

На правах рукописи

АХМЕДОВ АЛИОМАР КАМИЛОВИЧ

АЛГОРИТМ ПРЕДОПЕРАЦИОННОЙ ПОДГОТОВКИ ЗАДНЕГО
ПОСЛОЙНОГО ТРАНСПЛАНТАТА РОГОВИЦЫ
В УСЛОВИЯХ ГЛАЗНОГО ТКАНЕВОГО БАНКА

3.1.5 – Офтальмология

3.1.14 – Трансплантология и искусственные органы

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

Малюгин Борис Эдуардович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕН, заместитель генерального директора по научной работе ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России

Борзенко Сергей Анатольевич – доктор медицинских наук, академик РАЕН, профессор кафедры глазных болезней ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, руководитель Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России

Официальные оппоненты:

Слонимский Алексей Юрьевич – доктор медицинских наук, профессор, врач-офтальмолог ООО «Московская глазная клиника»

Астрелина Татьяна Алексеевна – доктор медицинских наук, руководитель Центра биомедицинских и аддитивных технологий ФГБУ «ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна» ФМБА России

Ведущая организация: ФГБНУ «НИИГБ»

Защита состоится « » 2022 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д.208.014.01 при ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России по адресу: 127486, г. Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59А.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России по адресу: 127486, г. Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59А.

Автореферат разослан « » _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

И.А. Мушкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Сквозная кератопластика (СКП) долгое время считалась «золотым стандартом» хирургического лечения больных с эпителиально-эндотелиальной дистрофией (ЭЭД) роговицы (Дронов М.М., 1978; Копаева В.Г., 1982, 2004; Малюгин Б.Э., 1994; Борзенко С.А., 2008; Мороз З.И. и др., 2004; Мамиконян В.Р. и др., 2009; Al-Yousuf N. et al., 2004). С целью улучшения биологических и функциональных результатов приживления больших трансплантатов роговицы в разное время предлагались различные модификации СКП, а именно: грибовидная (Юшко Н.А., 1971), конусовидная (Тоцкая Т.Д., 1991), ступенчатая (Ковшун Е.В., 1992) и ряд других.

Однако как сама СКП, так и ее модификации, по-прежнему не исключают возникновения ряда существенных проблем. Так, 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 (Копаева В.Г., 1982; Малюгин Б.Э., 1994; Комах Ю.А., 1995; Мороз З.И. и др., 2004; Борзенко С.А., 2008). Для исключения выше перечисленных проблем, связанных с СКП, и ведущей роли эндотелиального слоя в развитии буллезной кератопатии, была предложена техника послойной замены поврежденных задних слоев роговицы, названная эндотелиальной кератопластикой и выполняемая с помощью высокоточного, высокотехнологичного микрохирургического оборудования и инструментария (Terry M., 2004; Gorovoy M., 2006; Melles G., 2002, 2004).

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 патологией эндотелия роговицы различного генеза (Мамиконян В.Р. и др., 2009; Оганесян О.Г., 2011; Малюгин Б.Э. и др., 2013; Дроздов

И.В, 2013; Tan D., Mehta J., 2007; Cursiefen C., Kruse F.E., 2008; Dickman M.M., Kruit P.J., Remeijer L. et al., 2016).

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 3-5 мм с использованием глайда или инжектора с последующим прижатием лоскута к задней поверхности роговицы стерильным воздухом (Price F.W., Price M.O., 2006; Busin M. et al., 2013). 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 (толщиной 80-130 мкм) методом одинарного прохода микрокератомом в условиях Глазного тканевого банка на этапе предоперационной подготовки (Busin M. et al., 2013; Neff K.D. et al., 2011; Parekh M., et al., 2013; Tang M., et al., 2013; Boynton G.E., et al., 2012; Но Wang Yin et al., 2017). И если в Глазных банках Америки и Европы уже имеются протоколы выделения задних послойных трансплантатов роговицы, то алгоритмы получения и заготовки ультратонких трансплантатов трупных донорских роговиц для задней послойной автоматизированной кератопластики в системе Российских Глазных тканевых банков до настоящего времени отсутствуют.

Помимо этого, следует упомянуть быстро развивающееся направление фемтосекундного лазерного препарирования донорских роговиц для задней послойной кератопластики, равно как и использование с этой целью эксимерных лазеров. При этом нельзя полностью исключить возможность возникновения коллатерального повреждения тканей ударной волной и фонового излучения, приводящего к поломкам в ДНК и апоптозу эндотелиальных клеток (Lubatschowski

Н. Et al., 1994). Эти обстоятельства лишней раз подчеркивают необходимость дальнейшего изучения и оптимизации традиционного механического метода получения ультратонких трансплантатов методом задней послойной автоматизированной кератопластики.

Актуальность проблемы и нерешенность вышеперечисленных положений в технологии ЗАПК обусловили цель и задачи наших исследований.

Цель исследования

Разработка алгоритма предоперационной подготовки заднего послойного трансплантата роговицы на основе собственной рецептуры консервационной среды для оптимальной дегидратации донорской роговицы и техники выкраивания ультратонкого лоскута методом одинарного прохода микрокератомом в условиях Глазного тканевого банка.

Задачи исследования

1. Разработать рецептуру консервационной среды и обосновать ее физико-химические свойства для оптимальной дегидратации донорской роговицы, позволяющей выкраивать ультратонкий трансплантат методом одинарного прохода микротома.
2. Провести исследования морфофункциональных характеристик и жизнеспособности культуры кератоцитов и эндотелиальных клеток донорских роговиц, культивируемых в разработанной среде.
3. Провести морфометрические исследования стабильности, плотности и жизнеспособности эндотелиальных клеток донорских роговиц после консервации в разработанной среде.
4. Провести исследования формирования ультратонких трансплантатов из роговиц, предварительно консервированных в предложенной среде, техникой одинарного прохода микрокератома в условиях Глазного тканевого банка.
5. Предложить пошаговый Алгоритм заготовки ультратонкого заднего послойного трансплантата роговицы в условиях Глазного тканевого банка.

Научная новизна исследования

1. Впервые разработана и предложена консервационная среда оригинальной рецептуры для оптимальной дегидратации донорской роговицы; обоснованы свойства среды с учетом ее физико-химических свойств, определяющих оптимальную дегидратацию стромы и жизнеспособность клеток роговицы.
2. Впервые установлена сохранность морфофункциональных характеристик культуры кератоцитов и эндотелиальных клеток донорских роговиц, культивированных в разработанной среде; показано отсутствие экспрессии маркеров раннего апоптоза каспазного и митохондриального путей в культуре кератоцитов на 14-е сутки культивирования в разработанной среде.
3. Впервые показано, что консервация донорских роговиц в предложенной среде способствует дегидратации донорских роговиц до 19 объемных % от номинального объема с достижением исходных значений к 3-им суткам консервации с сохранением жизнеспособности эндотелиальных клеток донорских роговиц, что проявляется в уплотнении наружных клеточных и внутриклеточных мембран, в меньшей потере эндотелиальных клеток к 9-ым суткам консервации в опытной и в контрольной группах, соответственно 2,7% и 5% кл/мм².
4. Впервые определена возможность оптимального формирования ультратонкого заднего послойного трансплантата роговиц, предварительно консервированных в предложенной среде по сравнению с базисной средой Борзенка-Мороз (толщиной соответственно $105,3 \pm 14,2$ и $163,6 \pm 10,7$ мкм), техникой одинарного прохода микрокератомом в условиях Глазного тканевого банка.

Практическая значимость результатов исследования

1. Установлено сохранение жизнеспособности и морфофункциональных характеристик культуры кератоцитов и эндотелиальных клеток роговицы, культивируемых в предложенной среде, что указывает на ее биологическую безопасность для практического использования в клинических условиях.
2. Установлен выраженный эффект оптимальной дегидратации посмертно отекших донорских роговиц, консервированных в течение 2-3 суток в предложенной среде по сравнению с консервацией в базисной среде (пропись среды Борзенка-Мороз),

что дает возможность ее применения на подготовительном этапе перед выкраиванием ультратонкого заднего послойного трансплантата.

3. Установлена высокая эффективность применения предложенного Алгоритма предоперационной подготовки заднего послойного трансплантата роговицы для получения и заготовки ультратонких трансплантатов методом одного реза микрокератома в условиях Глазного тканевого банка.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработанный Алгоритм предоперационной подготовки заднего послойного трансплантата роговицы, заключающийся в консервации роговицы в предложенной среде собственной рецептуры для оптимальной дегидратации стромы и техники выкраивания методом одинарного прохода микрокератома, в условиях Глазного тканевого банка позволяет получать и заготавливать ультратонкие задние послойные трансплантаты с наименьшей интраоперационной потерей эндотелиальных клеток роговицы.

2. Разработанная среда с наличием в ее составе мембраностабилизирующего препарата и онкотического вещества в номинальных концентрациях, способствует оптимальной дегидратации посмертно отекавших донорских роговиц (до 19 объемных % от номинального объема нативной роговицы), сохраняет высокую плотность эндотелиальных клеток, их ультраструктуру и жизнеспособность, ингибирует процессы апоптоза до 9-ти суток гипотермической консервации.

Апробация работы

Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на IX Всероссийском съезде трансплантологов (Москва, 2018); XV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием: «Федоровские чтения – 2018» (Москва, 2018), XVI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием: «Федоровские чтения - 2019» (Москва, 2019), IV Российском национальном конгрессе с международным участием «Трансплантация и донорство органов» (Москва, 2019), XII Съезде Общества офтальмологов России (Москва, 2020).

Внедрение в практику

Результаты исследований внедрены в работу Головной организации и ряда филиалов ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России.

Результаты диссертационной работы используются в лекционных курсах для клинических ординаторов, аспирантов и курсантов Института непрерывного профессионального образования ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Федорова», а также ординаторов и аспирантов кафедры глазных болезней ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова».

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 4 печатных работы в журналах, рекомендованных ВАК РФ; получен 1 патент РФ на изобретение.

Структура и объем диссертации

Работа изложена на 137 страницах компьютерного текста; иллюстрирована 21 таблицей, 23 рисунками. Список литературы включает 140 источников, из них 42 отечественных и 98 иностранных. Диссертация состоит из введения, 4-х глав, включая обзор литературы, материалы и методы и 2 главы собственных исследований, обсуждения результатов и заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Эффективность и безопасность разработанной собственной среды для дегидратации роговицы изучена на экспериментальных моделях: культура клеток стромы, эндотелия роговицы, кадаверной роговице человека. Критериями отбора доноров для проведения эксперимента были: возраст доноров до 66 лет, время от момента смерти донора до начала экспериментальных исследований не более 18-ти часов, показатели адреналиновой пробы А и В, морфологические показатели роговицы 3 по классификации Борзенка С.А. (2008).

Дизайн исследование включал четыре последовательных этапа: 1 этап Исследование физико-химических показателей и функциональных свойств консервационной среды собственной рецептуры, 2 этап Исследование переживаемости культуры клеток донорской роговицы, культивируемой в среде собственной рецептуры, 3 этап Исследование донорских роговиц, консервированных в среде собственной рецептуры и 4 этап Сравнение результатов формирования ультратонких трансплантатов из роговиц, предварительно консервированных в двух видах сред (собственной рецептуры и базисной).

Все этапы экспериментального исследования осуществлялись в соответствии с официально принятыми процедурами и специальным разрешением в рамках законодательства РФ, на основании лицензии Федеральной государственной службы по надзору за Здравоохранением (ФС-34-01-000011-18 от 19.09.2018 г.), которая позволяет использовать ткани, выделенные из трупных человеческих глаз для целей трансплантации и научных исследований.

1 этап Исследование физико-химических показателей и функциональных свойств консервационной среды собственной рецептуры

Для определения водородного показателя pH в консервационных средах был использован микропроцессорный pH метр с термометром (HANNA, Португалия). Калибровку прибора осуществляли при комнатной температуре +25 °С, специализированными растворами с известными показателями pH = 4; 7; 10. . Каждый образец исследовали пятикратно с дальнейшим усреднением полученных показателей.

Исследование онкотической активности консервационных сред проводилось с помощью медицинского осмометра ОСКР-1М методом криоскопии общей концентрации осмотически активных веществ (осмоляльности). Диапазон измерения концентрации равнялся 0...2000 ммоль/кг H₂O; пределы допускаемой основной абсолютной погрешности при измерении концентрации от 0 до 500 ммоль/кг H₂O составляли ± 2 ммоль/кг H₂O.

Для подтверждения функциональных свойств консервационной среды проводили изучение уровня гидратации стромы консервированных донорских роговиц опытной (n = 8, раствор для хранения роговицы (ТУ № 9398-013-29039336-2008 (пропись среды

Борзенка-Мороз)) и контрольной групп (n = 8, консервационная среда собственной рецептуры) методом точного взвешивания на аналитических весах (Sartorius BP 210S, Германия) и пахиметрии с помощью оптического когерентного томографа (Optovue, iVue 100, США) на 0, 1-е, 2-е, 3-и и 4-е сутки исследования.

На основании полученных данных определяли срок консервации, при котором достигается оптимальная дегидратация донорских роговиц без потери жизнеспособности.

2 этап Исследование переживаемости культуры клеток донорской роговицы, культивируемой в среде собственной рецептуры

Культура кератоцитов

Культура кератоцитов была получена из крио-банка Глазного тканевого банка ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Для изучения токсического воздействия консервационной среды собственной рецептуры были использована 2D клеточная культура кератоцитов 3 пассажа. Полученную клеточную культуру делили на две группы:

- контрольная группа (n=6) – культивирование клеток проводили в стандартной культуральной бессывороточной среде (DMEM/F12 (Sigma aldrich, США), фактор роста фибробластов – 10 нг/мл (ПанЭко, Россия), эпителиальный фактор роста – 5 нг/мл (ПанЭко, Россия), L-аскорбиновая кислота – 10 нг/мл (Sigma aldrich, США), 1% - раствор антибиотиков (Thermofisher scientific, США), L-глутамин – 2 мМ (Thermofisher scientific, США));
- опытная группа (n=6) – использовали консервационную среду собственной рецептуры (Патент РФ RU 2676311C1 от 27.12.2018).

Посевная концентрация кератоцитов в обеих группах составила $4,2 \cdot 10^4$ клеток в 1 мл, культивирование производили в чашках Петри 60 мм (SPL, Южная Корея), при стандартных условиях (+37 °C, 5% CO₂), срок культивирования 14 дней, смена среды каждые 3-е суток.

Культура заднего эпителия (эндотелия) роговицы

Для изучения переживания эндотелия роговицы в культуральных растворах было получено 6 пар корнеосклеральных дисков из Глазного тканевого банка ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Полученные корнеосклеральные диски очищали от переднего эпителия используя офтальмологический скребок. Далее корнеосклеральные диски переносили в 25-и см² культуральные матрасы, с добавлением 15 мл питательной среды:

- контрольная группа – DMEM/F12 (Sigma aldrich, США), фетальная бычья сыворотка - 2% (Thermofisher scientific, США), раствор антибиотиков - 1% (Thermofisher scientific, США), L-глутамин – 2 мМ (Thermofisher scientific, США);
- опытная группа – использовали консервационную среду собственной рецептуры (Патент РФ RU 2676311C1 от 27.12.2018).

Культивирование производили при стандартных условиях (+37 °С, 5% CO₂), срок культивирования 7 дней, смена среды каждые 3-е сутки.

Для подтверждения сохранности клеточного фенотипа кератоцитов и эндотелия роговицы проводился иммуноцитохимический анализ: для кератоцитов использовали маркеры – Кератокан и Люмикан, α-гладкомышечный актин, для эндотелия роговицы - ZO-1 и Na/K АТФ-аза. Так же в 2D культуре кератоцитов оценивали апоптоз: для определения активации каспазного пути апоптоза изучали – Каспазы 3 и 8 для активации митохондриального пути апоптоза изучали Цитохром С и ВАХ. Изучение образцов проводили на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Olympus Fluoview FV 10i (Olympus, Япония).

Жизнеспособность кератоцитов оценивали на проточном цитофлуориметре «CytoFlex» (Beckman Coulter, США) используя флуоресцентный краситель Live and Dead по протоколу, заявленному производителем. Определение индекса пролиферации производили в автоматическом счетчике клеток «Luna II» (Logos Biosystems, Южная Корея). Для определения жизнеспособности эндотелиальных клеток роговицы так же использовали флуоресцентный краситель Live and Dead. Однако изучение препаратов проводили на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе «Olympus Fluoview FV 10i» (Olympus, Япония).

3 этап Исследование донорских роговиц, консервированных в среде собственной рецептуры

Для исследования цельных донорских роговиц, консервированных в среде собственной рецептуры было сформировано 2 группы исследования:

- контрольная группа (n=12) – консервацию проводили в растворе для хранения роговицы (ТУ № 9398-013-29039336-2008 (пропись среды Борзенка-Мороз).
- опытная группа (n=12) – консервацию проводили в среде собственной рецептуры.

Все роговицы подвергались гипотермической консервации при +4...6°C в течение 1х (n=6), 3х (n=6), 7ти (n=6) и 9ти (n=6) суток.

Изучение ультраструктурных особенностей и сохранности митохондриального аппарата эндотелиальных клеток роговиц проводили методом трансмиссионной электронной микроскопии (JEM 1200 EX II Япония). ТЭМ выполнялся на базе лаборатории анатомии микроорганизмов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Морфологическая оценка и подсчет количества клеток эндотелия донорских роговиц, а также изучения архитектоники сформированных ультратонких трансплантатов проводили на растровом сканирующем электроном микроскопе «Jeol JSM-6000 PLUS» (Jeol, Япония). Для всех образцов была использована стандартная методика подготовки проб и стандартный протокол настроек сканирующего электронного микроскопа.

Для определения жизнеспособности эндотелиальных клеток роговицы в обеих группах после гипотермической консервации при +4...6°C проводили окрашивание Аннексином-V с контрастированием ядер Hoechst 33258. Анализ препаратов проводили на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе «Olympus Fluoview FV 10i» (Olympus, Япония).

4 этап Сравнение результатов формирования ультратонких трансплантатов из роговиц, предварительно консервированных в двух видах сред

Роговицы контрольной (n = 6) и опытной (n = 6) групп консервировали при + 4°C в

течение 4-х суток в двух средах – базовой и собственной рецептуры. После консервации из роговиц обеих групп под контролем оптического когерентного томографа (Optovue, iVue 100, США) формировали ультратонкие задние послойные трансплантаты с использованием микрокератома (Moria, Франция) путем одинарного прохода режущей головкой.

По окончании формирования ультратонкого заднего послойного трансплантата проводили морфофункциональное исследование жизнеспособности эндотелиальных клеток с использованием флуоресцентного красителя «Live and Dead» (Abcam, Великобритания). Исследование образцов проводили с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа (Olympus FV 10i, Япония).

Для оценки ультраструктуры эндотелиального клеточного слоя, ориентации и повреждения коллагеновых волокон стромы, а также профиля среза образцы обеих групп подвергались пробоподготовке для электронной микроскопии. Полученные образцы исследовали с использованием растрового электронного микроскопа (JEOL JSM-6000, Япония)

В качестве описательной статистики использовали среднее со стандартным отклонением ($M \pm \sigma$). Нормальность распределения переменных оценивалась с использованием теста Шапиро-Уилка. При оценке результатов статистически значимыми считали результаты при значениях $p \leq 0,05$. Статистическую обработку полученных данных и визуализацию данных при помощи программы GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ РАЗРАБОТКИ СРЕДЫ ДЛЯ ДЕГИДРАТАЦИИ И ГИПОТЕРМИЧЕСКОЙ КОНСЕРВАЦИИ ДОНОРСКИХ РОГОВИЦ

Обоснование собственной рецептуры среды для дегидратации и гипотермической консервации донорских роговиц

До настоящего времени как в России, так и за рубежом отсутствуют рецептуры консервационных сред для оптимальной дегидратации донорских роговиц. Задачей данного этапа являлось создание многокомпонентного средства для повышения жизнеспособности трансплантата роговицы и пролонгирования сроков консервации, как для сквозной, так и для задней послойной кератопластики.

Разрабатываемое средство для консервации донорской роговицы, в режиме гипотермической консервации, содержит среду 199, среду Хэма F-10, хондроитин-сульфат, Гентамицин-сульфат, амфотерицин В, среду Дульбекко-Игла и декстран-40 в умеренно повышенной концентрации (6,0 – 7,0 %), в отличие от стандартной концентрации 5,0 % в контрольной среде Борзенка-Мороз, для создания дегидратирующего эффекта до 20-30 объемных % от номинального объема нативной донорской роговицы.

Дополнительно содержит препарат Фосфоглив-комбинированное мембранопротективное и мембраностабилизирующее фармакологическое средство. Препарат способен восстанавливать клеточные и внутриклеточные мембраны, их структуру и функции при повреждении, тем самым оказывать цитопротекторный эффект, нормализовывать белковый и липидный обмены, даже в условиях гипотермии.

Адекватность подбора электролитного, аминокислотного состава, кислотно-щелочного состояния, онкотического и осмотического баланса к внутриглазным жидкостям предложенной нами среды позволила нам продолжить доклиническое изучение ее физико-химических и биологических свойств донорских роговиц, консервированных в ней.

Исследование физико-химических показателей консервационной среды собственной рецептуры

Так как состав предложенной нами среды с дегидратирующими свойствами (опытная группа) имеет увеличенную концентрацию декстрана-40 по сравнению с известным составом раствора для хранения роговицы (контрольная группа), нами проведены физико-химические исследования общей осмолярности (эффективной концентрации растворенных веществ в растворе) и водородного показателя, определяющих стабильность среды, выживаемость клеток эндотелия и прозрачность стромы донорской роговицы.

Предложенная среда с дегидратирующими свойствами имеет схожий рН со средой Борзенка-Мороз, при этом показатель осмолярности статистически выше, чем в указанной среде (контрольная группа - $323 \pm 0,8$, опытная - $326 \pm 0,9$ ($p < 0,05$)), что обусловлено большим содержанием онкотических компонентов, чем и объясняется

дегидратирующая способность предложенного раствора. При этом важно отметить, что несмотря на повышение значений осмолярность предложенного раствора входила в рамки референсных значений осмолярности влаги передней камеры.

Исследование функциональных свойств консервационной среды собственной рецептуры

По результатам пахиметрии и аналитического взвешивания донорских роговиц опытной и контрольной группы были определены оптимальные параметры и сроки дегидратации: уменьшение толщины на 19% в опытной группе на 1-е сутки консервации с постепенным увеличением и достижением номинальной величины (масса $0,195 \pm 0,015$ г; толщина 648 ± 35 мкм) к 3-м суткам, в контрольной группе гидратация наблюдалась с первых суток консервации.

Для оценки динамики изменения массы в обеих группах исходные значения были приняты за 100% и соответствовали номинальному значению $0,195 \pm 0,015$ г.

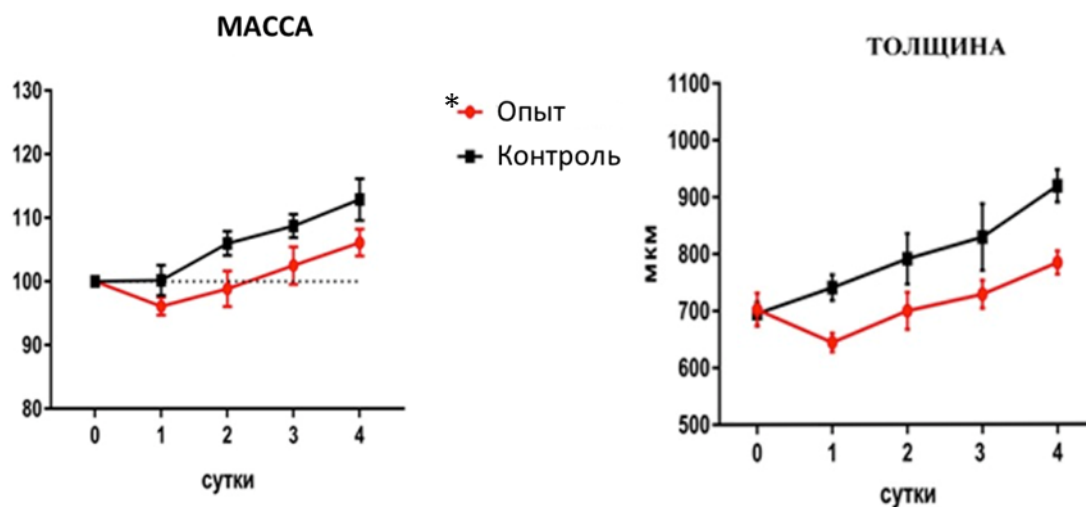


Рисунок 1 - Динамика изменения массы и толщины донорских роговиц в опытной и контрольных группах (* $p < 0,05$)

Выявлена корреляция между массой (рисунок 1) и толщиной исследуемых роговиц (рисунок 1) 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. Также стоит отметить, что исследуемые показатели в опытной группе были достоверно ниже по сравнению с контрольной группой на протяжении всего периода наблюдения.

Исследование переживаемости культуры кератоцитов и клеток заднего эпителия роговицы в среде собственной рецептуры

Оценка роста и фенотипа 2D культуры кератоцитов роговицы

Морфология кератоцитов в исследуемых группах была представлена схожими биполярными мезенхимо-подобными клетками. Иммуноцитохимическое окрашивание показало, что кератоциты активно экспрессируют кератокан и люмикан и не экспрессируют специфический маркер миофибробластов – α -гладкомышечный актин.

В ходе исследования отметили слабую пролиферативную активность кератоцитов в обеих исследуемых группах в течение всего срока культивирования. При сравнительном анализе кривой изменения количества клеток статистической разницы между группами выявлено не было, что может свидетельствовать об отсутствии у исследуемых составов сред стимуляции к пролиферации.

При изучении жизнеспособности кератоцитов в течение всего срока культивирования, с использованием флуоресцентного красителя «Live and Dead», было показано отсутствие статистической разницы между группами. При оценке апоптоза в обеих группах было выявлено отсутствие экспрессии маркеров раннего апоптоза каспазного пути – каспаза 3 и 8, а также митохондриального пути – цитохром С и ВАХ.

Оценка роста и фенотипа клеток заднего эпителия роговицы

В обеих исследуемых группах спустя 7 дней культивирования отмечалась потеря плотности клеток эндотелия, которая между группами была статистически недостоверна.

При детекции живых и мертвых клеток флуоресцентным красителем «Live and Dead» значительных различий между группами также выявлено не было. Следует отметить, что потеря клеток в опытной группе не превышала 8%.

Проведенное иммуноцитохимическое окрашивание спустя 7 дней культивирования показало наличие функциональных маркеров эндотелия ZO – 1 и Na/K АТФазы. Клеток, не экспрессирующих данные маркеры в обеих группах обнаружено не было.

При анализе морфологии клеток эндотелия роговицы на 7-е сутки культивирования с использованием электронной сканирующей микроскопии было выявлено наличие клеток характерной гексагональной формы, а также группы клеток, утративших целостность клеточной мембраны и с ярко выраженным клеточным ядром, свидетельствующим о нежизнеспособности данных клеток.

Полученные результаты показали, что инкубация культуры кератоцитов в течение 14-и суток и культуры эндотелиальных клеток роговицы в течение 7-ми суток в предложенной среде собственной рецептуры (патент РФ RU 2676311C1 от 27.12.2018 г.) способствует сохранению характерного фенотипа дифференцированных клеток, среда поддерживает жизнеспособность культуры клеток, не вызывает апоптоз в культуре кератоцитов. При оценке влияния разработанной среды на культуру эндотелиальных клеток роговицы была выявлена незначительная потеря ЭК, которая к 7-ми суткам культивирования не превышала 8% и была сопоставимой с контрольной группой, культивирование в которой осуществлялось на основе селективной среды для культивирования эндотелиальных клеток роговицы.

Исследование донорских роговиц, консервированных в среде собственной рецептуры и 4 этап

Целью данной части работы стало проведение морфометрического исследования стабильности, плотности и жизнеспособности эндотелиальных клеток цельных донорских роговиц после консервации в разработанной среде.

При трансмиссионной микроскопии эндотелиальных клеток донорских роговиц разница между опытной и контрольной группами была отмечена уже на 1-е сутки эксперимента; в опытной группе наблюдалось уплотнение не только наружных клеточных, но и внутриклеточных мембран, с усилением эффекта на вторые сутки и сохранением его до 6-х суток консервации. В образцах опытной группы на 9-е сутки были обнаружены участки начального повреждения внутриклеточных, в частности митохондриальных мембран эндотелиальных клеток донорских роговиц. При этом в контрольной группе наблюдалось постепенное истончение и повреждение клеточных мембран начиная с пятых суток, выявлены грубые ультраструктурные изменения с паринхиматозной дегенерацией, то есть осаждением клеточных белков в матриксе

цитоплазмы эндотелиальной клетки роговицы, что является проявлением необратимых клеточных процессов.

При оценке морфометрических характеристик выявлено, что за 9 суток консервации потеря плотности эндотелиальных клеток донорских роговиц в опытной группе составила - 2,7%, в контрольной группе – 5% (таблица 1).

Таблица 1. Динамика изменения плотности эндотелиальных клеток в группах сравнения

Сутки	Опыт	Контроль
1	0,89±0,065	1,8±0,24
3	1,1±0,07	2,5±0,18
7	1,8±0,18	3,6±0,27
9	2,7±0,16	5,0±0,58

При анализе потери эндотелиальных клеток в связи с развитием апоптоза обнаружено, что количество поврежденных клеток увеличивалось постепенно и к 9 суткам консервации в опытной группе достигало - 2,5 %, в контрольной группе – 4,3 % .

Сравнение результатов формирования ультратонких трансплантатов из роговиц, предварительно консервированных в двух видах сред (собственной рецептуры и базисной)

В данном разделе представлены сравнительные результаты формирования задних послыных трансплантатов роговиц, предварительно консервированных в дегидратирующей среде собственной рецептуры (опытная группа) и базисной консервационной среде (контрольная группа).

Результаты формирования ультратонких задних послыных трансплантатов в обеих группах с использованием продольного микрократома путем одинарного прохода режущей головкой (Mogia, Франция) представлены в таблице 2.

Таблица 2. Толщина полученных ультратонких трансплантатов

	Образец 1, мкм	Образец 2, мкм	Образец 3, мкм	Образец 4, мкм	Образец 5, мкм	Образец 6, мкм	Σ
Контроль	148	163	156	179	167	169	163,6±10,7
Опыт	105	123	116	85	93	110	105,3±14,2

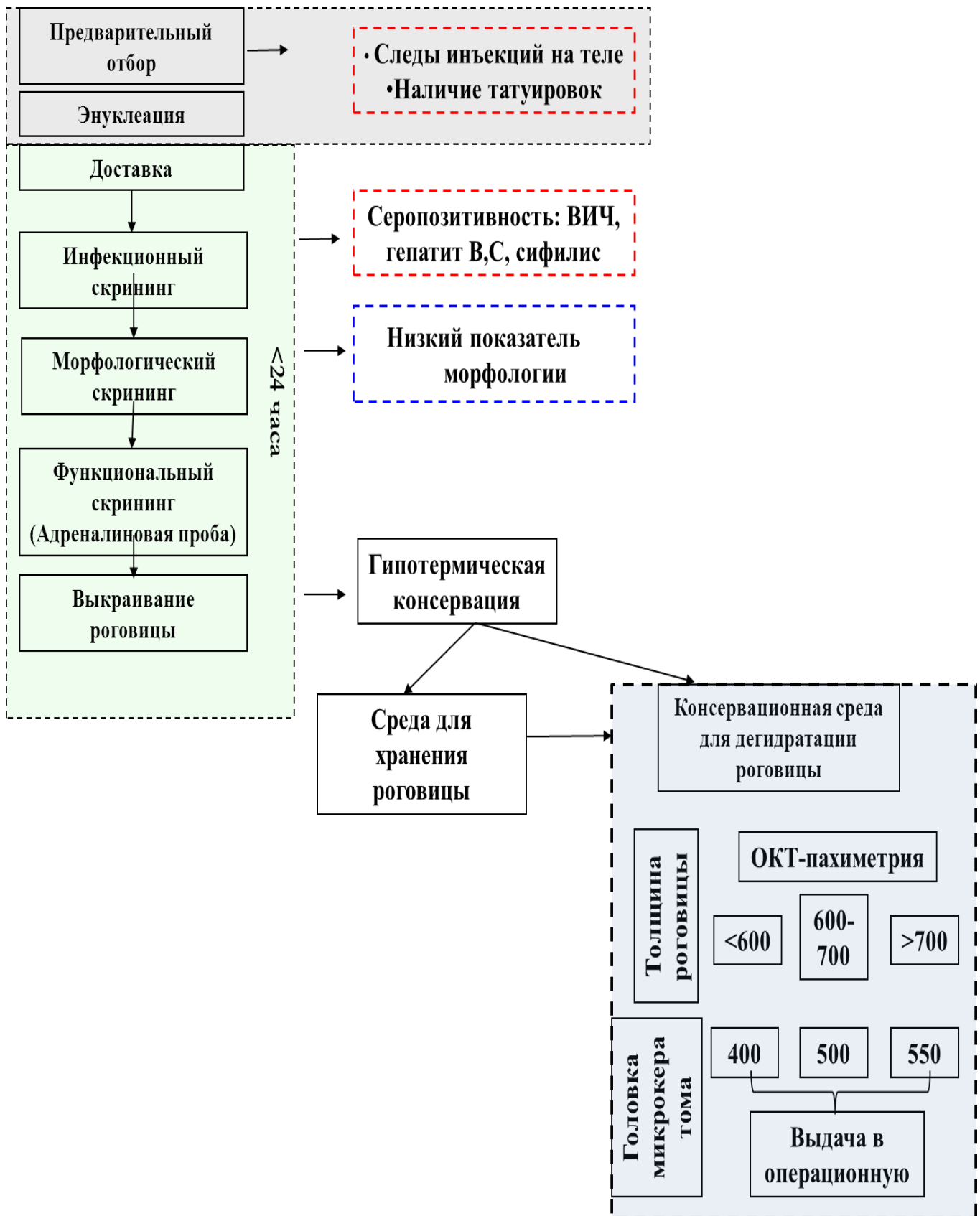
Полученные результаты сканирующей электронной микроскопии сформированных по предложенной технике ультратонких трансплантатов демонстрируют сохранность архитектоники коллагеновых волокон роговиц, консервированных в предложенной среде, и признаки гидратации волокон роговицы из контрольной группы на 2-е сутки консервации.

По окончании 4-х суток консервации при исследовании жизнеспособности эндотелиальных клеток роговиц исследуемых групп методом иммунофлуоресцентной микроскопии с использованием флуоресцентного набора «Live and Dead» достоверной разницы между группами выявлено не было ($p > 0,05$): 88,4% живых клеток, 11,6% мертвых клеток в опытной группе и 87,9% живых и 12,1% мертвых клеток в контрольной группе.

Таким образом, 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 ($105,3 \pm 14,2$ мкм) по сравнению с контрольной ($163,6 \pm 10,7$ мкм). Несмотря на дегидратацию в группе эксперимента, исследование морфофункциональной сохранности эндотелиальных клеток достоверной разницы с контрольной группой не выявило, что исключает токсический и повреждающий эффекты консервационной среды собственной рецептуры.

Алгоритм предоперационной подготовки заднего послойного трансплантата роговицы в условиях Глазного тканевого банка

С учетом полученных результатов наших исследований впервые в России разработан Алгоритм предоперационной подготовки заднего послойного трансплантата трупной донорской роговицы человека в условиях Глазного тканевого банка с помощью микрократома, детально представленный в виде схемы. В процессе разработки Алгоритма учитывались требования Директивы 2004/23/ЕС Парламента Европейского Союза для Тканевых и клеточных банков.



Алгоритм предоперационной подготовки заднего послойного трансплантата роговицы в условиях Глазного тканевого банка

ВЫВОДЫ

1. С учетом биохимических и физико-химических характеристик водянистой влаги разработана оригинальная рецептура консервационной среды для оптимальной дегидратации донорской роговицы перед выкраиванием ультратонкого трансплантата методом одинарного прохода микрокератомом; обоснованы ее номинальные физико-химические свойства: осмотичность 326 мосм/л и рН 7,4; при этом степень дегидратации роговицы на 19% достигается в течение трех суток предварительной гипотермической консервации.

2. Показано, что инкубация культуры кератоцитов в течение 14-ти суток и культуры эндотелиальных клеток роговицы в течение 7-ми суток в предложенной среде собственной рецептуры способствует сохранению уникального фенотипа дифференцированных клеток (наличие экспрессии люмикана, кератокана и Na/K АТФазы, ZO соответственно); среда поддерживает жизнеспособность культуры клеток, не вызывает апоптоз в культуре кератоцитов (отсутствие экспрессии маркеров раннего апоптоза каспазного пути – каспаза 3 и 8, а также митохондриального пути – цитохром С и ВАХ); потеря эндотелиальных клеток к 7-ми суткам культивирования не превышала 8% и была сопоставимой с контрольной группой.

3. Морфометрические исследования эндотелиальных клеток донорских роговиц, консервированных в среде предложенной рецептуры при гипотермии методом трансмиссионной электронной микроскопии показали, что на 1-ые сутки эксперимента в опытной группе наблюдалось уплотнение наружных клеточных и внутриклеточных мембран с усилением эффекта на вторые сутки с сохранением эффекта до 6-ти суток консервации; потеря эндотелиальных клеток в связи с апоптозом увеличивалась постепенно и к 9-ым суткам консервации составила 2,5 % (в контрольной группе – 4,3 %).

4. Установлена возможность оптимального формирования ультратонкого заднего послойного трансплантата роговиц, предварительно консервированных в предложенной среде с толщиной $105,3 \pm 14,2$ мкм по сравнению с базисной средой Борзенка-Мороз ($163,6 \pm 10,7$ мкм), техникой одинарного прохода микрокератомом в условиях Глазного тканевого банка.

5. Разработан и предложен пошаговый Алгоритм предоперационной подготовки ультратонких задних послойных трансплантатов донорской роговицы в условиях Глазного тканевого банка, заключающийся в достижении оптимальной дегидратации стромы посредством консервации в среде предложенной рецептуры и последующим одинарным резом микрокератома.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Предложенная среда собственной рецептуры имеет в своем составе фармакологически разрешенный препарат фосфоглив, умеренно повышенную концентрацию высокомолекулярного онкотического компонента Декстран-40000 D, обладает выраженным дегидратирующим и мембранопротективным эффектом, способствует сохранению наружных клеточных и внутриклеточных мембран, может быть рекомендована для гипотермической консервации донорских роговиц в течение 6-ти суток как для сквозной, так и для селективных послойных кератопластик.

2. Для получения ультратонкого заднего послойного трансплантата с помощью микрокератома LSK Classic (Moria) целесообразно проводить предварительную консервацию донорской роговицы в предложенной среде собственной рецептуры; рез микрокератомом следует выполнять со стороны максимальной толщины роговицы по данным OCT-пахиметрии головкой «550» - при толщине >700 мкм; головкой «500» - при толщине от 700 мкм до 600 мкм; головкой «450» - при толщине <600 мкм.

3. Предложенный Алгоритм предоперационной подготовки заднего послойного трансплантата роговицы позволяет получать и заготавливать ультратонкие задние послойные трансплантаты роговицы в условиях Глазного тканевого банка и минимизировать потерю эндотелиальных клеток и донорского материала на интраоперационном этапе в процессе выкраивания лоскута.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Тонаева Х.Д.** Результаты разработки консервационной среды для предоперационной подготовки ультратонкого трансплантата роговицы / **Х.Д.Тонаева, А.К.Ахмедов, Ю.А.Комах, Б.Э.Малюгин, С.А.Борзенко** // Вестник трансплантологии и искусственных органов.-2018.- Том 20.-С.165. (Приложение)
2. **Борзенко С.А.** Оценка Жизнеспособности эндотелиальных клеток донорской роговицы после гипотермической консервации в новой селективной среде / **С.А.Борзенко, Х.Д.Тонаева, Д.С.Островский А.К.Ахмедов, Ю.Ю.Калинников** // Вестник трансплантологии и искусственных органов.-2019.- Том XXI.-С.146. (Приложение)
3. **Ахмедов А.К.** Технология получения ультратонкого заднего послойного трансплантата роговицы в условиях глазного тканевого банка / **А.К.Ахмедов, Т.З.Керимов, Х.Д.Тонаева, Б.Э.Малюгин, С.А.Борзенко** // Вестник трансплантологии и искусственных органов.- 2020. - Т.22. - №3. - с.167-173.
4. **Борзенко С. А.** Переживаемость кератоцитов и эндотелиальных клеток заднего послойного трансплантата роговицы, культивированных в модифицированной консервационной среде / **С.А.Борзенко, Б.Э.Малюгин, Д.С.Островский, А.К.Ахмедов, Х.Д.Тонаева, Ю.А.Комах, М.Х.Хубецова** // Офтальмохирургия.- 2021. - №2.- с. 32-39.

ИЗОБРЕТЕНИЯ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Патент на изобретение № RU 2676311 С1 от 27.12.2018 г. «Средство для консервации заднего послойного трансплантата донорской роговицы». Авторы: Борзенко С.А., Малюгин Б.Э., Тонаева Х.Д., **Ахмедов А.К.**, Керимов Т.З., Комах Ю.А., Белодедова А.В., Литвинов А.В

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЗАПК (DSAЕК)	Задняя автоматизированная послойная кератопластика (Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty)
СКП	Сквозная кератопластика
ЭЭД	Эпителиально-эндотелиальная дистрофия
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
pH	pondus Hydrogenii (Водородный показатель)