Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. $\times 100$

Fig. 6. Immunohistochemical staining of the limbal bed with a fixed mini-graft obtained using FSL (a, б, в) and using microsurgical instruments (г, д, е). б, д – expression of cytochrome C (red) and BAX (green); в, е – expression of caspase 8 (green) and caspase 3 (red). Confocal laser scanning microscopy. $\times 100$

лимбального трансплантата, поскольку подсчет клеток был затруднителен ввиду их слабой дифференцировки на фоне непрозрачной ткани лимба. Визуальная оценка состояния каждого мини-трансплантата показала несколько большее повреждение клеток мини-трансплантатов в опытной группе, в которой использовали ФСЛ. Однако данные ИГХ-исследования образцов ткани корнеосклеральных дисков, содержащих выкроенные и не отделенные от лимбального ложа мини-трансплантаты, после 7 дней культивирования в среде DMEM/F12 продемонстрировали активный выход клеточной популяции, что позволяет сделать заключение об отсутствии проапоптотического влияния ФСЛ на клеточные компоненты мини-трансплантатов, что, в свою очередь, подтверждает безопасность применения ФСЛ и сохранение нормальной пролиферативной активности компонентов лимбальной ниши.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами разработана принципиально новая технология выкраивания и фрагментации мини-трансплантатов, со-

держающих ЛСК на базе использования ФСЛ Femto LDV Z8. Технология представляется нам безопасной с точки зрения сохранности ЛСК и перспективной для использования в клинической практике у пациентов с односторонним СЛН по методу GSLET. Подобранные оптимальные параметры работы лазера в лимбальной зоне – плоскостной рез на глубине 250 мкм с использованием 110% уровня энергии лазера.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Choi SK, Kim JH, MD, Lee D, Oh SH. New surgical technique: A femtosecond laser-assisted keratolimbal allograft procedure. *Cornea*. 2010;29: 924–929.
2. Brown SI, Bloomfield SE, Pearce DB. Follow-up report on transplantation of the alkali burned cornea. *Am J Ophthalmol*. 1974;77: 538e42.
3. Tseng SC. Concept and application of limbal stem cells. *Eye*. 1989;3: 141e57.
4. Sangwan VS, Basu S, MacNeil S, et al. Simple limbal epithelial transplantation (SLET): a novel surgical technique for the treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol*. 2012;96: 931–934.
5. Basu S, Sureka SP, Shanbhag SS, et al. Simple limbal epithelial transplantation: long-term clinical outcomes in 125 cases of unilateral chronic ocular surface burns. *Ophthalmology*. 2016;123: 1000–1010.

6. Malyugin B, Kalinnikova S, Isabekov R, Ostrovskiy D, Knyazer B, Gerasimov M. Diagnostic algorithm for surgical management of limbal stem cell deficiency. *J Diagnostics (Basel)*. 2023;13(2): 199. doi: 10.3390/diagnostics13020199
7. Malyugin B, Kalinnikova S, Knyazer B, Gerasimov M. Midterm outcomes of autologous glueless simple limbal epithelial transplantation for unilateral limbal stem cell deficiency. *Cornea*. 2023. doi: 10.1097/ICO.0000000000003279
8. Kim JH, Yum JH, Lee D, et al. Novel technique of corneal biopsy by using a femtosecond laser in infectious ulcers. *Cornea*. 2008;27: 363–365.
9. Ramirez BE, Victoria DA, Murillo GM, Herreras JM, Calonge M. In vivo confocal microscopy assessment of the corneal limbal stem cell niche before and after biopsy for cultivated limbal epithelial transplantation to restore corneal epithelium. *Histol Histopathol*. 2015;30(2): 183–192. doi: 10.14670/HH-30.183
10. Parfitt GJ, Kavianpour B, Wu KL, Xie Y, Brown DJ, Jester JV. Immunofluorescence tomography of mouse ocular surface epithelial stem cells and their niche microenvironment. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56: 7338–7344.
11. Grieve K, Ghoubay D, Georgeon C, Thouvenin O, Bouheraoua N, Paques M, et al. Three-dimensional structure of the mammalian limbal stem cell niche. *Exp Eye Res*. 2015;140: 75–84.
12. Ramirez BE, Victoria DA, Murillo GM, Herreras JM, Calonge M. In vivo confocal microscopy assessment of the corneal limbal stem cell niche before and after biopsy for cultivated limbal epithelial transplantation to restore corneal epithelium. *Histol Histopathol*. 2015;30: 183–192.
13. Massie I, Dziasko M, Kureshi A, Levis HJ, Morgan L, Neale M, et al. Advanced imaging and tissue engineering of the human limbal epithelial stem cell niche. *Methods Mol Biol*. 2015;1235: 179–202.
14. Nubile M, Curcio C, Dua HS, Callieno R, Lanzini M, Iezzi M, et al. Pathological changes of the anatomical structure and markers of the limbal stem cell niche due to inflammation. *Mol Vis*. 2013;19: 516–525.
15. Notara M, Shortt AJ, O'Callaghan AR, Daniels JT. The impact of age on the physical and cellular properties of the human limbal stem cell niche. *Age*. 2013;35: 289–300.
16. Kim JH, Lee D, Rhee KI. Flap thickness reproducibility in laser in situ keratomileusis with a femtosecond laser: optical coherence tomography measurement. *J Cataract Refract Surg*. 2008;34: 132–136.
17. Sarayba MA, Ignacio TS, Tran DB, et al. A 60 kHz IntraLase femtosecond laser creates a smoother LASIK stromal bed surface compared to a Zyoptix XP mechanical microkeratome in human donor eyes. *J Refract Surg*. 2007;23: 331–337.
18. Kohnen T, Steinwender G. Laser-in-situ-Keratomileusis mit Mikrokeratom oder Femtosekundenlaser [Laser in situ keratomileusis with microkeratome or femtosecond laser]. *Ophthalmologie*. 2017;114(7): 661–665. (In German) doi: 10.1007/s00347-017-0517-8
19. Chen S, Feng Y, Stojanovic A et al (2012) IntraLase femtosecond laser vs mechanical microkeratomes in LASIK for myopia: a systematic review and meta-analysis. *J Refract Surg*. 1995;(28): 15–24.
20. Terry MA, Ousley PJ, Will B. A practical femtosecond laser procedure for DLEK endothelial transplantation: cadaver eye histology and topography. *Cornea*. 2005;24: 453–459.
21. Seitz B, Brunner H, Viestenz A, et al. Inverse mushroom-shaped nonmechanical penetrating keratoplasty using a femtosecond laser. *Am J Ophthalmol*. 2005;139: 941–944.
22. Meltendorf C, Schroeter J, Bug R, et al. Corneal trephination with the femtosecond laser. *Cornea*. 2006;25: 1090–1092.
23. Holzer MP, Rabsilber TM, Auffarth GU. Penetrating keratoplasty using femtosecond laser. *Am J Ophthalmol*. 2007;143: 524–526.
24. Sarayba MA, Maguen E, Salz J, et al. Femtosecond laser keratome creation of partial thickness donor corneal buttons for lamellar keratoplasty. *J Refract Surg*. 2007;23: 58–65.
25. Steinert RF, Ignacio TS, Sarayba MA. «Top hat»-shaped penetrating keratoplasty using the femtosecond laser. *Am J Ophthalmol*. 2007;143: 689–691.
26. Riau AK, Liu Y-C, Lwin NC, et al. Comparative study of nJ- and µJ-energy level femtosecond lasers: evaluation of flap adhesion strength, stromal bed quality, and tissue responses. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55: 3186–3194. doi: 10.1167/iovs.14-14434

Информация об авторах

Борис Эдуардович Малюгин, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, академик РАЕН, зам. генерального директора по научной работе, boris.malyugin@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5666-3493>
Сергей Анатольевич Борзенко, д.м.н., профессор, академик РАЕН, 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>

Ольга Николаевна Нефедова, аспирант, врач-офтальмолог, dr.olganefedova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2126-000X>
Дмитрий Сергеевич Островский, к.б.н., заведующий лабораторией трансплантологии и клеточной биологии Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем, dmitriyostrovskiy@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2817-7102>
Максим Юрьевич Герасимов, врач-офтальмолог, младший научный сотрудник лаборатории трансплантологии и клеточной биологии, gerasimovmy@mntk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3433-8352>
Анна Викторовна Шацких, к.м.н., заведующая лабораторией патологической анатомии и гистологии глаза, avsatik07@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3437-8162>

Information about the authors

Boris E. Malyugin, Doctor of Sciences in Medicine, Professor, Corresponding member of RAS, Deputy general director for science, boris.malyugin@gmail.com, <https://orcid.org/0000000156663493>
Sergey A. Borzenok, Doctor of Science in Medicine, Head of the Center for Fundamental Science, Academician of the RANS, mdborzenok@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9160-6240>
Olga N. Nefedova, PhD Student, Ophthalmologist, dr.olganefedova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2126-000X>
Dmitrii 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>
Maksim Yu. Gerasimov, Ophthalmologist, Junior Researcher, gerasimovmy@mntk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3433-8352>
Anna V. Shatskikh, PhD in Medicine, Head of the laboratory of pathological anatomy and histology of the eye, avsatik07@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3437-8162>

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, окончательное утверждение версии, подлежащей публикации
О.Н. Нефедова: существенный вклад в концепцию и дизайн работы, сбор, анализ и обработка материала, написание текста.
Д.С. Островский: редактирование.
М.Ю. Герасимов: редактирование.
А.В. Шацких: редактирование.

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, final approval of the version to be published.
O.N. Nefedova: significant contribution to the concept and design of the work, collection, analysis and processing of material, writing.
D.S. Ostrovskii: editing.
M.Yu. Gerasimov: editing.
A.V. Shatskikh: editing.

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: 26.10.2023
 Переработана: 12.12.2024
 Принята к печати: 01.02.2024*

*Originally received: 26.10.2023
 Final revision: 12.12.2024
 Accepted: 01.02.2024*