

Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный  
медицинский исследовательский центр Межотраслевой научно-технический  
комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова»  
Министерства здравоохранения  
Российской Федерации

---

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

Научные руководители:  
доктор медицинских наук, профессор  
Малюгин Борис Эдуардович

доктор медицинских наук  
Борзенко Сергей Анатольевич

Москва – 2021

<b>ОГЛАВЛЕНИЕ</b>		
ВВЕДЕНИЕ		5
ГЛАВА 1.	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1.	Роль Глазных тканевых банков в заготовке трупного донорского материала для выполнения кератопластики	12
1.2.	Современные аспекты эндотелиальной кератопластики	15
1.3.	Технология задней автоматизированной послойной кератопластики	19
1.4.	Проблема гипотермической консервации и жизнеспособности донорских роговиц в культуральных средах	24
ГЛАВА 2.	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	
2.1.	Дизайн исследования и общая характеристика материалов и методов экспериментальных исследований	32
2.2.	Методы исследования физико-химических свойств консервационных растворов	38
2.3.	Исследование переживаемости культуры клеток заднего эпителия роговицы и кератоцитов в консервационных средах	42
2.4.	Исследование донорских роговиц в консервированных средах	46
2.5.	Техника выкраивания ультратонкого трансплантата из консервированных донорских роговиц методом задней автоматизированной послойной кератопластики	49
2.6.	Методы статистической обработки результатов исследований	50

ГЛАВА 3.	РЕЗУЛЬТАТЫ РАЗРАБОТКИ СРЕДЫ ДЛЯ ДЕГИДРАТАЦИИ И ГИПОТЕРМИЧЕСКОЙ КОНСЕРВАЦИИ ДОНОРСКИХ РОГОВИЦ	
3.1.	Обоснование собственной рецептуры среды для дегидратации и гипотермической консервации донорских роговиц	51
3.2.	Технология получения собственной рецептуры среды для дегидратации и гипотермической консервации донорских роговиц	57
3.3.	Исследование физико-химических показателей и основных функциональных свойств консервационной среды собственной рецептуры	58
3.3.1.	Исследование физико-химических показателей консервационной среды собственной рецептуры	58
3.3.2.	Исследование функциональных свойств консервационной среды собственной рецептуры	61
3.4.	Исследование переживаемости культуры клеток заднего эпителия роговицы и кератоцитов в среде собственной рецептуры	65
3.4.1.	Оценка роста и фенотипа 2D культуры кератоцитов роговицы	65
3.4.2.	Оценка роста и фенотипа клеток заднего эпителия роговицы	70
3.5.	Исследование ультраструктуры, плотности и жизнеспособности эндотелиальных клеток донорских роговиц, консервированных в среде собственной рецептуры	73

3.6.	Резюме	78
ГЛАВА 4	РЕЗУЛЬТАТЫ ФОРМИРОВАНИЯ УЛЬТРАТОНКОГО ТРАНСПЛАНТАТА РОГОВИЦЫ, КОНСЕРВИРОВАННОЙ В СРЕДЕ СОБСТВЕННОЙ РЕЦЕПТУРЫ	
4.1.	Сравнительные результаты формирования ультратонких трансплантатов из роговиц, предварительно консервированных в двух видах сред	80
4.2.	Сравнительные результаты исследования архитектоники ультратонких трансплантатов из роговиц, консервированных в двух видах сред	84
4.3.	Алгоритм предоперационной подготовки заднего послойного трансплантата роговицы в условиях Глазного тканевого банка	88
4.4.	Резюме	105
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ		107
ВЫВОДЫ		116
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ		118
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ		119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ		121

## ВВЕДЕНИЕ

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; Борзенок 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; Борзенок 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 DSAЕК), 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 H. 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 ЗПАК 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 микротомом.

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/мм<sup>2</sup>.

4. Впервые определена возможность оптимального формирования ультратонкого заднего послойного трансплантата роговицы, 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 отекших 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 136 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.

# ГЛАВА ПЕРВАЯ

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Роль Глазных тканевых банков в заготовке трупного донорского материала для выполнения кератопластик

В 1935 г. Филатовым В.П. в СССР впервые в мире была организована Лаборатория по заготовке и консервации трупных донорских роговиц [3]. А первый в мире Глазной банк (ГБ) был открыт в 1945 г. в США (Нью-Йорк), в Европе – в 1962 г. в Болгарии (София) [51]. В настоящее время в США имеется более 120 ГБ, заготавливается около 80 000 донорских роговиц в год [79], в Европе – около 80 ГБ, заготавливается около 60 000 роговиц в год [65]. В Российской Федерации в 1988 г был организован самый крупный в стране Глазной тканевой банк (ГТБ) при ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени акад. С.Н.Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации [37; 51], который заготавливает около 500 трупных донорских роговиц в год только для головной клиники Учреждения.

Глазным банком принято называть медицинское учреждение, занимающееся поиском, заготовкой, хранением и распределением тканей глазных яблок, изъятых у доноров-трупов, для трансплантологических целей [51; 60; 64; 79; 112]. В России учреждения с подобными функциями до 2007 г. назывались по-разному: Глазной банк [14], Глазной банк тканей [6], Банк глазных тканей [11], Тканевой банк [27]. В ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени акад. С.Н. Федорова» такая структура была создана приказом Генерального директора (акад. С.Н. Фёдоров) №155 от 22 ноября 1988 г. и наименована Глазным банком. В 2007 г. с учетом рекомендаций Директивы Европейского Союза 2004/23 в 2007 г это название

было уточнено и изменено на ГТБ [3]. В настоящее время в мире по-прежнему встречаются два варианта названия: ГБ и ГТБ.

ГБ Америки и Европы являются самостоятельными организациями государственного подчинения. ГБ Америки объединены в Американскую Ассоциацию Глазных банков (ЕВАА), которая возникла 50 лет назад как Служба Глазных банков Америки, а в настоящее время ЕВАА является составной частью Американской Ассоциации Тканевых банков [79; 112]. В отличие от Американской ассоциации, Европейская Ассоциация Глазных банков (ЕЕВА) сравнительно молодая самостоятельная организация созданная при Европейском Союзе (ЕС). Она была учреждена по предложению N.Ehlers в 1989 г на I-й Европейской Учредительной конференции по Глазным банкам (Архус, Дания) [111] и существует как самостоятельная организация при Парламенте ЕС вне деятельности Ассоциации Тканевых Банков Европы [134]. ГТБ ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени акад. С.Н.Федорова» был принят в действительные члены ЕЕВА в 1995 г. [65].

ЕЕВА – это медицинская научно-техническая организация, проводящая ежегодные встречи своих членов по обмену опытом; требующая от них выполнения Стандартов Качества, которые ежегодно пересматриваются и дополняются Комитетом по Стандартам качества при президиуме ЕЕВА; ЕЕВА стимулирует своих членов к разработке собственных Стандартов качества с целью достижения наиболее высоких показателей качества и безопасности трупного донорства роговиц [64; 95; 111]. Эти требования распространяются только на Глазные банки Европейских стран – членов ЕС.

В 2003 г. постоянно действующая Комиссия по Тканевым и Глазным банкам при Парламенте ЕС в качестве рабочего Положения о Тканевых и Глазных банках издала специальную Директиву [64], согласно которой Тканевым и Глазным банкам Европы предписываются следующие основные направления деятельности [62]:

- осуществляет организационно-методическую деятельность;
- производит забор и учет донорского материала в прозектурах;
- производит консервацию роговиц и донорских тканей в различных режимах и средах;
- осуществляет контроль качества сред, консервации и проверки трансплантационной пригодности (жизнеспособности) донорских роговиц;
- решает вопросы распределения и перераспределения донорских роговиц по другим ГБ и клиникам в случае его избыточного накопления;
- решает научные вопросы по проблеме донорства и трансплантации роговиц;
- осуществляет разработку методов тканевой и клеточной фармакологической защиты донорских роговиц.

В последние годы во всем мире активно внедряется технология так называемой эндотелиальной кератопластики (ЭКП) в силу своей высокой эффективности в хирургическом лечении эндотелиальных дистрофий роговицы и буллезных кератопатий, что подтверждается статистическими данными Американской ассоциации глазных банков (ЕВАА). Так, доля выполненных эндотелиальных кератопластик за период с 2010 по 2019 гг. возросла с 19,1 до 30,6%, в то время как объем выполненных сквозных кератопластик (СКП) сократился с 21,9% до 17,4% в данный период [66, 106]. 2020 г. в связи с развитием пандемии новой коронавирусной инфекции (COVID-19) ознаменовался значительными ограничениями в области трансплантации органов и тканей и, в частности трансплантации донорской роговицы. В этой связи, данные по пересадкам роговицы за указанный период, представляются не показательными и не приводятся.

Директива 2004/23/ЕС в качестве рабочего документа устанавливает

стандарты качества и безопасности донорства, юридическое обоснование донорства, тестирование, производство, консервацию, сохранение и распространение донорских органов, тканей и клеток человека в системе Европейской ассоциации глазных банков (ЕЕВА) [54]. На основании базисных положений Директивы ГБ, отдельно взятых стран – членов ЕС, рекомендуется разработка собственных Алгоритмов и Стандартной процедуры отбора и качества трупных донорских роговиц.

В Российской Федерации до настоящего времени не имеется ни одного официального документа Минздрава России, регламентирующего деятельность ГТБ, однако имеется единственная утвержденная Росздравнадзором Медицинская технология «Алгоритм забора и заготовки трупных роговиц человека для трансплантации (Рег. ФС № 210/243 от 24.06.2010). При этом данная технология ориентирована только на подготовку трупного донорского материала в условиях ГТБ для выполнения сквозных кератопластик. Учитывая бурное развитие технологий по выполнению задних послойных кератопластик, актуальной является проблема разработки Алгоритма подготовки ультратонких трансплантатов донорских роговиц в условиях Глазных тканевых банков Российской Федерации.

## **1.2. Современные аспекты эндотелиальной кератопластики**

До начала XXI века СКП считалась «золотым стандартом» хирургического лечения больных с эндотелиальными дистрофиями роговицы различного генеза [3;13; 20;22; 24; 51; 92]. С целью улучшения биологических и функциональных результатов приживления больших трансплантатов роговицы в разное время предлагались различные модификации СКП, а именно: грибовидная [41], конусная [35] и ступенчатая [18] кератопластики.

Однако ни СКП, ни ее модификации не исключают возникновения ряда

существенных проблем: проведение операции сопровождается объемной и длительной разгерметизацией глазного яблока, что приводит к риску геморрагических и инфекционных осложнений, в пост-трансплантационном периоде нередко развиваются иммунобиологические реакции тканевой несовместимости и появляются индуцированные аметропии различной степени выраженности, приводящие к неудовлетворительному оптическому результату [3;19;20;24;29].

В этой связи в последние двадцать лет силы ученых были сосредоточены на разработке новых эффективных хирургических техник послойных кератопластик, способных свести к минимуму выше названные недостатки СКП, одной из которых является ЭКП. К настоящему времени в литературе описано множество различных техник и модификаций ЭКП, которые позволяют свести к минимуму интраоперационные риски и обеспечивают высокий биологический эффект приживления послойного эндотелиального трансплантата и достаточно высокие клиничко-функциональные результаты.

Одной из таких инновационных техник ЭКП является Задняя послойная кератопластика (ЗПК), суть которой состоит в селективной замене эндотелия роговицы реципиента послойным донорским трансплантатом, включающим задние слои стромы с сохранным эндотелиальным пластом [75;77].

В 1956 г Tillet С. впервые предложил технику селективной замены поврежденных задних слоев роговицы путем формирования ложа в строме реципиента [130]. Операция сопровождалась лимбальным разрезом длиной около 12 мм, путем расслаивания задние слои стромы отделялись от передних, далее производилось выкраивание части стромы с эндотелием. После этого в сформированное ложе размещался заранее выкроенный трансплантат задних слоев роговицы донора с пластом эндотелия. Далее на первом уровне трансплантат фиксировался швами к строме роговицы реципиента, а второй уровень швов накладывался в зоне лимба, фиксируя таким образом



поверхностный лоскут роговицы реципиента. К сожалению, в силу хирургической сложности выполнения и, возможно, не высоких биологических и клинических результатов данная операция не получила широкого распространения.

В 1972 году J.I. Barraquer опубликовал предложенную им технику селективной замены эндотелия с использованием, разработанного им же кератома с пневматической фиксацией [48]. Однако данная хирургическая техника имела ряд существенных недостатков: выполнялась по типу «открытого неба», требовала наложения большого количества швов, приводила к постоперационному астигматизму, в отдаленном периоде отмечалось врастание переднего эпителия под сформированный клапан [8]. В связи с этим, на тот данная техника также не получила широкого распространения.

Следует отметить и тот факт, что в 80-х годах прошлого века отечественные офтальмологи также разрабатывали хирургические техники задних послойных кератопластик. Так, в 1983 г. Гундорова Р.А. применила технику задней ламеллярной кератопластики у пациентов с посттравматическим врастанием эпителия в переднюю камеру с реконструктивной и органосохранной целью [10]. В 1992 г. Мороз З.И. и Тоцкая Т.Д. предложили способ ЗПК, заключающийся в бесшовной межслойной фиксации трансплантата задних слоев донорской роговицы толщиной около 150 мкм между поверхностным лоскутом и пояском задних слоев собственной роговицы толщиной не менее 200 мкм [34].

В 1998 г. Jones D.T. и Culberston W.W. впервые ввели термин «Эндотелиальная послойная кератопластика» (Endothelial lamellar keratoplasty) при описании впервые предложенной ими техники подшивания донорской линтикулы в сформированное ложе в задних слоях роговицы реципиента [85]. Клинические результаты продемонстрировали возможность полного восстановления прозрачности роговицы реципиента с помощью селективной

трансплантации здорового эндотелия донора.

В 2002 г. Melles G. предложил оригинальную технику бесшовной ЗПК [99], которая заключалась в выполнении 5 мм склерального тоннельного разреза, формировании стромального ложа в непосредственной близости от Десцеметовой мембраны, иссечении поврежденных слоев, имплантации в переднюю камеру трансплантата, сложенного в соотношении 60/40, и его фиксации путем введения стерильного воздуха.

Уже в 2004 г. Melles G. и соавторы предложили упрощенную технику ЗПК, исключавшую трудоемкий этап ламеллярной диссекции роговицы реципиента, которую назвали DSEK (Descemet's stripping endothelial keratoplasty) [100]. Суть операции заключалась в изолированном удалении ДМ и эндотелия реципиента с последующим введением и адаптацией заднего послойного трансплантата к задним слоям стромы и его фиксацией воздушным пузырем. Было предложено несколько модификаций этой техники, когда передняя камера заполнялась воздухом с целью лучшей визуализации ДМ, проведение десцеметорексиса (ДР) с использованием вископротекторов, физиологического раствора, либо при непрерывной подаче воздуха в переднюю камеру [70;74].

Предложенная техника ДР позволила значительно уменьшить риск травматизации радужной оболочки и структур передней камеры, а также дала возможность сохранять целостность задних слоев стромы реципиента, что обеспечивало наличие более гладкого интерфейса.

В 2004 г. Terry M.A. разработал ряд инструментов, модифицировали классическую методику ЗПК и назвал ее DLEK (Deep lamellar endothelial keratoplasty) – глубокой ламеллярной эндотелиальной кератопластикой [128]. Клинические сравнительные исследования, проведенные рядом офтальмологов, наглядно продемонстрировали более высокие клинико-функциональные результаты DLEK в сравнении с СКП. В 2008 г. Heidemann D.G. и соавторы

отмечали более высокую корригируемую остроту зрения (КОЗ) в срок 6 мес. после DLEK по сравнению с СКП и незначительный астигматизм ( $0,89 \pm 1,64$  дптр) в группе DLEK по сравнению с СКП ( $2,55 \pm 1,64$  дптр) [80]. В то же время Bahar I. и соавторы выявили сопоставимую КОЗ спустя 12 месяцев после операции ( $0,60 \pm 0,33$ ) у пациентов с DLEK по сравнению с СКП ( $0,42 \pm 0,14$ ) СКП [47]. Но, несмотря на значительные преимущества перед СКП, DLEK не получила широкого распространения в офтальмологии, в виду значительной технической сложности, необходимости наличия специального инструментария, а также высокого риска травматизации радужной оболочки [80].

### **1.3. Технология задней автоматизированной послойной кератопластики**

В 2006 году Gorovoy M.S. была предложена автоматизированная техника выкраивания донорского трансплантата с помощью микрокератома, получившая название DSAEK (Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty) – Задняя автоматизированная послойная кератопластика, или ЗАПК [75]. Для выкраивания заднего послойного трансплантата корнеосклеральный диск помещался в искусственную переднюю камеру, далее с помощью головки микрокератома толщиной 300-350 мкм, осуществлялся стромальный рез, при этом поверхностный клапан полностью удалялся. Затем корнеосклеральный диск укладывался эндотелиальной стороной вверх и выполнялась трепанация с помощью 9 мм трепана. Далее выкроенный трансплантат укладывался в дубликатуру 60/40 и имплантировался через 5 мм роговичный разрез с помощью пинцета. Далее производилась центровка трансплантата и его фиксация пузырем воздуха. Данная техника имеет ряд значительных преимуществ в сравнении с техникой DSEK (мануальной диссекции). Так стандартизация техники выкраивания трансплантата позволяет значительно уменьшить отбраковку дефицитных донорских роговиц, а

использование микрокератома обеспечивает практически идеально гладкий стромальный рез и более быструю зрительную реабилитацию пациентов [108]. Однако по-прежнему «тонким местом» данной техники остается малая предсказуемость толщины выкраиваемого тонкого трансплантата задних слоев донорской роговицы [12].

И тем не менее, по данным крупного перспективного сравнительного исследования 200 пациентов, было достоверно отмечено, что уже через 1 месяц после операции более высокая КОЗ наблюдалась у пациентов после DSAEK по сравнению с другими техниками ЗПК [108]. При этом следует отметить, что усовершенствованная и стандартизированная техника DSAEK позволила производить заготовку задних послойных трансплантатов роговицы непосредственно в условиях Глазных тканевых банков и значительно сократить время выполнения операций по трансплантации.

Однако одним из недостатков DSAEK по сравнению с традиционной СКП, является бóльшая потеря плотности эндотелиальных клеток (ПЭК). Так, было отмечено, что через 12 месяцев после DSAEK ПЭК составила 38%, а после СКП всего 20% [109].

При этом, как отмечают авторы, травма эндотелиальных клеток (ЭК) может происходить не только при имплантации выкроенного лоскута в переднюю камеру глаза, но и на разных этапах его выкраивания с помощью техники DSAEK. С целью уменьшения потери ЭК в последние годы усилия офтальмологов сосредоточены на разработке различных модификаций техники DSAEK и технических приемов имплантации выкроенных лоскутов.

Техника трансплантации эндотелия на Десцеметовой мембране (ТЭДМ или DMEK) представляет собой следующий этап развития эндотелиальной кератопластики. Популярность её продолжает расти, что связано с двумя основными факторами: возможность получить более высокие зрительные функции, чем при традиционной ЗАПК (DSAЕК), а также внедрением в

клиническую практику трансплантатов для ТЭДМ, предварительно заготовленных в ГБ [110]. При этом следует подчеркнуть, что ЗАПК имеет более широкие клинические показания, хирург может использовать данную технику при наличии патологических изменений переднего отрезка глазного яблока (колобомы, внекапсулярная фиксация ИОЛ, наличие трубчатых дренажей в передней камере, авитрия и т.д.). Также необходимо отметить, что функциональные результаты, достигаемые при ТЭДМ и ЗАПК ультратонкими трансплантатами, по мнению целого ряда авторов являются сравнимыми [131].

Одним из достижений последнего времени является задняя послойная кератопластика с использованием ультратонких трансплантатов. Ультратонким послойный трансплантат считается толщиной менее 131 мкм [25; 102; 107]. М. Busin и соавторы впервые предложили технику double-pass с использованием микрокератома [53], которая стала наиболее распространенной во всем мире для выкраивания ультратонкого трансплантата и получила название UT-DSAEK (Ultrathin DSAEK). Суть ее в выполнении двух последовательных резов донорской ткани со стороны переднего эпителия до максимально возможного иссечения толщины остаточной стромы донорской роговицы. При этом средние значения итоговой толщины ультратонкого трансплантата составляют  $89,1 \pm 34,1$  мкм. Однако в 2014 г. Woodward M.A. с соавт. сообщили о 29% случаев выбраковки донорской ткани при использовании double-pass техники UT-DSEK [138]. По их мнению, основным недостатком техники UT-DSEK является высокий риск возникновения перфораций донорской ткани с использованием микрокератома. В связи с «хроническим дефицитом» трупного донорского материала данная техника не получила широкого применения в мировой офтальмологии.

Техника с использованием многократных проходов микрокератома также разрабатывалась отечественными учеными из МНТК «МГ» [25].

В 2018 г Вае S.S. с соавторами опубликовали разработанные ими

номограммы для техники double-pass, позволяющие предсказать итоговую толщину трансплантата и минимизировать выбраковку донорского материала [46]. Использование номограмм позволяет предсказать итоговую толщину с погрешностью 20  $\mu\text{m}$  в 80% с учетом перфораций задних слоев донорской роговицы в 1,5%. Однако, проведенный нами поиск литературы не обнаружил работ, подтверждающих применение данных номограмм в широкой практике.

Лишь в одной работе описана техника double-pass выкраивания нанотрансплантата толщиной менее 50 мкм с использованием этих номограмм [57]. Техника получила название NT-DSAEK (Nanothin Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty) При этом средние значения толщины ультратонких трансплантатов составили всего  $41,1 \pm 6,4$  мкм в отличие от толщины расчетной, а количество выбракованных роговиц в результате перфорации составили 4,8%. На основании своих исследований авторы делают вывод, что на практике достижение расчетной толщины трансплантата достигалось лишь в 65% случаев, в связи с чем использование данных номограмм и, на их основе, выполнение NT-DSAEK являются проблематичными для практической офтальмологии. Помимо этого, существует мнение, что проблема выкраивания предельно тонких трансплантатов роговицы с помощью микрокератома опосредована и теми обстоятельствами, что механическим путем не представляется возможным выкраивание абсолютно равномерно тонкой по толщине линтикулы, вследствие чего формируется гиперметропический астигматизм [117]. На сегодня принято считать, что номинальная толщина выкроенного ультратонкого трансплантата с помощью техники ЗАПК должна быть в пределах 80–130 мкм, в среднем 105 мкм [12; 25; 50; 53; 125].

Тем не менее, для достижения цели получения очень тонких задних трансплантатов (80-50 мкм и менее) в настоящее время быстрыми темпами развивается научное направление препарирования донорских роговиц для ЗПК с

помощью фемтосекундного лазера (ФЛ). Широкое применение ФЛ получил в рефракционной хирургии, конкурируя с техникой формирования роговичного клапана с помощью микрокератома [120; 123]. Основными преимуществами ФЛ, способствующими его популяризации, является высокая точность реза, прогнозируемая толщина получаемого клапана, а также минимальные осложнения на этапе выкраивания заднего послойного трансплантата [56; 132]. В настоящее время ФЛ в роговичной трансплантологии находит все большее применение благодаря высокой точности реза и соответствию получаемого результата расчетным значениям [15; 31; 84; 101; 107].

Но при всех достоинствах ФЛ, мало учитывается тот факт, что при его использовании, возникает коллатеральное повреждение тканей окружающих зону разреза, а при эксимерлазерных воздействиях может возникать фоновое излучение, приводящее к апоптозу ЭК и кератоцитов, а также поломкам в их ДНК [94]. Эти обстоятельства лишней раз подчеркивают необходимость проведения дальнейших сравнительных исследований лазерных и механических методик и изучения собственно роговичных лоскутов, полученных с помощью техники ЗАПК для их широкого практического использования в Российских клиниках.

В первую очередь, нам представляется, что дальнейшее усовершенствование методов получения ультратонких высоко жизнеспособных задних трансплантатов со стабильной ПЭК должно иметь акцент не только на модификации хирургических методик, но и на разработке путей фармакологической защиты донорских роговиц на этапе их консервации в специализированных средах и подготовки к ЗАПК.

В этой связи ряд исследователей по проблеме донорства роговиц обсуждают вопрос в литературе о роли ГБ в подготовке ультратонких трансплантатов для эндотелиальных кератопластик [50; 126].

По мнению ученых, долгосрочный клинический эффект от использования

донорского материала для ЗПК (DMEK и DSAEK) может быть достигнут при условии применения адекватных сред для консервации, корректной разработки протоколов поэтапной подготовки задних послойных трансплантатов с сохранным эндотелием и интактной десцеметовой мембраной в условиях ГБ, а также уровня профессиональной компетентности сотрудников.

#### **1.4. Проблема гипотермической консервации и жизнеспособности донорских роговиц в культуральных средах**

В 1934 г Филатов В.П. впервые в мире предложил уникальный метод продления жизни трупной донорской роговицы до ее пересадки во влажной камере при низких температурах [38; 69], что явилось существенным вкладом в борьбу с роговичной слепотой во всем мире [51; 58; 92]. Долгое время метод консервации глазных яблок по Филатову считался непревзойденным, позволявшим сохранять донорские роговицы до 2-5 суток и даже более [7].

И только в 60-х годах прошлого века рядом офтальмологов было, что хранение трупных донорских роговиц в изолированном виде в физиологических растворах значительно пролонгирует жизнеспособность их клеточного пула [1; 2; 3; 39; 42; 55; 78; 104; 114; 122].

Новая эра холодового сохранения донорских роговиц началась с 1974 г и связана с именами Mc Carey E. и Kaufman H.E. Авторы сообщили, что роговицы новозеландских кроликов, консервированные в среде для тканевых культур (среда McCarey-Kaufman) при  $t +4^{\circ}\text{C}$ , сохраняют свою жизнеспособность до 14-ти дней [96; 97]. Однако, в результате дальнейших исследований было установлено, что NERES-буфер и гентамицин, содержащиеся в данной среде, оказывали неблагоприятное воздействие на насосную функцию ЭК, что приводило к отеку стромы роговиц и сокращало сроки их консервации [83].

С этого периода началась активная разработка и усовершенствование



растворов для гипотермической консервации. В 1985 г. Kaufman Н.Е. с соавторами разработали среду K-Sol [87]. Согласно мнению авторов, была достигнута сохранность жизнеспособности донорских роговиц даже в течение 2-х недель консервации. Однако другие исследователи установили, что, несмотря на сохранность гистологии и архитектоники роговиц до 10-ти суток, на функциональном уровне к этому сроку их эндотелий становился нежизнеспособным [49; 67]. Эти наблюдения побудили исследователей продолжить поиски оптимального состава консервационных сред.

В 1990 г. группа исследователей ЕВАА предложила новую рецептуру среды, без хондроитин-сульфата, лишь незначительно изменив концентрацию декстрана-40, которая была ими названа Dexsol. Примерно в то же время Н.Е. Kaufman с соавторами усовершенствовали ранее предложенную пропись и разработали среду Optisol [88], которая была признана эталонной и до настоящего времени остается табельной для всех ГБ Америки и других стран [115].

В 1990 г в России был предложен состав отечественной среды для гипотермической консервации роговицы (пропись Борзенка-Мороз), который также имеет в своем составе компоненты, регулирующие онкотическое давление в ткани роговицы, но от выше приведенных сред существенно отличается уточненным подбором аминокислотного состава и содержанием энергетически активного субстрата – натрия  $\gamma$ -оксибутирата, способствующих пролонгированию энергетического метаболизма и оказывающих выраженное защитное действие на ЭК, тем самым обеспечивая стабилизацию клеточных мембран, их исходную плотность и достаточный уровень содержания в них макроэргических соединений как минимум до 6-ти суток консервации [28; 72; 73]. В настоящее время среда Борзенка-Мороз зарегистрирована, производится и является коммерчески доступной («Раствор для хранения роговицы» ТУ № 9398-013-29039336-2008 ООО НЭП «Микрохирургия глаза», Москва)

применяется во всех Глазных тканевых банках Российской Федерации. В 2008 г С.А. Борзенком были подробно изложены морфологические, ультраструктурные и функциональные характеристики ЭК роговиц, консервированных в предложенной среде [3]. При этом необходимо отметить, что для других промышленно выпускаемых в мире сред, такое подробное описание морфофункциональных характеристик донорского материала обнаружить не удалось.

Анализ причин ограниченных сроков гипотермической консервации донорских тканей, проведенных отечественными трансплантологами, показал невозможность увеличения сроков гипотермического сохранения донорского материала уже потому, что сама гипотермия, снижающая кислородную и энергетическую потребность тканей, превращается из фактора защиты в фактор повреждения клеток [40]. В результате воздействия пониженных температур в клеточных структурах развиваются конформационные перестройки (в структуре мембранных липидов и белков, регулируемых энергией слабых связей), которые нарушают адекватность сниженного энергетического метаболизма и способствуют накоплению энергетической задолженности в тканях. При этом усиливаются диффузионные процессы, приводящие к развитию интерстициального отека и повреждению клеток донорского трансплантата как органов, так и витальных тканей.

Исследованиями зарубежных офтальмологов было установлено по F-актину ЭК роговиц, консервированных в среде Optisol-GS в гипотермических условиях что, к 7-ми суткам их хранения возникают значительные повреждения и поломки в цитоскелете [86].

На сегодня, по общепринятому мнению в мировой трансплантологии, для пролонгирования допустимых сроков холодовой консервации донорских тканей (в том числе и роговиц), необходимо использовать методы фармакологической протекции с помощью патогенетически ориентированных лекарственных

препаратов и ростовых факторов, которые, встраиваясь в мембранные структуры клеток, стабилизируют энергетический метаболизм, повышают эффективность внутриклеточных взаимодействий органелл и межклеточных взаимодействий [3; 32; 40].

В ряде зарубежных публикаций показана возможность стимуляции эндотелиальных клеток, синтеза в них ДНК, митотической активности с помощью эпидермального фактора роста (EGF), фактора роста фибробластов (FGF), трансформирующего ростового фактора  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), тромбоцитарного фактора роста, инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1), гепарина, 3',5'-циклического монофосфата и селенитов. При этом наиболее выраженным эффектом обладают FGF и EGF [68; 76; 82; 116; 121; 133; 139].

Отечественными офтальмологами было установлено, что в норме не наблюдается активного образования перечисленных факторов роста и их воздействия на клетки эндотелия интактных роговиц [33; 36]. Синтез биологически активных факторов начинается только при системных патологических процессах, таких как сахарный диабет, злокачественные опухоли, системные заболевания.

В настоящее время продолжает интенсивно исследоваться влияние различных факторов роста и их сочетания с другими биологически активными веществами на эндотелий трупной донорской роговицы при ее консервации перед трансплантацией.

Также было выявлено протективное воздействие человеческого EGF и инсулина, введенных в пропись среды Optisol, на стабильность фосфолипидов клеточных мембран донорских роговиц в процессе гипотермической консервации [93].

По данным Rieck P.W. с соавторами (2003 г.), введение FGF-2 в среду Optisol в концентрации 40 нг/мл способствует достоверно значимому снижению обратимого и необратимого апоптоза ЭК донорских роговиц не менее, чем на

48% при снижении потери ЭК на 38 и 54% соответственно по сравнению с контролем в течение 14-ти суток гипотермической консервации [113].

Не так давно установлено, что помимо ультраструктурной и морфофункциональной сохранности для максимальной сохранности ПЭК трансплантата в послеоперационном периоде необходимо сохранение баланса между про- и антиапоптотическим балансом в ЭК [44; 90]. Изначально апоптоз рассматривался учеными как процесс, сопровождающийся «физиологической гибелью» отживающих клеток, в противовес некрозу - «насильственной гибели» клеток. Однако было показано, что апоптоз сопровождает патологические процессы как *in vivo*, так *in vitro* при воздействии на культуры клеток различных этиопатогенетических факторов [89]. Одним из таких индукторов апоптоза ЭК в процессе консервации трупной донорской роговицы является холодовой стресс [16; 23; 59; 91; 119]. От показателя апоптотически поврежденных клеток (апоптотического индекса) зависит благополучие отдаленного посттрансплантационного периода (от 1 недели до 1 года) [44; 71; 91; 103].

К физиологическим ингибиторам апоптоза относятся факторы роста, экстрацеллюлярный матрикс, аминокислоты, пептиды, антиоксиданты, фосфолипиды, нейтральные жиры, соли макро- и микроэлементов, цинк и другие вещества, обеспечивающие нормальное функционирование и жизнедеятельность любых клеток. В этой связи исследования жизнеспособности ЭК и возможности ингибирования апоптотического процесса в ЭК донорских роговиц с помощью различных биологически активных веществ на этапе консервации являются актуальными [140].

На сегодня опубликованных работ по изучению ПЭК в трансплантатах роговицах, подвергшихся апоптозу в процессе консервации очень мало. Однако в них прослеживается зависимость выраженности апоптоза от состава сред, способа консервации, длительности, исходного состояния трупа-донора роговиц. При этом предельно допустимый показатель апоптотически

поврежденных ЭК в случае гипотермического хранения в течение 14-ти суток в известных средах не должен превышать 15-17% [45; 71; 91; 103].

Как отмечалось выше, принято считать, что введение в состав консервационных сред фармакологических препаратов как клеточных протекторов и ингибиторов апоптоза более предпочтительно, чем ростовых факторов. На этом принципе основано несколько зарегистрированных в Российской Федерации изобретений на составы сред для консервации донорской роговицы. Среда с препаратом «Адгелон» – неспецифическим регуляторным гликопротеином [17]; средство с гомеопатическим препаратом NeuDIL № 37 – специфическим внутриклеточным регуляторным пептидом [34], средство с препаратом «Полудан» [5].

Несомненно, выше названные растворы эффективно защищают ЭК от патогенетических последствий холодового и других стрессорных воздействий в процессе консервации при +4...6°C. Однако они в своем составе не содержат должной концентрации высокомолекулярных веществ (Полиглюкина – декстрана 40 000 D), способной эффективно и в кратчайший срок произвести дегидратацию стромы до первоначальных показателей толщины интактной роговицы.

М. Tang и соавторами (2013 г.) была проведена оценка задних трансплантатов роговицы с помощью FD-ОСТ (фурье-оптической когерентной томографии), консервированных в различных средах, после их выкраивания микрокератомом по стандартной технике DSAEK [125]. Авторы измеряли центральную и периферическую толщины трансплантата сразу после выкраивания, затем через 1, 2, 3 и 4 часа после гипотермической консервации. Было установлено, что средняя толщина трансплантатов сразу после выкраивания составляла  $188,7 \pm 44,4$  мкм (146 – 255 мкм), но после 4-х часов хранения в консервационных средах уменьшалась до  $147,5 \pm 33,0$  мкм (116 – 190 мкм). При этом в течение 1-го часа консервации толщина уменьшалась на

30,5 мкм, далее эффект дегидратации был незначительным, к 3-м часам составлял всего -2,0 мкм, а к 4-м часам 0 мкм. Истинная толщина послойного трансплантата после DSAEK зависит от его исходной гидратации и времени пребывания в консервационных средах. Для зарубежных ГБ проблема выкраивания ультратонких трансплантатов номинальной толщины без отбраковки материала техникой DSAEK практически неактуальна в связи с небольшими сроками посмертного извлечения роговиц в виде корнеосклеальных комплексов при отсутствии отека стромы. Табельные среды ГБ ЕВАА и ЕЕВА (Optisol, Eusol и др.) несомненно обеспечивают остаточную дегидратацию и поддержание онкотического баланса тканей роговицы в процессе консервации. Однако для ГТБ Российской Федерации выше означенная проблема представляет актуальность.

Борзенком С.А. (2008 г.) было установлено, что среднее время доставки в ГТБ энуклеированных глаз трупов-доноров после вскрытия в среднем составляет 14-16 часов [3]. За это время диски роговиц подвергаются коллоидному набуханию в пределах +30% от исходного объема. По мнению автора данного исследования, как зарубежные, так и отечественные среды (Борзенка-Мороз) не в состоянии обеспечить номинальную дегидратацию набухших и утолщенных после смерти донорских роговиц для получения ультратонких трансплантатов после консервации техникой одного прохода микрократома без отбраковки материала.

Таким образом, как показал анализ литературных источников, 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 (80–130 мкм, в среднем 105 мкм) методом одинарного прохода микрократомом в условиях ГТБ на этапе предоперационной подготовки. И если в ГБ Америки и Европы уже имеются Протоколы выделения задних послойных трансплантатов

роговицы, то алгоритмы получения и заготовки ультратонких сегментов трупных донорских трансплантатов роговиц для ЗАПК в системе Российских ГТБ до настоящего времени отсутствуют.

Нерешенность вышеперечисленных проблем в технологии ЗАПК для Российской Федерации обуславливает актуальность проведения фундаментальных медико-биологических и экспериментально-клинических исследований.

## ГЛАВА ВТОРАЯ

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 2.1. Дизайн исследования и общая характеристика материалов и методов экспериментальных исследований

В данной работе для решения поставленных задач была проведена серия исследований, включающих эксперименты *in vitro*. При этом эффективность и безопасность разработанной собственной среды для дегидратации роговицы изучена на экспериментальных моделях: культура клеток стромы, эндотелия роговицы, кадаверной роговице человека.

Донорский материал (цельные роговицы и выделенные клетки стромы роговиц доноров-трупов) использовали в качестве источника биоматериала для экспериментальных исследований.

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.

Перед введением глаза донора трупа в эксперимент проводили серологическую диагностику трупов-доноров на инфицированность вирусами ВИЧ I/II, гепатитов В и С, сифилисом, представляющих потенциальную угрозу для персонала. Клинико-лабораторную диагностику указанных инфекций проводили в микробиологической лаборатории ФГАУ "НМИЦ "МНТК "Микрохирургия глаза" им. акад. С.Н. Федорова" Минздрава России по



образцам крови, поставляемым вместе с тканями глазных яблок от доноров-трупов. После прохождения проверки на инфекционную безопасность сотрудник Глазного тканевого банка проводил оценку морфофункционального показателя трансплантабельности [3].

Критериями отбора для дальнейшего 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. [3]. Дизайн исследования представлен в таблице 1.

Таблица 1. Общий дизайн исследования

Этап исследования	Методика исследований	Количество образцов
I этап		
Исследование физико-химических показателей консервационной среды собственной рецептуры	Измерение pH растворов опытной и контрольной группы	n = 8
	Измерение осмолярности растворов опытной и контрольной группы	n = 8
Исследование функциональных свойств консервационной среды собственной рецептуры	Измерение толщины роговицы опытной и контрольной группы	n = 8
	Измерение массы роговиц опытной и контрольной группы	
II этап		

<p>Исследование переживаемости культуры клеток донорской роговицы, культивируемой в среде собственной рецептуры</p>	<p>Изучение фенотипа и пролиферативной активности культуры клеток в опытной и контрольной группах</p>	<p>n=12</p>
	<p>Изучение жизнеспособности и апоптоза культуры кератоцитов роговицы в опытной и контрольной группах</p>	<p>n=12</p>
	<p>Изучение фенотипа и морфологии эндотелиальных клеток роговицы в опытной и контрольной группах</p>	<p>n=6</p>
	<p>Изучение жизнеспособности и плотности эндотелиальных клеток в опытной и контрольной группах</p>	<p>n=6</p>
<p>III этап</p>		
<p>Исследование донорских роговиц, консервированных в</p>	<p>Исследование ультраструктуры, ПЭК, жизнеспособности</p>	<p>n=24</p>

среде собственной рецептуры	эндотелиальных клеток донорских роговиц опытной и контрольной группы	
IV этап		
Сравнение результатов формирования ультратонких трансплантатов из роговиц, предварительно консервированных в двух видах сред (собственной рецептуры и базисной)	Формирование ультратонкого трансплантата задних слоев донорской роговицы с измерением толщины	n=12
	Изучение жизнеспособности, архитектоники и жизнеспособности сформированного ультратонкого трансплантата в опытной и контрольной группах	

## Список используемого лабораторного оборудования и расходных материалов

Таблица 2. Список лабораторного оборудования

Наименование	Компания производитель
Кератоанализатор для Глазных банков ЕКА-98	Konan Medical Inc., Япония
Конфокальный лазерный сканирующий биологический микроскоп FLUOVIEW FV10i	OLYMPUS, Япония
Микрокератом LSK	MORIA Inc., Франция
Искусственная передняя камера глаза ALTK	MORIA Inc., Франция
Оптический когерентный томограф iVue100	Optovue, США
Сканирующий электронный микроскоп JCM-6000Plus	JEOL, Япония
Сушилка для образцов K850	Quorum Technologies, Великобритания
Вакуумная напылительная установка Smart Coater	JEOL, Япония
Ламинарный шкаф II класса микробиологической защиты MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific, США
Центрифуга многофункциональная SL 40	Thermo Fisher Scientific, США
Инвертированный световой фазово-контрастный микроскоп IX81 с интегрированной цифровой фотокамерой XC10	Olympus Corporation, Япония
Лабораторный CO <sub>2</sub> -инкубатор NU-5510	NuAire, США
Автоматический счетчик клеток Luna II	Logos Biosystems, Южная

	Корея
Трансмиссионный электронный микроскоп JEM 1200 EX II	JEM, Япония
Медицинский осмометр ОСКР-1М	КИВИ, Россия
pH-метр Hanna	Hanna, Португалия

Таблица 3. Список питательных сред и химических реактивов

Название	Компания производитель
Среда Игла в модификации Дульбекко и Среда Хэма (F12) в соотношении 1:1 DMEM/F12	Sigma-Aldrich, США
Смесь антибиотиков (пенициллин 10000 МЕ/мл, стрептомицин 10000 мкг/мл, амфотерицин 25 мкг/мл)	Sigma-Aldrich, США
Эмбриональная телячья сыворотка FBS	Thermo Fisher Scientific, США
L-глутамин	Thermo Fisher Scientific, США
Формалин	PanReac AppliChem, Германия
Triton-X100	PanReac AppliChem, Германия
Twen 20	PanReac AppliChem, Германия
Live and Dead	Абсам, Великобритания
Na + /K + -АТФаза	Абсам, Великобритания

ZO-1	Abcam, Великобритания
Вторичные антитела козлиные против мыши (Goat anti-Mouse)	Abcam, Великобритания
Вторичные антитела козлиные против кролика (Goat anti-Rabbit)	Abcam, Великобритания
Краситель Hoechst	Abcam, Великобритания
$\alpha$ -Гладкомышечный актин	Abcam, Великобритания
Виментин	Abcam, Великобритания
Кератокан	Santa-Cruz Biotechnology, США

Таблица 4. Список используемой лабораторной посуды

Название	Компания производитель
Чашки Петри 35 мм	SPL, Южная Корея
Чашка Петри 100 мм	Corning Inc., США
Пробирки центрифужные, 15 мл	Corning Inc., США
Криопробирки, 2,0 мл	Corning Inc., США
Флаконы культуральные, 25см <sup>2</sup>	Corning Inc., США
Пробирки типа Эппендорф, 1,5 мл	Genfollower, Китай

## 2.2 Методы экспериментальных исследований консервации донорских роговиц и питательных сред

### *Исследование водородного показателя pH консервационных сред*

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 рН = 4; 7; 10.

Для исследования водородного показателя в консервационных средах опытной и контрольной группах, были отобраны аликвоты сред в объёме 10 мл. Далее аликвоты нагревали до комнатных температур +25 °С, путем не прямого нагрева флакона на водяной бане. После стабилизации температуры, образцы помещали в емкость объёмом 10 мл. с широким горлышком для погружения рН и термо- электродов. Каждый образец исследовали пятикратно с дальнейшим усреднением полученных показателей. После каждого измерения электроды доставили и 3-х кратно промывали 10 мл. mQ водой (18,2 МΩ/см; +25 °С; очищенной через 0,22 μm мембранный фильтр)

### ***Исследование осмотического давления консервационных сред***

Под осмолярностью понимают количество частиц в 1 кг воды (моляльность раствора — это число молей в 1 л воды). Осмотическая активность (молярность) является важной характеристикой водного пространства. Осмолярность определяет обмен жидкости между сосудом и тканью, поэтому ее изменения могут существенно сказываться на интенсивности обмена воды и ионов и нарушениях их обмена. Молярная концентрация плазмы колеблется в пределах от 295 до 310 ммоль/л.

Онкотическое или коллоидно-осмотическое давление крови обусловлено белками, а сред для консервации роговиц — крупномолекулярными полисахаридами (декстранами), составляет в среднем 25 мм.рт.ст. и входит составляющей в общую осмолярность плазмы и растворов или осмотическую активность.

Осмолярность плазмы составляют Na<sup>+</sup> и анионы (88%), остальные 12% — глюкоза, мочевины, K<sup>+</sup>, Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>, белки. Осмотическую активность мочи

определяют мочевины (53%), анионы (30%),  $\text{Na}^+$  (9%), остальные 8% приходятся на  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ . Осмотическую активность определяют с помощью осмометра, принцип работы которого основан на определении криоскопической константы данного раствора и сравнении ее с криоскопической константой воды. Исследование осмотической активности консервационных сред проводилось с помощью медицинского осмометра ОСКР-1М (рис. 1) методом криоскопии общей концентрации осмотически активных веществ (осмоляльности). Прибор прост в калибровке, автоматически запоминает калибровочные значения, не требует каких-либо регулировок. Процесс измерения полностью автоматизирован, что освобождает оператора от постоянного наблюдения за работой прибора, за исключением необходимости правильной подготовки образца для каждого измерения. Автоматическая калибровка и измерение исключает субъективность в интерпретации результата. Использовалась возможность проведения измерения осмоляльности в микрообъемах плазмы именно данной модели прибора.

Для исследования отбирались аликвоты сред в объеме по 100 мкл из 20-ти миллилитровых флаконов нескольких партий выпуска. При этом диапазон измерения концентрации равнялся 0...2000 ммоль/кг  $\text{H}_2\text{O}$ ; пределы допускаемой основной абсолютной погрешности при измерении концентрации от 0 до 500 ммоль/кг  $\text{H}_2\text{O}$  составляли  $\pm 2$  ммоль/кг  $\text{H}_2\text{O}$ .





Рисунок 1 - Общий вид медицинского осмометра OSCP-1M.

***Исследование динамики гидратации и жизнеспособности клеток роговицы после консервации в среде собственной рецептуры***

Использовали жизнеспособные трупные роговицы человека, полученные из Глазного тканевого банка ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, в количестве 16 от 8 доноров. Одна роговица от каждого донора являлась контрольной, другая, парная, служила опытным образцом. Роговицы, составляющие контрольную группу, помещали во флаконы с раствором Борзенка-Мороз для консервации роговицы. Роговицы, входящие в опытную группу, консервировали во флаконах в среде собственной рецептуры, которое, за счет входящих в его состав фармакологических компонентов, обладает мембраностабилизирующим и мембрано-восстанавливающим действием.

Для подтверждения функциональных свойств консервационной среды проводили изучение уровня гидратации стромы консервированных донорских

роговиц опытной (n = 8) и контрольной групп (n = 8) 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.

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

#### **Получение клеточных культур**

##### ***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)), использование бессывороточной среды с факторами роста позволяет оценить переживаемость кератоцитов, данная среда не вызывает пролиферативной активности.

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 ( $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ), срок культивирования 14 дней, смена среды каждые 3-ое 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  $\text{cm}^2$  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 ( $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ), срок культивирования 7 дней, смена среды каждые 3-е сутки.

### ***Иммуноцитологическое исследование клеточных культур***

Для подтверждения сохранности клеточного фенотипа кератоцитов и эндотелия роговицы проводился иммуноцитохимический анализ: для

кератоцитов использовали специфические маркеры – Кератокан и Люмикан, для эндотелия роговицы - ZO-1 и Na/K АТФ-аза. Кроме того, для кератоцитов оценивали экспрессию  $\alpha$ -гладкомышечного актина, данный маркер является неспецифичным для данных клеток, но его обнаружение в культуре свидетельствует о переходе кератоцитов в миофибробласты. 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 (Табл. 5).

Таблица 5. Список используемых антител

Название (Хозяин)	Производитель	Каталожный номер
Кератокан (Кролик)	Santa Cruz	sc-66941
Люмикан (Кролик)	Abcam	ab-168348
ZO-1 (Кролик)		ab-221546
Na/K АТФаза (Мыш)	Santa Cruz	sc-48345
$\alpha$ - гладкомышечный актин (Мыш)	Abcam	ab-7817
Каспаза 3 (Кролик)		ab-44976
Каспаза 8 (Кролик)		ab-32397
Цитохром С (Мыш)		ab-110325
ВАХ (Кролик)		ab-81083

Спустя 14 дней культивирования кератоцитов и 7 дней культивирования корнеосклеральных дисков производили их фиксацию в 10% нейтральном формалине (рН=7,0) в течение 15 минут при комнатной температуре +25 °С, после чего 3-хкратно отмывали в растворе PBS (ПанЭко, Россия). Далее 2D культуру кератоцитов и корнеосклеральные диски обрабатывали 0,25 %

раствором Triton X-100 (Thermofisher scientific, США) в течение 20 минут при комнатной температуре, с последующим 3-х кратным промыванием PBS. Инкубирование с первичными антителами проводили в течение 60 мин в темноте при комнатной температуре с последующим 3-х кратным промыванием PBS. Затем производили инкубирование с вторичными антителами Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 594 (Табл. 6) в течение 60 мин в темноте при комнатной температуре. Ядра клеток контрастировали Hoechst 33258 (Табл. 6) в течение 20 мин в темноте при комнатной температуре. Изучение образцов проводили на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Olympus Fluoview FV 10i (Olympus, Япония).

Таблица 6. Список используемых вторичных антител

Название	Производитель	Каталожный номер
Козлиный против Мыши Alexa Fluor 488	Abcam	ab150113
Козлиный против Кролика Alexa Fluor 594		ab 150080
Hoechst 33258		ab 228550

### ***Изучение жизнеспособности клеток***

Жизнеспособность кератоцитов оценивали на проточном цитофлуориметре «CytoFlex» (Beckman Coulter, США) используя флуоресцентный краситель Live and Dead (Табл. 7) по протоколу, заявленному производителем. Определение индекса пролиферации производили в автоматическом счетчике клеток «Luna II» (Logos Biosystems, Южная Корея) по стандартному протоколу.

Для определения жизнеспособности эндотелиальных клеток роговицы так же использовали флуоресцентный краситель Live and Dead (Табл. 7) Однако изучение препаратов проводили на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе «Olympus Fluoview FV 10i» (Olympus, Япония).

Таблица 7. Используемый флуоресцентный краситель

Название	Производитель	Каталожный номер
Флуоресцентный краситель Live and Dead	Abcam	ab 115347

#### **2.4 Исследование донорских роговиц, консервированных в среде собственной рецептуры**

##### ***Морфологическая оценка заднего эпителия роговицы и изучения архитектоники сформированных ультратонких трансплантатов***

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. Все этапы включали в себя следующие действия:

1. Для удаления остаточного загрязнения после фиксации в нейтральном 10% формалине, образцы промывали 3-хратно раствором PBS.
2. Для дегидратации образцов использовали раствор ацетона в восходящей концентрации (10, 20, 30, 50, 70, 90, 100x3) по 30 минут.

3. Для удаления раствора ацетона, образцы помещали в сушку в критической точке в парах CO<sub>2</sub> при возрастающем давлении до 1250 psi +37 °С в течение 120 мин на приборе «Quorum EMS 850» (Quorum, Великобритания).

4. Для обеспечения электронно-проходящего слоя дегидратированные образцы помещали на предметные столики для электронной микроскопии с последующим напылением золота (толщина слоя 5 нм) с использованием «Smart Coater» (Jeol, Япония).

5. Далее образцы помещались в камеру сканирующего электронного микроскопа, анализ осуществлялся в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 15 кВ.

### ***Трансмиссионная электронная микроскопия***

Для изучения на трансмиссионном электронном микроскопе сохранности митохондриального аппарата эндотелиальных клеток роговицы, а также ультраструктурных особенностей было получено 12 пар корнеосклеральных дисков из Глазного тканевого банка ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Полученные корнеосклеральные диски делили на две группы:

Контрольная группа (n=12) – консервацию проводили в растворе для хранения роговицы (Борзенка-Мороз).

Опытная группа (n=12) – консервацию проводили в среде собственной рецептуры.

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

ТЭМ выполнялся на базе лаборатории анатомии микроорганизмов «НИЦ Эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи».

Полученные образцы фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида на 0,1М фосфатном буфере, в холодильнике при +4 °С в течение 12 часов. Далее

образцы отмывали 3-х кратно раствором PBS в течение 2-х часов. Контрастирование материала осуществляли 1% растворе четырехокси осмия в течение 1,5 часов при комнатной температуре +25 °С. Далее образцы дегидратировали в восходящей концентрации этанола: 25%; 30%; 50% (3-х кратно, по 5 мин); далее раствор заменяли на 70% р-р этанол + ацетат (1:1) в течение 2-х часов; 96% и 100% этанол (2 раза по 15 мин); 100% ацетон (2 раза по 20 мин). Стабилизацию образцов производили рабочей смесью ацетона и смесью смол в соотношении 1:1 в течение 2-х часов. Заливку образцов производили по общепринятой методике в ЭПОН-812. Полимеризация образцов проводили в течение 24-х часов при +37 °С, далее в течение 48-ми часов при +45 °С и в течение 60-ти часов при +56 °С. Полутонкие срезы толщиной 1 мкм готовили на ультратоме LKB-3 (Швеция), окрашивали толуидиновым синим, ориентацию материала проводил под световым микроскопом для дальнейшей заточки блока. Полученные срезы образцов контрастировали ацетатом уранила и цитратом свинца, исследовали в электронном микроскопе JEM 1200 EX II (Япония).

### ***Флуоресцентная микроскопия***

Для определения жизнеспособности эндотелиальных клеток роговицы в обеих группах после гипотермической консервации при +4...6°С проводили окрашивание Аннексином-V с контрастированием ядер Hoechst 33258 (Табл. 8). Для этого образцы 3-х кратно отмывали раствором PBS и добавляли смесь флуоресцентных красителей и окрашивали в течение 15 мин., далее образцы 3-х кратно отмывались раствором PBS. Анализ препаратов проводили на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе «Olympus Fluoview FV 10i» (Olympus, Япония).

Таблица 8. Используемые флуоресцентные красители



Название	Производитель	Каталожный номер
Аннексин-V	Abcam	ab 108194
Ноеchst 33258		ab 228550

## **2.5. Техника выкраивания ультратонкого трансплантата из консервированных донорских роговиц методом задней автоматизированной послойной кератопластики**

Роговицы контрольной (n = 6) и опытной (n = 6) групп консервировали при + 4<sup>0</sup>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). Для этого образцы однократно промывались раствором PBS, далее образцы переносили в чашки Петри и размещались эндотелием вверх, добавляли 200 мкл 10-кратного раствора красителя на 10 мин., далее удаляли краситель 3-х кратным отмыванием в PBS. Все манипуляции проводили в темное помещение при комнатной температуре. 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 JCM-6000, Япония)

## **2.6. Методы статистических исследований**

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).

## **ГЛАВА ТРЕТЬЯ**

### **РЕЗУЛЬТАТЫ РАЗРАБОТКИ СРЕДЫ ДЛЯ ДЕГИДРАТАЦИИ И ГИПОТЕРМИЧЕСКОЙ КОНСЕРВАЦИИ ДОНОРСКИХ РОГОВИЦ**

Целью данной главы явилась разработка рецептуры консервационной среды и обоснование ее физико-химических свойств для оптимальной дегидратации донорской роговицы, позволяющей выкраивать ультратонкий трансплантат методом одинарного прохода микротома; исследование морфофункциональных характеристик и жизнеспособности культуры кератоцитов и эндотелиальных клеток донорских роговиц, культивируемых в разработанной среде и морфометрические исследования стабильности, плотности и жизнеспособности эндотелиальных клеток донорских роговиц после консервации в разработанной среде.

#### **3.1. 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.

Для обоснования собственной рецептуры среды для дегидратации был проведен ряд исследований, включающий в себя изучение физико-химических свойств среды, подтверждение способности к дегидратации и переживаемости собственных клеток роговицы в данной среде.

Известно средство для консервации донорских роговиц глаза (патент РФ № 2450515), содержащее: среду 199, среду Хэма F-10, среду Дульбекко-Игла, хондроитин-сульфат, декстран-40, гентамицин-сульфат, амфотеррицин В и дополнительно содержит пептидный препарат NeyDIL № 37 St.III (P/Y ЛРС-008827/08-061108), который является основным регенераторным средством для роговицы, улучшающим процессы внутриклеточной репарации, диффузии, осмоса, стимулирующим метаболизм и восстанавливающим цитоархитектонику ЭК роговицы, при следующем соотношении компонентов, мас. %: Среда 199 25,0, Среда Хэма F-10 25,0, хондроитин-сульфат А 0,5, Декстран-40 5,0, Гентамицин-сульфат 0,00014, Амфотерицин В 0,00015, NeyDIL №37 St.III 0,00015, среда Дульбекко-Игла - остальное.

Однако было установлено, что использованные регуляторные пептиды NeyDIL №37 St.III не восстанавливают липидный слой клеток роговицы, не уменьшают внутриклеточный некроз эндотелия и кератоцитов.

Предполагаемым результатом разработки среды для дегидратации и гипотермической консервации донорских роговиц является повышение жизнеспособности трансплантата путем восстановления клеточных и внутриклеточных мембран, пролонгирование сроков консервации за счет сохранения плотности эндотелиальных клеток в режиме гипотермической (при температуре + 4...8 °С) консервации донорской роговицы.

Разрабатываемое средство для консервации донорской роговицы, в режиме гипотермической консервации, содержит среду 199, среду Хэма F-10, хондроитин-сульфат, декстран-40, Гентамицин-сульфат, амфотерицин В и среду Дульбекко-Игла, дополнительно содержит препарат Фосфоглив при следующем соотношении компонентов, мас. %:

Среда 199	25,0
Среда Хэма F-10	25,0

Хондроитин-сульфат А	0,5
Декстран-40	6,0-7,0
Гентамицин-сульфат	0,00014
Амфотерицин В	0,00015
Фосфоглив	0,025-0,05
Среда Дульбекко-Игла	остальное

При этом среда 199 имеет следующий состав, мг/л: L-аланин 25; L-аргинина хлорид 70; аспарагиновая кислота 30; L-цистеина хлорид - 0,0987; L-цистина динатриевая соль; L-глутаминовая кислота 66,82; L-глутамин 100; глутатион 0,05; глицин 50; L-гистидина хлорид одноводный 21,88; L-гидроксипролин 10; L-изолейцин 20; L-лейцин 60; L-лизина хлорид 70; L-метионин 15; L-фенилаланин 25; L-пролин 40; L-серин 25; L-треонин 30; L-триптофан 10; L-тирозина динатриевая соль - 49,72; L-валин 25; L-аскорбиновая кислота 0,05; биотин 0,01; кальциферол 0,1; D-кальция пантотенат 0,01; холина хлорид 0,5; фолиевая кислота - 0,01; и-инозитол 0,05; менафтона натрия бисульфат трехводный 0,019; никотиновая кислота 0,025; никотинамид 0,025; пара-амино-бензойная кислота 0,05; пиридоксальхлорид 0,025; пиридоксинхлорид 0,025; рибофлавин 0,01; тиамин хлорид 0,01; D-L-токоферола фосфата динатриевая соль 0,01; витамина А-ацетат 0,1147; кальция хлорид двухводный 185,5; железа нитрат девятиводный 0,01; калия хлорид 400; калия дегидроортофосфат 60; магния сульфат семиводный 200; натрия хлорид 8000; натрия гидроортофосфат 47,5; аденина сульфат 10; 5-АМФ 0,2; АТФ динатриевая соль 10; холестерол 0,2; 2-дезоксирибоза 0,5; D-глюкоза 1000; гуанина хлорид - 0,3; гипоксантин 0,3; D-рибоза 0,5; натрия ацетата 36,71; натриевая соль фенола красного 17; тимин 0,3; твин 80-5; урацил 0,3; ксантин 0,3.

Среда Хэма F-10 имеет следующий состав, мг/л: L-аланин 8,91; L-аргинина хлорид 210,7; L-аспарагин 1-водный - 15,01; L-аспарагиновая кислота 13,31; L-цистеина хлорид 31,53; L-глутаминовая кислота 14,71; L-глутамин 146,2; глицин 7,51; L-гистидина хлорид одноводный 20,96; L-изолейцин 2,62; L-лейцин 13,12; L-лизин 29,3; L-метионин 4,48; L-фенилаланин 4,96; L-пролин 11,51; L-серин 10,5; L-треонин 3,57; L-триптофан 0,61; L-тирозина натриевая соль 2,25; L-валин 3,51; биотин 0,024; D-кальция пантотенат 0,715; хлорид холина 0,698; фолиевая кислота 1,32; и-инозитол 0,541; никотинамид 0,611; пиридоксин-хлорид 0,206; рибофлавин 0,376; тиамин хлорид 1,012; витамин B12 1,36; кальция хлорид двухводный 44,1; сульфат меди пятиводный 0,0025; сульфат железа семиводный 0,8346; хлорид калия - 285; калия дегидрофосфат 83; магния сульфат семиводный 152,7; натрия хлорид 7400; натрия гидроортофосфат 156,2; цинка сульфат семиводный 0,0288; D-глюкоза 1100; гипоксантин 4,08; липоевая кислота 0,206; натриевая соль фенола красного 12; натрия пируват 110; тимидин 0,727.

Среда Дульбекко-Игла имеет следующий состав, мг/л: L-аргинин 84; L-цистина динатриевая соль 56,78; L-глутамин 584; глицин 30; L-гистидина хлорид одноводный 42; L-изолейцин 104,8; L-лейцин 104,8; L-лизина хлорид 146,2; L-метионин 30; L-фенилаланин - 66; L-серин 42; L-треонин 95,2; L-триптофан 16; L-тирозина динатриевая соль 89,5; L-валин 93,6; D-кальция пантотенат 4; холина хлорид 4; фолиевая кислота 4; и-инозитол 7; никотинамид 4; пиридоксаль-хлорид 4; рибофлавин 0,4; тиамин хлорид 4; кальция хлорид двухводный 264,9; нитрат железа девятиводный 0,1; калия хлорид 400; магния сульфат семиводный 200; натрия хлорид 6400; натрия бикарбонат 3700; натрия дигидроортофосфат двухводный 141,3; D-глюкоза 4500; натриевая соль фенола красного 15; натрия пируват 110.

Фосфоглив (рег.№: Р N002528/02), содержит фосфолипиды (липоид С100) 500 мг, натрия глицирризинат (тринатриевая соль глицирризиновой кислоты) 200 мг; Вспомогательное вещество: мальтоза - 1800 мг.

Выбор сред объяснялся уязвимостью эндотелиальных клеток, относящихся к глиальной ткани. Наиболее оптимальным является выбор трех сред - среда 199, среда Хэма F-10 и среда Дульбекко-Игла, в заявленных соотношениях, имитирующих аминокислотный и метаболический состав водянистой влаги передней камеры интактного глаза.

Хондроитин-сульфат А относится к цитопротекторам, обладая соответствующим знаком и электронным зарядом, он образует поверхностную защитную пленку на клетках эндотелиального пласта роговицы. Тем самым предотвращается механическое повреждение и десквамацию клеток эндотелия роговицы в процессе гипотермической консервации донорского материала.

Декстран с молекулярной массой 40000 D относится к высокомолекулярным онкотическим компонентам среды и, таким образом, подобранный в заявленной концентрации создает в среде онкотическое давление равное 320 мосм/л, при котором предотвращается процесс набухания клеток и коллоидного вещества стромы донорской роговой оболочки в процессе длительной гипотермической консервации. Помимо этого, данная среда собственной рецептуры содержит 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. При этом общая осмолярность среды, включая онкотическое давление, опосредованное именно концентрацией декстрана-40, не должна выходить за референсные рамки физиологической нормы и в идеальном (расчетном) варианте должна соответствовать или незначительно превышать таковое значение в среде Борзенка-Мороз. Водородный показатель (pH) предложенной

рецептуры среды также не должен отличаться от нормативных значений, независимо от увеличения онкотического компонента общей осмолярности предложенного раствора.

Для предотвращения роста патогенной микрофлоры добавлены: гентамицин-сульфат, оказывающий бактерицидное и бактериостатическое действия в отношении широкого спектра грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, и амфотерицин В, обладающий фунгицидным и фунгистатическим эффектами.

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. Согласно аннотации к применению, дополнительно обладает антиоксидантной и противовирусной активностью.

Заявленное средство для консервации донорской роговицы благодаря входящим в его состав компонентам в обозначенных концентрациях восстанавливает клеточные мембраны (мембрано-восстанавливающее действие) и обладает мембрано-протективным действием.

В результате этого создаются условия для повышения жизнеспособности трансплантата роговицы и пролонгирования сроков консервации донорской роговицы для задней послойной кератопластики.

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.



### **3.2 Технология получения собственной рецептуры среды для дегидратации и гипотермической консервации донорских роговиц**

Средство для консервации роговицы получают следующим образом: в условиях ламинарной комнаты в химически чистую и стерильную мерную колбу сливают вместе две среды: 25 мл среды 199 и 25 мл среды Хэма F-10. Далее последовательно вносят 0,00014 г гентамицин-сульфата, 0,00015 амфотерицина В. Состав разделяют на две равные части по 25 мл и растворяют в первой части 6-7 г декстрана-40, а во второй части 0,5 г хондроитин-сульфата А путем медленного нанесения сухого вещества на поверхность жидкой смеси. После внесения указанных компонентов растворы оставляют до полного набухания на 80-120 минут, после чего полностью растворяют. Затем оба раствора сливают вновь вместе в мерную колбу, и добавляют среду Дульбекко-Игла до метки 100 мл. Затем, после префилтрации через фильтр «Миллипор» с диаметром пор 0,45 мкм, средство без добавления Фосфоглива разливают по 20 мл во флаконы, с одновременной «Глубинной стерилизацией» через систему миллиметровых фильтров с диаметром пор 0,22 мкм. Флаконы укупориваются стерильными крышками и помещаются в холодильник для сохранения при температуре +4° С.

Средство используют следующим образом. В условиях стерильного бокса выкраивают роговицу с ободком склеры диаметром 16 мм и помещают во флакон с предварительно подготовленным средством (без Фосфоглива) и добавляют в него Фосфоглив в соотношении 0,025-0,05 мас.%, разведенный по инструкции производителя непосредственно перед использованием, плотно закрывают и консервируют при температуре +4...8°С до 14 суток.

### **3.3. Исследование физико-химических показателей и основных функциональных свойств консервационной среды собственной рецептуры**

В основу консервирующего раствора (Борзенка-Мороз), применяемого в России, положены принципы, разработанные С.А. Борзенком [3]. Как известно, консервирующие составы должны пролонгировать не только метаболизм клеток роговицы, но и осмотическую резистентность, поддерживать онкотическое равновесие клеток и стромы роговицы, препятствуя их отеку (за счет декстрана 40000), должны иметь достаточную буферную емкость для длительного поддержания рН в пределах 7,35-7,45 (HEPES-буфер).

#### ***3.3.1 Исследование физико-химических показателей консервационной среды собственной рецептуры***

Согласно результатам ранее выполненных исследований [3], водянистая влага передней камеры глаза человека по основным физико-химическим параметрам (общая осмолярность и водородный показатель –рН), практически сопоставима с плазмой крови и ликвором и соответствует таковым в среде Борзенка-Мороз (табл. 9 и 10). И так как состав предложенной нами среды с дегидратирующими свойствами (опытная группа) имеет увеличенную концентрацию декстрана-40 по сравнению с известным составом среды Борзенка-Мороз (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 (табл. 11 и 12).

Таблица 9. Нормативные значения водородного показателя (рН) в жидкостях организма человека и консервационной среде Борзенка-Мороз [3]

Объект исследования	Референсные значения	Среднее значение
Кровь, плазма	7,37 – 7,44	7.4
Ликвор цистернальный	7,32-7,34	7,33
Водянистая влага иглаза	7,50-7,56	7,53
Среда Борзенка-Мороз	7.40 – 7.44	7.42

Таблица 10. Нормативные значения общей осмолярности (мОсм/л) в жидкостях организма человека и консервационной среде Борзенка-Мороз [3]

Объект исследования	Референсные значения	Среднее значение
Кровь, плазма	290-320	305
Ликвор цистернальный	310-320	315
Водянистая влага глаза	310-330	320
Среда Борзенка-Мороз	321-325	323

Таблица 11. Водородный показатель (рН) в опытной и контрольной группах (p ≥ 0,05)

№ партии	Контроль					M±σ
К-1	7,38	7,41	7,39	7,42	7,41	7,40 ± 0,01
К-2	7,40	7,41	7,39	7,42	7,42	7,40 ± 0,01
К-3	7,41	7,43	7,42	7,41	7,43	7,42 ± 0,01
К-4	7,38	7,41	7,39	7,40	7,41	7,39 ± 0,01
Σ						7,40 ± 0,01
Опыт						
О-1	7,41	7,42	7,40	7,41	7,40	7,40 ± 0,008
О-2	7,38	7,39	7,40	7,41	7,39	7,39 ± 0,01
О-3	7,40	7,41	7,41	7,41	7,40	7,40 ± 0,005
О-4	7,42	7,41	7,42	7,41	7,41	7,41 ± 0,005
Σ						7,40 ± 0,007

Таблица 12. Общая осмолярность в опытной и контрольной группах (p < 0,05)

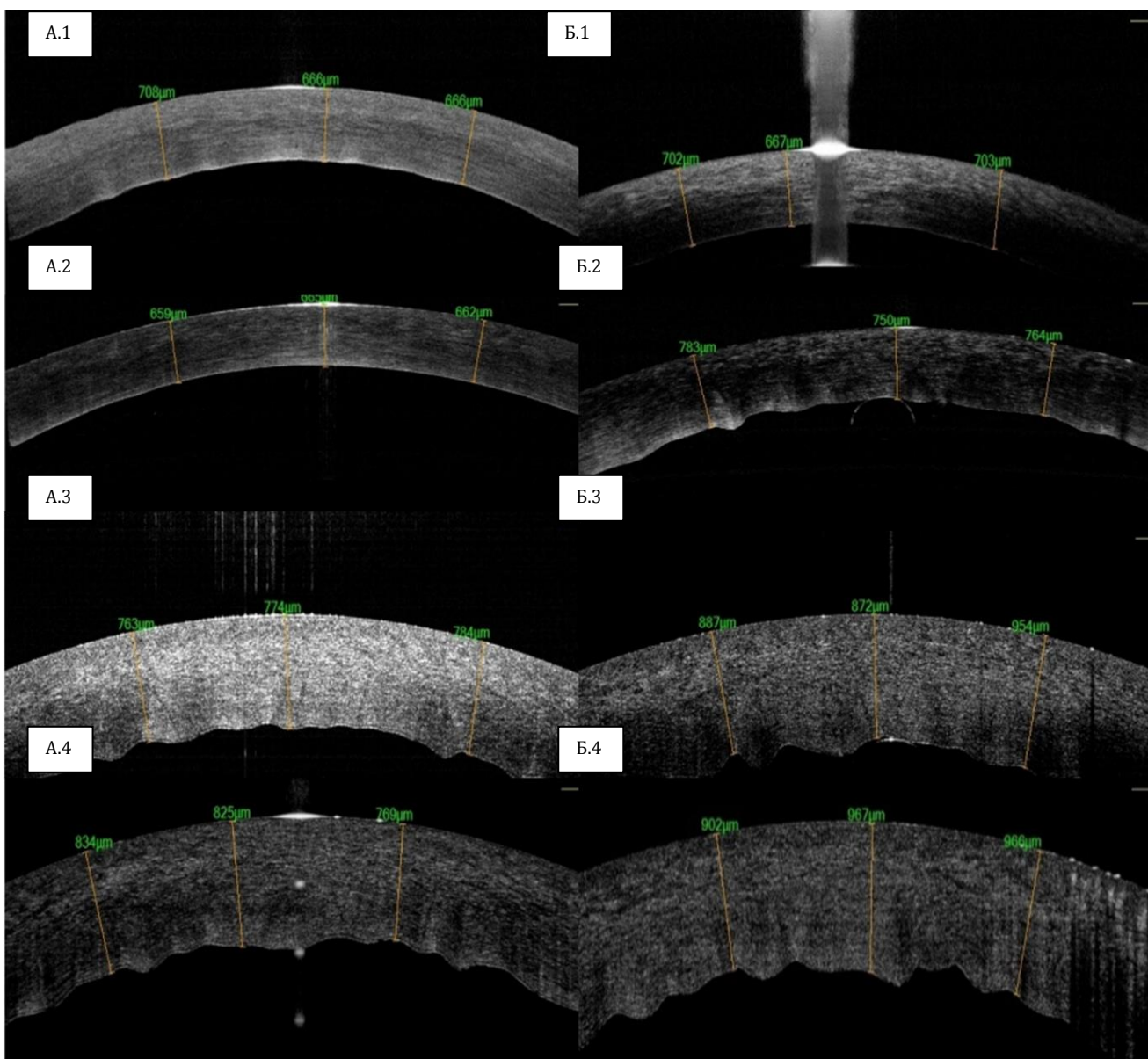
№ партии	Контроль					M±σ
К-1	323	324	323	324	323	323 ± 0,5
К-2	321	321	322	321	322	321 ± 0,5
К-3	325	325	323	324	325	324 ± 0,9
К-4	323	322	324	321	322	322 ± 1,1
Σ						323 ± 0,8
Опыт						
О-1	327	326	325	328	325	326 ± 1,3

O-2	325	327	327	326	325	326 ± 1,0
O-3	325	326	326	327	325	325 ± 0,8
O-4	327	326	325	326	327	326 ± 0,8
Σ						326 ± 0,9

Предложенная среда с дегидратирующими свойствами имеет схожий рН со средой Борзенка-Мороз, при этом показатель осмолярности статистически выше, чем в указанной среде, что обусловлено большим содержанием онкотических компонентов, чем и объясняется дегидратирующая способность предложенного раствора. При этом важно отметить, что несмотря на повышение значений осмолярности предложенного раствора входила в рамки референсных значений осмолярности влаги передней камеры.

### ***3.3.2 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  $648 \pm 35$  мкм) к 3-м суткам, в контрольной группе гидратация наблюдалась с первых суток консервации. Пахиметрическая оценка с использованием оптического когерентного томографа на всех сроках наблюдения в опытной и контрольной группах показана на рисунке 2.



А – опытная группа, Б – контрольная группа.

Рисунок 2 - ОКТ-картина изменения толщины донорской роговиц в опытной и контрольной группах на 0-е (1), 1-е (2), 3-е (3) и 4-е (4) сутки исследования.

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

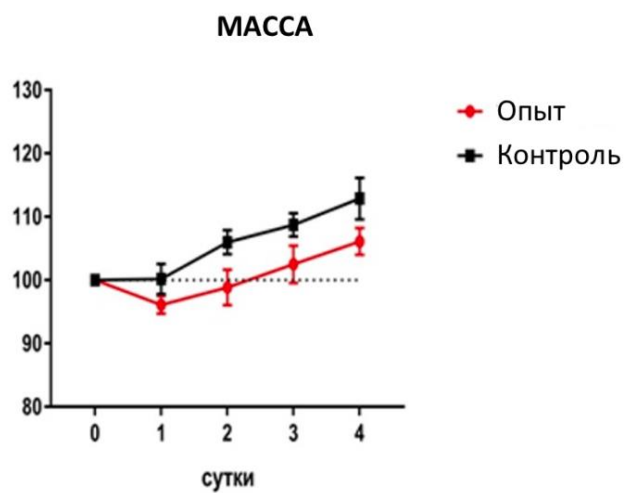


Рисунок 3 - Динамика изменения массы донорских роговиц в опытной и контрольных группах, %.

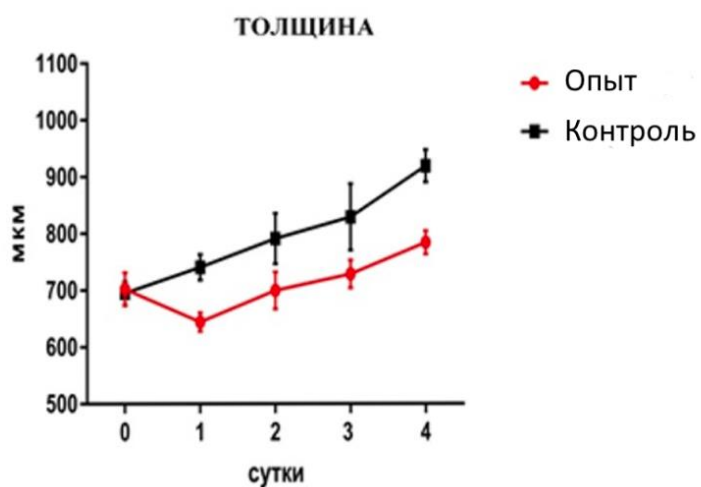


Рисунок 4 - Динамика изменения толщины донорских роговиц в опытной и контрольных группах (по данным ОКТ), мкм.

Таблица 13. Толщина донорских роговиц в опытной и контрольной группах по данным оптической когерентной томографии (ОКТ), мкм (\*p<0,05)

Сутки	Опытная группа	Контрольная группа
0 сутки	766.25 +/- 45,84	757.58 +/- 37.74
1 сутки	627.50 +/- 55.19*	771.00 +/- 56.94
2 сутки	684.83 +/- 43.78*	819.45 +/- 72.21
3 сутки	754.00 +/- 17.91*	884.58 +/- 55.97
4 сутки	801.45 +/- 30.80*	923.83 +/- 25.01

Выявлена корреляция между массой (Рис.3) и толщиной исследуемых роговиц (Рис.4; Табл.13) 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.

Таким образом, с помощью физико-химических исследований был обоснован состав, а также технология получения собственной рецептуры среды для дегидратации и гипотермической консервации донорских роговиц; было показано, что разработанная в данном исследовании опытная консервационная среда обеспечивает более выраженную дегидратацию роговицы по сравнению с базисной консервационной средой, используемой в контрольной группе.



### ***3.4. Исследование переживаемости культуры клеток заднего эпителия роговицы и кератоцитов в среде собственной рецептуры***

Целью данной части работы стало: провести исследование морфофункциональных характеристик и жизнеспособности культуры кератоцитов и эндотелиальных клеток донорских роговиц, культивируемых в разработанной среде.

Для оценки влияние предложенной рецептуры среды на переживаемость клеток донорской роговицы было сформировано 2 группы исследования: опытная и контрольная, при этом в опытной группе культивирование осуществлялось в заявленной среде, в контрольной – в соответствующих культуральных средах.

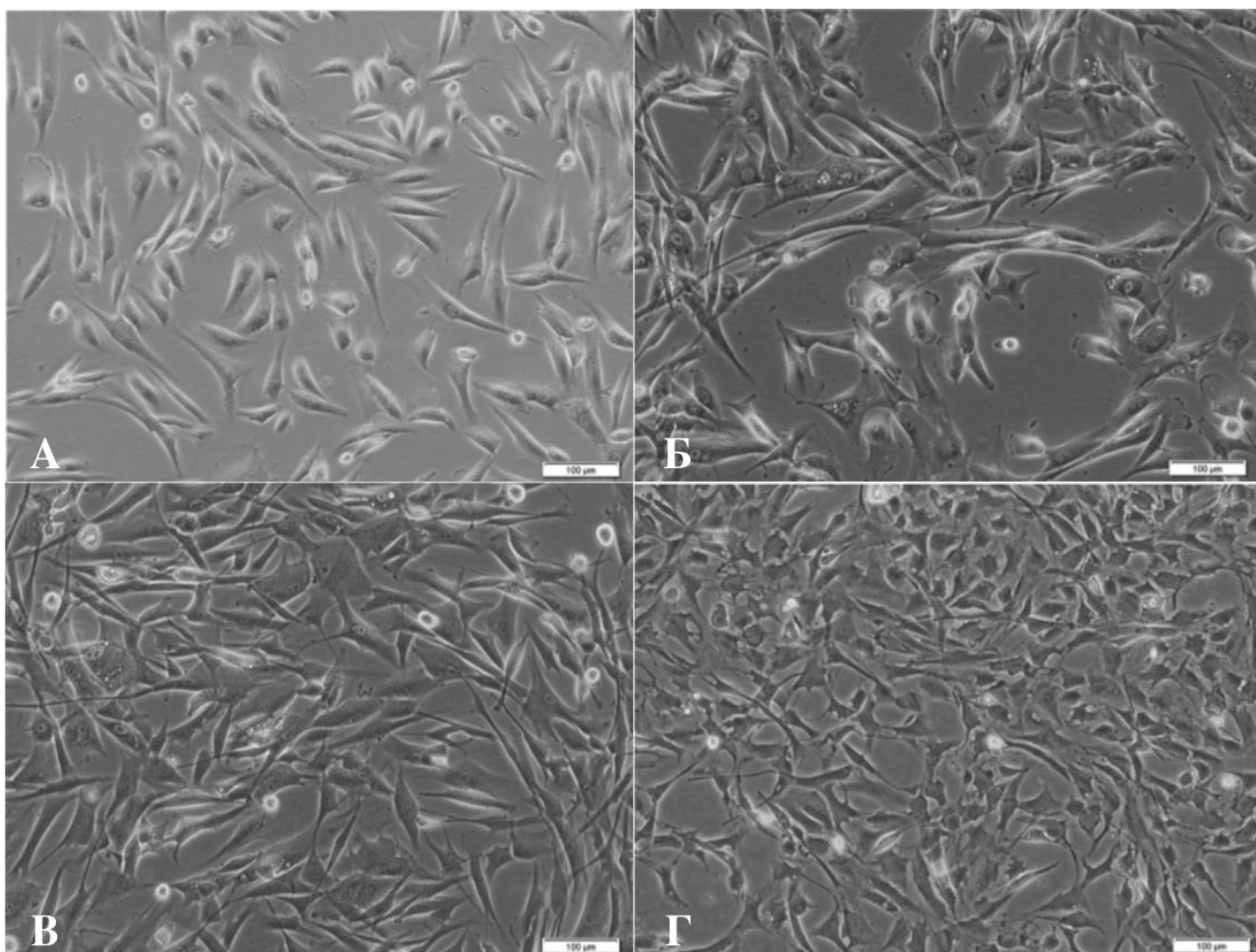
#### ***3.4.1 Оценка роста и фенотипа 2D культуры кератоцитов роговицы***

Морфология кератоцитов в исследуемых группах была представлена схожими биполярными мезенхимо-подобными клетками (Рис 5).

В ходе исследования отметили слабую пролиферативную активность кератоцитов в обеих исследуемых группах в течение всего срока культивирования. Коэффициент пролиферации в экспериментальной группе составил 12,63%, в контрольной группе - 13,86%. Количество делящихся кератоцитов в обеих группах в разные сроки культивирования представлены в таблице 14. 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 (Таб. 15).



А - 3 сутки, контрольная группа; Б - 3 сутки, опытная группа; В – 14 сутки, контрольная группа; Г – 14 сутки опытная группа.

Рисунок 5 - Морфология клеточной культуры кератицитов, *Световая фазово-контрастная микроскопия ув. 100х.*

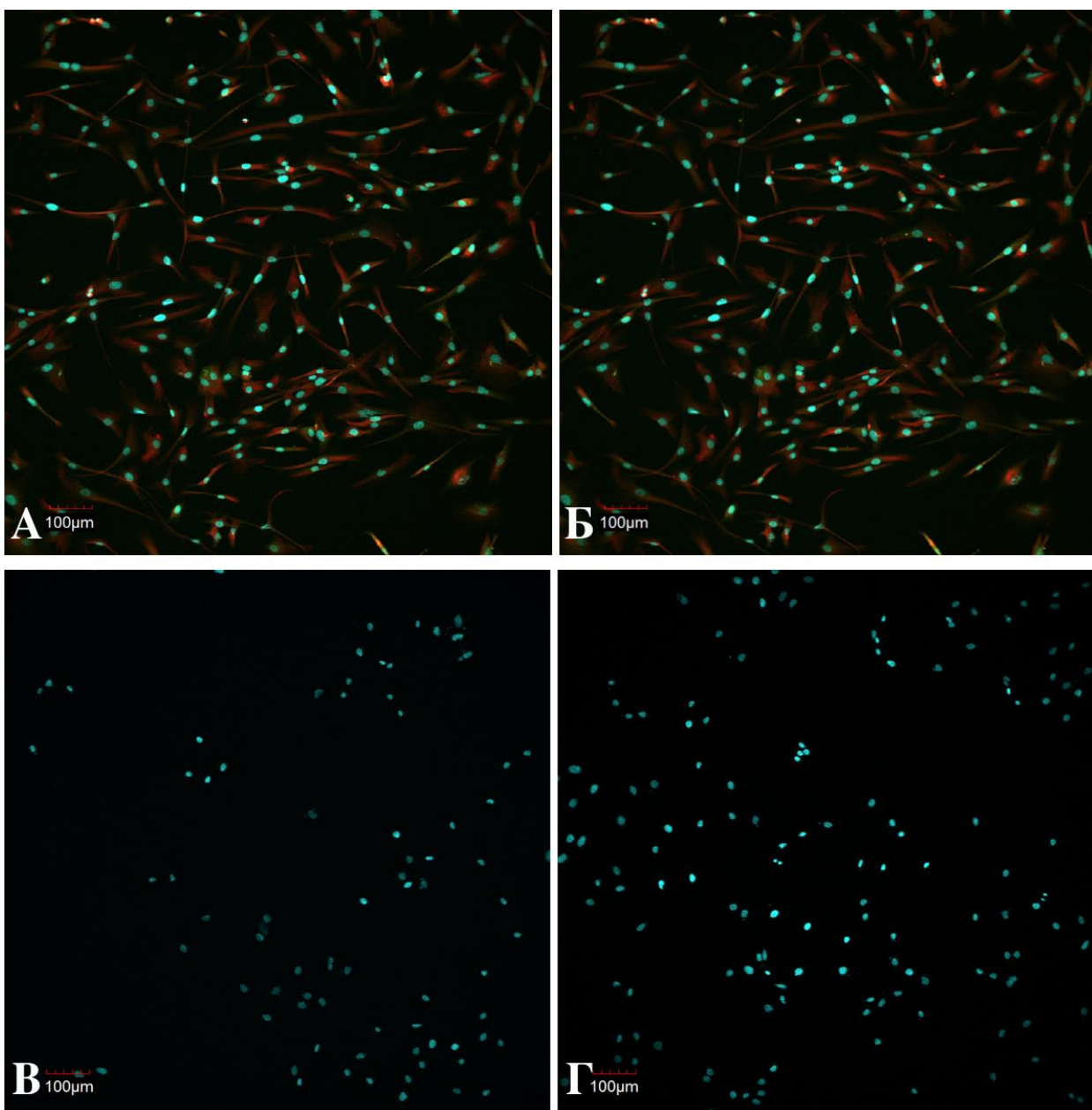
Таблица 14. Динамика изменения количества кератоцитов по группам, тыс. кл.

Группы сравнения	1-е сутки	4-е сутки	7-е сутки	10-е сутки	14-е сутки
Контрольная группа	300 ± 2,6	305,9 ± 1,8	312,5 ± 4,8	325,8 ± 12,8	337,9 ± 14,8
Опытная группа	300 ± 2,8	308,7 ± 2,3	315,9 ± 5,3	331,7 ± 11,9	341,5 ± 13,6

Таблица 15. Соотношение живых и мертвых клеток кератоцитов

Группы сравнения	1-е сутки	4-е сутки	7-е сутки	10-е сутки	14-е сутки
Контрольная группа	98% / 2%	94,3% / 5,7%	93,5% / 6,5%	92,7% / 7,3%	91,5% / 8,5%
Опытная группа	97% / 3%	93,6% / 6,4%	93% / 7%	92,5% / 7,5%	91,8% / 8,2%

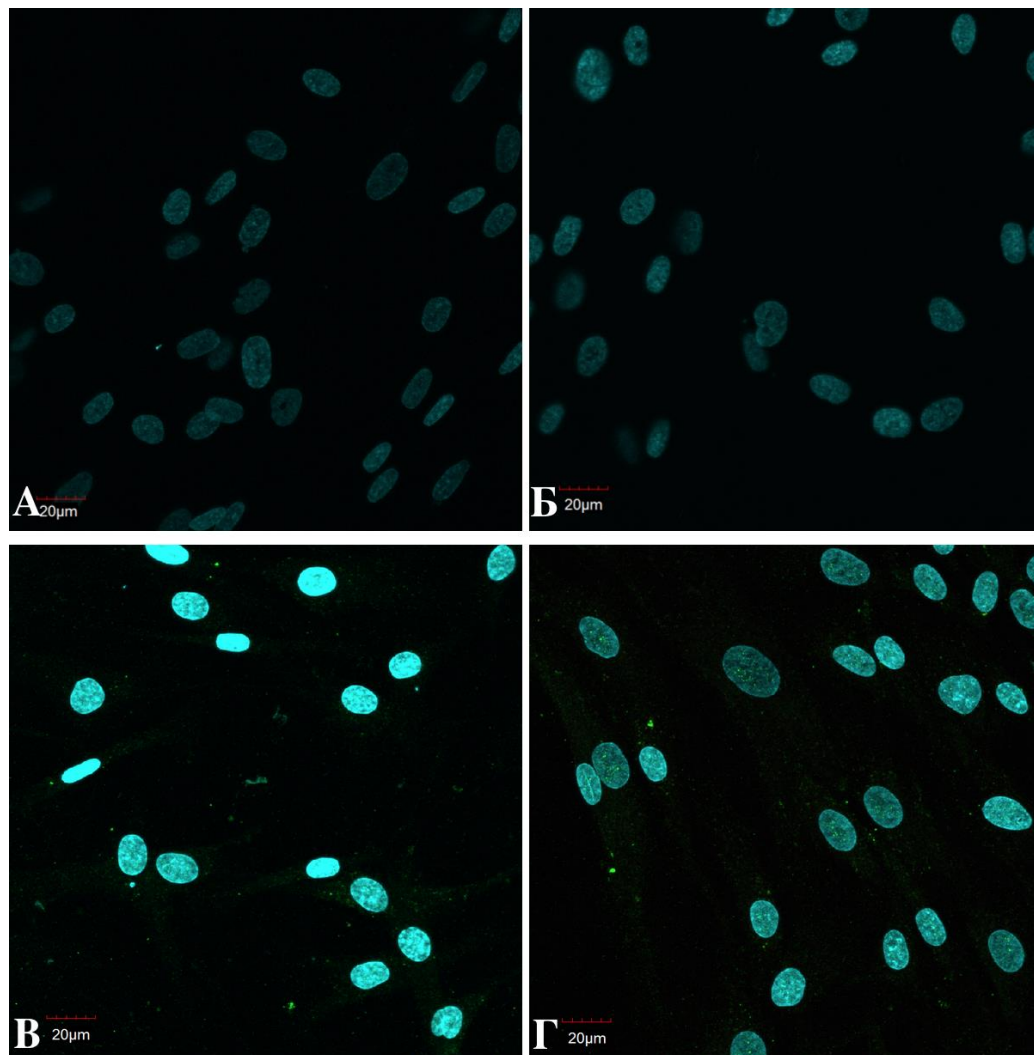
Иммуноцитохимическое окрашивание показало, что кератоциты активно экспрессируют кератокан и люмикан и не экспрессируют специфический маркер миофибробластов –  $\alpha$ -гладкомышечный актин (Рис. 6).



А,Б – экспрессия кератокана (красный цвет) и люмикана (зеленый цвет) В,Г – экспрессии  $\alpha$  – гладкомышечного актина (зеленый цвет); А,В – контрольная группа, Б,Г – опытная группа.

Рисунок 6 - Иммуноцитохимический анализ культуры кератоцитов  
*Иммуноцитохимическое окрашивание, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, ядра контрастированы бис-бензимида (Hoechst 33258) ув. 100x*

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 (Рис. 7).



А,Б – экспрессия цитохрома С (красный цвет) и ВАХ (зеленый цвет) В,Г – экспрессии каспазы 8 (зеленый цвет) и каспазы 3 (красный цвет); А,В – контрольная группа, Б,Г – опытная группа.

Рисунок 7 - Иммуноцитохимический анализ культуры кератоцитов  
*Иммуноцитохимическое окрашивание, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, ядра контрастированы бис-бензимида (Hoechst 33258) ув. 100х.*

Полученные результаты показали, что предложенная нами среда оригинальной рецептуры (патент РФ RU 2676311C1 от 27.12.2018 г.) способствует сохранению уникального фенотипа кератоцитов и является нетоксичной.

### **3.4.2 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 (Таб. 16).

Таблица 16. Динамика изменения количества клеток заднего эпителия роговицы в исследуемых группах, кл/мм<sup>2</sup>

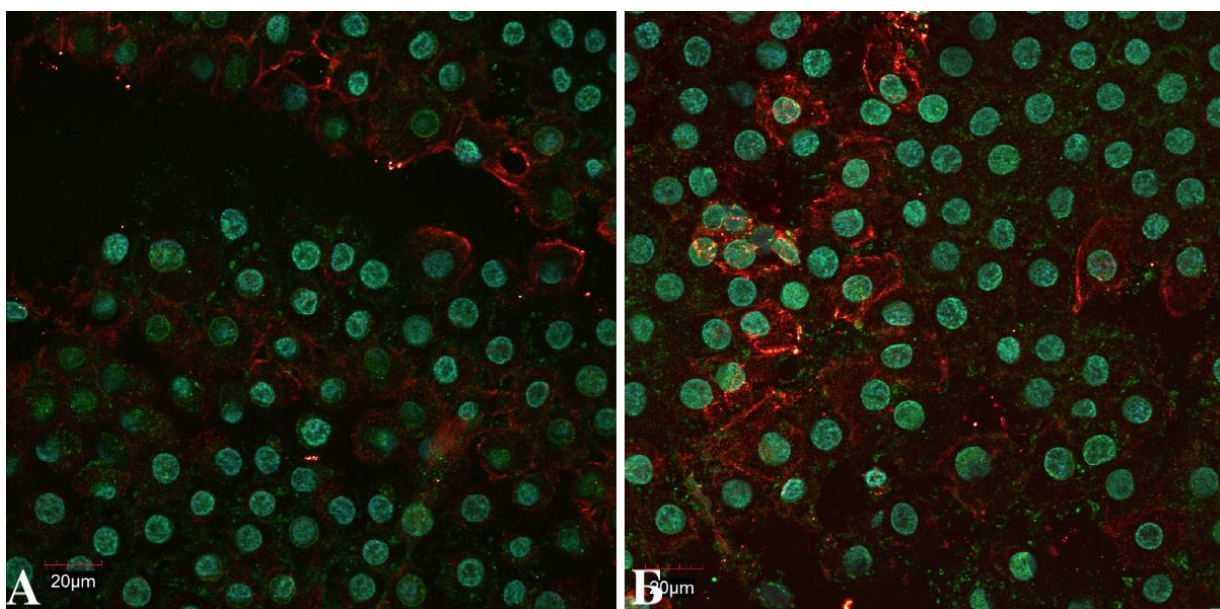
Группы сравнения	1-е сутки	4-е сутки	7-е сутки
Контрольная группа	2650 ± 239	2510 ± 280	2430 ± 320
Опытная группа	2710 ± 220	2590 ± 250	2490 ± 220

При детекции живых и мертвых клеток флуоресцентным красителем «Live and Dead» значительных различий между группами также выявлено не было (Таб. 17). Следует отметить, что потеря клеток в опытной группе не превышала 8%.

Таблица 17. Соотношение живых и мертвых клеток заднего эпителия роговицы

Группы сравнения	1-е сутки	4-е сутки	7-е сутки
Контрольная группа	99% ± 1%	95% ± 5%	90% ± 10%
Опытная группа	99% ± 1%	96% ± 4%	91% ± 9%

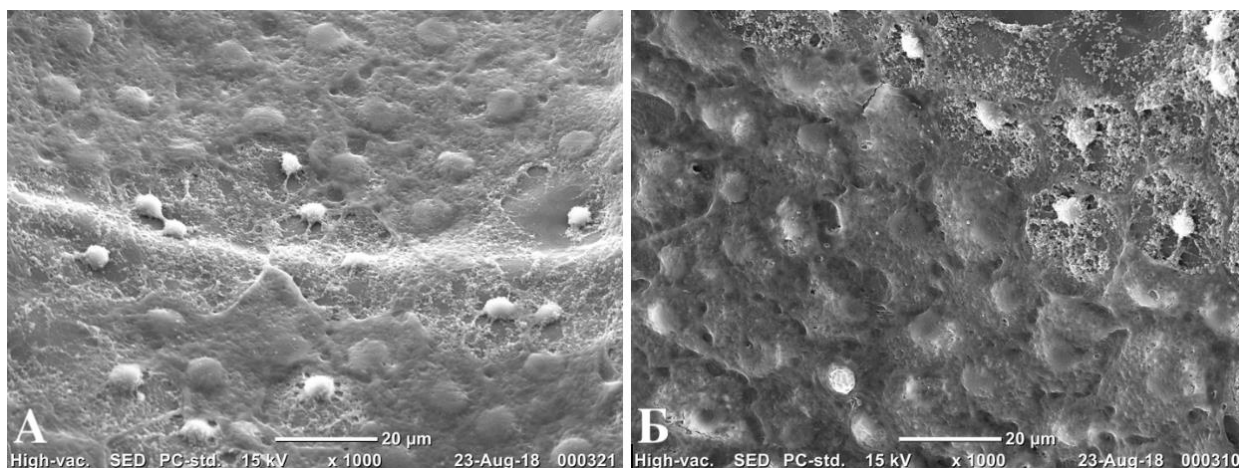
Проведенное иммуноцитохимическое окрашивание спустя 7 дней культивирования показало наличие функциональных маркеров эндотелия ZO – 1 и Na/K АТФазы (Рис. 8). Клеток, не экспрессирующих данные маркеры в обеих группах обнаружено не было.



А – контрольная группа, Б – опытная группа.

Рисунок 8 - Иммуноцитохимический анализ клеток эндотелия роговицы, экспрессия Na/K АТФазы (красный цвет), ZO – 1 (зеленый цвет); Иммуноцитохимическое окрашивание, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, ядра контрастированы бис-бензимидазолом (Hoechst 33258) ув. 100х

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 (Рис. 9).



А – контрольная группа, Б – опытная группа.

Рисунок 9 - Морфология клеток эндотелия роговицы на 7-е сутки культивирования, *Электронная сканирующая микроскопия, высокий вакуум, ускоряющее напряжение 15 kV, ув. 1000x*

Таким образом, 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 уникального 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.



### **3.5. Исследование ультраструктуры, плотности и жизнеспособности эндотелиальных клеток донорских роговиц, консервированных в среде собственной рецептуры**

Целью данной части работы стало: провести морфометрические исследования стабильности, плотности и жизнеспособности эндотелиальных клеток донорских роговиц после консервации в разработанной среде.

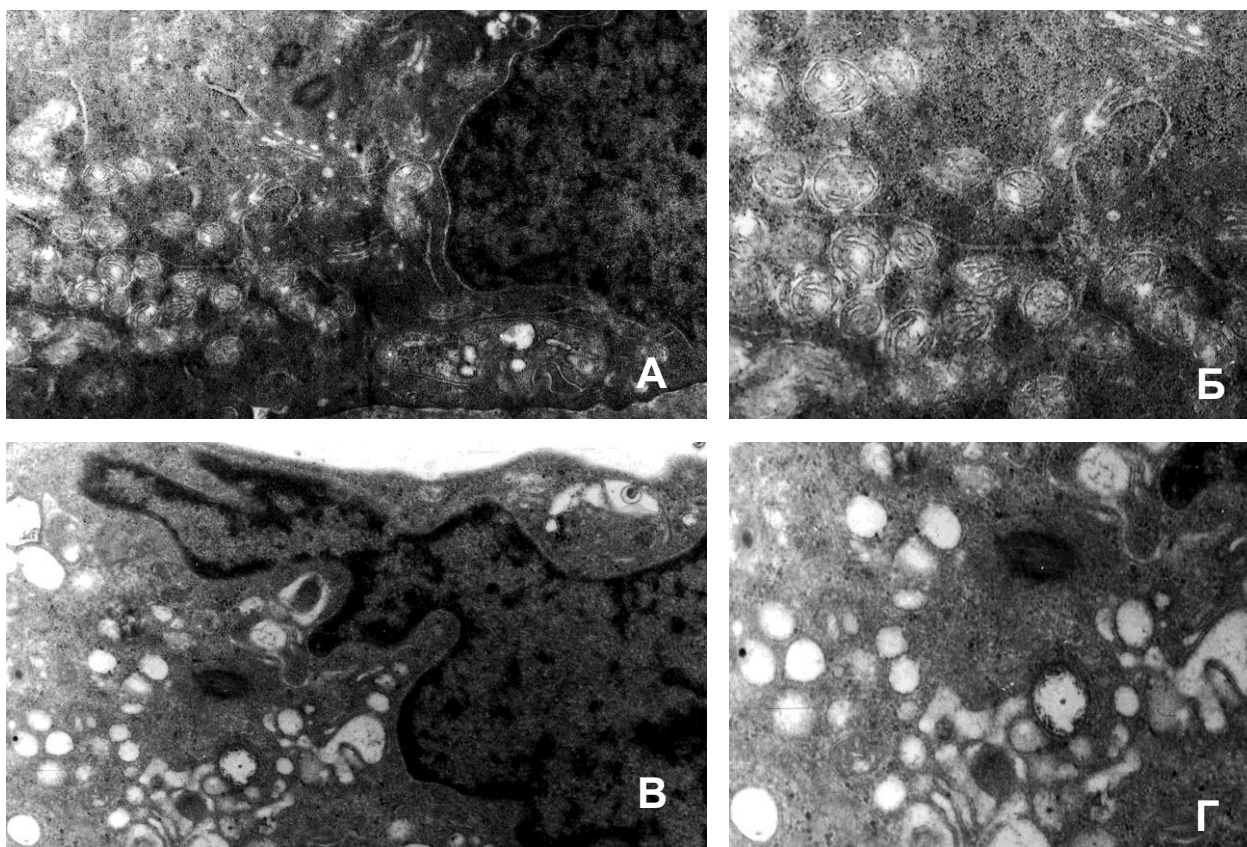
На данном этапе было сформировано 2 группы исследования: опытная и контрольная, при этом в опытной группе консервация осуществлялась в заявленной среде собственной рецептуры, в контрольной – в растворе для хранения донорской роговицы (ТУ № 9398-013-29039336-2008 (пропись среды Борзенка-Мороз).

Для оценки состояния мембран клетки и ее органелл использовалась трансмиссионная электронная микроскопия на электронном микроскопе JEM 1200 EX II (Япония). Подсчет плотности эндотелиальных клеток проводился с помощью кератоанализатора для Глазных тканевых банков (модель 98, «Canon», Япония).

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.

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 (Рис. 10 (А-Б)).

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. На Рисунке 10 (В-Г) представлена трансмиссионная электронная микроскопия эндотелиальной клетки роговицы образца из контрольной группы на 9е сутки консервирования.



А – опытная группа 10000х, Б – опытная группа 20000х, В - контрольная группа 10000х, Г - контрольная группа 20000х

Рисунок 10 - Ультраструктура эндотелиальных клеток роговиц на 9-ые сутки гипотермической консервации. Трансмиссионная электронная микроскопия.

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%. Процент потери эндотелиальных клеток отображен на Рисунке 11, Таблице 18.

Таблица 18. 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

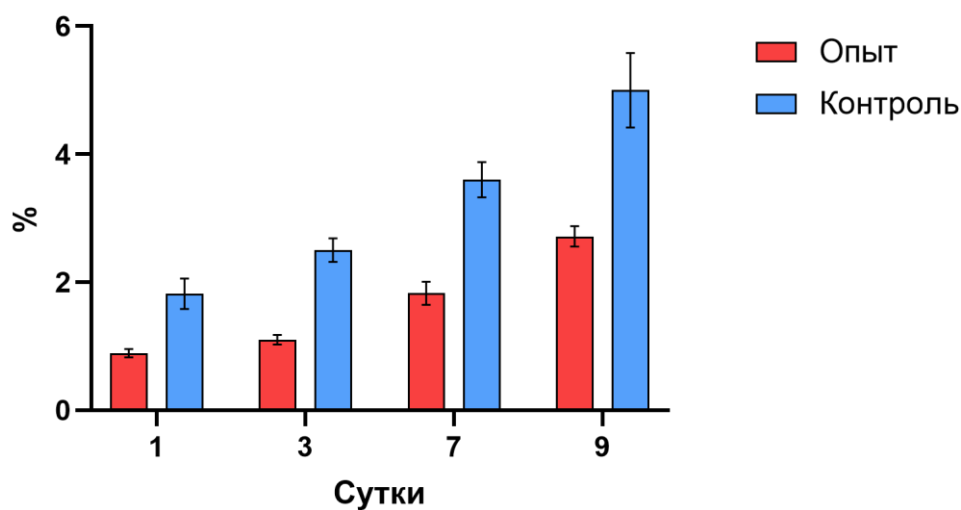
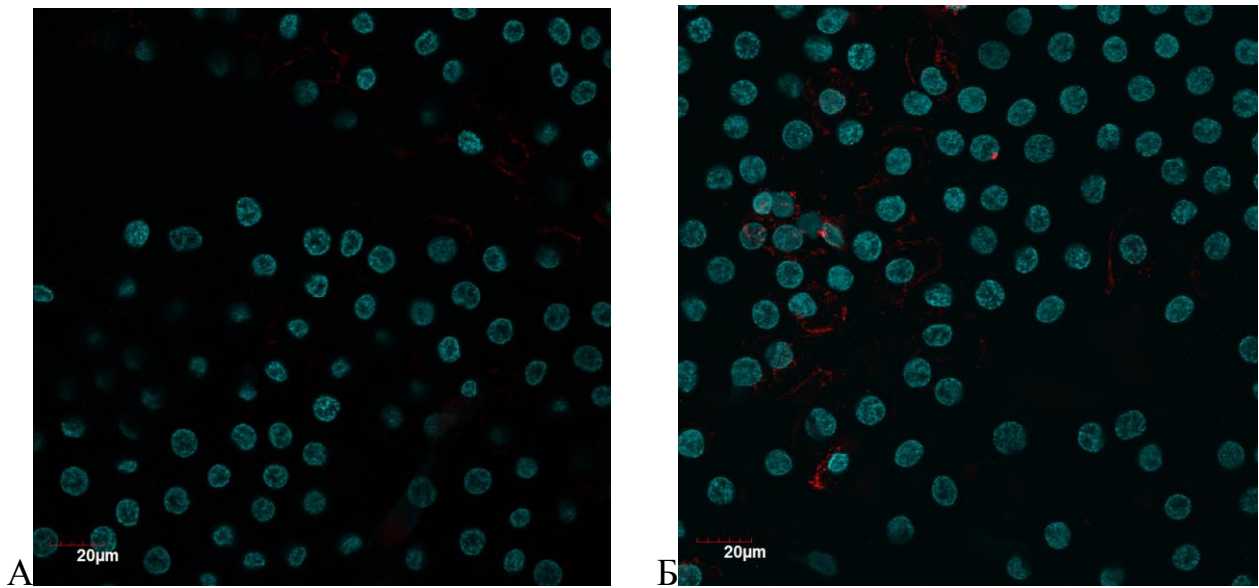


Рисунок 11 - Динамика изменения плотности эндотелиальных клеток в группах сравнения.

При анализе потери эндотелиальных клеток в связи с развитием апоптоза обнаружено, что количество поврежденных клеток увеличивалось постепенно (Рис. 12) и к 9 суткам консервации в опытной группе достигало - 2,5 %, в контрольной группе – 4,3 % (Рис. 13, Табл. 19).



А – опытная группа, Б – контрольная группа

Рисунок 12 - Пласт эндотелиальных клеток донорской роговицы, окрашенных Аннексином –V (красный цвет), на 9-е сутки гипотермической консервации. Иммуноцитохимическое окрашивание, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, ядра контрастированы бис-бензимидазолом (Hoechst 33258) ув. 100x

Таблица 19. Динамика потери эндотелиальных клеток донорских роговиц в связи с развитием апоптоза в опытной и контрольной группах

Сутки	Опыт	Контроль
1	0,74± 0,05	1,65±0,21
3	0,89±0,06	2,23±0,16
7	1,488±0,15	3,57±0,19
9	2,5±0,13	4,3±0,32

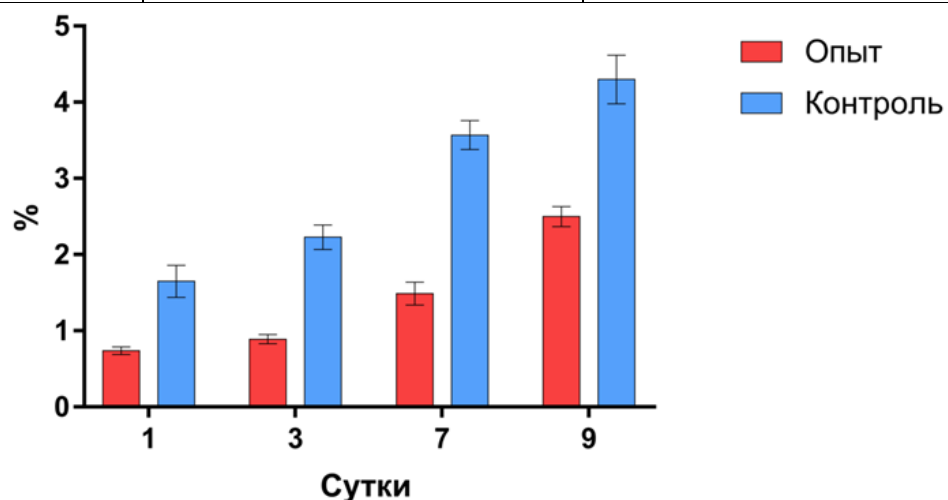


Рисунок 13 - Динамика потери эндотелиальных клеток донорских роговиц в связи с развитием апоптоза в опытной и контрольной группах.

Таким образом, консервация донорских роговиц в среде предложенной рецептуры способствует сохранению ультраструктуры эндотелиальных клеток, методом трансмиссионной электронной микроскопии показало, что уже на 1-е сутки эксперимента в опытной группе наблюдалось уплотнение наружных клеточных и внутриклеточных мембран с усилением эффекта на вторые сутки и сохранением эффекта до 6-х суток консервации, а также оказывает противоапоптотическое действие, при анализе потери эндотелиальных клеток

по причине апоптоза обнаружено, что количество поврежденных клеток увеличивалось постепенно и к 9 суткам консервации достигало всего 2,5 % (в контрольной группе 4,3 %).

### **3.6. Резюме**

Таким образом, подводя итог исследованиям по разработке среды собственной рецептуры для дегидратации и гипотермической консервации донорских роговиц, представляется возможным сделать следующее резюме.

С помощью физико-химических исследований обоснован состав, а также технология получения собственной рецептуры среды для дегидратации и гипотермической консервации донорских роговиц (патент РФ RU 2676311C1 от 27.12.2018). Разработанная консервационная среда (опытная группа) обеспечивает более выраженную дегидратацию роговицы по сравнению с базисной консервационной средой (контрольная группа).

Культивирование 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; опытная среда за счет физиологически активных компонентов поддерживает жизнеспособность культуры клеток, не вызывает апоптоза в культуре кератоцитов; при оценке влияния разработанной среды на культуру эндотелиальных клеток роговицы 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.

Консервация донорских роговиц в среде предложенной рецептуры способствует сохранению ультраструктуры эндотелиальных клеток; с помощью трансмиссионной электронной микроскопии показано: уже на 1-е сутки

эксперимента в опытной группе наблюдается уплотнение наружных клеточных и внутриклеточных мембран с усилением эффекта на 2-е сутки с сохранением эффекта до 6-ти суток консервации; опытная среда оказывает противоапоптотическое действие: количество поврежденных клеток увеличивалось ежедневно постепенно и к 9-ти суткам консервации достигало всего 2,5 % (в контрольной группе – 4,3 %).

Предложенная среда собственной рецептуры является биологически безопасной, физико-химически и физиологически высоко эффективной, не уступающей по этим параметрам базисной консервационной среде (пропись Борзенка-Мороз), и может рекомендоваться для дегидратации и гипотермической консервации трупных донорских роговиц в условиях Глазных тканевых банков.

#### **ГЛАВА ЧЕТВЕРТАЯ**

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ФОРМИРОВАНИЯ УЛЬТРАТОНКОГО ТРАНСПЛАНТАТА РОГОВИЦЫ, КОНСЕРВИРОВАННОЙ В СРЕДЕ СОБСТВЕННОЙ РЕЦЕПТУРЫ**

### **4.1. Сравнительные результаты формирования ультратонких трансплантатов из роговиц, предварительно консервированных в двух видах сред (собственной рецептуры и базисной)**

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

После гипотермической консервации роговиц в двух средах задние послойные трансплантаты формировали с применением микрокератома (LSK Classic, Moria) в условиях Глазного тканевого банка ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Федорова» Минздрава России с использованием следующей техники.

Корнеосклеральный диск монтировали на искусственную переднюю камеру эндотелиальной поверхностью книзу (рис. 14), подключали к инфузионной системе, внутри которой создавали давление 50 см вод. ст. Выполняли пахиметрию с помощью оптической когерентной томографии. Затем использовали механический микрокератомом Moria LSK Classic (Moria, Франция) с турбиной продольного типа, головку располагали таким образом, чтобы место вреза соответствовало максимальной толщине ОКТ пахиметрии. В зависимости от исходной толщины консервированной роговицы во всех случаях применяли методику одного реза с использованием различных одноразовых головок (550 мкм, 500 мкм, 450 мкм) (рис. 15), далее выполнялась повторная ОКТ пахиметрия.



Результаты формирования ультратонких задних послойных трансплантатов в обеих группах с использованием продольного микрокератома путем одинарного прохода режущей головкой (Mogia, Франция) представлены на рисунке 16 и 17 и в таблице 20.

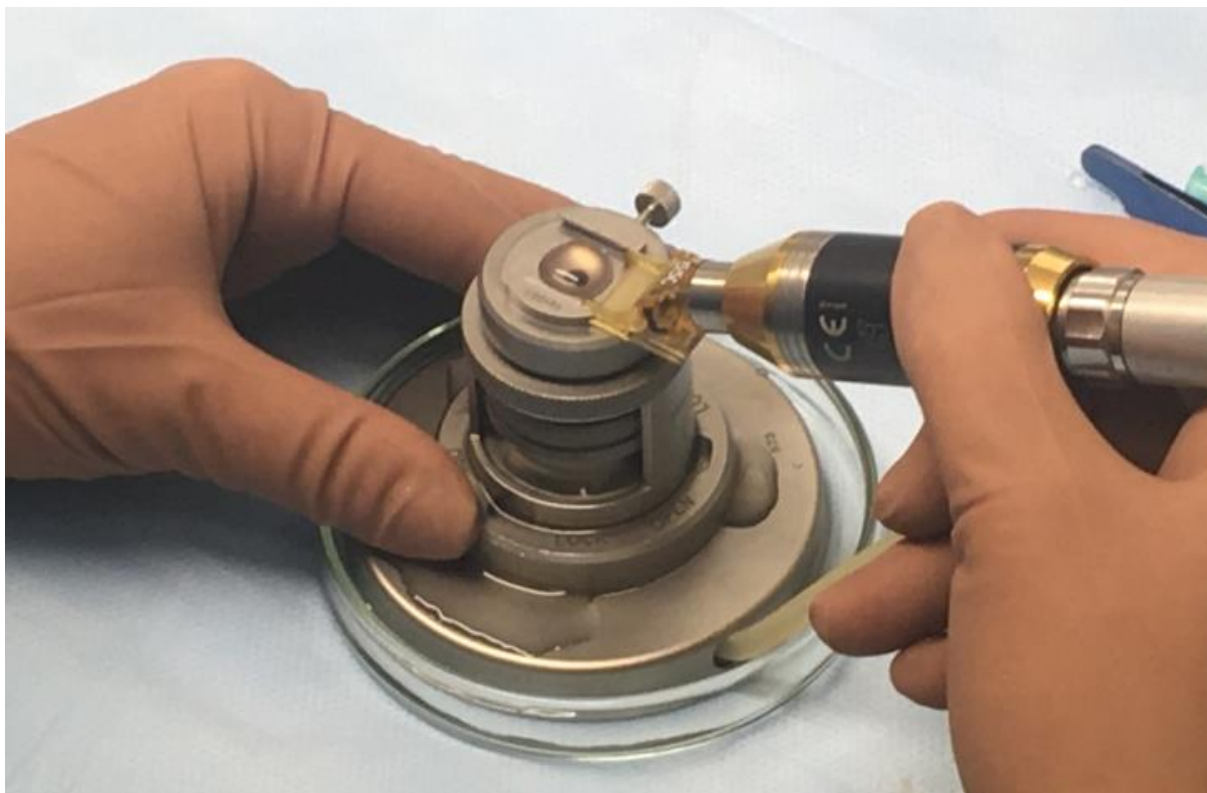


Рисунок 14 - Вид микрокератома продольного типа в процессе формирования ультратонкого заднего послойного трансплантата.



Рисунок 15 - Фото режущей головки 550 мкм присоединенной к рукоятке микрокератома продольного типа Moria LSK.

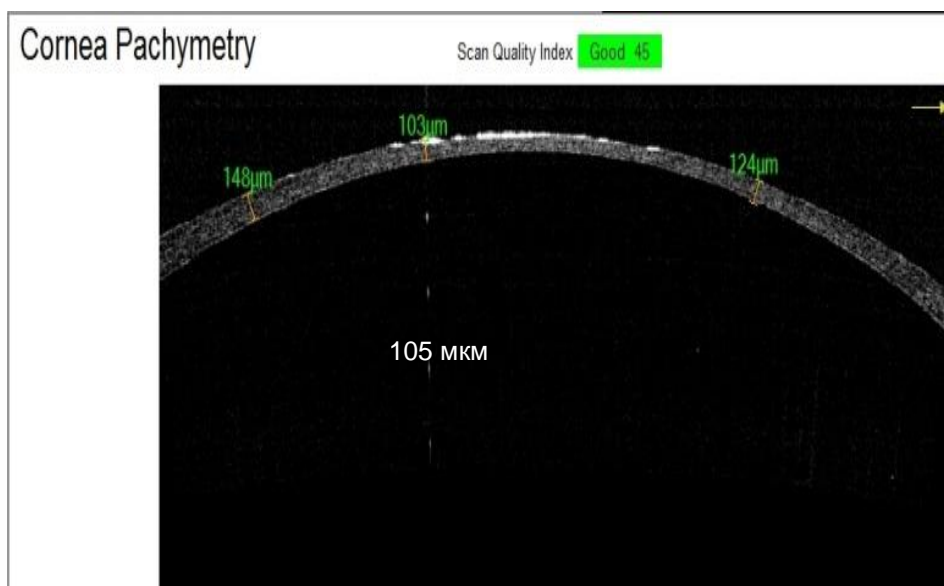


Рисунок 16 - ОКТ-картина ультратонкого заднего трансплантата донорской роговицы из опытной группы.

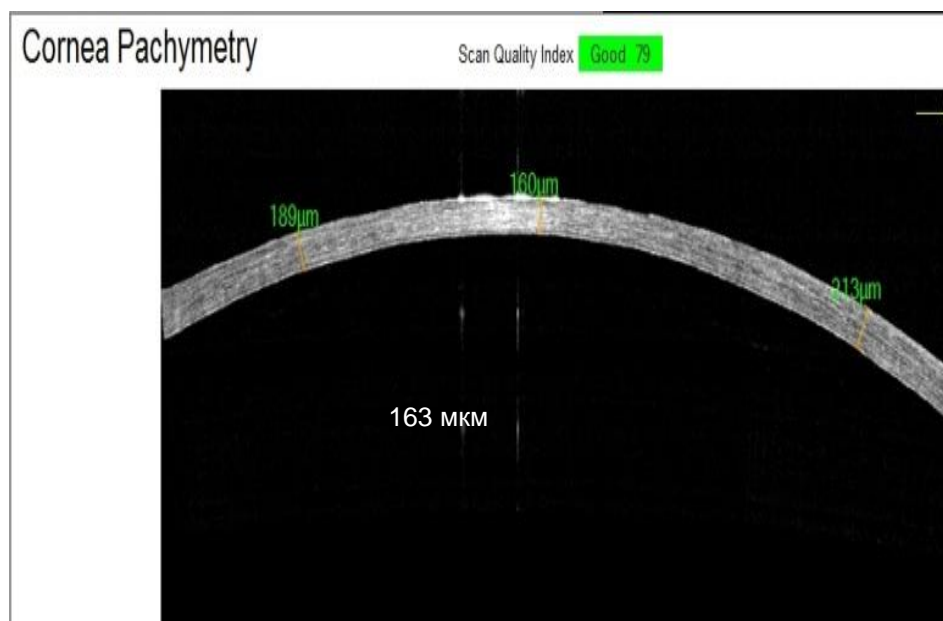


Рисунок 17 - ОКТ-картина ультратонкого заднего трансплантата донорской роговицы из контрольной группы.

Таблица 20. Толщина полученных ультратонких трансплантатов

	Опытная группа OD, мкм	Контрольная группа OS, мкм
Образец 1	105	148
Образец 2	123	163
Образец 3	116	156
Образец 4	85	179
Образец 5	93	167
Образец 6	110	169
Σ	105,3±14,2	163,6±10,7

Таким образом, в результате формирования ультратонких задних послойных трансплантатов предварительно консервированных роговиц обеих групп с использованием продольного микрократома путем одинарного прохода режущей головкой ультратонкая толщина трансплантата достигалась только в случае консервации роговицы в дегидратирующей среде собственной рецептуры ( $105,3 \pm 14,2$  мкм) по сравнению с консервированной в базисной среде ( $163,6 \pm 10,7$  мкм).

#### **4.2. Результаты исследования архитектоники ультратонкого трансплантата консервированной роговицы, выкроенного с помощью техники одного реза**

Полученные результаты сканирующей электронной микроскопии сформированных по предложенной технике ультратонких трансплантатов демонстрируют сохранность архитектоники коллагеновых волокон роговиц, консервированных в предложенной среде (Рис. 18), и признаки гидратации волокон роговицы из контрольной группы на 2-е сутки консервации (Рис. 19).

Дополнительно представлен вид профиля среза (Рис. 20) и эндотелиального пласта клеток (Рис. 21) ультратонкого заднего послойного трансплантата после 2-х суток консервации донорской роговицы в разработанной среде.

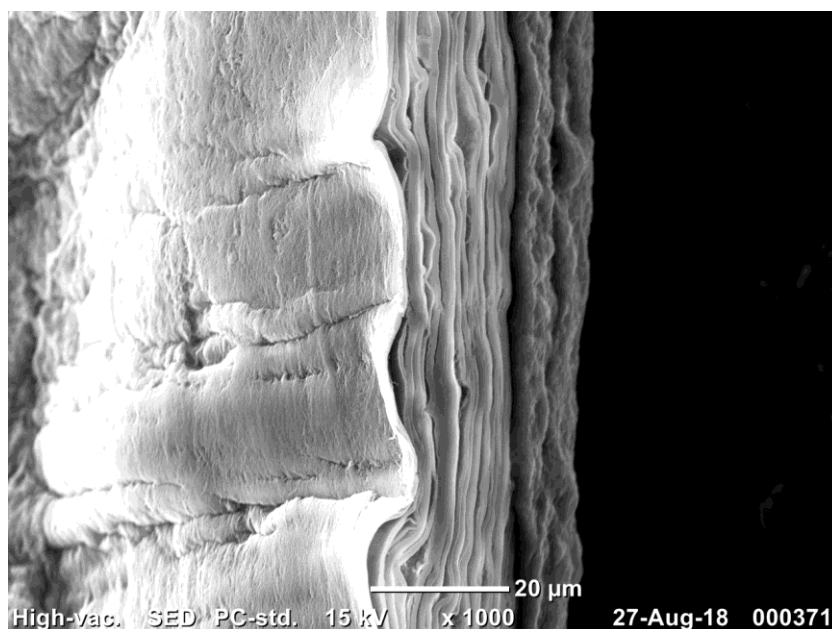


Рисунок 18 - Вид среза ультратонкого заднего послойного трансплантата на 2-е сутки консервации в опытной группе. Электронно-сканирующая микроскопия, ув. x1000.

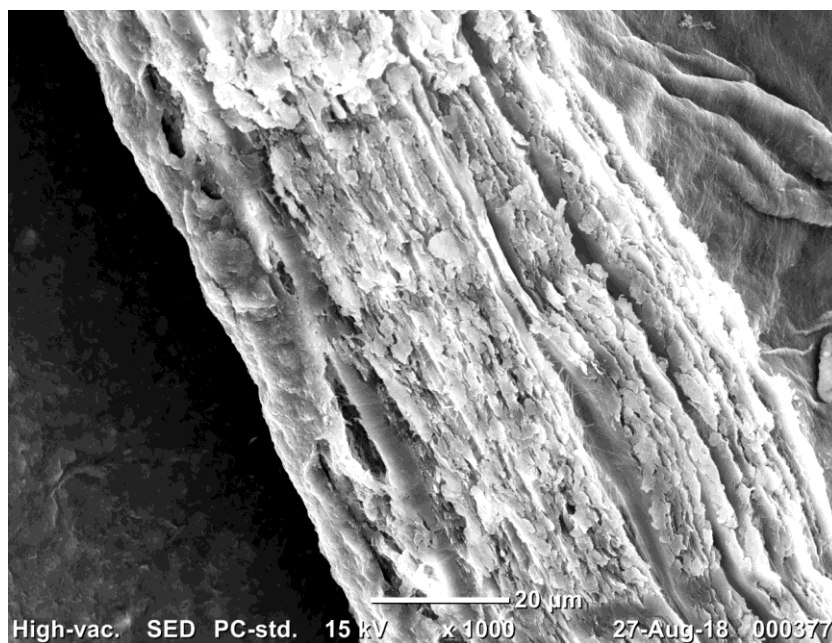


Рисунок 19 - Вид среза ультратонкого заднего послойного трансплантата на 2-е сутки консервации в контрольной группе. Электронно-сканирующая микроскопия, ув. x1000.

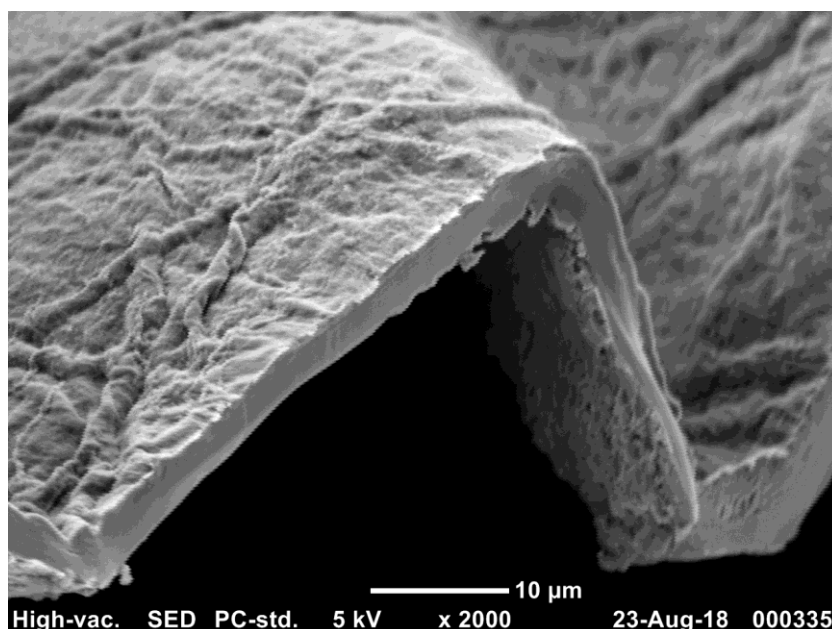


Рисунок 20 - Вид профиля среза ультратонкого заднего послойного трансплантата после 2-х суток консервации донорской роговицы в разработанной среде. Электронно-сканирующая микроскопия, ув. x2000.

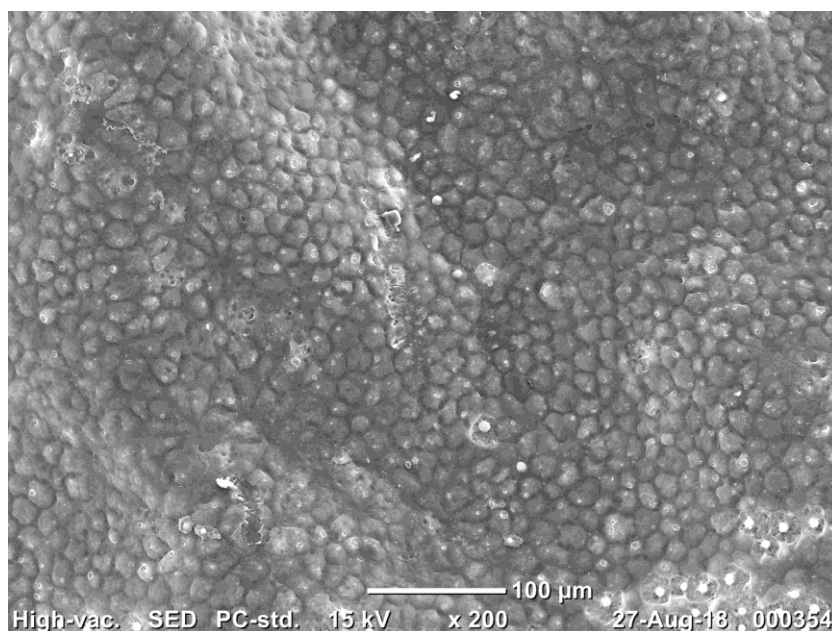
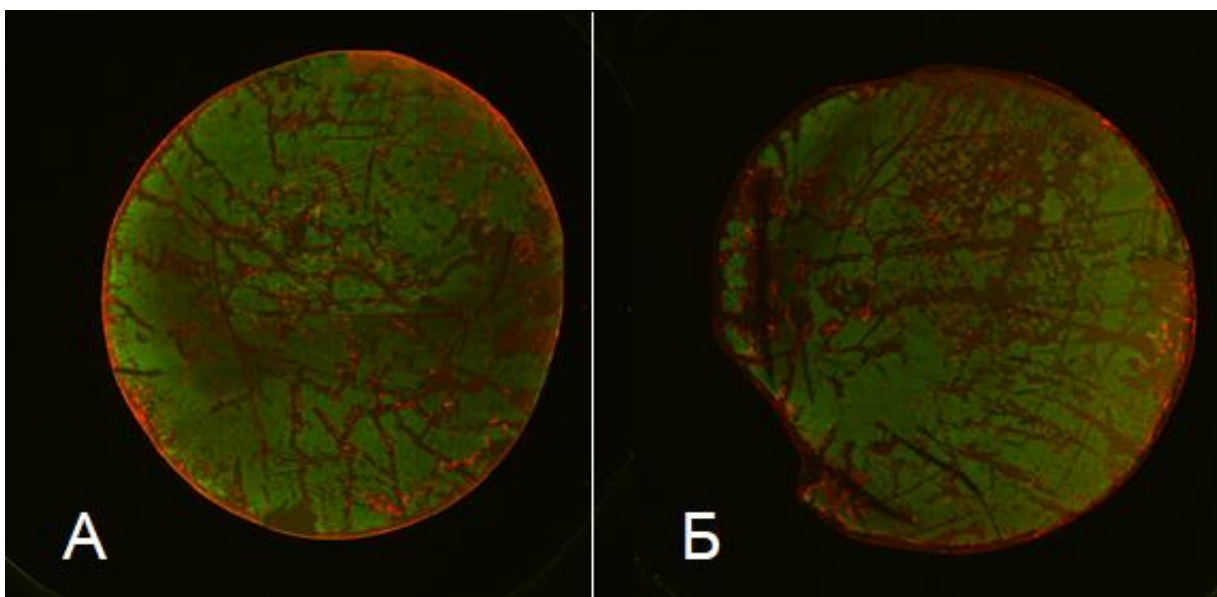


Рисунок 21 - Вид эндотелиального пласта клеток ультратонкого заднего послойного трансплантата после 2-х суток консервации донорской роговицы в разработанной среде. Электронно-сканирующая микроскопия, ув. x200.

Разработанная в данном исследовании консервационная среда обеспечивает более выраженную дегидратацию роговицы по сравнению со стандартной консервационной средой. Было показано, что данный факт позволяет получить трансплантат задних слоев роговицы толщиной  $105 \pm 14,2$  мкм путем одинарного прохода микрокератомом по сравнению с толщиной  $163,6 \pm 10,7$  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 повышению тем самым функциональных результатов операции.

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 (Рис. 22-А) и 87,9% живых и 12,1% мертвых клеток в контрольной группе (Рис. 22-Б).

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) (Рис. 16) по сравнению с контрольной ( $163,6 \pm 10,7$  мкм) (Рис. 17, таблица 20). 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.



А – опытная группа, Б – контрольная группа

Рисунок 22 - Флуоресцентная окраска эндотелиальных клеток заднего послойного трансплантата роговицы на 4-е сутки консервации, окрашивание: набором «Live and Dead» (зеленое – живые клетки, красное – мертвые). *Лазерно-сканирующая микроскопия, ув. x100.*

#### **4.3. 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 микрокератома. В процессе разработки Алгоритма учитывались требования Директивы 2004/23/ЕС Парламента Европейского Союза для Тканевых и клеточных банков.

##### ***Показания к использованию Алгоритма***

Первичные и вторичные дистрофии и другая патология эндотелия



роговицы, требующие проведения задней автоматизированной послойной кератопластики с использованием ультратонкого трансплантата задних слоев донорской консервированной роговицы.

*Материально-техническое обеспечение*

- Стандартное офтальмологическое оборудование (щелевая лампа, операционный микроскоп, набор инструментов для глазных операций);
- Стандартное секционное оборудование и инструментарий;
- Стандартное клиничко-лабораторное оборудование (ламинарный шкаф, ультрафиолетовый облучатель, холодильник медицинский);
- Кератоанализатор для Глазных банков (Eye bank Keratoanalyzer), модель ЕКА-98, фирмы «Koran», (Япония) (прибор не относится к медицинскому оборудованию и не подлежит сертификации на территории Российской Федерации);
- Пинцеты глазные микрохирургические Пмх-«МГ», Россия (рег. уд. № ФСР 2008/02448);
- Ножи офтальмомикрохирургические, Россия (рег. уд. № ФСР 2008/02450);
- Микрократом LSK One, головки с заданной толщиной реза 400, 500 и 550 мкм (Moria, Франция);
- Искусственная передняя камера (Moria, Франция);
- Тонометр Барракера 90 мм Hg (Moria, Франция);
- Оптический когерентный томограф iVue 100 с блоком для проведения измерений в горизонтальном положении iStand (Optovue (США);
- Раствор для хранения роговицы по ТУ 9398-013-29039336-2008, ООО «НЭП МГ», Россия (Рег. уд. № ФСР 2010/06650);
- Среда для дегидратации и гипотермической консервации донорской роговицы собственной разработки (Патент РФ № 2676311 от 27.12.2018.);

*Антисептическое лекарственное средство:*

-Бетадин 10% р-р 120 мл, Венгрия (Рег. номер П №015282/03);

***Адреномиметик:***

-Адреналин р-р для инъекций 1мг/мл в ампулах по 1 мл, Россия (Рег. № ЛС-001849);

***Регидратирующее средство:***

-Натрия хлорид р-р для инфузий изотонический 0,9% 250 мл, Россия (Рег. № 000772/01);

***Средство парентерального питания:***

-Глюкоза р-р для внутривенного введения 40% 10 мл, Россия (Рег № 001186/01).

## **Описание Алгоритма**

Необходимым условием, без которого невозможно применение данного Алгоритма, является наличие в офтальмологическом стационаре государственного (муниципального) медицинского учреждения Глазного тканевого банка и Лицензии на осуществление медицинской деятельности по забору и заготовке органов и тканей человека для трансплантации.

### ***1. Транспортировка трупных донорских тканей человека в Глазной тканевой банк***

Первичный отбор трупов-доноров глазных яблок для трансплантации роговицы производится заочно (по телефону, факсу, электронной почте) сотрудниками ГТБ совместно с сотрудниками танатологических отделений (ТО) по половым, возрастным, нозологическим признакам и срокам давности наступления биологической смерти. В офтальмологии органная пересадка целого глазного яблока от донора-трупа до настоящего времени не производится. В клинике для трансплантации широко используются отдельные

тканевые фрагменты трупных глаз человека (роговица, склера и др.). При этом важно сохранить максимальную стерильность трансплантатов трупных донорских роговиц и склеры еще на этапе аутопсии в танатологическом отделении, что практически невыполнимо. В этой связи рекомендуется не выделять необходимые для трансплантации фрагменты тканей трупного глаза в танатологических отделениях, а производить аутопсию всего глазного яблока у донора-трупа с последующей тканевой препаровкой в стерильных условиях ГТБ.

Аутопсию (изъятие) глазных яблок у донора-трупа производят сотрудники ТО совместно с сотрудниками ГТБ, допущенные заведующими к этому виду деятельности. Процедура аутопсии производится стерильным секционным и офтальмохирургическим инструментарием. Далее глазные яблоки помещаются в стерильные пластиковые контейнеры для сбора, транспортировки и хранения биоматериала (ООО «Гем», Москва), маркируются и размещаются в индивидуальные ячейки термоизолирующей сумки объемом 10 л для перевозки биоматериала (ООО «Гем», Россия). Кровь для серологического исследования от соответствующего трупа отбирается из бедренной вены, полостей сердца или сосудистых синусов головного мозга по 9 мл в две промаркированные полимерные пробирки (ООО «Гем», Россия) и помещаются в другую термоизолирующую сумку объемом 6 л (ООО «Гем», Россия).

Прием трупного тканевого материала для трансплантации осуществляется сотрудниками выездной бригады ГТБ по акту передачи трупных глазных яблок и образцов крови для серологического исследования.

Транспортировка трупного донорского материала и образцов крови осуществляется только в оборудованном автомобиле бригадой сотрудников ГТБ. Выездная бригада состоит из водителя и медицинской сестры, прошедших

соответствующий санитарно-эпидемиологический инструктаж. ГТБ, комплектуемый выездную бригаду, обязан иметь лицензию на медицинскую деятельность по транспортировке органов и тканей человека для трансплантации.

## ***II. Серологическое исследование образцов крови трупов-доноров тканей глазных яблок на инфицированность ВИЧ, гепатитами В и С, сифилисом***

Трупы-доноры органов и тканей человека для трансплантации в обязательном порядке должны исследоваться на инфицированность ВИЧ, гепатитами В и С, сифилисом согласно действующим ведомственным приказам и инструкциям.

По мере доставки трупного донорского материала в офтальмологическую клинику термоизолирующая сумка с образцами крови и соответствующей документацией передается в клиническую лабораторию медицинского учреждения, имеющую лицензию на право работы с 3-4 группами патогенности микроорганизмов. Сумка с трупными глазными яблоками помещается в карантинной зоне ГТБ до получения результатов анализов из клинической лаборатории.

При проведении исследований на выше перечисленные инфекции в клинической лаборатории должен использоваться иммуноферментный анализ (ИФА) с тест-системами от разных производителей, разрешенными действующими ведомственными приказами для работы с донорской кровью: скрининговая ИФА-методика и, одновременно, подтверждающая ИФА-методика (для ВИЧ – антиген/антитело, для гепатита С – иммуноблот, для гепатита В – подтверждающая тест-система для ИФА). Лабораторная диагностика сифилиса осуществляется с помощью ИФА на выявление суммарных антител и антигенов к бледной трепонеме. В случае положительного

результата на ВИЧ, образцы сыворотки от этого трупа в течение суток отправляются в территориальный центр по профилактике и борьбе со СПИДом.

После получения письменного заключения из клинической лаборатории, инфицированные трупные ткани уничтожаются сотрудниками ГТБ по акту контрольной комиссии со строгим соблюдением условий дезинфекции и утилизации, предусмотренных действующими санитарными правилами и нормами. Неинфицированный трупный донорский материал (глазные яблоки) переводится на следующий этап для дальнейшего исследования на жизнеспособность и трансплантабельность.

### ***III. Способ исследования трупных тканей глазных яблок на жизнеспособность и трансплантабельность***

Отбор жизнеспособного донорского материала для сквозной трансплантации роговицы осуществляется в три этапа:

- 1) морфологический скрининг трупных глазных яблок и роговиц на наличие биомикроскопических дефектов;
- 2) физиологический скрининг определения в трупных тканях глазных яблок энергетически значимого критерия жизнеспособности;
- 3) определение показателя трансплантабельности роговиц (ПТР) и выбор трупных роговиц человека для трансплантации.

#### ***Этап 1. Морфологический скрининг трупных глазных яблок и роговиц на наличие биомикроскопических дефектов***

Глазное яблоко от неинфицированного донора-трупа осматривается с помощью щелевой лампы на наличие морфологических дефектов, врожденных аномалий развития, следов перенесенных глазных операций, глубины

посмертных структурных изменений. Выявление грубых морфологических дефектов в тканевых структурах трупного глаза, наличие выраженного дегенеративного кольца на роговице является основанием к выбраковке исследуемого донорского материала. Далее биомикроскопической оценке подвергается роговица согласно шкале морфологических признаков, описанных в баллах:

*1 балл* – передний эпителий отечен, на некоторых участках отслаивается пластами от Боуменовой мембраны, местами наблюдается его мозаичная десквамация. Строма отечна по всей толщине, матового цвета. Десцеметова мембрана имеет выраженную складчатость, складки направлены в разные стороны по типу «паркетного пола» или «шахматной доски». Эндотелиальный пласт матовый, прерывается по контурам складок, которые кажутся прозрачными. Контур радужки практически не просматриваются. Тонус глазного яблока составляет минус 1-2.

*2 балла* – поверхностный эпителий незначительно отечен (по типу «запотелого стекла»), целостность его не нарушена (исключение может составлять незначительная механическая десквамация). Строма с начальными признаками отека в нижних слоях, практически не утолщена, прозрачна. Десцеметова мембрана имеет единичные в основном радиально направленные от центра нежные складки; эндотелиальный пласт в основном интактен, на единичных участках вдоль складок Десцеметовой мембраны допустимо едва заметное набухание в виде матовой опалесценции. Контур радужки просматриваются хорошо, зрачковая кайма просматривается с трудом. Тонус глазного яблока в норме или составляет минус 1.

*3 балла* – роговица в целом представлена картиной практически интактного глаза, однако могут наблюдаться явления начального отека с точечными участками ксероза переднего эпителия. Строма абсолютно прозрачна, не утолщена. Могут улавливаться единичные короткие и очень

тонкие складки десцеметовой мембраны. Эндотелиальный пласт полностью прозрачен, интактен на всей площади. Контуры радужки и зрачковая кайма просматриваются хорошо. Тонус глазного яблока в норме.

Для послойной кератопластики морфологически пригодным считается донорский материал, соответствующий 2 и 3 баллам.

*Этап 2. Физиологический скрининг определения в трупных тканях глазных яблок энергетически значимого критерия жизнеспособности.*

Определение энергетически значимого критерия жизнеспособности трупных роговиц человека для сквозной трансплантации осуществляется с помощью скринингового неинвазивного физиологического теста - адреналиновой пробы.

Адреналиновая проба выполняется следующим образом. На поверхность роговицы трупного глазного яблока, находящегося в транспортировочном контейнере, закапывается 4 – 6 капель 0,1% р-ра адреналина гидрохлорида. От момента закапывания фиксируется стартовое время начала постановки адреналиновой пробы. Начало реакции радужки на действие адреналина определяется по первым признакам вытяжения зрачка в одном из меридианов; в классическом варианте – это феномен «кошачьего глаза».

Осмотр зрачка производится под щелевой лампой в равных интервалах времени: через 5 минут (степень А), через 10 минут (степень В) и через 15 минут (степень С) от момента закапывания р-ра адреналина и в зависимости от появления первых признаков реакции зрачка.

*Степень А.* Если начало реакции зрачка на адреналин составляет 5 мин, проба считается резко положительной по критерию жизнеспособности донорского материала (посмертная потеря АТФ в клетках роговицы по данным <sup>31</sup>Р-ЯМР-спектроскопии составляет 0-55% от исходной величины - условной нормы).

*Степень В.* Если начало реакции зрачка на адреналин составляет 10 мин, проба считается положительной по биоэнергетическому критерию жизнеспособности донорского материала (посмертная потеря АТФ в клетках роговицы по данным  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектromетрии составляет 56-69% от исходной величины).

*Степень С.* Если начало реакции зрачка на адреналин составляет 15 мин, проба считается сомнительной (условно положительной) и соответствует степени «С» по энергетическому критерию жизнеспособности донорского материала (посмертная потеря АТФ в клетках роговицы по данным  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектromетрии составляет 70-100% от исходной величины).

Если реакция зрачка на адреналин отсутствует через 15 минут, проба считается отрицательной и соответствует степени «0» («ноль»), а донорский материал расценивается как энергетически несостоятельный и нежизнеспособный (остаточная квота АТФ в клетках эндотелия практически равна 0%).

### *Этап 3. Определение показателя трансплантабельности роговиц (ПТР) и выбор трупных роговиц человека для трансплантации.*

После морфологического и физиологического тестирования трупных донорских роговиц производится определение показателя трансплантабельности роговиц (ПТР) и выбор трупных роговиц человека для задней послойной кератопластики.

Для задней послойной кератопластики пригодным считается донорский материал, соответствующий показателям трансплантабельности «3-А», «2-А», «3-В», «2-В».

## ***IV. Техника подготовки заднего послойного трансплантата трупных роговиц человека для трансплантации***



Техника подготовки заднего послойного трансплантата трупных роговиц человека состоит из пяти ступеней, согласно предложенным методикам:

- 1) методика антисептической обработки трупных глаз человека;
- 2) методика выкраивания роговично-склерального диска и дегидратация в консервационной среде собственной рецептуры;
- 3) методика микробиологического тестирования консервированных роговиц на стерильность;
- 4) методика морфометрического тестирования эндотелиальных клеток консервированных роговиц для трансплантации;
- 5) методика выкраивания послойного трансплантата задних слоев донорской роговицы.

### ***Ступень 1. Методика антисептической обработки трупных глаз человека***

Трупное глазное яблоко для последующего выкраивания донорской роговицы подвергается антисептической обработке с помощью 5% р-ра Бетадина. Антисептическая обработка трупного глаза производится непосредственно перед выкраиванием и консервацией роговицы по следующей технике:

-Глазное яблоко, фиксированное с помощью хирургического зажима за остаток прямой или косой мышцы, обильно оmyвается струей проточной холодной воды в течение 20-30 секунд, после чего ополаскивается струей стерильного изотонического р-ра Натрия хлорида;

-Глазное яблоко переносится в стерильный пластиковый контейнер объемом 60 мл (ООО «Гем») таким образом, чтобы поверхность роговицы была ориентирована кверху;

-В контейнер заливается 30 мл 5% р-ра Бетадина. 5% р-р Бетадина

приготавливается из официального 10% р-ра Бетадина непосредственно перед употреблением путем разбавления стерильным изотоническим раствором Натрия хлорида в соотношении 1:1;

-Глазное яблоко выдерживается в 5% р-ре Бетадина в течение 5 минут, после чего раствор сливается в лабораторную раковину;

-Глазное яблоко в этом же контейнере заливается до верха первой порцией стерильного изотонического раствора натрия хлорида. Через 10 секунд раствор сливается, а глазное яблоко вновь заливается второй порцией р-ра натрия хлорида на 10 сек, после чего раствор сливается, а глазное яблоко заливается третьей порцией р-ра натрия хлорида на 1 мин, после чего раствор также сливается;

-Контейнер с обработанным глазным яблоком закрывается винтовой крышкой и в таком виде сохраняется до момента выкраивания и консервации роговицы.

Период от дезинфекции до начала консервации роговиц не должен превышать 30 мин в связи с дальнейшим нарастанием отека тканей роговицы и возникновением складок десцеметовой мембраны.

## *Ступень 2. Методика выкраивания роговично-склерального диска для консервации и трансплантации*

Выкраивание роговично-склерального диска и его холодовая консервация осуществляются по следующей методике:

-Перед употреблением все инструменты стерилизуются автоклавированием или в сухожаровом шкафу в обычном режиме;

-После антисептической обработки глазное яблоко фиксируется; далее с помощью шприца и тупоконечной канюли поверхность роговицы орошается стерильным 40% р-ром глюкозы с одновременным механическим слущиванием

переднего эпителия роговицы. Более тщательное удаление эпителия производится с помощью роговичного скребца-скарификатора;

-Бульбарная конъюнктура отсепаровывается от склеры по кругу от лимба и до экватора с помощью роговичных ножниц и фиксационного пинцета, затем иссекается. Поверхность склеры зачищается скребцом и готовится к трепанированию;

-Трепанирование производится диаметром 16 мм на глубину  $\frac{2}{3}$  -  $\frac{3}{4}$  толщины склеры - до первой перфорации и появления в просвете сосудистой оболочки;

-Склера по окружности дорезается роговичными ножницами, а роговично-склеральный комплекс тупым путем отделяется от иридо-хрусталиковой диафрагмы.

Алгоритм предполагает 2 подхода:

1) перенос выкроенного роговично-склерального комплекса во флакон объемом 20 мл со стерильным раствором для хранения роговицы с дальнейшим его переносом в асептических условиях во флакон объемом 20 мл со стерильной средой собственной разработки на 24-48 часов;

2) непосредственный перенос выкроенного роговично-склерального комплекса во флакон объемом 20 мл со стерильной средой собственной разработки с последующим сохранением в холодильнике при температуре  $+4...8^{\circ}\text{C}$  до 6-ти суток.

### ***Ступень 3. Методика микробиологического тестирования консервированных роговиц на стерильность***

Для бактериологического исследования консервированных роговиц на стерильность в процессе выкраивания роговично-склерального диска из него иссекаются 4 кусочка бульбарной конъюнктивы, а с поверхности роговицы

собираются 4 порции скарифицированного переднего эпителия; 2 кусочка конъюнктивы и 2 порции эпителия переносятся в пробирки с жидкой средой Сабуро (10 мл) для выявления грибковой флоры, другие 2 кусочка конъюнктивы и 2 порции эпителия помещаются в пробирку с тиогликолевой средой (10 мл) для выявления бактериальной флоры.

Пробирки маркируются и помещаются в термостаты. Пробирки со средой Сабуро инкубируются в термостате при +31°C в течение 8 суток, пробирки с тиогликолевой средой инкубируются в термостате при +37°C в течение 5 суток. Все пробирки ежедневно осматриваются на пророст.

Предварительные результаты бактериологического исследования консервированных роговиц, как правило, определяются уже на 2-4 сутки инкубирования тканевых образцов. В случае пророста инкубационной среды соответствующая роговица во флаконе с раствором для консервации уничтожается путем автоклавирования и утилизируется по акту списания.

В том случае, если бактериологически инфицированная роговица уже была трансплантирована, реципиенту назначается профилактическая антибиотикотерапия, а пробирка с проросшей питательной средой передается в клинко-бактериологическую лабораторию для типирования микроорганизма и, в случае необходимости, определения его чувствительности к антибиотикам.

В процессе консервации также осуществляется ежедневный контроль изменения цветности и прозрачности консервационной среды. В норме раствор абсолютно прозрачен, а его цвет ярко-красный. Эти свойства раствора не должны изменяться в течение всего периода консервации роговицы. В случае контаминированности и развития микрофлоры раствор начинает мутнеть, а ее цвет постепенно меняется от ярко-красного до оранжево-желтого. Флаконы с консервированными роговицами, подозрительные на контаминированность, передаются в клинко-бактериологическую лабораторию для дальнейшей верификации.

Роговицы во флаконах с консервационной средой без признаков контаминированности и с предварительным отрицательным результатом бактериологического исследования соответствующих тканевых образцов после проведения морфометрического тестирования эндотелиальных клеток передаются для выкраивания заднего послойного трансплантата.

#### *Ступень 4. Методика морфометрического тестирования эндотелиальных клеток консервированных роговиц для сквозной трансплантации*

Перед выполнением выкраивания лоскута заднего послойного трансплантата консервированная роговица должна пройти морфометрическое тестирование с целью исключения донорского материала с низкой пороговой плотностью эндотелиальных клеток. Для определения плотности эндотелиальных клеток (ПЭК) Американской и Европейской ассоциациями ГТБ на современном этапе рекомендуется использовать автоматизированные компьютерные методы морфометрии. При этом табельным для Глазных тканевых банков являются Кератоанализаторы (Eye bank keratoanalyzer) типа модели ЕКА-98, выпускаемой фирмой «Koran» (Япония). Приборы этого типа не относятся к медицинскому оборудованию и не подлежат обязательной сертификации на территории Российской Федерации, могут быть приобретены через представительства соответствующих фирм.

Морфометрический анализ эндотелиальных клеток на кератоанализаторе достаточно прост и выполняется по автоматизированной методике согласно прилагаемым к прибору программам. Основным преимуществом данной методики является возможность проведения морфометрического анализа роговиц непосредственно во флаконах с консервационной средой, что абсолютно предотвращает инфекционную контаминацию донорского материала в процессе проведения теста. При этом нижний порог ПЭК консервированной

роговицы для дальнейшего получения ультратонкого трансплантата не должен быть ниже 2500 кл/мм<sup>2</sup>.

Результаты анализа консервированных роговиц с морфометрической характеристикой и микроскопической картиной пласта эндотелиальных клеток выводятся на бумажный бланк в качестве приложения к сопроводительной документации на трупную консервированную роговицу.

### *Ступень 5. Методика выкраивания послойного трансплантата задних слоев донорской роговицы*

Выкраивание послойного трансплантата задних слоев донорской роговицы осуществляются по следующей методике:

-Перед употреблением все инструменты стерилизуются автоклавированием или в сухожаровом шкафу в обычном режиме;

-Корнеосклеральный диск извлекается из флакона со средой собственной разработки и помещается в искусственную переднюю камеру;

-Давление в передней камере составляет 90 мм Нг, контроль давления осуществляется с помощью тонометра Барракера;

-Проводится измерение толщины донорской роговицы с использованием оптического когерентного томографа iVue-100 (Optovue, США); данный способ измерения толщины донорской роговицы достаточно прост и выполняется по автоматизированной методике согласно прилагаемым к прибору программам; основным преимуществом данного способа является высокая точность и быстрота проведения исследования;

-В зависимости от толщины донорской роговицы проводится выкраивание заднего трансплантата роговицы толщиной  $100\pm 30$  мкм путем одного реза микрокератома с использованием головки 400, 500 или 550 мкм (Табл. 21).

Таблица 21. Выбор головки микрокератома в зависимости от исходной толщины роговицы

Исходная толщина стромы роговицы, мкм	Головка микрокератома, мкм
$\geq 600$	400
600 – 700	500
$\leq 700$	550

Подготовленный ультратонкий трансплантат задних слоев донорской роговицы помещается во флакон объемом 20 мл со стерильной средой собственной рецептуры для дальнейшей передачи в операционный зал.

Таким образом, был разработан Алгоритм предоперационной подготовки заднего послойного трансплантата роговицы в условиях Глазного тканевого банка, который детально представлен в виде схемы на рисунке 23.



Рисунок 23. Алгоритм предоперационной подготовки заднего послойного трансплантата роговицы в условиях Глазного тканевого банка.



#### 4.4. Резюме

Таким образом, подводя итог исследованиям по формированию ультратонкого трансплантата роговицы, консервированной в среде собственной рецептуры, представляется возможным сделать следующее резюме.

В результате формирования ультратонких задних послойных трансплантатов предварительно консервированных роговиц обеих групп с использованием продольного микрокератома путем одинарного прохода режущей головкой, ультратонкая толщина трансплантата достигалась только в случае консервации роговицы в дегидратирующей среде собственной рецептуры ( $105,3 \pm 14,2$  мкм) по сравнению с консервированной в базисной среде ( $163,6 \pm 10,7$  мкм).

Исследование морфофункциональной сохранности эндотелиальных клеток выкроенных задних послойных трансплантатов показало хорошие результаты в обеих группах консервированных роговиц, что указывает на отсутствие токсического и повреждающего действия консервационной среды собственной рецептуры.

Разработанный и предложенный Алгоритм предоперационной подготовки заднего послойного трансплантата роговицы в условиях Глазного тканевого банка позволяет предупреждать инфицированность пациентов ВИЧ, вирусами гепатитов, сифилисом, бактериальными и грибковыми офтальмоинфекциями, сокращать количество помутнений трансплантатов консервированных роговиц и значительно повышать реабилитационный эффект у слабовидящих и инвалидов по зрению. Проведение задней послойной кератопластики позволяет значительно снизить риск отторжения трансплантата по сравнению со сквозной кератопластикой, а также добиться высоких функциональных результатов. Подготовленный по предложенному алгоритму ультратонкий трансплантат путем применения одного реза микрокератома значительно снижает риск перфорации донорской роговицы, обусловленный

необходимостью проведения повторных резов, приводящих к снижению жизнеспособности эндотелиальных клеток роговицы.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Преимущества селективной эндотелиальной кератопластики над сквозной на данном этапе развития офтальмохирургии не вызывают 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 [109, 129]. В целом это способствует сокращению срока клинической и зрительной реабилитации больных после трансплантации ультратонкого лоскута роговицы.

Задняя автоматизированная послойная кератопластика (ЗАПК) в настоящее время является наиболее часто используемым хирургическим методом реабилитации больных с эндотелиальной дистрофией роговицы различного генеза и буллезной кератопатией в развитых странах. Однако до сих пор в стадии разработки остается вопрос повышения клинико-функциональных результатов ЗАПК путем использования трансплантатов задних слоев донорской роговицы с минимальной толщиной остаточной стромы.

На сегодня существует несколько методик получения ультратонкого трансплантата задних слоев роговицы, включающих в себя технику двойного реза микрокератомом, использование фемтолазера. Особняком, по нашему мнению, стоит техника предварительной дегидратации донорской роговицы путем ее помещения в специальную среду.

По нашим данным и данным литературы, применение техники двойного реза микрокератома способствует получению более равномерного трансплантата толщиной около 100 мкм [137]. Однако она имеет высокий риск перфорации донорской роговицы. Кроме того, в сравнительных исследованиях было показано, что отношение нежизнеспособных клеток эндотелия донорской

роговицы к общему количеству эндотелиальных клеток в группе двойного реза составляло 0,0145, а в группе с одним резом - 0,0028. Таким образом, проведение дополнительного реза донорской роговицы приводит к статистически значимому более высокому количеству поврежденных нежизнеспособных эндотелиальных клеток [136]. Применение лазеров (преимущественно фемтосекундных) для выкраивания трансплантата задних слоев роговицы приобретает все большую популярность ввиду простоты методики и возможности получения равномерного трансплантата заданной толщины. Однако, по данным литературы, фемтолазерное сопровождение характеризуется более высокой потерей эндотелиальных клеток по сравнению с применением микрокератома [135]. Также стоит отметить, что применение фемтосекундного лазера приводит к коллатеральным повреждениям и вторичному индуцированному излучению, приводящему к патологическому накоплению перекисных радикалов в тканях. Эти радикалы оказывают повреждающее действие на клеточные и тканевые структуры стромы роговицы, что может провоцировать избыточную асептическую воспалительную регенерацию в посттрансплантационном периоде [94].

Другим направлением получения ультратонких трансплантатов, которое в настоящее время только получает свое развитие, является предварительная дегидратация донорской роговицы непосредственно перед выкраиванием. Однако, согласно литературным данным, эта методика не получила своего развития в связи с дополнительными манипуляциями: переносом донорской роговицы в отдельную ёмкость со специальным раствором и повышенным риском контаминации донорского материала [94]. Среди методов, направленных на получение ультратонкого трансплантата задних слоев роговицы также можно выделить технологию, заключающуюся в истончении роговицы потоком стерильного воздуха. В проведенном исследовании было показано, что предложенная методика способствует достижению толщины

роговицы равной 530 мкм. Однако указанная технология представляется трудоемкой и, по мнению ее разработчиков, требует дальнейшего изучения [127].

Необходимо отметить, что до настоящего времени нет ни одной публикации, в которой отражалось бы изучение апоптоза повреждений хромосом в кератоцитах и эндотелии донорских роговиц, подвергнутых предварительной дегидратации в различных растворах перед выкраиванием с помощью методов механической микрокератомии и фемтолазерного сопровождения. Такие исследования представляют несомненный научный и практический интерес.

С учетом вышесказанного целью работы явилась разработка алгоритма предоперационной подготовки заднего послойного трансплантата роговицы на основе собственной рецептуры консервационной среды для оптимальной дегидратации донорской роговицы и техники выкраивания ультратонкого лоскута оптимизированным методом одинарного прохода микрокератомом в условиях Глазного тканевого банка.

Для достижения поставленной цели работа была разделена на 5 этапов соответствующих задачам исследования, которое включало в себя разработку рецептуры консервационной среды для оптимальной дегидратации донорской роговицы и обоснование ее физико-химических свойств, изучение морфо-функциональных характеристик культуры кератоцитов и эндотелиальных клеток роговицы, культивируемых в разработанной среде, проведение морфометрических исследований стабильности и плотности эндотелиальных клеток донорских роговиц после консервации в разработанной среде, поиск оптимального метода выкраивания ультратонкого трансплантата роговицы, консервированного в предложенной среде, техникой одинарного прохода микрокератомом и исследования жизнеспособности эндотелиальных клеток ультратонких трансплантатов роговицы, а также разработка пошагового

Алгоритма предоперационной подготовки заднего послойного трансплантата роговицы в условиях Глазного тканевого банка.

На первом этапе было проведено обоснование физико-химического состава предложенной среды.

Как известно из приведенной литературы в первой главе настоящей работы, одним из основополагающих направлений в развитии новых консервационных сред для гипотермического хранения роговицы является сохранение жизнеспособности и морфофункциональной сохранности ЭК трансплантатов донорских роговиц, путем повышения их резистентности к гипотермическому стрессу, фактору длительной изоляции и торможении процессов посмертного апоптоза. Так, в работе по применению препарата NeyDIL Nr.37 «Comea» в составе базисного раствора для хранения роговицы (ТУ № 9398-013-29039336-2008 (пропись среды Борзенка-Мороз) показано повышение жизнеспособности и сохранение цитоархитектоники эндотелиальных клеток донорских роговиц, но без достижения дегидратирующего эффекта и нормализации толщины стромы [4]. Помимо этого, установлено, что препарат NeyDIL Nr.37 не восстанавливает липидный слой клеток роговицы, повреждение которого, как известно, является причиной внутриклеточного некроза как эндотелия, так и кератоцитов.

Согласно проведенному нами глубокому поиску литературных источников, до настоящего времени нет ни одной работы, посвященной разработке рецептуры специализированной среды для гипотермической консервации и предварительной дегидратации донорской роговицы перед выкраиванием ультратонких задних послойных трансплантатов.

Предложенная нами рецептура оригинальной среды содержит разрешенный к применению фармакологический препарат Фосфоглив - комбинированное мембранопротективное и мембраностабилизирующее 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.

Помимо этого, данная среда собственной рецептуры содержит онкотический агент Декстран-40 ( мол. масса 40.000 D) в умеренно повышенной концентрации (6,0 – 7,0 %) в отличие от стандартной концентрации 5,0 % в контрольной среде Борзенка-Мороз, посредством чего достигается дегидратирующий эффект посмертно набухшей донорской роговицы.

Проведенное исследование физико-химических свойств предложенной нами среды показало, что она имеет оптимальный для эндотелиальных клеток рН ( $7,4 \pm 0,01$ ), при этом показатель осмолярности статистически выше, чем в среде Борзенка-Мороз ( $326 \pm 0,9$  мосм/л и  $323 \pm 0,8$  мосм/л соответственно), что обусловлено большей концентрацией онкотического агента, чем и объясняется дегидратирующий эффект предложенной прописи. При этом важно отметить, что, несмотря на умеренно завышенные показатели значений, осмолярность предложенной среды не входила за рамки референсных значений осмолярности влаги передней камеры.

В литературе имеются данные по изучению недавно предложенной среды для дополнительной дегидратации, после стандартной гипотермической консервации, донорских роговиц – «Thin – C medium» (Alchimia, Italy) [52]. Данная среда в своем составе содержит комбинацию декстранов разной молекулярной массы Т500, Т40, имеет рН 7,2–7,4 при осмолярности 300–360 мосм/кг. Проведенное экспериментальное исследование показало возможность получения трансплантата задних слоев роговицы с более гладким интерфейсом, однако, по мнению авторов, проблема непрогнозируемого реза микрокератома и риск получения перфорации донорского материала остаются по-прежнему крайне актуальными. Кроме того, предложенная рецептура среды не содержит в своем составе мембранопротекторных компонентов, повышающих

устойчивость эндотелиальных клеток роговицы к стрессовому воздействию, в том числе на интраоперационную травму в процессе выкраивания заднего послойного трансплантата.

В нашей работе для оценки дегидратирующих свойств предложенной среды была изучена толщина и масса донорских роговиц ( $n=8$ ), консервированных в указанной среде и растворе для хранения роговицы (среда Борзенка-Мороз), соответственно, в опыте и контроле. Установлено, что консервация в предложенной среде на 1-е сутки приводит к уменьшению толщины на 19% с постепенным увеличением и достижением номинальной величины (масса  $0,195 \pm 0,015$  г; толщина  $648 \pm 35$  мкм) к 3-м суткам; в контрольной группе дегидратация с первых суток практически не наблюдалась. Начиная с 3-х суток, гидратация в опытной группе достигала номинальных значений с тенденцией к стабилизации, поэтому дальнейшее наблюдение не производилось.

Дальнейшим направлением наших исследований являлось изучение безопасности среды собственной рецептуры на культурах клеток кератоцитов и эндотелия донорских роговиц. С этой целью проводили исследования морфофункциональных особенностей указанных клеточных культур на пролиферативную активность кератоцитов, апоптоз (в культуре кератоцитов) и оценку жизнеспособности эндотелиальных клеток. Установлено, что культура кератоцитов в обеих группах сохраняла свой уникальный фенотип с выраженной экспрессией характерных маркеров кератоцитов (люмикана и кератокана) при отсутствии экспрессии  $\alpha$ -гладкомышечный актина. Оценка жизнеспособности культуры кератоцитов в опыте и контроле была сопоставима, при этом экспрессия маркеров раннего апоптоза каспазного пути – каспаза 3 и 8, а также митохондриального пути – цитохром С и ВАХ отсутствовали.



Пролиферативная активность клеток в обеих группах также была сопоставимой, что свидетельствовало об отсутствии у предложенного состава среды стимуляционной и трансформационной активности.

При оценке влияния разрабатываемой среды на культуру эндотелиальных клеток роговицы было выявлено, что на протяжении 7 дней культивирования в обеих группах происходит постепенная незначительная потеря их жизнеспособности. Однако достоверная разница между группами отсутствовала и не превышала 8-ми %. Иммуногистохимическое исследование выявило сохранность морфофункциональных особенностей эндотелиальных клеток в обеих группах, а именно наличие экспрессии маркера помпальной функции – Na/K АТФазы и маркера плотных межклеточных контактов – ZO-1.

На третьем этапе осуществлялась консервация донорских роговиц с высоким показателем трансплантатбельности 3А (n=24) в предложенной среде собственной рецептуры (опытная группа) и в базисном растворе для хранения роговицы (контрольная группа) [3] с целью изучения особенностей ультраструктуры, плотности и жизнеспособности эндотелиальных клеток непосредственно на донорских роговицах на протяжении 9-ти суток.

Для оценки состояния клеточных мембран и органелл использовалась трансмиссионная электронная микроскопия на электронном микроскопе JEM 1200 EX II, Япония. Проведенное исследование показало, что уже на 1-ые сутки эксперимента в опытной группе наблюдалось уплотнение наружных клеточных и внутриклеточных мембран с усилением эффекта на 2-ые сутки и сохранностью до 6-ых суток консервации. При этом в контрольной группе наблюдалось постепенное истончение и повреждение клеточных мембран начиная с 5-ых суток: выявлены грубые ультраструктурные изменения с дегенерацией органелл..

При анализе потери эндотелиальных клеток в связи с развитием апоптоза обнаружено, что количество поврежденных клеток увеличивалось постепенно и

к 9-ти суткам консервации в опытной группе достигло всего 2,5 %, в контрольной группе – 4,3 %.

В результате проведенных исследований было показано, что среда предложенной рецептуры является биологически безопасной, способствует дегидратации стромы донорских роговиц, сохранению ультраструктуры эндотелиальных клеток вплоть до 9-ти суток и проявляет антиапоптотическое действие.

Полученные результаты позволили перейти к следующему этапу исследования, а именно к разработке технологии (как части пошагового алгоритма) получения заднего послойного ультратонкого трансплантата методом одностороннего реза микроккератома донорских роговиц, предварительно консервированных в среде собственной рецептуры с дегидратирующими и мембраностабилизирующими свойствами.

В результате проведенных исследований на этом этапе было установлено, что в опытной группе за счет большей дегидратации донорских роговиц одинарный проход режущей головкой позволяет формировать (статистически достоверно,  $p < 0,05$ ) ультратонкие задние послойные трансплантаты ( $105,3 \pm 14,2$  мкм) по сравнению с группой контроля ( $163,6 \pm 10,7$  мкм). Результаты сканирующей электронной микроскопии сформированных ультратонких трансплантатов продемонстрировали сохранность архитектоники и картину умеренной дегидратации коллагеновых волокон стромы донорских роговиц, консервированных в предложенной среде по сравнению с аналогичными образцами из группы контроля. Изучение морфофункциональной сохранности эндотелиальных клеток ультратонкого трансплантата роговицы не выявило достоверной разницы с контрольной группой, что исключает токсический и повреждающий эффект консервационной среды собственной рецептуры.

В результате проведенных фундаментальных исследований нами впервые был разработан и предложен к практическому применению пошаговый Алгоритм предоперационной подготовки заднего послойного трансплантата роговицы в условиях Глазного тканевого банка с использованием консервационной среды собственной рецептуры с дегидратационными и мембраностабилизирующими свойствами и техники одинарного прохода механическим кератомом.

## 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 микрократомом; обоснованы ее номинальные физико-химические свойства: осмоличность 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 ОСТ-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 СОКРАЩЕНИЙ

ГБ	Глазной банк
ГТБ	Глазной тканевой банк
ДМ	Десцеметовая мембрана
ДР	Десцеметорексис
ЕС	Европейский Союз
ЗАПК	Задняя автоматизированная послойная кератопластика
ЗПК	Задняя послойная кератопластика
ИФА	Иммуноферментный анализ
КОЗ	Корректируемая острота зрения
ОКТ	Оптическая когерентная томография
ПТР	Показатель трансплантабельности роговицы
ПЭК	Плотность эндотелиальных клеток
СКП	Сквозная кератопластика
ТО	Танатологическое отделение
ТЭДМ	Трансплантация эндотелия с Десцеметовой мембраной
ФЛ	Фемтосекундный лазер
ЭК	Эндотелиальные клетки
ЭКП	Эндотелиальная кератопластика
ЭЭД	Эпителиально-эндотелиальная дистрофия
DLEK	Deep lamellar endothelial keratoplasty
DMEK	Descemet membrane endothelial keratoplasty
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DSAEK	Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty
DSEK	Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty
ЕВАА	Eye Bank Association of America (Американская Ассоциация Глазных банков)

EEBA	European Eye Bank Association (Европейская Ассоциация Глазных банков)
EGF	Epidermal Growth Factor (Эпидермальный фактор роста)
FD-OCT	Frequency domain- Optical coherence tomography (Фурье-оптическая когерентная томография)
FGF	Fibroblast growth factor (Фактор роста фибробластов)
IGF-1	Insulin-like growth factor 1 (Инсулиноподобный фактор роста 1)
NT-DSAEK	Nanothin Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty
OSM	OptiSol-medium
PBS	Phosphate buffered saline
pH	pondus Hydrogenii (Водородный показатель)
TGF-b	Transforming growth factor beta (Трансформирующий фактор роста b)
UT-DSAEK	Ultra-Thin Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бордюгова Г.Г. Оценка жизнеспособности консервированной ткани роговой оболочки методом автордиографии/ Г.Г. Бордюгова, А.В. Альсакини //Травмы глаз. – М., 1978. – С. 25-26.
2. Бордюгова Г.Г. Математический анализ способов консервирования роговичного трансплантата в клинике/ Г.Г. Бордюгова, И.П. Лукашевич //Трансплантация органов и тканей: Материалы. – Тбилиси, 1979. – С. 305-306.
3. Борзенок С.А. Медико-технологические и методологические основы эффективной деятельности глазных тканевых банков России в обеспечении операций по сквозной трансплантации роговицы/ С.А. Борзенок // Дис. ... д-ра мед. наук. – М.- 2008. - 156 с.
4. Борзенок С.А., Ролик О.И., Онищенко Н.А., Комах Ю.А., Делекторская В.В. Применение гомологичных клеточных пептидов для улучшения морфофункционального состояния эндотелия донорских роговиц при хранении в нормотермическом и гипотермическом режимах // Вестник трансплантологии и искусственных органов. - 2012. - Т. 14. - № 1. - С. 78-85.
5. Борзенок С.А. Средство для консервации донорской роговицы / С.А. Борзенок, Б.Э. Малюгин, Х.Д. Тонаева, Т.З. Керимов, Н.А. Гаврилова, С.Б. Измайлова, Е.В. Ковшун // Патент РФ № 2 674 585, опубликовано 11.12.2018 г.
6. Горгиладзе Т.У. К вопросу об организации Глазного банка тканей/ Т.У. Горгиладзе, Р.К. Игнатов, Т.М. Шарлай, Н.С. Шульгина //Межд. конф. по кератопластике и кератопротезированию. – Одесса, 1978. – С. 44-45.
7. Горгиладзе Т.У. Пересадка роговицы/ Т.У. Горгиладзе // Батуми: Сабчота Аджара, 1983. – 119 с.
8. Гундорова Р.А. Пересадка задних слоев роговицы при посттравматическом врастании эпителия: III науч. Конференция офтальмологов Грузии, Сб. науч. тр./ Р.А. Гундорова, А.В. Бойко // Тбилиси, 1974. – С. 241-274.

9. Гундорова Р.А. Сохранность структур роговой оболочки при различных способах консервирования/ Р.А. Гундорова, Г.Г. Бордюгова, А.Г. Травкин //Межд. конф. по кератопластике и кератопротезированию: Материалы. - Одесса, 1978. - С. 70-71.

10. Гундорова Р.А. Лечебная кератопластика при различных патологических состояниях роговицы / Р.А. Гундорова // Офтальмол. журн. – 1983. – № 2 – С. 75-77.

11. Гундорова Р.А. Систематизация клиники, диагностики и лечения поражений роговицы при травматической болезни органа зрения/ Р.А. Гундорова //Федоровские чтения – 2004. «Новые технологии в лечении заболеваний роговицы». – М., 2004. – С. 94-99.

12. Дроздов И.В. Хирургическое лечение эпителиально-эндотелиальной дистрофии роговицы методом задней автоматизированной послойной кератопластики с использованием ультратонких трансплантатов/ И.В. Дроздов //Дис...кан-та мед наук. -Москва-2013. -С.54.

13. Дронов М.М. Глубокая дистрофия роговой оболочки и методы ее лечения/М.М. Дронов // Автореферат дисс. на соиск.уч.ст. канд. мед. наук, Ленинград. - 1978г.-С.56.

14. Ерошевский Т.И. О глазных банках для целей кератопластики/ Т.И. Ерошевский, Н.М. Яхина //Вестн. офтальмол. – 1973. – № 6. – С. 3-5.

15. Зими́на М.В. Первый опыт экспериментального моделирования ex vivo кератопластики с одномоментной имплантацией оригинального интрастромального кольца с целью профилактики посткератопластических аметропий / М.В.Зими́на, С.Б.Измайлова, Н.С.В.овиков, А.В.Шацких, Х.Д.Тонаева, А.С.Завьялов, И.Н.Шормаз, О.Ю.Комарова Современные технологии в офтальмологии, 2018.- № 4. - С. 96-99.

16. Канюков В.Н. Экспериментально-гистологические обоснование новых технологий в офтальмохирургии/ В.Н. Канюков, А.А. Стадников // М.: Медицина, 2005. - С. 84-89.

17. Каспаров А.А. Среда для консервации роговицы донора/ А.А. Каспаров, В.Н. Розина, В.П. Ямска, Ю.Н. Наим // Патент РФ 2138163, публикация 27.09.1999 г.

18. Ковшун Е.В. Хирургическое лечение вторичной послеоперационной эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы на основе сквозной кератопластики/ Е.В. Ковшун // Дис. ... канд. мед. наук. - М., 1992. - 151 с.

19. Комах Ю.А. Клинико-цитохимические аспекты прогнозирования и профилактики помутнения трансплантата после рекератопластики/ Ю.А. Комах // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 1995. – 20 с.

20. Копаева В.Г. Современные аспекты сквозной субтотальной кератопластики/ В.Г. Копаева // Дис. ... д-ра мед. наук. - М., 1982. - 435 с

21. Копаева В.Г. Астигматизм в трансплантате роговицы/ В.Г. Копаева // «Новые технологии в лечении заболеваний роговицы». – М., 2004. – С. 220 – 228.

22. Копаева В.Г. Морфологические и математические аспекты эктазии роговицы при кератоконусе и кератоглобусе/ В.Г. Копаева, Л.С. Легких // Федоровские чтения 2004: сб. Тез. – Москва, 2004. – С. 236-239.

23. Лушников Е.Ф. Гибель клетки (апоптоз) / Е.Ф. Лушников, А.Ю. Абросимов//М.: Медицина, 2001. - С. 87-95.

24. Малюгин Б.Э. Хирургическая коррекция астигматизма после сквозной кератопластики / Б.Э. Малюгин //Дис. ... канд. мед. наук. – М., 1994. – 166 с.

25. Малюгин Б.Э. Первый опыт и клинические результаты задней автоматизированной послойной кератопластики (ЗАПК) с использованием предварительно выкроенных 86 консервированных ультратонких роговичных

трансплантатов / Б.Э. Малюгин, З.И. Мороз, С.А. Борзенко, И.В. Дроздов, Э.Э. Айба, А.Н. Паштаев // Офтальмохирургия. - 2013. – № 3. – С. 12-16.

26. Мамиконян В.Р. Автоматизированная задняя послойная кератопластика в лечении буллезной кератопатии/ В.Р. Мамиконян, С.В. Труфанов //Бюллетень СО РАМН. 2009. 138 (4): 37-39.

27. Миллюдин Е.С. Роль тканевого банка в работе офтальмологической больницы / Е.С. Миллюдин, А.В. Золотарев, В.К. Степанов // «Новые технологии в лечении заболеваний роговицы». – М., 2004. – С. 479-484.

28. Мороз З.И. Отдаленные результаты клинико-экспериментального исследования среды Борзенка-Мороз для консервации жизнеспособной донорской роговицы. Актуальные проблемы современной офтальмологии/ З.И. Мороз, С.А. Борзенко, Ю.А. Комах, Е.В. Ковшун, О.С. Волкова// Тез.Российской конф. научно-мед. общества офтальмологов. - Смоленск, 1995. - С. 27.

29. Мороз, З. И. Лечение послеоперационной дистрофии роговицы методом задней послойной кератопластики / З. И. Мороз, Т. Д. Тоцкая, Т. Н. Григорьянц. – Текст: непосредственный // Офтальмохирургия. – 1992. – № 1.– С. 59–63.

30. Оганесян О.Г. Система хирургической реабилитации пациентов с эндотелиальной патологией роговицы/ О.Г. Оганесян // дис. ... докт. мед. наук. М., 2011. 308.

31. Паштаев А.Н. Клинические результаты задней послойной фемтокератопластики при эндотелиальной дистрофии роговицы / А.Н. Паштаев, Н.П. Паштаев, Б.Э. Малюгин, Н.А. Поздеева, Ю.Н. Елаков, К.И. Катмаков// Вестник офтальмологии. 2020;136(3):25-31.

32. Ролик О.И. Фармакологическая защита эндотелия донорских роговиц гомологичными клеточными пептидами на этапе консервации / О.И. Ролик // диссертация кандидата медицинских наук. – Москва. – 2012. – С.125.

33. Ронкина Т.И. Закономерности возрастных изменений эндотелия роговицы человека в норме и патологии, возможности активации пролиферации эндотелия и их назначение в офтальмологии/ Т.И. Ронкина // Дис. ... д-ра мед. наук в форме науч. доклада. - М., 1994. - 48 с.

34. Тахчиди Х.П. Средство для консервации донорской роговицы/ Х.П. Тахчиди, С.А. Борзенко, Б.Э. Малюгин, О.И. Ролик, Ю.А. Комах, З.И. Мороз, Е.В. Ковшун// Патент РФ № 2 450 515, опубликовано 20.05.2012 г.

35. Тоцкая Т.Д. Лечение вторичной эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы методами сквозной и задней послойной кератопластики/ Т.Д. Тоцкая// Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 1991. - 12 с.

36. Федоров С.Н. Эндотелий роговицы человека/ С.Н. Федоров, Т.И. Ронкина, Т.М. Явишева // М.: МНТК «Микрохирургия глаза», 1993. – 126 с.

37. Федоров С.Н. Глазной банк МНТК «Микрохирургия глаза» - 1988 - 1998 (десятилетний опыт) / С.Н. Федоров, З.И. Мороз, С.А. Борзенко, Ю.А. Комах //Офтальмохирургия. - 1998. - № 4. - С. 54 - 64.

38. Филатов В.П. Роговица трупа как материал для пересадки/ В.П. Филатов //Сов. вестн. офтальмологии. – 1934. – № 2. – С. 222-224.

39. Шульгина Н.С. Биологические свойства роговой оболочки, консервированной разными методами/ Н.С. Шульгина, Н.Б. Никулина //Проблемы пересадки роговой оболочки. - Киев: Здоровья, 1966. - С. 268-271.

40. Шумаков В.И. Фармакологическая защита трансплантата/ В.И. Шумаков, Н.А. Онищенко, В.И. Кирпатовский// М.: Медицина, 1983. - 232 с.

41. Юшко Н.А. Послойно-сквозная пересадка роговой оболочки и применение роговиц мертворожденных в качестве трансплантационного материала при кератопластике/ Н.А. Юшко // Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. - Одесса, 1971. - 24 с.

42. Яхина Н.М. О трансплантабельности консервированной донорской роговицы/ Н.М. Яхина, Н.И. Затулина, Н.В. Панормова //Междунар. конф. по

кератопластике и кератопротезированию: Материалы. – Одесса, 1978. – С. 87-88.

43. Al-Yousuf N. Penetrating keratoplasty: indications over a 10-year period/ Al-Yousuf N., Mavrikakis I., Mavrikakis E., Daya S.M. // Br J Ophthalmol. 2004 Aug;88(8):998-1001.

44. Albon J. Apoptosis in the Endothelium of Human Corneas for Transplantation/ J. Albon, A.B. Tullo, S. Aktar, M.E. Boulton // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2000. - Vol. 41, № 10. - P. 2887-2893.

45. Azizi B. p53-regulated increase in oxidative-stress--induced apoptosis in Fuchs endothelial corneal dystrophy: a native tissue model / B. Azizi, A. Ziaei, T. Fuchsluger, T. Schmedt, Y. Chen, U.V. Jurkunas // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2011. - Vol. 52, № 13. – P. 9291-9297.

46. Bae S.S. Nomogram to Predict Graft Thickness in Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty: An Eye Bank Study/ S.S. Bae, I. Menninga, R. Hoshino//Cornea. - 2018.-Vol.36-№7-P.697-690.

47. Bahar I. Comparison of Posterior Lamellar Keratoplasty Techniques to Penetrating Keratoplasty/ I. Bahar, I. Kaiserman, P. McAllum, A. Slomovic, D. Rootman // Ophthalmology.-2008.-Vol.115.-№9.-P.1525-1533.

48. Barraquer J.I. Lamellar keratoplasty (special techniques)/ J.I.Barraquer // Ann.Ophthalmol. – 1972. – № 6 – P. 437-469.

49. Bourne W.M. Endothelial cell survival on transplanted human corneas preserved at 4 C in 2,5% chondroitin sulfate for one to 13 days/ W.M. Bourne //Am. J. Ophthalmol. - 1986. - Vol. 102. - N 3. - P. 382-386.

50. Boynton G.E., Busin M. Eye-bank Preparation of Endothelial Tissue Microkeratome-assisted preparation of ultrathin grafts for descemet's stripping automated endothelial keratoplasty / M. Busin, A.K. Patel,V.Scorgia // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.- 2012.-Vol.53-P.521-524.

51. Brightbill F.S. Corneal surgery. Theory, technique and tissue / F.S. Brightbill // St. Louis et cet., 1993. – 540 p.

52. Bucher F. “OSMO-UT-DSA EK” using THIN-C medium / F. Bucher, S. Roters, A. Mellein, D. Hos et al. // Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology. – 2013. – Text : electronic Vol. 251,9.DOI:10.1007/s00417-013-2434-0.

53. Busin M. Ultrathin Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty with the microkeratome double-pass technique: Two-year outcomes/ M. Busin, S. Madi, P. Santorum, V. Scorcio, J. Beltz// Ophthalmology. – 2013.- 20: - P. 1186-1194.

54. Cachane M. Eye banking news highlights/ M. Cachane //EEBA News Letter. – November 2004. – P. 1.

55. Capella J.A. Corneal preservation. Clinical and laboratory evaluation of current methods/ J.A. Capella, H.F. Edelhauser, D.L. Van Horn // Springfield, USA: C.C. Thomas publisher, 1973. - 336 p.

56. Chen S. IntraLase femtosecond laser vs mechanical microkeratome in LASIK for myopia: a systematic review and meta-analysis / S. Chen, Y. Feng, A. Stonjanovic // J. Cataract Refract. Surg. – 2012 – Vol. 28- №1. – P. 15.

57. Cheung A.Y. Technique for Preparing Ultrathin and Nanothin Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty Tissue/ A.Y.Cheung, J.H. Hou, P. Bedard // Cornea. - 2018.-Vol.37-№5-P.661-666.

58. Chu W. The past twenty-five years in eye banking / W. Chu //Cornea. - 2000. - Vol. 19. - N 5. - P. 754-765.

59. Corwin W.L. The unfolded protein response in human corneal endothelial cells following hypothermic storage: implications of a novel stress pathway/ W.L. Corwin, J.M. Baust, J.G. Baust, R.G. Van Buskirk // Cryobiology. – 2011. – Vol. 63, № 1. – P. 46-55.

60. Costa–Vila J. Eye Bank and Corneal Transplants/ J. Costa–Vila, M. Canals, D. Pita //Transplantation Proceedings. - 1995. – Vol. 27. - N 4. - P. 2419.
61. Cursiefen C. Descemet's stripping with automated endothelial keratoplasty (DSAEK)/ C. Cursiefen, F.E. Kruse// Ophthalmologe. – 2008.- Feb;105(2) – P.183-90
62. De By T. Price setting of the corneas/ T. De By//16th Annual Meeting of the European Eye Bank Assotiation. – Barcelona (Spain), 2004. – P. 4.
63. Dickman M.M. A Randomized Multicenter Clinical Trial of Ultrathin Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty (DSAEK) versus DSAEK/ Dickman M.M., Kruit P.J., Remeijer L., van Rooij J., Van der Lelij A., Wijdh R.H., van den Biggelaar F.J., Berendschot T.T., Nuijts R.M.// Ophthalmology. - 2016. - Nov;123(11). – P.2276-2284.
64. Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 on setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells.
65. Directory EEBA, 14 edit. - Venice (Italy), 2006. - 80 p.
66. Eye Bank Assotiation of America (EBAA). Eye banking statistical report. - Washington, D.C., 2019 – 110 p.
67. Farge E.J. Morphologic changes of K-Sol preserved human corneas/ E.J. Farge, R.A. Fort, K.R. Wilhelmus //Cornea. - 1989. - N 8. - P. 159-169.
68. Feldman S.T. Stimulation of DNA Synthesis and c-Fos Expression in Corneal Endothelium by Insulin or Insulin-like Growth Factor-I / S.T. Feldman, D.B. Gately, L. Seely// Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. - 1993. - Vol. 34, № 6. - P. 2105-2111.
69. Filatov V.P. Transplantation of the cornea/ V.P. Filatov //Arch. Ophthalmol. - 1935. - Vol. 13. - P. 321-347.
70. Foster J.B. Three-millimeter incision descemet stripping endothelial keratoplasty using sodium hyaluronate (healon): asurvey of 105 eyes / J.B. Foster, R. Vasan, K.A. Walter // Cornea. – 2011 – Vol. 30.- № 2 – P. 150-153.



71. Fuchsluger T.A. Viral vectors for gene delivery to corneal endothelial cells/ T.A. Fuchsluger, U. Jurkunas, A. Kazlauskas, R. Dana // *Klin. Monbl. Augenheilkd.* – 2011. – Vol. 228, № 6. – P. 498-503.

72. Fyodorov S.N. Medical technological system of the IRTC "Eye microsurgery" eye bank/ S.N. Fyodorov, Z.I. Moroz, S.A. Borzenok, Y.A. Komakh (С.Н. Фёдоров, З.И. Мороз, С.А. Борзенок, Ю.А. Комах) // *International conference on cornea, eye banking and external diseases: Abstracts.* - Jerusalem, 1993.- P. 96.

73. Fyodorov S. Results of clinical bacteriological investigation of Borzenok-Moroz medium for storage of viable donor cornea/ S. Fyodorov, Z. Moroz, S. Borzenok, Yu. Komakh, G. Neverovskaya (С. Фёдоров, З. Мороз, С. Борзенок, Ю. Комах, Г. Неверовская) // *International conference on ocular infections:* - Jerusalem, Israel, 1995.- P.36.

74. Gabbay I.E. Comparison of Descemet stripping under continuous air flow, manual air injection and balanced salt solution for DMEK: a pilot study / I.E.Gabbay, I.Bahar , Y. Nahum, E.Livny// *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.*- 2017.- Vol.255.- №8.- P. 1605-1611.

75. Gorovoy MS. Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty/M. S. Gorovoy // *Cornea.* – 2006. -№8. -P.886-889.

76. Grant M.B. Effects of Epidermal Growth Factor, Fibroblast Growth Factor, and Transforming Growth Factor-B on Corneal Cell Chemotaxis/ M.B. Grant, P.T. Khaw, G.S. Schultz // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1992. – Vol. 33. - P. 3292-3301.

77. Hashemi H. Microkeratome-assisted posterior lamellar keratoplasty in pseudophakic and aphakic corneal edema / H. Hashemi, J.Noori ,M.A. Zare, F. Rahimi // *J. Refract. Surg.*- 2007.-№3-P.272-278.

78. Hashimoto T. Electron-microscopic study of the rabbit cornea stored in dialysed serum/ T. Hashimoto // *Acta. Soc. Ophthalmol. Jap.* - 1966. - Vol. 70. - № 6. - P. 1355-1366.

79. Heck E. Structure and Function of Eye Banks / E. Heck, J.H. Krachmer, M.J. Mannis, E.J. Holland // Cornea. Fundamentals, Diagnosis and Management, 2nd Edition.- Elsevier-Mosby, 2005. – Vol. 1. – P. 96-100.

80. Heidemann D.G. Comparison of deep lamellar endothelial keratoplasty and penetrating keratoplasty in patients with Fuchs endothelial dystrophy / D.G. Heidemann, S.P. Dunn, C.Y. Chow // Cornea. – 2008. – Vol. 27.-№ 2. – P. 161-167.

81. Ho Wang Yin G. 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)]/ G. Ho Wang Yin, M. Sampo, S. Soare, L. Hoffart // J Fr Ophtalmol. 2017; 40 (1): 36-43.

82. Hoppenreijs V.P. Basic fibroblast growth factor stimulates corneal endothelial cell growth and endothelial wound healing of human corneas/ V.P. Hoppenreijs, E. Pels, G. Vrensen // Invest Ophthalmol. Vis. Sci. - 1994. - Vol. 35, № 3. - P. 931-944.

83. Hull D.S. Effect of HEPES buffer on corneal storage in MK medium / D.S. Hull, K. Green, L. Thomas //Acta ophthalmol. - 1984. - Vol. 62. - N 6. - P. 900-910.

84. Jardine G.J. Eye bank-prepared femtosecond laser-assisted automated descemet membrane endothelial grafts cornea / G.J. Jardine, J.D. Holiman, J.D. Galloway J.D. // J. Cataract Refract. Surg. – 2015. – Vol. 34.-№7. – P. 838-843.

85. Jones D.T. Endothelial lamellar keratoplasty (ELK)/ D.T. Jones, W.W. Culbertson // Invest Ophthalmol Vis Sci.- 1998.-Vol.39.- P.76.

86. Joseph K.W.H. Changes in Corneal Endothelial Apical Junctional Protein Organization After Corneal Cold Storage/ K.W.H. Joseph, C. Dwight, V.J. James // Cornea. – 1999. - Vol. 18, № 6. - P. 712-720.

87. Kaufman H.E. K-Sol corneal preservation/ H.E. Kaufman, E.D. Varnell, S. Kaufman //Am. J. Ophthalmol. - 1985. - Vol. 100. - N 2. - P. 299-304.

88. Kaufman H.E. Optisol corneal storage medium / H.E. Kaufman, R.W. Beuerman, T.L. Steinemann //Arch. Ophthalmol. - 1991. - Vol. 109. - P. 864-868.

89. Kim E.C. A comparison of pupil dilation and induction of corneal endothelial apoptosis by intracameral 1% lidocaine versus 1:100,000 epinephrine in rabbits / E.C. Kim, S.H. Park, M.S. Kim// J. Ocul. Pharmacol. Ther. – 2010. – Vol. 26, № 6. – P. 563-570.

90. Koh M.S.W. Corneal endothelial autocrine trophic factor VIP in a mechanism-based strategy to enhance human donor cornea preservation for transplantation / M.S.W. Koh // Exp. Eye Res. – 2012. –Vol. 95, № 1. – P. 48-53.

91. Komuro A. Cell death during corneal storage at 4 degrees C/ A. Komuro, O. David, J.G. Gores, W.M. Bourne // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 1999. – Vol. 40, № 12. – P. 2827-2832.

92. Krachmer J.H. Cornea. Fundamentals, Diagnosis and Management/ J.H. Krachmer, M.J. Mannis, E.J. Holland // 2nd Edition. - Elsevier-Mosby, 2005. – Vol. 1. – 1409 p.

93. Lass J.H. The Effect of hEGF and Insulin on Corneal Metabolism During Optisol Storage/ J.H. Lass, S.C. Putman, W.E. Bruner// Cornea. - 1994. - Vol. 13, № 3. - P. 243-249.

94. Lubatschowski H. ArF-excimer laser-induced secondary radiation in photoablation of biological tissue/ H. Lubatschowski, O. Kermani, C. Otten, A. Haller, K.C. Schmiedt, W. Ertmer// Lasers Surg Med. – 1994. - 14(2). – P. 168-77.

95. Maas–Reijs J. Eye Banking in Europe 1991–1995 / J. Maas–Reijs, E. Pels, A.B. Tullo //Acta Ophthalmol. - 1997. - Vol. 75. - P. 541-543.

96. Mc Carey B.E. Improved corneal storage/ B.E. Mc Carey, H.E. Kaufman// Invest. Ophthalmol. - 1974. - Vol. 13. - P. 165-173.

97. McCarey B.E Corneal storage and handling //Current concepts in ophthalmology /Ed. by H.E. Kaufman, T. Zimmerman. // St.Louis: C.V. Mosby, 1976. - P. 134-163.

98. Mc Carey B.E. Improved corneal storage for penetrating keratoplasties in humans/ B.E. Mc Carey, R.F. Meyer, H.E. Kaufman //Ann. Ophthalmol. - 1976. - Vol. 8. - P. 1488-1492.
99. Melles G. Sutureless posterior lamellar keratoplasty / G. Melles, F. Lander, C.P. Nieuwendaal // Cornea. – 2002. – Vol. 21.-№ 3 – P. 325-327.
100. Melles GRJ. A Technique to Excise the Descemet Membrane from a Recipient Cornea (Descemetorhexis) / GRJ. Melles, RHJ. Wijdh, CP. Nieuwendaal// Cornea. - 2004.-Vol.23. -№ 3.- P.286-288.
101. Mootha V.V. Comparative study of descemet stripping automated endothelial keratoplasty donor preparation by Moria CBm microkeratome, horizon microkeratome, and Intralase FS60/ V.V. Mootha, E. Heck, S.M. Verity //Cornea. – 2011. – Vol. 30- №3. – P. 320-327.
102. Neff K.D., Biber JM, Holland EJ. Comparison of central corneal graft thickness to visual acuity outcomes in endothelial keratoplasty / K.D. Neff, J.M. Biber, E.J. Holland // Cornea.- 2011.- 30.- P.388 –91.
103. Okumura N. Enhancement on Primate Corneal Endothelial Cell Survival in Vitro by a ROCK Inhibitor/ N. Okumura, M. Ueno, N. Koizumi // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2009. - Vol. 50, № 8. – P. 3680-3687.
104. Pakarinen P. Preservation of the cornea for penetrating keratoplasty: an experimental study/ P. Pakarinen //Acta ophthalmol. - 1969. - P. 375.
105. Parekh M. Posterior lamellar graft preparation: a prospective review from an eye bank on current and future aspects/ M. Parekh, G. Salvalaio, A. Ruzza, D. Camposampiero, C. Griffoni, A. Zampini, D. Ponzin, S. Ferrari // J Ophthalmol. – 2013. - №7. – P.69-86.
106. Park C.Y. Keratoplasty in the United States: A 10-year review from 2005 through 2014/ C.Y. Park, J.K. Lee, P.K. Gore, C.Y. Lim// Ophthalmology. - Vol.122 - №12 -P.2432-2442.

107. Phillips P.M. "Ultrathin" DSAEK tissue prepared with a low-pulse energy, high-frequency femtosecond laser/ P.M. Phillips, L.J. Phillips, H.A. Saad// Cornea. -2013.-Vol.32-№1.-P.81-86.
108. Price M.O. Descemet's Stripping with Endothelial Keratoplasty. Comparative Outcomes with Microkeratome-Dissected and Manually Dissected Donor Tissue / M.O. Price, F.W. Price // Ophthalmology. - 2006.-Vol.32-№3 – P.411-418.
109. Price M.O. Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty outcomes compared with penetrating keratoplasty from the cornea donor study / M.O. Price, M. Gorovoy, B.A. Benetz // Ophthalmology. – 2010 – Vol.117. - № 3. – P. 438-444.
110. Price, M. O. Descemet's stripping endothelial keratoplasty / M. O. Price, F. W. Price. – Doi 10.1097/ICU.0b013e3281a4775b. – Text: electronic // Curr. Opin. Ophthalmol. – 2007. – Vol. 18, № 4. – P. 290–294.
111. Q-SOP EEBA: Agreements made at the Third Cornea Bank conference. - Leiden, 1990.
112. Requard J.J. The Evolution, Structure, and Function of Eye Bank Networks / J.J. Requard, J.H. Krachmer, M.J. Mannis, E. Holland // Cornea. - Volume I. - Mosby, 1997. - P. 475-480.
113. Rieck P.W. Fibroblast growth factor-2 protects endothelial cells from damage after corneal storage at 4 degrees C / P.W. Rieck, R.M. Von Stockhausen, S. Metzner// Graefes. Arch. Clin. Exp.Ophthalmol. - 2003. - Vol. 241, № 9. - P.757-764.
114. Robbins J.E. A study of endothelium in keratoplasty and corneal preservation/ J.E. Robbins, J.A. Capella, H.E. Kaufman //Arch. Ophthalmol. - 1965. - Vol. 73. - P. 242-247.
115. Sato E.H. Current Status of Corneal Storage / E.H. Sato //V World Cornea Congress: Program abstracts. - Washington, DC, 2005. – P. 16.

116. Schultz G. Growth factors and corneal endothelial cells: III stimulation of adult human corneal endothelial cell mitosis in vitro by defined mitogenic agents/ G. Schultz, L. Cipolla, A. Whitehouse// *Cornea*. - 1992. - Vol. 11. - P. 20-27.
117. Singh R. Corneal transplantation in the modern era / R. Singh, N. Gupta, M. Vanathi, R. Tandon// *Indian J Med Res.*- 2019.- Jul;150(1). - P.7-22.
118. Sharma N. Technique for Descemet Membrane Remnant Stripping in Hazy Cornea During DSAEK / Sharma N., Sharma V.K., Arora T., Singh K.R., Agarwal T., Vajpayee R.B. // *Cornea*. -2016. - Jan;35(1) – P.140-2.
119. Shin Y.J. Effect of cysteamine on oxidative stress-induced cell death of human corneal endothelial cells / Y.J. Shin, J.M. Seo, T.Y. Chung, J.Y. Hyon, W.R. Wee // *Curr. Eye Res.* – 2011. – Vol. 36, № 10. – P. 910-917.
120. Solomon K.D. Flap thickness accuracy: comparison of 6 microkeratome models/ K.D. Solomon, E. Donnenfeld, H.P. Sandoval // *J. Cataract Refract. Surg.* – 2004. – Vol. 30 – P. 964–977.
121. Sornelli F. NGF and NGF-receptor expression of cultured immortalized human corneal endothelial cells / F. Sornelli, A. Lambiase, F. Mantelli, L. Aloe // *Molecular Vision*. - 2010. – Vol. 16. – P. 1439-1447.
122. Stocker F.W. Medium term preservation of corneal tissue for grafting/ F.W. Stocker, D. Levenson, N.C. Georgiade // *Arch. Ophthalmol.* - 1963. - Vol. 70. - № 5. - P. 554-557.
123. Talamo J.H. Reproducibility of flap thickness with IntraLase FS and Moria LSK-1 and M2 microkeratomes/ J.H.Talamo, J. Meltzer, J. Gardner // *J. Refract. Surg.*– 2006 – Vol. 22 – P. 556–561.
124. Tan D.T. Future directions in lamellar corneal transplantation/ D.T. Tan, J.S. Mehta // *Cornea*. - 2007 - Oct;26(9 Suppl 1) – P. 21-8.
125. Tang M. Evaluating DSAEK graft deturgescence in preservation medium after microkeratome cut with optical coherence tomography / M. Tang, C. Stoeger, J.

Galloway, J. Holiman, M.R. Bald, D. Huang // *Cornea*. – 2013.- Jun;32(6) – P. 847-50

126. Tausif H.N. Corneal donor tissue preparation for Descemet's membrane endothelial keratoplasty / Tausif H.N., Johnson L., Titus M., Mavin K., Chandrasekaran N., Woodward M.A., Shtein R.M., Mian S.I. // *J Vis Exp*. – 2014.- Sep 17;(91). – P.519-29.

127. Thomas P.B M. Preconditioned donor corneal thickness for microthin endothelial keratoplasty / P.B M.Thomas, A. N. Mukherjee, D. O'Donovan, M. S. Rajan // *Cornea*. – 2013. – Vol. 32, №7. – p. 173-178. doi:10.1097/ICO.0b013e3182912fd2.

128. Terry M.A. Deep lamellar endothelial keratoplasty. A new surgical cure for bullous keratopathy following cataract surgery / M.A. Terry // *Cataract Refract. Surg.Today*. – 2004. –№2–P.20-24.

129. Terry M.A. Precut tissue for Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty: vision, astigmatism, and endothelial survival / M.A.Terry, N. Shamie, E.S. Chen et al. // *Ophthalmology*. – 2009. – Vol. 116, №2. – P.248-56. doi: 10.1016/j.ophtha.2008.09.017.

130. Tillett CW. Posterior lamellar keratoplasty/ C.W. Tillett // *Am. J. Ophthalmol.* - 1956.-№3.-P.530-533.

131. Torras-Sanvicens, J.; Visual Quality and Subjective Satisfaction in Ultrathin Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty (UT-DSAEK) versus Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty (DMEK): A Fellow-Eye Comparison / J.Torras-Sanvicens, I.Blanco-Domínguez; J.-M. Sánchez-González et al. - [https:// doi.org/10.3390/jcm10030419J](https://doi.org/10.3390/jcm10030419J). – Text : electronic // *J. Clin. Med.* – 2021, . – Vol. 10, 419.

132. Tran D.B. Randomized prospective clinical study comparing induced aberrations with IntraLase and hansatome flapcreation in fellow eyes: Potential

impact on wave front-guided laser in situ keratomileusis / D.B. Tran, M.A. Sarayba, Z. Bor // J. Cataract Refract. Surg. – 2005. – Vol. 31.-№ 1 – P.97.

133. Tripathi B.J., Kwait P.S., Tripathi R.C. Corneal growth factors: a new generation of ophthalmic pharmaceuticals/ B.J. Tripathi, P.S. Kwait, R.C. Tripathi // Cornea. - 1992. - Vol. 9. - P. 2-9.

134. Vasileva P. Problems in eye and tissue banking cooperation – legislative and organizational aspects/ P. Vasileva //Annual Meeting of the European Eye Bank Assotiation, 15th. – Belgium, 2003. – P. 68.

135. Vignola R. Monitoring the microbial contamination of donor cornea during all preservation phases: A prospective study in the Eye Bank of Rome/ R. Vignola, L. Giurgola, R.A.M. Colabelli Gisoldi, M. Gaudio, J. D'Amato Tóthová, A. Pocobelli// Transpl Infect Dis. - 2019 – Vol. - 21 № 2 – p.13041

136. Waite A. DSAEK Donor tissue preparation using a double pass microkeratome technique/ A. Waite, R. Davidson, M.J. Taravella// Journal of Cataract & Refractive Surgery/ - 2013 – V. 39 №. 3 – P. 446-450

137. Werner L. Localized opacification of hydrophilic acrylic intraocular lenses after procedures using intracameral injection of air or gas / L. Werner G. Wilbanks, C. Nieuwendaal// J. Cataract Refract. Surg. – 2015. – Vol. 41.-№ 1 – P.199-207.

138. Woodward M.A. Effect of microkeratome pass on tissue processing for descemet stripping automated endothelial keratoplasty/ M.A. Woodward, M.S. Titus, R.M. Shtein //Cornea. - 2014.-Vol.33-№5-P.507-509.

139. Xin G. Distribution and Putative Roles of Fibroblast Growth Factor-2 Isoforms in Corneal Endothelial Modulation/ G. Xin, P.K. EunDuck// Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.- 1998. - Vol. 39, № 12. - P. 2252-2258.

140. Yoeruek E. Effects of bevacizumab on apoptosis, Na<sup>+</sup> -K<sup>+</sup> -adenosine triphosphatase and zonula occludens 1 expression on cultured corneal endothelial



cells / E. Yoeruek, O. Tatar, M.S. Spitzer, O. Saygili // Ophthalmic Res. – 2010. –  
Vol. 44, № 1. – P. 43-49.