

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-3-167-173

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ УЛЬТРАТОНКОГО ЗАДНЕГО ПОСЛОЙНОГО ТРАНСПЛАНТАТА РОГОВИЦЫ В УСЛОВИЯХ ГЛАЗНОГО ТКАНЕВОГО БАНКА

А.К. Ахмедов¹, Т.З. Керимов², Х.Д. Тонаева¹, Б.Э. Малюгин¹, С.А. Борзенок^{1, 2}

¹ ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Цель исследования. Разработка технологии предоперационной подготовки заднего послойного трансплантата роговицы на основе собственной рецептуры консервационной среды для оптимальной дегидратации донорской роговицы и техники выкраивания ультратонкого лоскута оптимизированным методом в условиях Глазного тканевого банка. **Материалы и методы.** В серии экспериментальных исследований получены данные по уровню гидратации консервированных в различных растворах трупных донорских роговиц на разных сроках наблюдения. На примере 16 роговиц проведено аналитическое взвешивание и пахиметрия с использованием оптического когерентного томографа в опытной (n = 8) и контрольной (n = 8) группах, после чего оценивали морфофункциональные характеристики эндотелиального пласта клеток роговицы. На следующем этапе работы из 16 роговиц после гипотермической консервации в опытном (n = 8) и контрольном (n = 8) растворе были сформированы ультратонкие трансплантаты по методике одинарного прохода микрокератомом с последующей микроскопией образцов на растровом электронном микроскопе. **Результаты.** После первых суток консервации в предложенном растворе была выявлена дегидратация на 9% роговиц опытной группы по сравнению с образцами контрольной группы. По окончании 4-х суток консервации при исследовании жизнеспособности эндотелиального пласта клеток ультратонких трансплантатов роговиц методом иммунофлюоресцентной микроскопии с использованием маркера «Live and dead» достоверной разницы между группами выявлено не было (p > 0,05). Проведенная сканирующая электронная микроскопия выявила сохранность архитектоники коллагеновых волокон роговиц, консервированных в предложенной среде. **Заключение.** Предложенная технология может быть рекомендована для применения в условиях глазных тканевых банков для формирования ультратонкого трансплантата роговицы на предоперационном этапе.

Ключевые слова: ультратонкий послойный трансплантат роговицы, раствор для консервации, глазной тканевой банк, кератопластика.

TECHNOLOGY FOR OBTAINING AN ULTRATHIN POSTERIOR LAMELLAR CORNEAL GRAFT AT THE EYE TISSUE BANK

A.K. Ahmedov¹, T.Z. Kerimov², Kh.D. Tonaeva¹, B.E. Malygin¹, S.A. Borzenok^{1, 2}

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

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

Objective: to develop technologies for preoperative preparation of the posterior lamellar corneal graft based on our own formulation of the preservation medium for optimal dehydration of the donor cornea and a technique for cutting out an ultrathin flap using an optimized method at the Eye Tissue Bank. **Materials methods.** In a series of experimental studies, we obtained data on the hydration level of cadaveric donor corneas that were preserved in various solutions at different observation periods. Using 16 corneas, analytical weighing and pachymetry were

Для корреспонденции: Тонаева Хадизжат Джанхуватовна. Адрес: 127486, Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59а. Тел. (905) 515-66-11. E-mail: dr.tonaeva@gmail.com

Corresponding author: Khadizhat Tonaeva. Address: 59 A, Beskudnikovsky Boulevard, Moscow, 127486, Russian Federation. Phone: (905) 515-66-11. E-mail: dr.tonaeva@gmail.com

performed via optical coherence tomography in the experimental ($n = 8$) and control ($n = 8$) groups. Morphological and functional characteristics of the corneal endothelium were then assessed. At the next stage of work, ultrathin grafts were formed from 16 corneas after hypothermic preservation in the experimental ($n = 8$) and control ($n = 8$) solutions by single-pass microkeratome, followed by microscopy of the samples using a scanning electron microscope. **Results.** After the first days of preservation in the proposed solution, there was dehydration of 9% cornea in the experimental group in comparison with the samples of the control group. After 4 days of preservation, there was no reliable difference found between the groups ($p > 0.05$) in the study of the endothelial cell viability of ultra-thin corneal grafts by immunofluorescent microscopy using the «Live and dead» marker. Scanning electron microscopy revealed that corneal stromal collagen fibers, preserved in the proposed medium, retained their integrity. **Conclusion.** The proposed technology can be recommended for use at eye banks for formation of an ultra-thin corneal graft at the preoperative stage.

Keywords: ultrathin lamellar corneal graft, preservation solution, eye bank, keratoplasty.

ВВЕДЕНИЕ

Сквозная кератопластика (СКП) долгое время считалась «золотым стандартом» хирургического лечения больных с эпителиально-эндотелиальной дистрофией (ЭЭД) роговицы. С целью улучшения биологических и функциональных результатов приживления больших трансплантатов роговицы в разное время предлагались различные модификации СКП, а именно: грибовидная, конусная, ступенчатая кератопластики [1]. Однако СКП и ее модификации по-прежнему не исключают возникновения ряда существенных проблем: проведение операции сопровождается объемной и длительной разгерметизацией глазного яблока, что приводит к риску геморрагических и инфекционных осложнений, в посттрансплантационном периоде нередко развиваются иммунобиологические реакции тканевой несовместимости и появляются индуцированные аметропии различной степени выраженности, приводящие к неудовлетворительному оптическому результату [2, 3]. Для исключения вышеперечисленных проблем, связанных с СКП, и ведущей роли эндотелиального слоя в развитии ЭЭД с середины прошлого столетия были предложены различные техники замены задних слоев роговицы, однако в 2001 году М.А. Тергу была разработана техника послойной замены поврежденных задних слоев роговицы, названная эндотелиальной кератопластикой и выполняемая с помощью высокоточного, высокотехнологичного микрохирургического оборудования и инструментария [4]. К настоящему времени предложено несколько модификаций эндотелиальной кератопластики, одна из которых – задняя автоматизированная послойная кератопластика (ЗАПК, или DSAEK), получившая наибольшее распространение в клинике для лечения больных с ЭЭД роговицы различного генеза [5–7]. Суть операции ЗАПК заключается в удалении десцеметовой мембраны со слоем пораженного эндотелия роговицы реципиента и замене выкроенным трансплантатом задних слоев донорской роговицы через разрез шириной 3 мм с использованием модифициро-

ванного слайдера Busin и последующим прижатием лоскута к задней поверхности роговицы стерильным воздухом [8, 9]. При этом все этапы автоматизированного выкраивания заднего трансплантата роговицы проводятся исключительно в операционной, параллельно с манипуляциями на глазу пациента, что затягивает время проведения операции. Помимо этого, вынужденная спешка хирурга при интраоперационном выполнении срезов донорской роговицы нередко заканчивается перфорацией ультратонкого трансплантата и отменой операции. До настоящего времени как в России, так и за рубежом отсутствуют рецептуры консервационных сред для номинальной дегидратации донорской роговицы и оптимальная техника выкраивания ультратонких трансплантатов (50–145 мкм, в среднем 127 мкм) методом одинарного прохода микрокератомом в условиях Глазного тканевого банка на этапе предоперационной подготовки [10–14]. Актуальность проблемы и нерешенность вышеперечисленных положений в технологии ЗАПК обусловили цель данного исследования.

Цель исследования – разработка технологии предоперационной подготовки заднего послойного трансплантата роговицы на основе собственной рецептуры консервационной среды для оптимальной дегидратации донорской роговицы и техники выкраивания ультратонкого лоскута оптимизированным методом в условиях Глазного тканевого банка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовались жизнеспособные трупные роговицы человека, полученные из Глазного тканевого банка ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, в количестве 32 от 16 доноров. Одна роговица от каждого донора являлась контрольной, другая, парная, служила опытным образцом. Роговицы, составляющие контрольную группу, помещали во флаконы с базовой средой для консервации [15]. Роговицы, входящие в опытную группу, консервировали во флаконах с заявленным ранее «средством для консервации заднего послойного трансплантата донор-

ской роговицы» [16], которое за счет входящих в его состав фармакологических компонентов обладает мембраностабилизирующим и мембрановосстанавливающим действием. На первом этапе проводилось изучение уровня гидратации стромы консервированных донорских роговиц опытной ($n = 8$) и контрольной групп ($n = 8$) методом аналитического взвешивания (Sartorius BP 210S, Германия) и пахиметрии с помощью оптического когерентного томографа (Optovue, iVue 100, США) на 0, 1, 2, 3 и 4-е сутки исследования. По окончании консервации проводили морфофункциональное исследование жизнеспособности эндотелиальных клеток полученных ультратонких трансплантатов роговицы с помощью метода иммунофлюоресцентной микроскопии (Olympus FV 10i, Япония) с использованием маркера «Live and dead» (Abcam, Великобритания). На основании полученных данных определяли срок консервации, при котором достигается оптимальная дегидратация донорских роговиц. Затем переходили ко второму этапу исследования, на котором роговицы контрольной ($n = 8$) и опытной ($n = 8$) групп консервировали в течение 2 суток в указанных растворах. На 2-е сутки консервации из роговиц обеих групп под контролем оптического когерентного томографа (Optovue, iVue 100, США) формировали ультратонкие задние послойные трансплантаты с использованием микрократома (Moria, Франция) путем одинарного прохода режущей головкой 550 мкм (Moria, Франция). Затем образцы обеих групп подвергались микроскопии с использованием растрового электронного микроскопа (JEOL JCM-6000, Япония) для оценки ультраструктуры эндотелиального клеточного слоя, ориентации и повреждения коллагеновых волокон стромы, а также профиля среза.

ОБРАБОТКА ДАННЫХ

Для подсчета эндотелиальных клеток ультратонких задних послойных трансплантатов была использована программа CellProfile, которая позволяет провести количественный анализ изображений окрашенных клеток.

Статистический анализ полученных данных был проведен с помощью программы Graph Pad Prizm7.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам первого этапа проведенного исследования, измерение веса и пахиметрия донорских роговиц, были определены дегидратация и уменьшение толщины на 9% от исходной в опытной группе на 1-е сутки консервации с постепенным увеличением и достижением номинальной величины (вес $0,195 \pm 15$ г, толщина 648 ± 35 мкм) к 3-м суткам, в контрольной группе гидратация (увеличение толщины и веса) наблюдалась с первых суток консервации. Па-

химетрическая оценка с использованием оптического когерентного томографа на всех сроках наблюдения в опытной и контрольной группах показана на рис. 1.

Таким образом, выявлена корреляция между весом и толщиной исследуемых роговиц в процессе консервации. Определена степень дегидратации в первые двое суток в опытной группе и гидратацией в контрольной уже с первых суток консервации. Кроме того, было выявлено, что начиная с 3-х суток гидратация в опытной группе достигала номинальных значений с тенденцией к увеличению, поэтому дальнейшее наблюдение стало нецелесообразным. Таким образом, разработанная в данном исследовании опытная консервационная среда [16] обеспечивает более выраженную дегидратацию роговицы в течение первых 2 суток хранения по сравнению со стандартной консервационной средой, используемой в контрольной группе.

По окончании 4-х суток консервации при исследовании жизнеспособности эндотелиальных клеток ультратонких трансплантатов роговицы методом иммунофлюоресцентной микроскопии с использованием маркера «Live and dead» достоверной разницы между группами выявлено не было ($p > 0,05$): 88,4% живых клеток, 11,6% мертвых клеток в опытной группе (рис. 2, а) и 87,9% живых и 12,1% мертвых клеток в контрольной группе (рис. 2, б). Таким образом, несмотря на дегидратацию в группе эксперимента, исследование морфофункциональной сохранности эндотелиальных клеток ультратонкого трансплантата достоверной разницы с контрольной группой не выявило, что исключает токсический и повреждающий эффект консервационной среды, созданной по предложенной рецептуре.

На втором этапе исследования ультратонкие задние послойные трансплантаты в обеих группах формировались с использованием продольного микрократома путем одинарного прохода режущей головкой 550 мкм (Moria, Франция). Было отмечено, что в опытной группе за счет меньшей гидратации донорских роговиц одинарный проход режущей головкой позволяет формировать статистически достоверно ($p < 0,05$) более тонкие задние послойные трансплантаты (123 ± 27 мкм) по сравнению с контрольной (190 ± 35 мкм) (рис. 3, а–б).

Полученные результаты сканирующей электронной микроскопии сформированных по предложенной технике ультратонких трансплантатов демонстрируют сохранность архитектоники коллагеновых волокон роговиц, консервированных в предложенной среде (рис. 4, а), и признаки гидратации волокон роговицы из контрольной группы на 2-е сутки консервации (рис. 4, б). Дополнительно изображение ультраструктуры трансплантата опытной группы представлено на рис. 5.

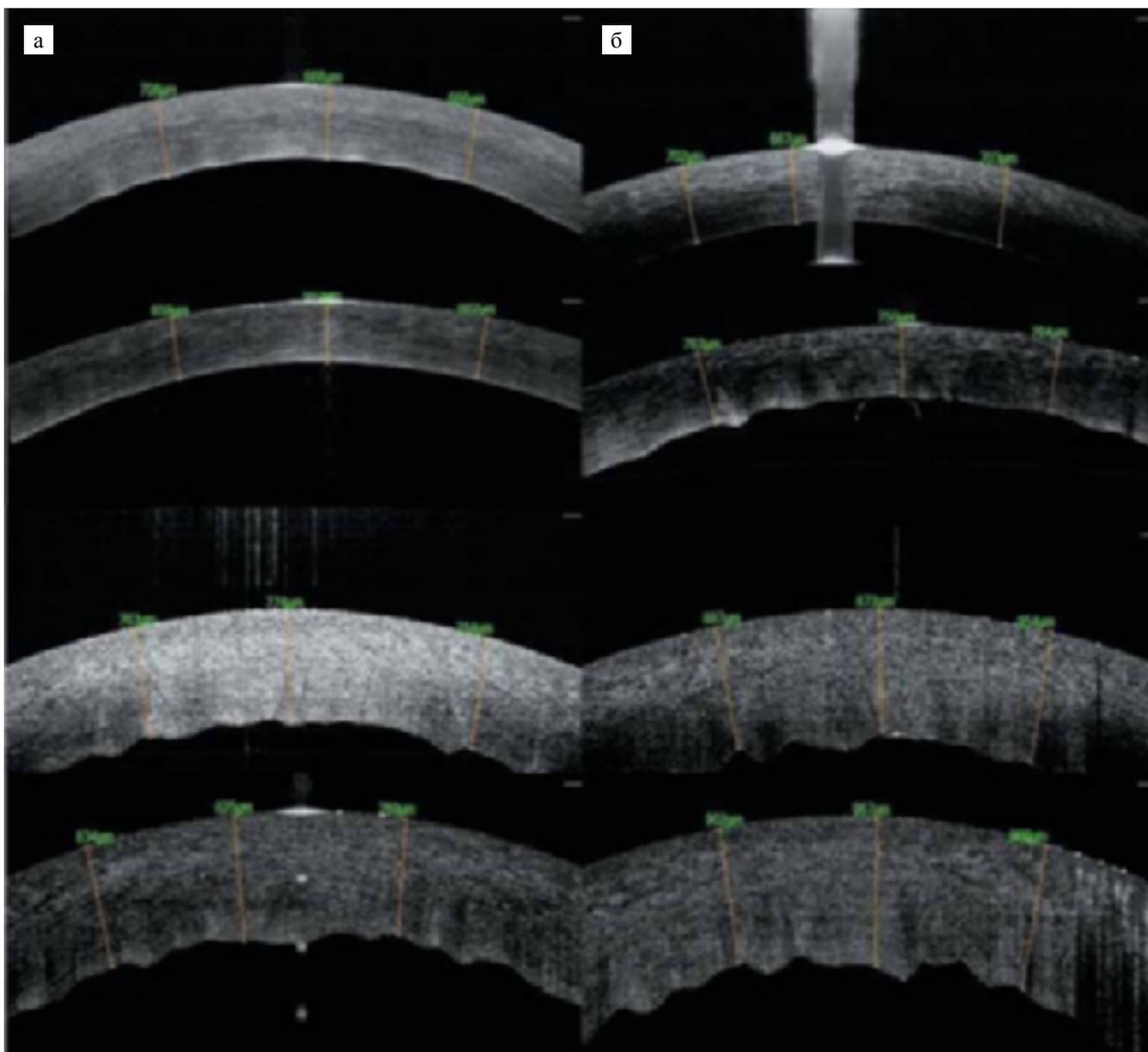


Рис. 1. ОКТ-картина изменения толщины донорской роговицы в опытной (а) и контрольной (б) группе на 0 (1), 1 (2), 3 (3) и 4-е (4) сутки исследования

Fig. 1. OCT-picture of changes in the thickness of the donor cornea in the experimental (а) and control (б) group on the 0th (1), 1st (2), 3rd (3) and 4th (4) day of the study

ОБСУЖДЕНИЕ

Преимущество селективной эндотелиальной кератопластики на данный момент не вызывает сомнений. Проведение операции в условиях «закрытого неба» существенно снижает риск развития опасных интраоперационных осложнений, кроме того, отсутствие обширного сквозного рубца и полное сохранение стромы позволяет сохранить биомеханическую устойчивость роговицы к травме, иннервацию и трофику роговицы реципиента, минимизировать индуцированный астигматизм. В целом это способствует сокращению срока клинической и зрительной реби-

литации больных после трансплантации донорской роговицы. Задняя автоматизированная послойная кератопластика (ЗАПК) в настоящее время является наиболее часто используемым хирургическим методом реабилитации больных с эпителиально-эндотелиальной дистрофией роговицы различного генеза в развитых странах. Однако до сих пор нерешенным остается вопрос о возможности повышения клинико-функциональных результатов ЗАПК путем использования трансплантатов задних слоев донорской роговицы с минимальной толщиной остаточной стромы. В этой связи на базе глазных тканевых банков может применяться предлагаемая технология заготовки ульт-

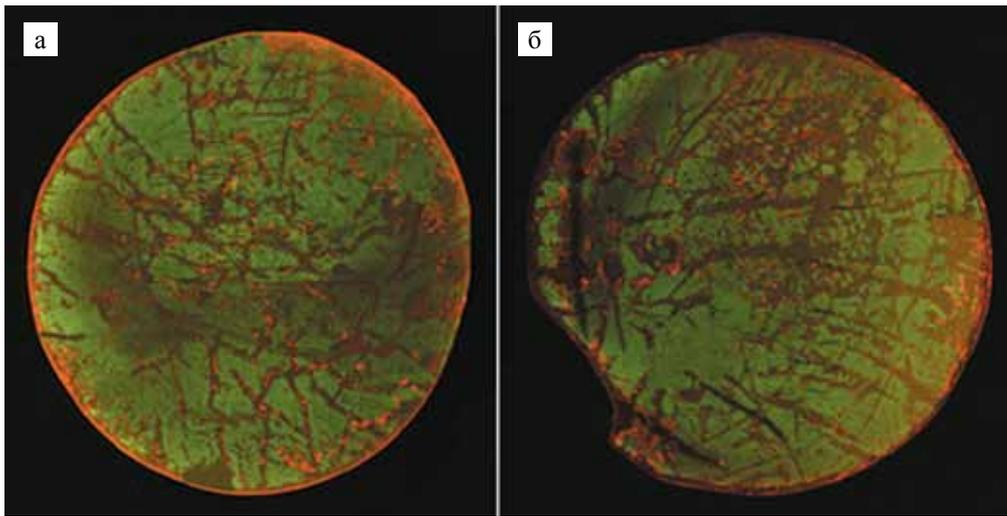


Рис. 2. Флуоресцентная окраска эндотелиальных клеток заднего послойного трансплантата роговицы на 4-е сутки консервации, «Live and dead», в опытной (а) и контрольной (б) группе. Лазерно-сканирующая микроскопия, $\times 100$. Окрашивание: зеленое – живые клетки, красное – мертвые

Fig. 2. Fluorescence staining of endothelial cells of the posterior corneal graft on the 4th day of conservation, Live and dead, in the experimental (a) and control (б) group. Laser scanning microscopy, $\times 100$. Staining: green – living cells, red – dead

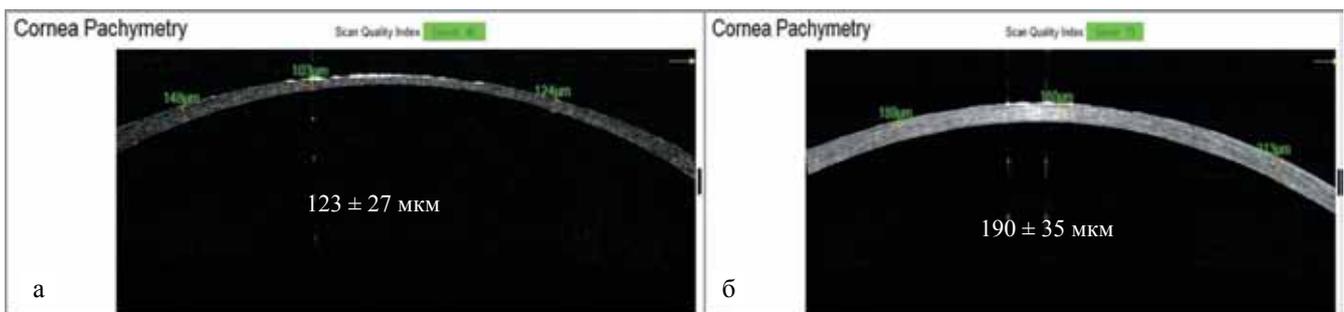


Рис. 3. ОКТ-картина ультратонкого заднего трансплантата донорской роговицы из опытной (а) и контрольной (б) группы

Fig. 3. OCT picture of an ultrathin posterior transplant of a donor cornea from the experimental (a) and control (б) groups

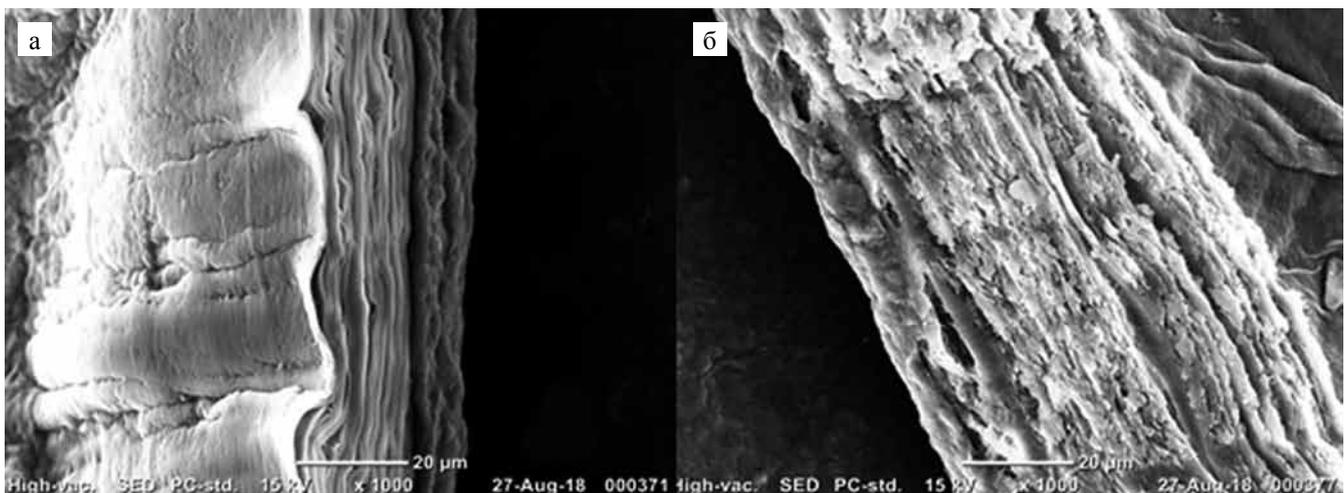


Рис. 4. Картина среза ультратонкого заднего послойного трансплантата на 2-е сутки консервации в опытной (а) и контрольной (б) группе. Электронно-сканирующая микроскопия, $\times 1000$

Fig. 4. The picture of the slice of the ultrathin posterior transplant on the 2nd day of conservation in the experimental (a) and control (б) group. Scanning electron microscopy, $\times 1000$

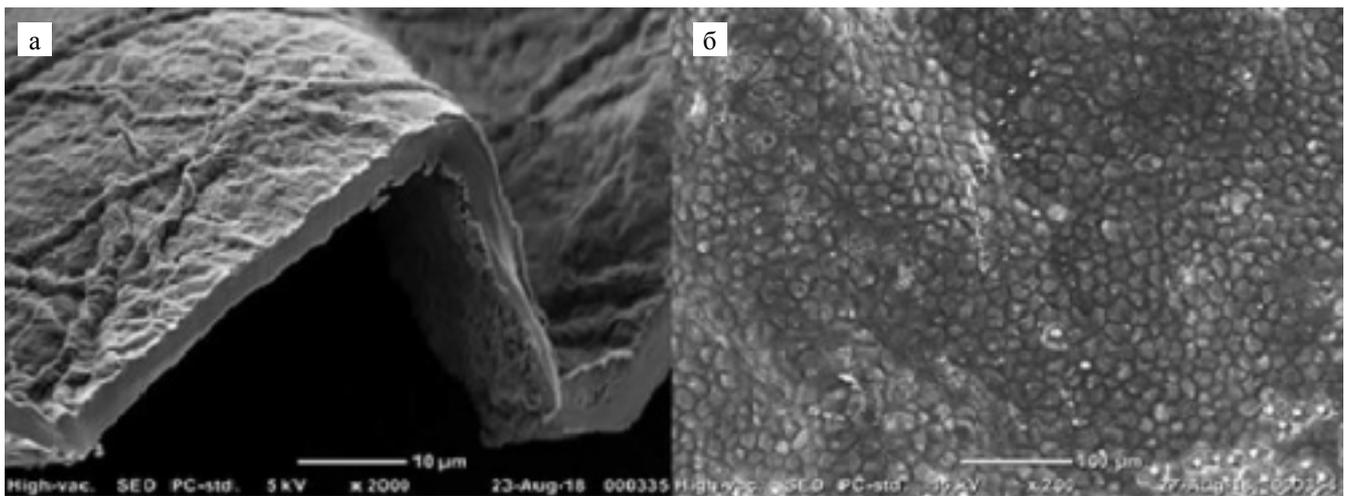


Рис. 5. Картина профиля среза (а) и эндотелиального пласта клеток (б) ультратонкого заднего послойного трансплантата на 2-е сутки консервации в опытной группе. Электронно-сканирующая микроскопия, а – $\times 2000$, б – $\times 200$

Fig. 5. Pictures of the profile of the slice (a) and endothelial layer of cells (б) of the ultrathin posterior graft on the 2nd day of conservation in the experimental group. Scanning electron microscopy, а – $\times 2000$, б – $\times 200$

тратонкого лоскута трупной донорской роговицы на основе созданной консервационной среды для дегидратации и оптимизированной техники выкраивания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная в данном исследовании консервационная среда [16] обеспечивает более выраженную дегидратацию роговицы в течение первых 2 суток культивирования по сравнению со стандартной консервационной средой. Было показано, что данный факт позволяет получить трансплантат задних слоев роговицы толщиной 123 ± 27 мкм путем одиарного прохода микрокератомом с головкой 550 мкм по сравнению с толщиной 190 ± 35 мкм, полученной в контрольной группе. Изучение морфофункциональной сохранности эндотелиальных клеток ультратонкого трансплантата роговицы не выявило достоверной разницы с контрольной группой, что исключает токсический и повреждающий эффект консервационной среды, созданной по предложенной рецептуре. Таким образом, предложенная консервационная среда может быть использована для получения ультратонких трансплантатов задних слоев роговицы и повышения тем самым функциональных результатов операции.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Flynn TH, Larkin DFP. Penetrating Keratoplasty. *Encyclopedia of the Eye*. 2010; 290–295. doi.org/10.1016/B978-0-12-374203-2.00010-5.
2. Борзенко СА. Медико-технологические и методологические основы эффективной деятельности глазных тканевых банков России в обеспечении операций по сквозной трансплантации роговицы: дис. ... докт. мед. наук. М., 2008. 306. Borzenok SA. Mediko-tehnologicheskie i metodologicheskie osnovy effektivnoy deyatel'nosti glaznykh tkanevykh bankov Rossii v obespechenii operatsiy po skvoznoy transplantatsii rogovitsy. [Dissertation]. M., 2008. 306.
3. Coster DJ, Lowe MT, Keane MC, Williams KA. A comparison of lamellar and penetrating keratoplasty outcomes: A registry study. *Ophthalmology*. 2014; 5: 979–987. PMID: 24491643. doi: 10.1016/j.ophtha.2013.12.017.
4. Terry MA. Endothelial keratoplasty: history, current state, and future, directions. *Cornea*. 2006; 25 (8): 873–878. PMID: 17102658. doi: 10.1097/01.ico.0000244869.54761.50.
5. Мамиконян ВР, Труфанов СВ. Автоматизированная задняя послойная кератопластика в лечении буллезной кератопатии. *Бюллетень СО РАМН*. 2009. 138 (4): 37–39. Mamikonyan VR, Trufanov SV. Avtomatizirovannaya zadnyaya posloynaya keratoplastika v lechenii bulleznoy keratopatii. *Byulleten' SO RAMN*. 2009; 138 (4): 37–39.
6. Малюгин БЭ, Мороз ЗИ, Борзенко СА, Дроздов ИВ, Айба ЭЭ, Пахтаев АН. Первый опыт и клинические результаты задней автоматизированной послойной кератопластики (ЗАПК) с использованием предварительно выкроенных консервированных ультратонких роговичных трансплантатов. *Офтальмохирургия*. 2013; 3: 12–16. Malyugin BE, Moroz ZI, Borzenok SA, Drozdov IV, Aiba EE, Pashtaev AN. First experience and clinical results of DSAEK utilizing the pre-cut ultrathin grafts. *Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery*. 2013; 3: 12–16. (In Russ.).

7. *Oganesyan OG*. Система хирургической реабилитации пациентов с эндотелиальной патологией роговицы: дис. ... докт. мед. наук. М., 2011. 308. *Oganesyan OG*. Sistema khirurgicheskoy reabilitatsii patsientov s endotelial'noy patologiei rogovitsy. [Dissertation]. M., 2011. 308.
8. *Price FW Jr, Price MO*. Descemet's stripping with endothelial keratoplasty in 200 eyes: Early challenges and techniques to enhance donor adherence. *J Cataract Refract Surg*. 2006 Mar; 32 (3): 411–418. PMID: 16631048. doi: 10.1016/j.jcrs.2005.12.078.
9. *Busin M, Madi S, Santorum P, Scorcia V, Beltz J*. Ultrathin Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty with the microkeratome double-pass technique: Two-year outcomes. *Ophthalmology*. 2013; 20: 1186–1194. PMID: 23466268. doi: 10.1016/j.ophtha.2012.11.030.
10. *Price MO, Price FW*. Descemet's Stripping with Endothelial Keratoplasty. Comparative Outcomes with Microkeratome-Dissected and Manually Dissected Donor Tissue. *Ophthalmology*. 2006; 32 (3): 411–418. doi: 10.1016/j.ophtha.2006.05.034.
11. *Gorovoy MS*. Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea*. 2006; 8: 886–889. PMID: 17102661. doi: 10.1097/01.ico.0000214224.90743.01.
12. *Tang M, Stoeger C, Galloway J, Holiman J, Bald MR, Huang D*. Evaluating DSAEK graft deturgescence in preservation medium after microkeratome cut with optical coherence tomography. *Cornea*. 2013 Jun; 32 (6): 847–850. doi: 10.1097/ICO.0b013e31828a27dd.
13. *Boynnton GE, Woodward MA*. Eye-bank preparation of endothelial tissue. *Curr Opin Ophthalmol*. 2014; 25 (4): 319–324. doi: 10.1097/ICU.0000000000000060.
14. *Ho Wang Yin G, Sampo M, Soare S, Hoffart L*. Impact des caractéristiques du greffon cornéen sur les résultats cliniques après Descemet stripping automated endothelial keratoplasty (DSAEK) [Effect of donor graft characteristics on clinical outcomes in Descemet stripping automated endothelial keratoplasty (DSAEK)]. *J Fr Ophthalmol*. 2017; 40 (1): 36–43. doi: 10.1016/j.jfo.2016.09.018.
15. *Федоров СН, Мороз ЗИ, Борзенко СА, Комах ЮА*. Среда для консервации роговицы глаза. Патент РФ № 2069951 от 21.02.1993 г. *Fedorov SN, Moroz ZI, Borzenok SA, Komakh YuA*. Sreda dlya konservatsii rogovitsy glaza. Patent RF № 2069951 ot 21.02.1993 g.
16. *Борзенко СА, Малюгин БЭ, Тонаева ХД, Ахмедов АК, Керимов ТЗ, Комах ЮА и др.* Средство для консервации заднего послойного трансплантата донорской роговицы. Патент РФ № 2676311 от 15.02.2018 г. *Borzenok SA, Malyugin BE, Tonaeva KhD, Akhmedov AK, Kerimov TZ, Komakh YuA i dr.* Sredstvo dlya konservatsii zadnego posloynogo transplantata donorskoy rogovitsy. Patent RF № 2676311 ot 15.02.2018 g.

*Статья поступила в редакцию 15.06.2020 г.
The article was submitted to the journal on 15.06.2020*