

**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

ЛИ ВАЛЕРИЙ ГЕРАСИМОВИЧ

**РАЗРАБОТКА И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ
ТЕХНОЛОГИИ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ И КРИОКОНСЕРВАЦИИ
РОГОВИЧНЫХ ЛЕНТИКУЛ ДЛЯ КЕРАТОРЕФРАКЦИОННОЙ
ХИРУРГИИ**

3.1.5. – Офтальмология

3.1.14. – Трансплантология и искусственные органы

диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук,
Костенев С. В.

доктор медицинских наук,
профессор Борзенко С. А.

Москва 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Стромальная кератофакия	12
1.1.1. Стромальная кератофакия и СМАЙЛ	14
1.1.1.1. Стромальная кератофакия с применением лентикулярного материала для коррекции гиперметропии	16
1.1.1.2. Стромальная кератофакия с применением лентикулярного материала для лечения пресбиопии	18
1.1.1.3. Стромальная кератофакия с применением лентикулярного материала для лечения кератоконуса.....	19
1.1.1.4. Стромальная кератофакия с применением лентикулярного материала для других терапевтических целей	20
1.2. Технологии тканевой инженерии роговицы	21
1.2.1. Децеллюляризация аллогенных и ксеногенных матриц роговицы	23
1.2.1.1. Физические методы децеллюляризации аллогенных и ксеногенных матриц.....	26
1.2.1.2. Химические методы децеллюляризации аллогенных и ксеногенных матриц.....	27
1.2.1.3. Биологические методы децеллюляризации аллогенных и ксеногенных матриц.....	29
1.2.1.4. Децеллюляризация аллогенного лентикулярного материала	30
1.3. Методы хранения роговицы	31
1.3.1. Метод хранения роговицы во «влажной камере».....	32
1.3.2. Гипотермический метод хранения роговицы	32
1.3.3. Метод органного культивирования	33
1.3.4. Метод криоконсервации роговицы	33
1.3.5. Гипотермический метод хранения аллогенного лентикулярного материала.....	36
1.3.6. Криоконсервация аллогенного лентикулярного материала.....	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	41
2.1. Дизайн исследования	41
2.2. Децеллюляризация лентикулярного материала.....	43
2.3. Криоконсервация децеллюляризованного лентикулярного материала ...	54

2.3.1. Протокол криоконсервации децеллюляризованного лентикулярного материала с использованием ДМСО	56
2.3.2. Описание протоколов криоконсервации децеллюляризованного лентикулярного материала	57
2.4. Цитотоксичность криоконсервированного лентикулярного материала после децеллюляризации в присутствии кератоцитов	59
2.5. Подготовка и применение криоконсервированного лентикулярного материала для интрастромальной кератофакии	65
2.6. Статистические методы	71
2.7. Список используемого лабораторного оборудования и расходных материалов в экспериментах <i>invitro</i> и <i>ex vivo</i>	72
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ РАЗРАБОТКИ ТЕХНОЛОГИИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО ЛЕНТИКУЛЯРНОГО МАТЕРИАЛА И ОЦЕНКА ЕГО ЦИТОТОКСИЧНОСТИ В ПРИСУТСТВИИ КЕРАТОЦИТОВ	76
3.1. Сравнительный анализ эффективности различных протоколов децеллюляризации лентикулярного материала	76
3.1.1 Результаты исследования прозрачности лентикулярного материала в разных транспортировочных средах	77
3.1.2. Результаты спектрофотометрии прозрачности ЛМ после децеллюляризации	80
3.1.3. Результаты гистологического анализа	83
3.1.4. Результаты иммуногистохимического анализа	84
3.1.5. Результаты сканирующей электронной микроскопии	85
3.1.6. Результаты анализа содержания ДНК	87
3.2. Результаты оценки различных протоколов криоконсервации децеллюляризованного лентикулярного материала	90
3.2.1. Оценка результатов влияния дегидратации на прозрачность децеллюляризованного лентикулярного материала перед криоконсервацией	90
3.2.2. Результаты спектрофотометрии	93
3.2.3. Результаты сканирующей электронной микроскопии	99
3.2.4. Результаты анализа стерильности криоконсервированного лентикулярного материала после децеллюляризации	104

3.3. Результаты оценки цитотоксичности криоконсервированного лентикулярного материала после децеллюляризации в присутствии кератоцитов	105
3.3.1. Результаты теста «Live and Dead»	105
3.3.2. Результаты метода «ДНК комет»	107
3.3.3. Результаты МТТ-теста	108
ГЛАВА 4. МАТЕМАТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ОСНОВНЫХ ПАРАМЕТРОВ ЛЕНТИКУЛЯРНОГО МАТЕРИАЛА И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ КОРРЕКЦИИ ГИПЕРМЕТРОПИИ ПРИ ИНТРАСТРОМАЛЬНОЙ КЕРАТОФАКИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ EX VIVO	111
4.1. Разработка математической формулы и диаграммы для расчета параметров лентикулярного материала, необходимого для коррекции гиперметропии при интрастромальной кератофакии	111
4.1.1. Разработка математической формулы, показывающей влияние параметров глаза и лентикулярного материала на рефракционный эффект роговицы	112
4.1.2. Диаграмма для выбора образца из банка лентикулярного материала для коррекции гиперметропии	118
4.1.3 Сравнение предлагаемой методики математического моделирования с расчетами из другого источника	121
4.2. Результаты морфометрических изменений до- и после имплантации криоконсервированного лентикулярного материала в кадаверный глаз человека для коррекции гиперметропии	123
4.2.1. Результаты изучения влияния дегидратации на толщину криоконсервированного лентикулярного материала после децеллюляризации	124
4.2.2. Результаты изучения возможности усиления рефракции глаза, а также его толщины до- и после имплантации ЛМ в строму роговицы	125
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	135
ВЫВОДЫ	149
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	151
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	152
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	155

ВВЕДЕНИЕ

Технология СМАЙЛ (Small Incision Lenticule Extraction – SMILE) позволяет формировать внутри стромы лентикулярный материал (ЛМ) с помощью фемтосекундного лазера, который в конце операции удаляется через 2-4 мм разрез (Sekundo et al., 2011; Shah et al., 2011). Данная технология является полностью бесклапанной и позволяет избежать осложнений, связанных с формированием клапана, таких как смещение лоскута (Iskander et al., 2001; Melki et al., 2000), послеоперационный «синдром сухого глаза» (Solomon R. et al., 2004).

Лентикулярный материал является побочным продуктом операции СМАЙЛ, что в условиях дефицита донорских роговиц в глазных банках, открывает широкие возможности для его реимплантации в будущем (Angunawela et al., 2012, Mohamed-Noriega et al., 2011). Попытки использовать криосохраненный донорский материал для интрастромальной кератофакии был известен еще со времен Х. Барракера (Barraquer, 1972). Хотя данная методика способна была исправлять гиперметропию до +20 дптр (Swinger C.A. et al., 1981), основными недостатками метода были: отсутствие стабильной рефракции, постоперационный астигматизм, высокая частота случаев врастания эпителия, высокая техническая трудность (Jester, J.V. et al., 1984). Кроме того, в период развития методики кератофакии, технологии криоконсервации донорских роговичных тканей находились на начальном этапе своего развития (Riau A.K. et al., 2020).

ЛМ, полученный после операции СМАЙЛ является частью стромы роговицы и его можно расценивать как истинный трансплантат. В литературе имеются сведения об использовании ЛМ в клинической практике для лечения пресбиопии, гиперметропии, при разных кератэктатических состояниях роговицы, а также для других терапевтических целей (Sun L. et al., 2015; Jacob S. et al., 2017; Zhao J. et al., 2019; Pant O.P. et al., 2018; Song Y.J et al., 2018). Применение ЛМ в широкой клинической практике возможно в виде его аллогенной трансплантации в строму роговицы (Shang Y.F. et al., 2020). Важно отметить, что при аллогенной трансплантации увеличивается риск иммунного отторжения ткани из-за наличия чужеродных клеточных компонентов. Технологии тканевой инженерии, а именно

методики децеллюляризации способны решить данную проблему (Crapo P.M. et al., 2011).

В 2017 году Lambert и Chamberlain из-за увеличения нехватки донорских роговиц предложили идею создания в будущем системы в глазных банках, осуществляющей стандартизированные методы хранения и подготовки ЛМ с необходимыми рефракционными параметрами для клинического использования (Lambert N.G. et al., 2017). В продолжение этой идеи, сингапурские ученые предложили создать банк для децеллюляризованного и криоконсервированного ЛМ (Riau A.K. et al., 2020). Основные ограничения данной идеи связаны с необходимостью создания условий для транспортировки, заготовки материала и его хранения, подготовкой кадров для выполнения процедур децеллюляризации и криоконсервации ЛМ.

В 2020 году при поддержке Европейской комиссии была создана интерактивная программа European Good Tissue and cells Practices II (EuroGTP II) (Trias E. et al., 2020). Целью протокола EuroGTP II является определение стратегии для снижения рисков при введении новых тканевых и клеточных технологий в клиническую практику. Фактически, протокол EuroGTP II является продолжением реализации вышеуказанных идей.

Резюмируя вышесказанное, актуальным является поиск оптимальных условий для децеллюляризации ЛМ с его последующей криоконсервацией для использования в рефракционной хирургии роговицы. Необходимость решения данной проблемы и определила цель настоящего исследования.

Цель исследования

Разработать технологию криоконсервации децеллюляризованного лентикулярного материала, полученного в процессе фемтосекундных лазерных рефракционных операций, для коррекции гиперметропии в эксперименте

Задачи

1. Провести сравнительный анализ известных способов децеллюляризации роговичной ткани и выявить из них наиболее оптимальный для лентикулярного материала методами физического, генетического и иммуногистохимического анализов.
2. Разработать протокол криоконсервации децеллюляризованного лентикулярного материала на основании физических и ультраструктурных характеристик методами спектрофотометрии и сканирующей электронной микроскопии.
3. Изучить цитотоксические свойства криоконсервированного лентикулярного материала в присутствии кератоцитов с помощью культуральных и иммуногистохимических методов исследований.
4. На основании математического моделирования произвести расчет параметров лентикулярного материала, необходимого для его имплантации в строму роговицы с целью коррекции гиперметропии.
5. Произвести морфометрическую оценку роговиц кадаверных глаз человека после имплантации криоконсервированного лентикулярного материала, с учетом результатов математического моделирования методами оптической когерентной томографии и сканирующей кератотопографии.

Научная новизна

1. Впервые разработан оригинальный способ транспортировки лентикулярного материала в дисперсном вискоэластике, позволяющий получать высокие показатели прозрачности материала для спектрофотометрического исследования. Проведенный сравнительный анализ протоколов децеллюляризации лентикулярного материала, полученного в ходе операции СМАЙЛ показал, что протоколы децеллюляризации с использованием 1.5М NaCl с нуклеазами и 0,1% SDS характеризуются воспроизводимостью, низкой иммуногенностью, сохранностью структуры внеклеточного матрикса и высокой прозрачностью лентикулярного материала.

2. Впервые проведен сравнительный анализ протоколов криоконсервации децеллюляризованного лентикулярного материала с использованием 0,1% SDS и 1.5M NaCl с нуклеазами в таких криопротекторах, как ДМСО, Криодерм и глицерин, который показал, что наилучшим протоколом, обеспечивающим высокие показатели прозрачности материала, без грубого нарушения ультраструктуры фибрилл коллагеновых волокон является протокол хранения в ДМСО с предварительной децеллюляризацией в 1.5M NaCl с нуклеазами.

3. Впервые показано, что использование дисперсного вискоэластика в качестве дегидратирующей среды для лентикулярного материала после его децеллюляризации и криоконсервации приводит к возвращению его исходных параметров толщины ($p < 0.05$), в интервале от 30 минут до 60 минут.

4. Впервые показано, что при совместном культивировании кератоцитов с криоконсервированным лентикулярным материалом после децеллюляризации в течение максимального срока наблюдения 9 суток получена высокая биосовместимость и сохранение пролиферативной активности культуры кератоцитов.

5. Впервые при помощи методов математического моделирования разработана формула, показывающая связь толщины лентикулярного материала и его диаметра с ожидаемой коррекцией гиперметропии после имплантации лентикулярного материала в строму роговицы, позволяющая достигать целевой рефракции глаза.

Практическая значимость

1. Разработанный протокол криоконсервации децеллюляризованного лентикулярного материала с использованием 1.5M NaCl с нуклеазами в ДМСО обеспечивает высокую прозрачность образцов ($89,44 \pm 2,68\%$ ($89,52$ ($87,99-91,18$))), сохранение ультраструктуры коллагенового внеклеточного матрикса ($2,45 \pm 0,36$ мкм) без грубого повреждения и токсического воздействия на окружающие ткани, что позволяет создать криобанк лентикулярной ткани.

2. На основании математического моделирования разработана формула, функционально связывающая толщину лентикулярного материала и его диаметра с рефракционным эффектом на роговице. Также проведены параметрические расчеты, показывающие влияние толщины образца на изменение величины рефракционного эффекта в диапазоне изменений кератометрии интактной роговицы от 40 дптр до 45 дптр, и диаметра образца от 6 мм до 7 мм. Разработана диаграмма для оценки возможной погрешности рефракционного эффекта при выборе образцов из банка хранения лентикулярного материала.

3. Для потенциального клинического использования образцов с целью коррекции гиперметропии целесообразно применять лентикулярный материал с меньшей диоптрийной силой, чем предполагаемая коррекция. Так, для коррекции гиперметропии +4 дптр, согласно разработанной диаграмме, потребуется образец толщиной от 56 мкм до 62 мкм, в зависимости от диаметра от 6,3 мм до 6,8 мм, что соответствует диоптрийной силе лентикулярного материала около 2,5 дптр, полученной при коррекции миопии методом СМАЙЛ.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанная технология криоконсервации децеллюляризованного лентикулярного материала – 1.5 М NaCl с нуклеазами в ДМСО, заключающаяся в двухэтапном постепенном снижении температуры хранения роговичной ткани (при температуре -80 °С и -196 °С) с последующим ее размораживанием на водяной бане (при температуре +37°С) и трехкратном цикле отмывания в растворе PBS, позволяет получать биосовместимые трансплантаты с высокой прозрачностью без грубого нарушения ультраструктуры фибрилл коллагеновых волокон, что подтверждается данными спектрофотометрии, сканирующей электронной микроскопии, культуральными и иммуногистохимическими методами исследований.
2. Разработанные математическая формула и диаграмма, необходимые для коррекции гиперметропии, заключающиеся в учете толщины и диаметра

лентикулярного материала при его имплантации в строму роговицы, а также исходных параметров роговицы и ожидаемого рефракционного эффекта, позволяют с высокой точностью добиваться коррекции целевой рефракции глаза, что подтверждается данными оптической когерентной томографии и сканирующей кератотопографии.

Апробация работы

Результаты научно-исследовательской работы были успешно доложены и обсуждены на онлайн-конференции «Роговица V. Новые достижения и перспективы» (Москва, 19 февраля 2021 г.), на Республиканской научно-практической конференции «Новые технологии в офтальмологии 2021» (Казань, 17 апреля 2021 г.), на Всероссийской научно-практической онлайн-конференции с международным участием «SOCHI-CORNEA 2021» (Сочи, 24 апреля 2021 г.), на Всероссийской научно-практической онлайн-конференции с международным участием Федоровские чтения / Конференция молодых учёных (Москва, 7 июня 2021 г.), на еженедельной научно-клинической конференции ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России (Москва, 11 июня 2021 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, из них 3 статьи – в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объём работы

Диссертационное исследование изложено на 177 страницах машинописного текста, иллюстрировано 53 рисунками и 23 таблицами. Работа состоит из введения и 4 глав, включающих обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты разработки протокола криоконсервации децеллюляризованного

лентикулярного материала, математическое обоснование основных параметров лентикулярного материала и оценка эффективности коррекции гиперметропии при интрастромальной кератофакии в эксперименте *ex vivo*, содержит общее заключение и выводы, включающего 205 источников, из них 30 отечественных и 175 зарубежных.

Экспериментальная часть *in vitro* выполнена в ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России под руководством заведующего Центром Фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем, д.м.н., профессора, академика РАЕН Борзенка С.А. Санитарно-бактериологическое исследование материала на стерильность проводилось на базе головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России под руководством заведующего лабораторией диагностики ВИЧ-инфекции и вирусных гепатитов Табунова В.С. Гистологическое исследование проводилось на базе головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России, под руководством заведующей лабораторией патологической анатомии и гистологии глаза, к.м.н., Шацких А.Н. ДНК-анализ проводился на базе Московского физико-технического института (национального исследовательского университета), под руководством младшего научного сотрудника лаборатории геномной инженерии Кегелеса Е. А.

Экспериментальная часть исследования *ex vivo*, включающая проведение комплекса специальных методов обследования кадаверных глаз до и после имплантации децеллюляризованного ЛМ после криоконсервации выполнена на базе головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России, под руководством старшего научного сотрудника отдела лазерной рефракционной хирургии, д.м.н., Костенева С.В. Математическое моделирование проводилось на базе вычислительного центра ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России под руководством кандидата технических наук Бессарабова А.Н.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Стромальная кератофакия

Стромальная кератофакия была разработана для лечения пациентов с высокой степенью гиперметропии и афакией [44]. В оригинальной методике, описанной J. Barraquer в 1980 году, свежая или консервированная донорская роговица подвергалась передней послойной кератэктомии (ППК) с последующим выделением из нее стромальной линзы. Линзу хранили с помощью методов криоконсервации, органного культивирования и лиофилизации [65, 130]. Далее проводили ППК у реципиента и помещали линзу на стромальное ложе с последующим подшиванием удаленной ранее «крышки» роговицы. Таким образом, добавленная стромальная линза увеличивала переднюю кривизну роговицы и, следовательно, усиливала преломляющую способность глаза. Данный метод позволял исправлять гиперметропию до +20 диоптрий (дптр) [176], ограничениями способа являлись индуцированный послеоперационный астигматизм, отсутствие рефракционной стабильности, врастание эпителия, отек роговицы, отсутствие репопуляции кератоцитов в трансплантате и недостаточная реиннервация роговицы [99]. Другими недостатками оригинальной стромальной кератофакии были дороговизна и техническая трудность выполнения операции [43]. Следует отметить, что во времена развития кератофакии, технологии криоконсервации тканей находились на начальном этапе оптимизации [155]. Для криосохраненных трансплантатов было характерно нарушение структуры и ориентации коллагеновых волокон, а также индуцированный клеточный некроз в тканях [156, 199].

Закон толщины Барракера выдержал испытание временем и до сих пор остается актуальным, а также служит основой для понимания хирургами принципа рефракционной межслойной (интрастромальной, интраламеллярной) кератопластики при различных видах кератэктазий, гиперметропии, пресбиопии и миопического астигматизма [153].

Кроме донорской ткани, для кератопластических операций также используют полимерные и гидрогелевые материалы. Большой вклад в развитие стромальной кератофакии внесли отечественные ученые Е.Д. Блаватская, И.В. Морхат, В.С. Беляев, П.А. Гончар, М.А. Фролов [2, 15, 1, 9, 27].

В настоящее время, нельзя сделать однозначный вывод, что технология стромальной кератофакии способна обеспечить с достаточной предсказуемостью коррекцию миопического астигматизма, гиперметропии высокой степени и афакии. Интраокулярные методы коррекции и лазерная рефракционная хирургия превосходят этот метод и дают более прогнозируемые послеоперационные результаты в коррекции вышеперечисленных аметропий [175]. Тем не менее, данная технология может быть полезна для лечения пациентов с кератоконусом и другими видами кератэктазий, которые также сопровождаются прогрессирующим истончением слоев роговицы, что в конечном итоге может привести к ее перфорации [17]. Исходя из данной актуальности, ряд отечественных ученых в своих работах показали возможность использования роговичной ткани для лечения кератоконуса. Мамиконян В.Р. с соавторами (2014) разработали операцию под названием бандажная лечебно-оптическая кератопластика (БЛОК) [14]. С помощью данной операции при имплантации донорской кольцевидной ленты происходит восстановление толщины роговицы в зоне истончения роговицы, а также стабилизация процесса эктазии. В 2019 году Шелудченко В.М. с соавторами сообщили, что технология БЛОК также эффективна в случае кератэктазии после ЛАЗИК [30].

В недавнем исследовании Оганесян О.Г. с соавторами (2020) успешно провели трансплантацию боуменового слоя (ТБС) и предложили собственную технологию его выкраивания, чтобы приостановить процесс прогрессирования кератоконуса III–IV стадии [16]. Дальнейшее совершенствование метода привело ученых к изучению влияния кросслинкинга ТБС. Результаты показали, что средние показатели кератопахиметрии увеличились в группе с кросслинкингом ТБС на $31,9 \pm 9,2$ мкм, а в группе без кросслинкинга ТБС на $41,5 \pm 16,3$ мкм. В целом, авторы

отмечали, что в период наблюдения $26,6 \pm 6,2$ месяцев у пациентов с кератоконусом III–IV стадии, показатели кератопахиметрии и Kmax оставались стабильными. Для выкраивания трансплантатов в процедурах БЛОК и ТБС требуется наличие донорских роговиц. В действительности же, в настоящее время существует проблема нехватки кадаверных роговиц в глазных банках [186].

1.1.1. Стромальная кератофакция и СМАЙЛ

Операция СМАЙЛ (ее фирменное название Refractive Lenticule Extraction (ReLEx) SMAll Incision Lenticule Extraction (SMILE/СМАЙЛ) является последним технологическим достижением в области рефракционной хирургии роговицы, позволяющей исправлять миопию и миопический астигматизм [164]. Данная операция является полностью бесклапанной и осуществляется с помощью фемтосекундного лазера. В ходе операции в толще стромы роговицы формируется лентикулярный материал (ЛМ), который затем извлекают через небольшой разрез [162]. ЛМ имеет дискообразную форму с максимальной толщиной в центре, которая постепенно уменьшается к периферии. Толщина и диаметр ЛМ зависят от степени корригируемой миопии и наличия астигматизма. Полученный ЛМ является побочным продуктом СМАЙЛ [70]. Данный материал состоит из коллагенового внеклеточного матрикса и клеточных компонентов. В связи с этим, он может расцениваться как истинный трансплантат. Для широкого применения ЛМ в клинической практике предполагается его аллогенная трансплантация [165]. Следует отметить, что в данном случае, в связи с наличием остаточных ядерных и клеточных элементов, увеличивается риск развития реакций иммунного отторжения. Для решения данной проблемы применяются методы децеллюляризации, которые относятся к технологиям тканевой инженерии [54]. В настоящее время существуют два основных сценария использования аллогенной стромальной ЛМ. Согласно первому, непосредственно после выкраивания ЛМ трансплантируется в роговицу реципиента в рамках одного операционного дня [109]. Согласно второму сценарию, после завершения рефракционной операции

ЛМ транспортируется и хранится в глазном банке (ГБ) до его клинического применения [71].

Lambert и Chamberlain (2017) в рамках обсуждения роли донорства в системе глазного банка (ГБ) и будущих перспектив его развития сформулировали новую идею, согласно которой в будущем существует потребность создания в системе ГБ стандартизированных процедур для хранения и подготовки лентикул с целевыми рефракционными параметрами, чтобы применить их в клинической практике [108].

С момента использования Барракером криосохраненных трансплантатов для стромальной кератофакии, криобиология как наука динамично развивалась [10]. Протоколы криоконсервации стали более исследованными в аспекте безопасной концентрации криопротекторов, которая уменьшает их токсическое воздействие на клетки и ткани роговицы. Происходит активный поиск оптимального температурного режима в цикле замораживания–оттаивания роговичных тканей, а также необходимых условий для отмывания протекторов из образцов после цикла оттаивания [5].

Кроме того, благодаря научно-техническому прогрессу современное оборудование позволяет проводить более глубокий анализ криотермического метода хранения роговицы [97].

В 2012 году Angunawela R. с соавторами проводили эксперимент на кроликах, которым трансплантировали аутологичный ЛМ [37]. Образцы предварительно хранили в течение 28 суток в растворах эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) и диметилсульфоксида (ДМСО) при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, с последующим переносом в жидкий азот $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Впервые было показано, что с помощью данного способа возможно восстановить объем центральной толщины роговицы, что впоследствии может быть использовано для случаев с эктатической роговицей, для коррекции гиперметропии и пресбиопии.

Дальнейшее совершенствование методов трансплантации ЛМ открыли новые возможности для изучения вышеперечисленных патологических состояний роговицы.

1.1.1.1. Стромальная кератофакция с применением лентикулярного материала для коррекции гиперметропии

Возможность, безопасность и эффективность данной рефракционной кератопластики были сначала продемонстрированы в экспериментальных исследованиях на животных.

Так, в 2015 году Liu R. с соавторами трансплантировали аллогенный ЛМ в интрастромальный карман (ИСК) на глубину 100 мкм [122]. Параметры ЛМ были следующими: толщина 60 мкм, диаметр 5,0 мм. Срок наблюдения составлял 6 месяцев. Кератотопографические карты показали усиление кривизны роговицы, а преломляющая сила роговицы увеличилась на $3,27 \pm 1,2$ дптр, что составляло 82% от запланированной коррекции. Авторы предположили, что это может быть связано с глубиной трансплантации ЛМ, реакцией на заживление раны в постоперационном периоде и ошибками измерений. Williams с соавторами (2018) сравнили рефракционные результаты для коррекции гиперметропии +2 дптр и +4 дптр с помощью ЛАЗИК, СМАЙЛ и стромальной кератофакии с помощью ЛМ [187]. Для последнего метода ЛМ (d 6,5 мм) были получены при коррекции миопии -2,0 дптр и -4,0 дптр. Далее их переносили в интрастромальный карман (ИСК) на глубину 160 мкм, диаметр 7,9 мм. Результаты показали, что через 3 месяца в группе с кератофакцией ЛМ тенденция к регрессу больше наблюдалась в глазах с ЛМ +2,0 дптр, чем +4,0 дптр. Однако абберации высшего порядка (АВП) чаще возникали в группе +4,0 дптр, чем +2,0 дптр [126]. Авторы объяснили регрессионный эффект глубиной трансплантации ЛМ (160 мкм). Zhao с соавторами (2019) пересаживали в ИСК на глубину 100 мкм ЛМ (толщина 60 мкм, диаметр 5,0 мм) [203]. Общая рефракция роговицы увеличилась через 6 месяцев ($3,27 \pm 1,2$ дптр), а через 2 года составляла $1,83 \pm 1,36$ дптр. К возможным факторам регресса авторы относят: толщину и диаметр ЛМ, глубину расположения ЛМ, заживление послеоперационной раны и ошибки измерения. Кроме того, авторы наблюдали децентрацию ЛМ, как следствие плохой фиксации глаза животных. Впервые Pradhan с соавт. (2013) представили клинический случай стромальной эндокератофакии для коррекции гиперметропии [148]. Первоначально исходная

рефракция глаза у пациента была +12,0 sph –1,50 cyl 157 ax. Через 1 год после операции рефракция составляла +7,5 sph –3,0 cyl 150 ax, показатель сферэквивалента снизился до 5,52 дптр. Авторы предположили, что ремоделирование эпителия и изменение задней поверхности роговицы могли привести к 50% недокоррекции. В другой работе, Sun с соавт. (2015) подтвердили, безопасность, эффективность, стабильность и предсказуемость результатов трансплантации аутологичной ЛМ для лечения гиперметропии через 1 год после операции [173]. В 2017 году Li с соавторами на основе 10 процедур предложили формулу для прогнозирования рефракционного результата, в соответствии с которой сила трансплантированной ЛМ должна быть меньше, чем предполагаемый результат коррекции [112]. Под силой трансплантированной ЛМ имеется ввиду образец, полученный при коррекции миопии и миопического астигматизма с исходными параметрами ЛМ (толщина, мкм и диаметр, мм). Однако авторы другого исследования, пришли к противоположному выводу, что сила трансплантированной ЛМ должна быть больше, чем предполагаемая коррекция [56]. Кроме того, изменение кривизны передней и задней поверхностей зависит от толщины ЛМ и глубины его расположения в ИСК. В дальнейшем, Moshirfar с соавт. (2018) предложили, что ЛМ лучше переносить в ИСК, а не под лоскут [138]. Тем самым это может вызвать меньшее количество осложнений, связанных с лоскутом, а также приведет к меньшему нарушению суббазального нервного сплетения роговицы.

Таким образом, представленные исследования носят достаточно противоречивый характер. Требуется провести дополнительные исследования, касающиеся определения порога минимальной и максимальной толщины ЛМ и его диаметра, необходимого для коррекции целевой рефракции. Также важным моментом является определение глубины трансплантации ЛМ, выбор хирургической техники помещения ЛМ под лоскут, либо в ИСК, роль реэпителизации после операции.

1.1.1.2. Стромальная кератофакция с применением лентикулярного материала для лечения пресбиопии

В качестве подтверждающего доказательства возможности и эффективности лечения пресбиопии Liu с соавторами (2018) провели исследование на приматах. В эксперименте переносили ЛМ (толщина 65 мкм, диаметр 3,0 мм) в ИСК на глубину 120 мкм [124]. Помимо аутологичных ЛМ, также использовались децеллюляризованные ксеногенные и ксеногенные ЛМ. Все три типа ЛМ эффективно приводили к усилению центра роговицы и значений кератометрии на 1,8–2,3 дптр, также происходило снижение значений асферичности Q с $-0,26$ до $-0,36$, и увеличение передней поверхности роговицы на 7,7–9,3 мкм. Иммуноцитологические исследования подтвердили биосовместимость аутологичных и децеллюляризованных лентикул, тогда как в одном глазу в ксеногенной группе произошло отторжение ЛМ. Через 6 месяцев произошло истончение передней части стромы на 23–29 мкм. Кроме того, процесс децеллюляризации вызвал отек ЛМ, что привело к изменению рефракции глаза. Этот отек постепенно регрессировал в течение 1 месяца. Lim с соавторами (2013) в эксперименте на кроликах для достижения эффекта «моновижн» показали, что трансплантация ЛМ также может быть полезна для восстановления миопии в недоминантном глазу у пациентов с пресбиопией, ранее перенесших рефракционную хирургию в молодом возрасте [119]. Jacob с соавт. (2017) использовали технику помещения аллогенной ЛМ для лечения пресбиопии [93]. Пациентам в недоминантный глаз трансплантировали ЛМ (толщина $61,5 \pm 3,32$ мкм, диаметр 1,0 мм) в ИСК на глубину 120 мкм. За 6 месяцев наблюдения не было замечено таких неблагоприятных зрительных явлений, как ореолы и ночные блики. По данным тех же ученых, объем трансплантата для ППК составляет $22,1 \text{ мм}^3$ (толщина 500 мкм, диаметр 7,5 мм), а объем ЛМ для пресбиопии составляет всего $0,048 \text{ мм}^3$ (толщина 61,5 мкм, диаметр 1 мм). Таким образом, антигенная нагрузка данного ЛМ значительно снижена. Тем не менее, для подтверждения долгосрочной

безопасности и эффективности процедуры необходимы исследования с большим размером выборки и более длительным периодом наблюдения.

1.1.1.3. Стромальная кератофакция с применением лентикулярного материала для лечения кератоконуса

Sachdev с соавторами (2015) в своем исследовании трансплантировали ЛМ на дезэпителизованное стромальное ложе роговицы (толщиной 370–380 мкм) с последующим проведением процедуры кросслинкинга по «Дрезденскому протоколу» [159]. После кросслинкинга ЛС отслаивали от дезэпителизированной поверхности. Гистологический анализ извлеченных ЛМ показал повышенную компактность коллагеновых волокон, что указывало на эффект кросслинкинга. Ganesh и Brar (2015) изучали эффекты добавления ЛМ в сочетании с акселерированным кросслинкингом роговицы у пациентов с кератоконусом (КС) I–III стадий и непереносимостью контактных линз [70]. Концентрация рибофлавина составляла 0,25%, экспозиция облучения 60 секунд, мощность УФ-излучения 30 мВт/см² при суммарной энергии лазерного излучения 6,3 Дж/см². По мнению авторов, данная процедура является перспективным вариантом лечения прогрессирующего КС. Стоит отметить, что в настоящее время отсутствует стандартизированный протокол для лечения КС с помощью проведения процедуры трансплантации ЛМ в комбинации с кросслинкингом роговицы. В редких случаях при данной технологии может наблюдаться послеоперационное помутнение роговицы. По данным литературы, лечение КС также возможно с помощью трансплантации ЛМ без проведения кросслинкинга роговицы. [94, 131, 100, 63]. Особое внимание заслуживает работа выполненная в 2019 году Alio Del Barrio с соавторами [35]. В данном исследовании ученые для лечения КС IV стадии использовали аутологичное заселение мезенхимальными стволовыми клетками жировой ткани человека (МСК–ЖТ), имплантацию децеллюляризованного ЛМ и имплантацию децеллюляризованного ЛМ (ДЛМ), заселенных МСК–ЖТ (ДЛМ+МСК–ЖТ). Срок наблюдения составлял 1 год. На всем сроке наблюдения не было выявлено осложнений, и данная процедура

была эффективна для лечения прогрессирующего КС. В группе с МСК–ЖТ происходили процессы дифференцировки кератоцитов с выработкой нового коллагена. Кроме того, в группах с ДЛМ и ДЛМ+МСК–ЖТ авторы сообщают о положительной клеточной реакции кератоцитов хозяина, была даже выявлена их положительная пролиферация и инвазия в имплантированную ткань. Роль стволовых клеток в аспекте заселения ДЛМ остается до конца неизученной. В связи с этим, существует необходимость проведения дополнительных исследований в данном направлении.

1.1.1.4. Стромальная кератофакция с применением лентикулярного материала для других терапевтических целей

Тот факт, что после операции СМАЙЛ остается невостребованным ЛМ, многих наводит на мысль о возможности его применения в следующих ситуациях: в ургентных случаях, при инфекционных осложнениях, доброкачественных новообразованиях, при осложнениях после рефракционных операций, при разных кератэктатических состояниях роговицы [71]. С недавних пор ЛМ использовался для лечения лимбального дермоида, при кератэктазии после ЛАЗИК, пост-ЛАЗИК-индуцированной гиперметропии и астигматизма высокой степени, микро– и макроперфорациях роговицы [109, 46, 113]. Также существуют сведения об использовании ЛМ в педиатрии для лечения перфорации роговицы как вторичного осложнения, вызванного демодекозом век [143]. Описаны случаи, где ЛМ использовался в качестве пластыря при осложнениях в хирургии глаукомы, связанных с дренажной трубкой устройства Ахмеда, и при буллезной кератопатии [184, 170]. В недавнем исследовании Калининкова Ю.Ю. с соавторами (2021) использовался комбинированный метод, включающий трансплантацию ЛМ в интрастромальный туннель с последующим проведением локального кросслинкинга роговицы [12]. Данный метод способен обеспечить высокую эффективность в лечении пеллюцидной краевой дегенерации. Соответственно, на сегодняшний день в литературе описано достаточное количество использования ЛМ в особых ситуациях, когда требуется сохранить глаз как орган. Тем не менее,

нельзя однозначно утверждать, что применение ЛМ в данной ситуации является методом выбора.

1.2. Технологии тканевой инженерии роговицы

Роговица человека представляет собой прозрачную, аваскулярную, внешнюю фиброзную оболочку глаза. Функционально роговица глаза выполняет защитную (барьерную), светопроводящую и светопреломляющую функции [7]. В строении роговицы можно выделить три отдельных слоя (эпителиальный, стромальный и эндотелиальный), разделенных двумя бесклеточными слоями (Боуменова и Десцеметова мембраны) [172]. В последнее время выделяют еще шестой слой Дюа, расположенный между стромой и десцеметовой мембраной [61]. Эпителий роговицы представлен многослойным плоским неороговевающим эпителием, который выполняет в основном барьерную функцию. Строма роговицы составляет 90% от общей толщины роговицы и состоит из внеклеточного матрикса (ВКМ), заселенного кератоцитами, и состоящего из коллагена I, III, V, VI типов, а также гликозаминогликанов (ГАГ) и протеогликанов, таких как декорин, люмикан и кератокан [38]. Эндотелий состоит из монослоя гексагональных клеток с ограниченными регенеративными возможностями. Данные клетки благодаря насосной функции обеспечивают водный баланс в роговице и доставку питательных веществ [49, 133].

В настоящее время в мире около 10 миллионов человек страдают двусторонней слепотой, связанной с патологией роговицы [185]. В данной ситуации трансплантация роговицы является единственным методом лечения патологий роговицы. Несмотря на то, что роговица является иммунопривилегированной тканью благодаря ее бессосудистой природе, тем не менее, отторжение трансплантата является наиболее частой причиной осложнений после пересадки роговицы [178, 177]. В недавнем глобальном исследовании было установлено, что на каждые 70 человек, нуждающихся в трансплантации роговицы, приходится только одна роговица [69].

Данный факт подчеркивает острую нехватку донорской роговичной ткани. Именно по этим причинам тканевая инженерия роговицы, как подход к созданию тканей для трансплантации вызывает большой интерес.

Тканевая инженерия и регенеративная медицина направлены на преодоление нехватки донорских органов и тканей, а также иммунного отторжения путем изготовления органов и тканей в лабораторных условиях из специфичных клеток и материалов. Основной принцип действия традиционной тканевой инженерии основан на межклеточном взаимодействии, изготовлении биосовместимых каркасов и применении внешних стимулов (механические, химические, биологические) [132]. В области тканевой инженерии роговицы в основном исследуются каркасы либо на основе коллагена, либо с применением других материалов, приближенных по свойствам к роговице, таких как рыба чешуя, полимеры, желатин, коллагеноподобные пептиды [86, 158, 136, 141]. Материалы на основе коллагена являются наиболее распространенными, так как коллаген является основным компонентом стромы роговицы. Коллагеновые каркасы могут быть построены на основе высокогидратированного гидрогеля, пластически сжатого коллагена и мембран, полученных методом витрификации [123, 62, 106, 111, 135]. Также были исследованы другие природные полимеры, такие как хитозан, фиброин шелка, фибрин и пептидные нановолокна [51, 183, 151, 32, 152]. На территории Российской Федерации также существует проблема нехватки донорских тканей роговицы в ГБ. Большое значение в развитии технологий тканевой инженерии роговицы имели экспериментальные труды отечественных ученых С.А. Борзенка, Д.С. Островского, М.Х. Хубецовой, М.Ю. Герасимова, С.И. Анисимова, Е.В. Ченцовой, Н.С. Егоровой [18, 6, 11, 29, 28, 21, 22].

Особый интерес вызывают технологии трехмерной биопечати и электроспиннинга [171,104]. Технология трехмерной биопечати способна воссоздать структуру роговицы с помощью биочернил [171]. Данные исследования показали многообещающие результаты. 3D-печатные каркасы привлекательны тем, что они имеют высоко контролируемый производственный процесс, поддающийся массовому производству. Также данная технология может позволить

печатать индивидуальные структуры под конкретного пациента, учитывая состояние его топографической карты роговицы [90]. Однако, в настоящий момент ученые не смогли добиться реального биохимического состава роговицы, также не смогли воспроизвести фибриллярную упорядоченность роговицы и архитектуру внеклеточного матрикса (ВКМ) [67].

Другим многообещающим направлением в тканевой инженерии роговицы являются гидрогели, полученные из ВКМ роговицы. Гидрогели способны воссоздать большую часть объема ВКМ, но достичь точной фибриллярной структурной организации нативной роговицы не представляется возможным [105,31]. Сообщалось также о бескаркасных подходах, при которых клетки по принципу самосборки способны синтезировать собственный ВКМ, тем самым создавая ткань *in vitro* [79, 76, 50]. Данные методы считаются дорогостоящими и для получения клеток требуют длительного срока ожидания. По данным Guerin (2021) для получения роговичной конструкции, созданной полностью из клеток по принципу самосборки требуется 56 суток [77].

Таким образом, сохранение естественной структурной архитектуры ВКМ является крайне актуальным в тканевой инженерии роговицы. В этой связи использование децеллюляризированной роговицы представляется наиболее перспективным направлением.

1.2.1. Децеллюляризация аллогенных и ксеногенных матриксов роговицы

Децеллюляризация — это процесс, направленный на удаление клеток из органов или тканей, в результате чего образуется бесклеточный каркас, состоящий из собственного ВКМ [24]. Удаление клеток из ВКМ снижает антигенную нагрузку на ткани и приводит к уменьшению риска отторжения трансплантата. В литературе описаны различные методы создания бесклеточных аллогенных и ксеногенных тканеинженерных роговичных конструкций. Децеллюляризация ксеногенных роговиц была описана на примере роговиц свиней, овец, собак, кроликов, обезьян, коров и рыб [198]. Несмотря на то, что обезьяны филогенетически являются близкими по виду к человеку, существует ряд недостатков, таких как этические

проблемы, риск передачи зоонозных инфекций, высокие финансовые затраты, а также отсутствие опыта внутривидового изменения генетического материала [80]. Вышеперечисленные недостатки обусловили переход к поиску альтернативных ксеногенных источников для тканевой инженерии роговицы. В результате поиска исследователи обратили внимание на роговицы свиньи. К достоинствам использования свиней относят: уровень фертильности выше, чем у обезьян, также меньше этических проблем, наличие опыта получения генетически модифицированных свиней путем отключения гена, кодирующего фермент Альфа-1,3-галактозилтрансферазу, который производит чужеродный для человека эпитоп Gala1-3gal β 1-4GlcNAc-R (α -GAL) [55]. Традиционная технология соматического ядерного переноса для получения гомозиготы свиньи с одной генной модификацией занимает 3 года. Вместе с тем известно, что использование традиционной технологии для получения генно-модифицированных свиней не способно решить проблемы, связанные как с гуморальным и клеточным ксеногенным отторжением тканей, так и риском передачи зоонозных инфекций [198]. Кроме α -GAL, в роговице свиньи также имеется чужеродный для человека эпитоп N-гликолил-нейраминовая кислота (Neu5Gc), который может вызвать реакции острого гуморального отторжения тканей [53].

На данный момент для децеллюляризации ксеногенных роговиц в основном используются свиньи. В мире только в Китае разрешено их использовать в клинической практике [64]. Китайские офтальмохирурги провели более 1000 трансплантаций для лечения язвы роговицы, грибкового кератита, герпетического кератита и прогрессирующего инфекционного кератита [116, 117, 201, 169, 204]. Долгосрочные результаты этих трансплантаций еще не были опубликованы.

По последним данным в Южной Корее проводится клиническое исследование, которое находится в фазе I. Целью данного исследования является изучение безопасности и эффективности ксенотрансплантации свиной роговицы [198].

Также имеются сообщения из Украины об использовании лиофилизированной свиной роговицы для лечения некротизирующего кератита и осложненных язв роговицы [59, 180].

Bianchi J. с соавт. (2020) сообщили, что децеллюляризация ксеногенных тканей может быть эффективной при удалении несвязанных или растворимых белков, содержащих α -GAL. Однако, для удаления эпитопа α -GAL может потребоваться более агрессивная децеллюляризация, что может привести к разрыву химических связей и, как следствие, дополнительному разрушению ВКМ вплоть до потери им биохимических свойств, что делает данную процедуру бессмысленной [47].

В связи с этим, децеллюляризация аллогенных роговиц с точки зрения биосовместимости представляется более перспективным направлением в регенеративной медицине роговицы. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* было установлено, что наличие остаточного клеточного материала после децеллюляризации может способствовать поляризации провоспалительного фенотипа макрофагов M1, что, в свою очередь, приведет к отторжению трансплантата [103]. Кроме того, недостаточное удаление клеточного дебриса после децеллюляризации потенциально может приводить к связыванию остаточных клеток с иммуноглобулинами и белками комплемента с дальнейшей активацией макрофагов и В-лимфоцитов, что, в конечном итоге, также приведет к отторжению ткани [139]. Данный факт диктует необходимость дальнейшего совершенствования методики децеллюляризации.

В последнее десятилетие методом децеллюляризации был обработан широкий спектр органов, включая печень, почки, сердце, легкие и поджелудочную железу [74]. Методы децеллюляризации роговицы можно разделить на три типа, в зависимости от оказываемого воздействия на ткань: физические, химические и биологические, чаще всего используется их комбинация [54]. Для описания методики децеллюляризации ученые используют протоколы, в которых подробно приведена пошаговая инструкция по использованию действующих веществ, времени их воздействия и необходимых условий для обработки образцов.

1.2.1.1. Физические методы децеллюляризации аллогенных и ксеногенных матриксов

В большинстве протоколов децеллюляризации присутствует некоторая форма механического перемешивания, которая в основном осуществляется с помощью орбитальных шейкеров. Данные приборы за счет контролируемого перемешивания способствуют прохождению потока децеллюляризирующих веществ через структуру ВКМ [140].

Использование повторяющихся циклов замораживания-оттаивания в температурном диапазоне от $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ в жидком азоте является простым методом децеллюляризации, позволяющим добиваться лизиса клеток путем образования внутри клетки кристаллов льда. Обычно за данными циклами замораживания-оттаивания следует отмывание, либо добавление другого децеллюляризирующего вещества для гарантии удаления клеточного дебриса [58, 115, 142, 149,]. Однако данный метод может вызвать повреждение ВКМ, снижение прозрачности и механической прочности [91].

Также имеются сообщения о применении электрофореза с сывороткой крови как дополнительного фактора для удаления остаточных клеток [166, 167]. Несмотря на то, что данный метод способен сохранить структуру ВКМ и прозрачность роговицы, авторам не удалось однородно удалить клеточные компоненты во всех слоях роговицы.

Применение высокого гидростатического давления снижает содержание ДНК и поддерживает уровень ГАГ в децеллюляризованной роговице свиней [82, 82, 160]. Данный метод осуществляется с помощью дорогостоящего оборудования и может вызвать дезорганизацию коллагеновых фибрилл, вызывая отек и, тем самым, снижая прозрачность ткани [91, 168].

Диоксид углерода можно использовать в качестве сверхкритического флюида, который, легко диффундируя через ткани, не оставляет после себя остатков. Данный метод показал хорошие первоначальные результаты для децеллюляризации роговиц крупного рогатого скота и свиньи. Кроме того, метод можно использовать для одновременной стерилизации тканей [78, 88]

Газообразный азот индуцирует процесс клеточного апоптоза путем создания гипоксической среды. Этот метод поддерживает прозрачные свойства роговицы свиньи, но не способен полностью удалить клетки из ткани. Кроме того, остается неясным его влияние на механическую прочность и ультраструктуру стромы роговицы [36, 110].

Хотя лиофилизация не является строгим методом децеллюляризации, исследователи использовали лиофилизацию для получения более пористых каркасов. Для этого, жидкость в роговице сначала подвергается замораживанию, затем происходит процесс высушивания ткани с помощью сублимации в условиях вакуума. Считается, что при таком подходе репопуляция соседними клетками увеличивается, хотя есть вероятность того, что этот процесс может нарушить архитектуру коллагеновых волокон роговицы [192, 120].

1.2.1.2. Химические методы децеллюляризации аллогенных и ксеногенных матриксов

Широкое распространение получил метод децеллюляризации роговицы с использованием детергентов. Детергенты обладают свойством растворимых амфифильных соединений и являются поверхностно-активными веществами, которые способны сольубилизовать клеточные мембраны, тем самым удаляя клеточные компоненты и нуклеиновые кислоты.

Детергенты классифицируют на четыре класса в зависимости от их заряда, свойства мицелл, особенностей связывания с белками и взаимодействия с различными растворенными веществами: ионные, неионные, катионные и цвиттерионные.

Наиболее широко используется ионный детергент додецилсульфат натрия (SDS). SDS является сильным ионным детергентом, способным сольубилизовать мембраны клеток. В литературе имеются противоречивые данные при использовании SDS для децеллюляризации роговицы в отношении прозрачности, удаления клеточного дебриса и нарушения коллагенового каркаса ВКМ [205, 163, 34, 197].

Также имеются данные описания более мягкого моющего средства, такого как дезоксихолат натрия (SD) [58,193]. Naresh Poliseti с соавторами (2021) сообщили об эффективном удалении клеточного материала при сохранении белков ВКМ и прозрачности роговицы после использования раствора SD в комбинации с ДНКазой и декстраном [146]. Примечательно, что авторы впервые предложили использовать декстран для контроля набухания ткани роговицы человека в процессе децеллюляризации. Однако, по данным Liqun Du с соавторами (2011), воздействие SD вызвало нарушение структуры коллагеновых волокон при неповрежденных Десцеметовой и Боуменовой мембран [60].

Тритон х-100 является одним из самых популярных неионных поверхностно-активных веществ, используемых для пермеабилзации клеток. Полярная головная группа Тритон х-100 встраивается в липидный бислой мембраны, разрушая водородные связи в этом слое. При достижении критической концентрации мицелл происходит разрушение целостности липидной мембраны и высвобождение клеточного содержимого, включая ДНК. Неионные детергенты, такие как Triton х-100, менее эффективны чем SDS и SD, но в свою очередь, менее разрушительны для ВКМ [52, 60, 66, 194,127].

Цвиттерионные детергенты, такие как 3-[(3-холамидопропил) диметриламмоний]-1-пропансульфонат (CHAPS) обладают характеристиками как ионных, так и неионных моющих средств, поскольку имеют положительные и отрицательные функциональные группы с нулевым зарядом. Несмотря на этот факт, данные детергенты безуспешно применялись для децеллюляризации роговицы [60].

Органические кислоты также использовались для децеллюляризации роговицы. S. Ponce Marquez с соавторами сообщили об использовании перуксусной кислоты для роговицы с неоптимальными результатами [147]. Мягкие кислоты, обычно встречающиеся в природе, такие как уксусная, муравьиная и лимонная кислоты, недавно были использованы для децеллюляризации роговицы свиней. Основания используются реже, чем кислоты, и только гидроксид аммония упоминается в литературе для децеллюляризации роговицы [52, 202]

Гипертонический раствор хлорида натрия использовался в концентрациях 1,5М и 2М несколькими исследовательскими группами с положительными результатами с точки зрения прозрачности, удаления клеток и удержания компонентов ВКМ [88, 142, 127, 128, 75, 189, 83, 201]. В сочетании с этапом промывки с использованием 0,2% Тритон х-100 были достигнуты наилучшие результаты [201, 127]. Напротив, Wilson и соавт. сообщили, что изолированный раствор 1,5М хлорид натрия не способен полностью удалить ядерный материал из ткани роговицы. В сочетании с нуклеазами также остается клеточный дебрис и значительно снижается прозрачность [189].

Gilbert с соавт. предположили, что раствор хлорида натрия индуцирует осмотический шок, вызывая разрыв клеток внутри ткани [74]. Другая альтернативная гипотеза предполагает, что ионы Na^+ и Cl^- способны пересекать клеточные мембраны, вытягивая воду из клеток, тем самым изменяя объем клеток и содержание макромолекул, вызывая гибель клеток [157]

Другие химические вещества, используемые для децеллюляризации роговицы, включают спирты, такие как этанол, и хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА). Ponce Marquez с соавт. использовали 75% этанол в соответствии с протоколом, первоначально описанным для децеллюляризации артерий [147, 134]. ЭДТА обычно используется вместе с трипсином, так как он гидролизует пептидные связи, нарушая межклеточные взаимодействия. Трипсин также секвестрирует кальций, присутствующий в соединениях кадгерина [142, 197, 127].

1.2.1.3. Биологические методы децеллюляризации аллогенных и ксеногенных матриксов

В литературе для децеллюляризации роговицы использовались несколько ферментов. Трипсин и диспаза II — это белки, диссоциирующие клетки, обычно используемые для выделения клеток. Лизис клеток происходит при увеличении времени инкубации и концентрации раствора [142, 120, 194, 75, 200, 89, 85]. Van den Bogerd В. с соавторами получили положительные результаты в отношении

удаления эпителиальных клеток и сохранении достаточной прозрачности при децеллюляризации капсулы хрусталика раствором трипсином-ЭДТА [182].

Фосфолипаза А-2 представляет собой эстеразу, которая разрушает фосфолипиды, присутствующие в клеточной мембране, и было показано, что она успешно удаляет компоненты клетки с минимальным разрушением ВКМ [192, 114]. Другой биологический агент - человеческая сыворотка, которая использовалась для децеллюляризации кровеносных сосудов и роговицы наряду с использованием электрофореза [166, 167].

Большинство исследований включают дополнительную стадию инкубации с нуклеазами, чтобы способствовать расщеплению последовательности нуклеиновых кислот с последующей деградацией ДНК, высвобождаемой после лизиса клеток [58,163, 193, 33].

1.2.1.4. Децеллюляризация аллогенного лентикулярного материала

Китайские ученые использовали протокол с гипертоническим раствором натрия хлорида с нуклеазами для последующей децеллюляризации стволовыми клетками. Авторы получили ацеллюлярные стромальные ЛМ и успешно его применили в экспериментальной работе на животных [196].

Gary Hin-Fai Yam с соавторами (2016) обрабатывали ЛМ изолированными растворами Тритон х-100, SDS, гипертоническим раствором хлорида натрия и их комбинациями с нуклеазами в различной концентрации [195]. В данной работе при оценке децеллюляризованных лентикул было показано, что изолированные растворы Тритон х-100, гипертонический хлорид натрия, а также гипертонический раствор хлорид натрия с нуклеазами не способны полностью вымывать клеточный дебрис из ткани. Кроме того, добавление нуклеаз в протокол децеллюляризации приводило к нарушению фибриллярной структуры ткани и снижению прозрачных свойств ткани. По мнению авторов исследования, протокол с использованием раствора SDS был лучшим в отношении сохранности прозрачности и удаления клеток из ЛМ.

Huh M. I. с соавторами (2018) использовали стромальный ЛМ с применением следующих протоколов децеллюляризации: растворы SDS, Тритон х-100 и трипсин-ЭДТА в концентрациях 0,1%, 0,25%, 0,5%. ЛМ также обрабатывали раствором нуклеаз и двойным отмыванием в гипотоническом, изотоническом и гипертоническом трис-буферных растворах [89]. Группы с 0,25% и 0,5% трипсин-ЭДТА с отмыванием в гипотоническом трис-буфере и раствором нуклеаз показали лучшие коэффициенты светопропускания и самое низкое содержание ДНК в ткани.

В недавнем исследовании Shuai Qin (2019) проводили рецеллюляризацию стволовыми клетками человека на ацеллюлярных матриксах, полученных с помощью лиофилизации [150]. ЛМ обрабатывали 0,025% раствором трипсина-ЭДТА, затем помещали в жидкий азот -196°C . Далее после их оттаивания подвергали трехкратному циклу замораживания/оттаивания и обработке нуклеазами с последующим высушиванием в лиофильной камере. Авторы подтвердили отсутствие остаточного клеточного дебриса. Однако, полученные лиофилизированные ЛМ после их помещения в культуральной среде DMEM были полупрозрачными.

Таким образом, в описанной литературе применение различных протоколов для децеллюляризации ЛМ носит противоречивый характер и единого стандартизованного протокола на данный момент не существует.

1.3. Методы хранения роговицы

В настоящее время существует значительное расхождение между спросом и предложением донорских роговиц в ГБ. С учетом значительной потребности в донорском материале, заготовка и консервация роговичной ткани является актуальной проблемой в офтальмологии.

Выделяют четыре основных метода для консервации донорской роговичной ткани: хранение во «влажной камере», гипотермический метод, метод органного культивирования и криоконсервация. Данные методы классифицируют в зависимости от времени хранения, соответственно как краткосрочные, среднесрочные, долгосрочные и с неограниченным сроком хранения [8].

1.3.1. Метод хранения роговицы во «влажной камере»

Основоположником консервации роговицы является академик В.П. Филатов, который в 1935 году разработал методику хранения роговиц во «влажной камере» [25]. Данный метод является самым простым и недорогим способом консервации роговицы, позволяющим использовать донорский материал для сквозной кератопластики и ППК на сроках 2 дня и дольше. Однако, недостатками данного способа является то, что во время хранения происходит посмертный контакт эндотелиального слоя с влагой передней камеры глаза, что в свою очередь, приводит к раннему отеку роговицы. В связи с этим, существует прямая связь между сроком хранения и клиническим исходом. Кроме того, во влаге передней камеры глаза происходит накопление продуктов метаболизма [107]. С тех пор изменилась парадигма от использования целого кадаверного глаза для консервации в направлении отдельно сформированного роговично-склерального диска (РСД).

1.3.2. Гипотермический метод хранения роговицы

При данном способе хранения в основе принципа действия лежит защита клеток от негативного воздействия продуктов метаболизма в условиях пониженной температуры, согласно кинетической теории химических реакций Аррениуса [68]. В настоящее время для гипотермического способа используются среды, которые дают наилучшие результаты при сроке хранения до 7 суток, при заявленной производителем возможности хранения до 14 суток. К данным средам относятся: Optisol-GS, Eusol, Dexsol [121, 188, 161]. Эти среды являются различными модификациями первоначальной синтетической среды McCarey-Kaufman (М-К среда). М-К среда представлена культуральной клеточной средой М-199, содержащей 5% декстран, антибиотики и HEPES-буфер [102]. При заявленном сроке хранения в 7 дней при температуре 4°C, наилучший клинический результат показали трансплантаты, которые хранились до 4 суток. Даже такой ограниченный срок консервации донорской ткани позволил решить проблемы, связанные с транспортировкой трансплантата. Данный среднесрочный метод нашел свое наиболее широкое применение на территории Российской Федерации и в Северной

Америке. С 1990 годов в России применяют «Раствор для хранения роговицы» (среда Борзенка-Мороз) (ООО НЭП «Микрохирургия глаза», Москва) [5]. Также отечественные ученые занимаются активной разработкой в области повышения жизнеспособности трансплантата [20].

1.3.3. Метод органного культивирования

В 1980 году в Великобритании был создан долгосрочный метод органного культивирования, который в дальнейшем получил свое распространение в странах Западной Европы [40, 57]. Самой распространенной средой является минимальная эссенциальная среда Игла с концентрациями 2% и 8%. FBS. Большинство глазных банков включают в свою среду амфотерицин В, пенициллин и стрептомицин. Около 40% банков не меняют среду во время хранения, в то время как остальные меняют культуральную среду каждые 1-2 недели. Содержание декстрана варьируется от 4% до 8%. РСД, сохраненные данным способом, могут быть пригодными до 4 недель при температуре 34°C [145]. Долгосрочный метод органного культивирования позволяет выполнять скрининг на бактерии и грибы в начале и в конце хранения непосредственно перед выдачей РСД для его трансплантации. Безусловно, данный способ хранения способствовал улучшению качества, безопасности и доступности РСД. Однако к недостаткам следует отнести постоянство выполнения экспертно-технической оценки на всех этапах от момента изъятия образца до конечного пункта назначения. На 2010 год из 62 глазных банков, включенных в каталог Ассоциации Европейских глазных банков, 47 использовали метод органного культивирования, 9 использовали гипотермический способ и 6 использовали оба метода. В общем 70% роговиц хранились в органной культуре [101].

1.3.4. Метод криоконсервации роговицы

Криоконсервация – метод потенциально неограниченного хранения клеток и тканей, которые вводятся в состояние «анабиоза», где с помощью низких температур происходит остановка биохимических процессов в клетках (аутолиз), в

том числе останавливается обмен энергией с внешней средой [97]. В 1911 году Magitot провел первый опыт хранения роговицы ниже 0°C , а точнее, при температуре -4° , -6°C [129]. В результате хранения данным методом роговица становилась непрозрачной.

В настоящее время существует тенденция перехода от сквозных кератопластик к послойным видам операций, таким как передние и межслойные [41]. В связи с данным фактом, возросла актуальность хранения роговичной ткани без криопротектора. В 2014 году Javadi MA. с соавторами в своем исследовании использовали замораживание кадаверных глаз без криопротектора [98]. Образцы хранили при температуре -70°C на сроках от 5 суток до 7 месяцев. Затем осуществляли двухэтапный цикл оттаивания: сначала в течение 1 часа до 4°C , затем 1 час при комнатной температуре. Далее из образцов выкраивали РСД. Авторы сообщили об успешном применении данных трансплантатов у пациентов с КС, которым была выполнена глубокая передняя послойная кератопластика (ГППК). Huang D. с соавторами (2014) также сообщили об успешном использовании трансплантатов для лечения пациентов с краевой дегенерацией Терьена, которым была выполнена периферическая ГППК [87]. Образцы для трансплантации замораживали и хранили при температуре -20°C . Jang с соавторами (2011) представили клинический случай, где пациенту с перфорацией роговицы выполнили ГППК с использованием криоконсервированной роговицы, хранившейся в растворе Optisol GS при температуре -70°C в течение 4 недель [96]. Через шесть месяцев после операции роговица оставалась прозрачной и восстанавливала нормальную толщину.

Как правило, криоконсервацию делят на 2 типа: обычное замораживание (до -20°C) и глубокое замораживание (от -79°C до -196°C)

Процесс криоконсервации состоит из 4 основных этапов [97]:

1. Использование криопротекторов перед замораживанием для сохранения структуры тканей и жизнеспособности консервированных клеточных компонентов.

2. Замораживание клеток или тканей до целевой низкой температуры с последующим их хранением.

3. Оттаивание (нагревание) клеток или тканей.

4. Удаление криопротекторов из клеток или тканей после оттаивания.

Основными повреждающими факторами при замораживании являются образование внутриклеточного льда и обезвоживание клетки [73]. Образование внутриклеточного льда характерно для большой скорости охлаждения (более 10К/мин). Кристаллизация внутриклеточной воды приводит к увеличению внутреннего объема мембранных структур (ядро, аппарат Гольджи, митохондрии, эндоплазматическая сеть, лизосомы, цитоплазматическая мембрана и пр.) с последующим их разрушением. Обезвоживание клетки характерно для небольшой скорости охлаждения (менее 10К/мин). Потеря клеткой воды происходит вследствие замораживания воды во внешнем экстрацеллюлярном пространстве. Таким образом в данном пространстве увеличивается концентрация растворенных веществ и клетки теряют воду из-за осмотического дисбаланса. В криобиологии повреждения, которые получает клетка в процессе замораживания, называются «криоповреждениями» [190]. Криоконсервация ставит перед собой основную задачу, которая сводится к определению оптимальной скорости замораживания и оттаивания для предотвращения криоповреждений. Безусловно, для решения данной проблемы следует учитывать такие аспекты, как биофизические свойства клеточной мембраны, объем ткани, тип криопротектора и его концентрацию [144].

Криопротекторы должны обладать такими свойствами, как водорастворимость при минусовых температурах, хорошая мембранопроницаемость и низкая токсичность [45]. Данные вещества препятствуют избыточному формированию внутриклеточного льда и уменьшают эффект гиперконцентрации растворенных веществ внутри- и во внеклеточном пространстве.

Криопротекторы делят на 3 типа [13]:

1. Мембранопроникающие, проникая внутрь клетки, увеличивают концентрацию растворенных в ней веществ. В результате предотвращается потеря

воды из клетки. Затем происходит образование водородных связей с молекулами воды, тем самым криопротекторы препятствуют кристаллизации в клетке – диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин, пропиленгликоль (1,2 – пропандиол), этиленгликоль.

2. Мембранонепроницающие, не проникая внутрь клетки, снижают скорость кристаллизации воды и способствуют осмотическому балансу – 2-метил-2,4-пентандиол, поливинилпирролидон, полиэтиленгликоль, гидроксипропилкрахмал, декстран, трегалоза, сахароза, фикоил, альбумин.

3. Криопротекторы смешанного действия – обладают одновременно эффектами проникающих и непроницающих протекторов – полиэтиленоксид, гексаметиленгидроксипропилмочевина, оксиэтилированный глицерин.

1.3.5. Гипотермический метод хранения аллогенного лентикулярного материала

Хранение ЛМ в ГБ позволяет решить проблему острой нехватки донорского материала, чтобы использовать его в дальнейшем для лечения разных патологий роговицы.

В исследовании Liang G. с соавторами (2019) хранили ЛМ в трех средах: Optisol, 99% глицерин и аллохроичный силикагель, которые хранили при температуре 4°C в течение 14 суток [118]. На сроках 1, 3, 7 и 14 суток проводили оценку жизнеспособности клеток, коллагеновой структуры и прозрачности лентикул. Авторы сообщили об изменениях гисто-архитектуры и прозрачных свойств лентикул с течением времени. Сравнение этих сред показало, что лучшим оказался Optisol, за которым следовал аллохроичный силикагель, а затем 99% глицерин. В другой работе Xia F с соавторами (2020) использовали силиконовое масло, 99% глицерин и аллохроичный силикагель в качестве среды для хранения нативных образцов [191]. ЛМ хранили при температуре 4°C в течение 1 месяца. Коэффициент светопропускания в группах глицерина и силиконового масла значительно снизился, чего не наблюдалось в группе силикагеля. Кроме того, плотность коллагеновых фибрилл уменьшилась во всех экспериментальных

группах ($p < 0.001$). Исходя из вышесказанного, даже среднесрочное хранение лентикул открывает возможность использования ткани в особых ситуациях, когда требуется проведение неотложных операций на роговице. Однако, существует необходимость дальнейших исследований для изучения иммуногенности и биомеханических свойств ткани.

1.3.6. Криоконсервация аллогенного лентикулярного материала

В настоящее время только в Сингапуре в рамках системы good manufacturing practice (GMP) выполняются мероприятия от момента забора аллогенного материала с последующей его обработкой либо хранением в глазном банке и транспортировкой образца до операционной [155]. Срок доставки составляет несколько часов. Однако, в данном случае, следует учесть во внимание географическое пространство других стран, где срок доставки образцов между городами может занимать от нескольких суток до нескольких месяцев. В связи с данным фактом, огромным потенциалом обладает метод неограниченного криотермического хранения, позволяющим использовать материал по требованию.

В исследовании Mohamed-Noriega K. С соавторами (2011) впервые применили метод криоконсервации лентикулярного материала, где в качестве протектора использовался 10% FBS и 10% ДМСО [137]. Криопробирки сначала переносили в морозильную установку с температурой -80°C на ночь, затем в жидкий азот на 1 месяц. Авторы пришли к выводу, что замороженный ЛМ после 1 месяца хранения способен поддерживать жизнеспособность кератоцитов и сохранять сложную коллагеновую архитектуру. Однако следует отметить, что использование раствора FBS увеличивает риск передачи зоонозной инфекции. Тем не менее, в дальнейшем данный протокол криогенного хранения ЛМ был апробирован в других работах на экспериментальных животных [37, 154, 119, 174]. Авторы оригинальной методики фемтосекундной интрастромальной имплантации лентикулы - ФИЛИ (Femtosecondlaser Intrastromal Lenticular Implantation - FILI) использовали замороженный ЛМ в 10% среде для культивирования тканей

человека и 10% ДМСО для лечения 1 глаза с афакией и 8 глаз с гиперметропией [71]. Средний срок хранения линтикул составлял 96 дней.

Liu с соавторами (2017) в качестве логистического времени, необходимого для транспортировки, в своем исследовании выбрали краткосрочное хранение 48 часов и долгосрочное хранение 1 месяц [125]. Нативный ЛМ не показал значительных изменений в прозрачности, индукции апоптоза и фиброза клеток после 48-часового хранения в таких средах, как фосфатно-буферный солевой раствор (PBS), DMEM с добавлением 10% FBS, Optisol-GS и 100% глицерин. Образцы, которые хранились в растворе глицерина при -80°C и при комнатной температуре имели более упорядоченную структуру коллагеновых фибрилл по сравнению с образцами, которые хранились в жидком азоте. При оценке светопропускания лучшими результатами обладали образцы, которые сначала хранились в DMEM (48 часов), а затем они были перенесены в среду SFM, 2,5% хондроитинсульфат, 2,5мМ HEPES, 10% ДМСО (1 месяц). Далее при оценке светопропускания следовали образцы с глицерином, которые хранились 1 месяц при комнатной температуре. Хотя вышеприведенные результаты показали улучшение светопропускания ЛМ в данных средах в течение 1 месяца. Однако, статистический анализ данных не выявил значимых различий ($p=0,294$). Таким образом, предпочтительным является применение глицерина, который значительно снижает стоимость хранения нативных образцов по сравнению с другими средами. В свете вышеизложенного, необходимо дальнейшее подтверждение в долгосрочной перспективе, поскольку в случае аутологичной или аллогенной стромальной кератофакии перерыв с момента рефракционной операции у пациента и лечением его будущей пресбиопии может составлять 10–20 лет.

Кроме того, аллогенная трансплантация криосохраненных тканей донора повышает уровень антигенной нагрузки в организме реципиента. Следовательно, потенциально увеличивается риск иммунного отторжения трансплантата.

В 2020 г. была предложена интерактивная программа European Good Tissue and cells Practices II (EuroGTP II) разработанная при поддержке Европейской

комиссии [179]. Инструмент EuroGTP II помогает оценить и определить стратегии снижения риска для внедрения новых тканевых и клеточных технологий в клиническую практику. Для этого были оценены три типа стромальных лентикул: криоконсервированные, дегидратированные и децеллюляризированные. Фактически, инструмент EuroGTP II является продолжением реализации идеи о стандартизации процедур хранения лентикул в ГБ, предложенных в 2017 г. Lambert и Chamberlain [108].

Кроме того, высказанная в 2019 году сингапурскими учеными идея создания банка хранилищ для децеллюляризированного ЛМ представляет теоретический интерес и практическую значимость [155]. С тех пор данная идея не нашла своего воплощения, поскольку существует ряд ограничивающих факторов. К таким факторам относятся: отсутствие необходимых условий для забора ЛМ из операционной с последующим его транспортировкой в ГБ для проведения процедур децеллюляризации и криоконсервации. В большинстве ситуаций медицинские учреждения не располагают необходимыми лабораторными условиями, специально обученными данным процедурам квалифицированными кадрами, расходными материалами для децеллюляризации и криоконсервации ЛМ, а также специализированным оборудованием. Кроме того, время, которое потребуется для транспортировки ЛМ из операционной медицинского учреждения до ГБ и обратно может играть решающую роль в аспекте сохранения морфо - функциональных параметров ЛМ. В доступной литературе данных о проведении децеллюляризации ЛМ с последующей его криоконсервацией не найдено. В связи с этим актуальным является поиск оптимальных протоколов для создания банка децеллюляризированных ЛМ, прошедших криоконсервацию при минусовых температурах.

В данном случае потребность в жизнеспособных клетках донора сводится к минимуму, а сохранность каркасной структуры ВКМ, который в дальнейшем может повторно заселяться клетками хозяина, приобретает решающее значение. В связи с данным фактом перспективным является способ криоконсервации децеллюляризированного лентиккулярного материала с применением

криопротекторов, который позволит в короткие сроки создать большой пул тканей с потенциально неограниченным сроком хранения для лечения различных патологий роговицы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Дизайн исследования

Исследование было проведено в 2 этапа *in vitro* и *ex vivo*. На первом этапе проводилась разработка технологии криоконсервации децеллюляризованного ЛМ и оценка цитотоксичности данного ЛМ в присутствии кератоцитов. В рамках первого этапа в соответствии с поставленными тремя задачами проводился следующий вид работ: выбор транспортировочной среды для нативного ЛМ; выбор наиболее оптимального протокола децеллюляризации; влияние дегидратации на прозрачность децеллюляризованного лентикулярного материала (ДЛМ) перед его криоконсервацией; криоконсервация ДЛМ; стерильность криоконсервированного ДЛМ; цитотоксичность криоконсервированного ДЛМ в присутствии кератоцитов.

На втором этапе проводилось математическое обоснование основных параметров ЛМ, необходимого для коррекции гиперметропии при интрастромальной кератофакии. В рамках второго этапа в соответствии с поставленными 4 и 5 задачами проводился следующий вид работ: изучение влияния дегидратирующей среды на толщину криоконсервированного ДЛМ; изучение морфометрических изменений передней кривизны роговицы до- и после имплантации криоконсервированного ДЛМ в строму роговицы в эксперименте *ex vivo*.

Распределение ЛМ в зависимости от метода исследования в экспериментах *in vitro* и *ex vivo* представлено в Таблице 1.

Таблица 1 – Распределение ЛМ по видам работ

Вид работы	Методы исследования	Количество ЛМ
<i>In vitro</i>		
1. Выбор среды для транспортировки нативного ЛМ	Спектрофотометрия	53

Продолжение таблицы 1

Вид работы	Методы исследования	Количество ЛМ
In vitro		
2. Оптимизация протоколов децеллюляризации	Спектрофотометрия Гистологический анализ	191
3. Влияние дегидратирующей среды на прозрачность децеллюляризованного ЛМ перед криоконсервацией	Спектрофотометрия Иммуногистохимический анализ Сканирующая-электронная микроскопия ДНК-анализ	63
4. Криоконсервация ДЛМ	Спектрофотометрия Сканирующая-электронная микроскопия	155
5. Стерильность криоконсервированного ДЛМ	Санитарно-бактериологическое исследование на стерильность	5
6. Жизнеспособность и выживаемость культуры кератоцитов в присутствии криоконсервированного ДЛМ	Тест «Live and Dead» Метод «ДНК-комет» МТТ– тест	9
Ex vivo		
1. Влияние дегидратирующей среды на толщину криоконсервированного ДЛМ	Оптическая когерентная томография (ОКТ)	45

Продолжение таблицы 1

Вид работы	Методы исследования	Количество ЛМ
Ex vivo		
2. Морфометрические исследования роговиц кадаверных глаз до и после имплантации криоконсервированного ДЛМ	Оптическая когерентная томография (ОКТ) Компьютерная топография роговицы (Pentacam)	10
Всего		531

2.2. Децеллюляризация лентикулярного материала

Заготовка и перенос нативного лентикулярного материала из операционного блока до лаборатории глазного тканевого банка

Перед началом исследования у всех пациентов было получено добровольное информированное согласие в соответствии с положениями Хельсинкской декларации. ЛМ получали у пациентов после проведения рефракционной операции СМАЙЛ по поводу миопии и сложного миопического астигматизма. Возраст пациентов в среднем составлял $27,3 \pm 5,4$ лет. Значения сферического эквивалента до операции СМАЙЛ варьировали в пределах $-4,72 \pm 0,86$ дптр. Параметры ЛМ были следующими: толщина 77 – 148 мкм, диаметр 6,5 мм. Забор ЛМ проходил в операционном блоке на базе головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. Сама операция СМАЙЛ проходила под местной капельной анестезией с помощью фемтосекундного лазера VisuMax (частота следования импульсов 500 кГц, энергия в импульсе 160 нДж) сначала формировалось дно ЛМ (диаметр 6,5 мм), а затем ее «крышка» (диаметр 7,5 мм либо 7,6 мм). Сразу после извлечения, под контролем операционного микроскопа накладывался шовный материал 10-0 (Mani, Япония) на край ЛМ, при этом узел шва подтягивался в сторону передней поверхности

ткани (Рисунок 1). Далее ЛМ переносили в стерильную пробирку типа Эппендорф (GenFollower, Китай), содержащей 1 мл среды для переноса образцов. Пробирка типа Эппендорф со средой была заранее подготовлена в лаборатории глазного тканевого банка (ГТБ). Затем контейнер с образцами транспортировался в лабораторию ГТБ, располагающейся на базе Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем (ЦФПМБП) головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. Дальнейшие исследования в лаборатории проводились в стерильных условиях *in vitro*.



Рисунок 1 – Шовный материал наложен на край лентикулярного материала, узел подтянут к его передней поверхности

Для переноса ЛМ из операционной до лаборатории ГТБ использовались разные среды. Для выбора лучшей среды для транспортировки ЛМ были сформированы 4 группы (Таблица 2):

1. «Раствор для хранения роговицы» (среда Борзенка-Мороз) (ООО НЭП «Микрохирургия глаза», Москва) [19]
2. «Средство для консервации заднего послойного трансплантата донорской роговицы» которая, в сущности, является дополненным и модифицированным производным р«аствора для хранения роговицы» [20]
3. Когезивный вискоэластик (КВ), массой 2.500.000 Дальтон, содержащий 1,0% гиалуроната натрия (ALCON Laboratories Inc, США)
4. Дисперсный вискоэластик (ДВ), массой 600.000 Дальтон, содержащий 4,0% хондроитин сульфат и 3,0% гиалуронат натрия (ALCON Laboratories Inc, США)

Таблица 2 – Распределение ЛМ в зависимости от используемой среды для транспортировки нативных образцов.

Среда для переноса ЛМ	Количество используемых образцов
1. «Раствор для хранения роговицы» (среда Борзенка-Мороз)	15
2. «Средство для консервации заднего послойного трансплантата донорской роговицы»	12
3. Когезивный вискоэластик (КВ)	12
4. Дисперсный вискоэластик (ДВ)	14

Метод спектрофотометрии

Для оценки прозрачности ЛМ в разных средах для транспортировки использовали спектрофотометр Multiskan GO (Thermo Scientific, США). Светопропускные свойства нативного ЛМ измеряли в диапазоне длины волны 380–780 нм. Данные собирались с шагом 10 нм (Рисунок 2). Образцы помещали в 96-луночный планшет, начиная со второй лунки. Среду для транспортировки равномерно добавляли в каждую лунку планшета, начиная с первой в объеме 250 мкл. Далее для измерения коэффициента пропускания $K_{\text{п}}$ (%) 96-луночный планшет с образцами вставляли в камеру спектрофотометра. Для статистического анализа данных в качестве расчетного значения было использовано среднее значение для всей группы по 41 точке прозрачности полученного волнового спектра.



Рисунок 2 – Исследование прозрачности ЛМ с помощью спектрофотометра Multiskan GO (Thermo Scientific, США)

Для этого, сначала был рассчитан K_o , следующим образом:

$$K_o = \frac{K_1}{K_2} \times 100 \%,$$

где K_o – коэффициент пропускания в пределах одного образца для каждой из 41 точек спектра

K_1 – коэффициент пропускания лунки с образцом

K_2 – коэффициент пропускания лунки без образца

Далее был рассчитан K_c следующим образом:

$$K_c = \frac{\sum K_o}{N},$$

где K_c – средний коэффициент пропускания всех образцов в группе

K_o – сумма всех измерений каждого образца в группе для 41 точки спектра

N – общее количество образцов в пределах группы

В конце рассчитывали K_{Π} следующим образом:

$$K_{\Pi} = \frac{\sum K_c}{41},$$

где K_{Π} – средний коэффициент пропускания для всех точек спектра целой группы

$\sum K_c$ – суммарное значение среднего коэффициента пропускания

41 – количество точек спектра, которые получили при анализе длины волны от 380–780 нм, выполненных с шагом 10 нм.

Описание протоколов децеллюляризации лентиккулярного материала

Все манипуляции с ЛМ проводили в стерильных условиях ламинарного бокса II класса безопасности MSC-Advantage (Thermo Fisher Scientific, Германия). Децеллюляризация ЛМ, направленная на снижение антигенных свойств и разрушение клеток в ЛМ, проводилась с использованием термошейкера TS-100 (Biosan, Латвия) (Рисунок 3).



Рисунок 3 – Процесс непрерывного встряхивания образцов в термошейкере TS-100 (Biosan, Латвия)

Для оптимизации протоколов децеллюляризации ЛМ была изучена эффективность различных концентраций детергентных растворов (SDS, гипертонического раствора натрия хлорида с нуклеазами и раствора Трипсин-ЭДТА с нуклеазами и двойным отмыванием в гипотрис-буфере), ранее описанных в доступной литературе [195, 196, 163, 89].

Перед началом децеллюляризации ЛМ отмывали от среды для транспортировки трехкратно по 5 минут в PBS с уровнем pH 7,4. В данном

исследовании использовались 3 протокола децеллюляризации, которые различались между собой по времени экспозиции, концентрации веществ и действующим компонентам (Рисунок 4).

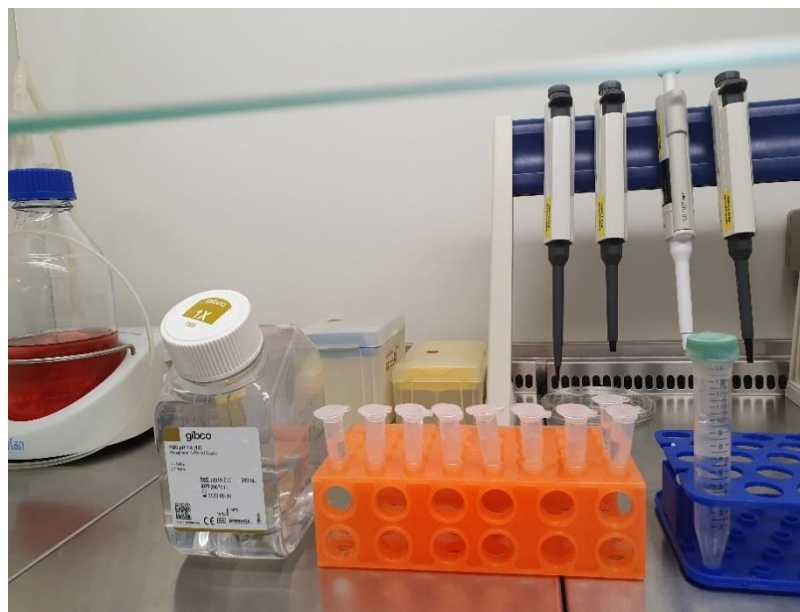


Рисунок 4– Проведение децеллюляризации образцов

Было сформировано четыре группы, где три группы были опытными (протоколы децеллюляризации), а одна являлась контрольной (нативные образцы) (Таблица 3).

Таблица 3– Описание протоколов децеллюляризации ЛМ

№	Действующие компоненты	Описание методики
1	нативные образцы (Контроль)	—
2	0,1% раствор SDS (SDS)	Сначала образцы инкубировали в 0,1% растворе SDS (Sigma-Aldrich, США) в течение 24 часов при комнатной температуре. Далее их отмывали в растворе PBS (Gibco, США) при непрерывном перемешивании в шейкере при температуре 4°C. Замена PBS проводилась каждые 24 часа.

Продолжение таблицы 3

№	Действующие компоненты	Описание методики
3	1,5 М раствор NaCl с ДНКазой 5 Ед/мл и РНКазой 5 Ед/мл (NaCl)	Инкубация образцов в течение 48 часов в 1,5 М растворе хлорида натрия. Замена раствора хлорида натрия проводилась каждые 24 часа. Далее образцы инкубировали в течение 48 часов в растворе ДНКазы 5 Ед/мл (Sigma-Aldrich, США) и РНКазы 5 Ед/мл (Sigma-Aldrich, США). В конце, образцы в течение 72 часов промывали в растворе PBS. Замена PBS проходила каждые 24 часа. Все этапы обработки проводились при непрерывном встряхивании в шейкере и при комнатной температуре
4	0,25% раствор Трипсин-ЭДТА + гипотонический трис-буфер (pH 7.2) + ДНКазы 50 Ед/мл и РНКазы 1 Ед/мл + гипотонический трис-буферный раствор (pH 7.2) (Трипсин-ЭДТА)	Инкубация образцов в течение 48 часов в 0,25% растворе Трипсин-ЭДТА (Thermo Fisher Scientific, США). Далее в течение 1 часа в гипотоническом растворе трис-буфера (при pH 7.2). Затем образцы переносили в раствор ДНКазы 50 Ед/мл (Sigma-Aldrich, США) и РНКазы 1 Ед/мл (Sigma-Aldrich, США) в течение 24 часов. В конце образцы отмывали в течение 1 часа в гипотоническом трис-буферном растворе (pH 7.2). Все этапы децеллюляризации проводились при температуре 37°C и при непрерывном встряхивании в термошейкере

Для оценки результатов протоколов децеллюляризации, а также для качественного анализа структуры ЛМ до и после обработки образцы исследовали с помощью различных методов (Таблица 4).

Таблица 4 – Распределение образцов в зависимости от метода исследования для децеллюляризированных и нативных ЛМ

Методы исследования	Количество использованного ЛМ до- и после обработки			
	Контроль	NaCl	SDS	Трипсин-ЭДТА
1. Спектрофотометрия	21	21	22	27
2. Гистология	5	5	5	5
3. Иммуногистохимия	5	5	5	5
4. Сканирующая –электронная микроскопия	5	5	5	5
5. ДНК-анализ	10	10	10	10

Спектрофотометрия для децеллюляризованного и нативного лентикулярного материала

Сбор и анализ данных спектрофотометра проводился тем же методом, которым оценивали светопропускаемость образцов, где выбирали среду для их транспортировки. С целью устранения неспецифического отека ЛМ, возникающего после децеллюляризации обычно используют глицерин. В данной работе для решения данной проблемы применялся, разрешенный к клиническому использованию в офтальмохирургии дисперсный вискоэластик (ДВ). Для спектрофотометрического анализа ЛМ предварительно дегидратировали в ДВ от 30 минут до 1 часа.

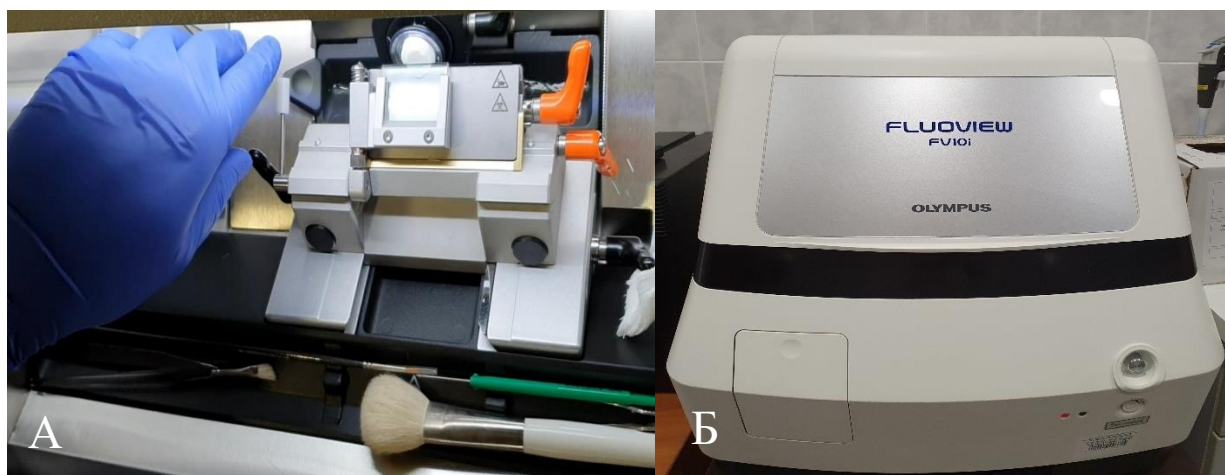
Гистологический анализ

ЛМ сначала фиксировали в растворе 10% нейтрального формалина, далее отмывали под проточной водой, проводили обезвоживание в спиртах восходящей концентрации с последующим заливанием в парафин. Затем выполняли серии гистологических срезов толщиной 2-3 мкм с использованием окрасок гематоксилином-эозином для оценки наличия либо отсутствия клеточного материала, по методу Ван-Гизон определяли общую структуру коллагена, а также

альциановым синим для оценки состояния гликозаминогликанов в тканях. Изучали препараты на инвертированном микроскопе ix81 (Olympus, Япония) при 40-кратном увеличении с последующим их фотографированием.

Иммуногистохимический анализ

Данным методом оценивали экспрессию коллагена I, III, V и VI типов, которые являются характерными для стромы роговицы, а также входят в основной состав ВКМ. Для этого нативные и децеллюляризованные образцы помещали в реактив Shandon Cryomatrix (Thermo scientific, Великобритания) и замораживали в криостате HM525 NX (Thermo scientific, Великобритания) при температуре -30°C . Далее проводили криостатные срезы образцов (толщина среза 10 мкм). Потом образцы переносили на слайды Polysine (Thermo scientific, Великобритания) из расчета четыре среза на один слайд (Рисунок 5).



А – выполнение криостатных срезов для конфокальной микроскопии

Б – лазерный сканирующий конфокальный микроскоп «Fluo View FV10i»
(Olympus, Япония)

Рисунок 5 – Подготовка образцов для конфокального микрофотографирования

В данном исследовании применяли следующие первичные антитела: коллаген I типа (Rabbit 1:200, ab34710, Abcam, Великобритания), коллаген III типа (Mouse 1:100, ab6310, Abcam, Великобритания); коллаген V типа (Rabbit 1:100, ab114072, Abcam, Великобритания); коллаген VI типа (Rabbit 1:200, ab6588, Abcam,

Великобритания). С целью идентификации вышеперечисленных маркеров применяли вторичные антитела Alexa Fluor 488 (1:250, ab150077, Goat Anti-Rabbit IgG, Abcam, Великобритания) и Alexa Fluor 594 (1:250, ab150116, Goat Anti-Mouse IgG, Abcam, Великобритания) с последующим их отмыванием. Помимо этого, для оценки окрашивания ядер применяли краситель Hoechst (O150, ПанЭко, Россия) (Таблица 5). Результаты оценивали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа «Fluo View FV10i» (Olympus, Япония) x 100.

Таблица 5 – Протокол окраски ЛМ для иммуногистохимического анализа

№	Манипуляция	Температура	Время
1	Отмывание в PBS (на MQводе)	комнатная температура	3 раза по 5 минут
2	5% Бычий сывороточный альбумин (BSA)	комнатная температура	10 минут
3	0,2% Tween-20 в PBS (на MQводе)	комнатная температура	4 раза по 5 минут
4	0.2% TritonX-100 в PBS (на MQводе)	комнатная температура	10 минут
5	Инкубация с первичными антителами	+4°C	16-18 часов
6	0.2% TritonX-100 в PBS (на MQводе)	комнатная температура	4 раза по 5 минут
7	Инкубация с вторичными антителами	+4°C, в темноте	1 час
8	0.2% TritonX-100 в PBS (на MQводе)	+4°C, в темноте	4 раза по 5 минут
9	Инкубация с ядерным красителем	+4°C, в темноте	2-5 минут
10	0.2% TritonX-100 в PBS (на MQводе)	+4°C, в темноте	4 раза по 5 минут

Продолжение таблицы 5

№	Манипуляция	Температура	Время
11	Монтирование	+4 °С, в темноте	–

Метод сканирующей электронной микроскопии

Образцы сначала обезвоживали в растворе ацетона по восходящей концентрации 10%; 30%; 50%; 70%; 90%; 100%, трехкратно по 10 минут в каждом. Затем образцы подвергались критической сушке с применением осушителя (Critical Point Dryer Qurum k850, Quorum Technologies, Великобритания). Далее образцы напыляли золотом (толщина слоя 5нм, проба 999) с помощью специальной напылительной установки (Smart Coater SPI, SPI Supplies, США). Данные анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа – 6000plus (Jeol, Япония) (Рисунок 6). Анализ образцов проводился в десяти случайно выбранных точках центральной 3 мм зоны и осуществлялся в режиме высокого вакуума x1000 (мощность 10kV).



Рисунок 6 – Сканирующий электронный микроскоп– 6000plus (Jeol, Япония)

ДНК-анализ

Содержание ДНК в ткани является одним из достоверных способов оценки эффективности протоколов децеллюляризации тканей [54]. ДНК выделяли из

образцов с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя (Рисунок 7). Подсчет содержания ДНК в полученных растворах осуществлялся с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США) и набора для анализа Qubit dsDNAHS High-Sensitivity Assay Kit (Invitrogen, США). Процедура измерения проводилась согласно инструкции компании-производителя.

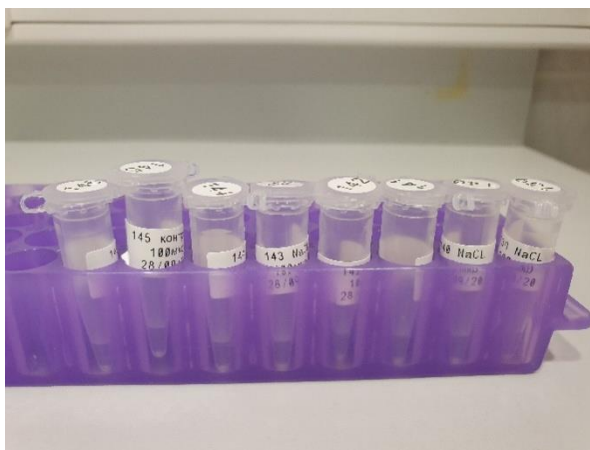
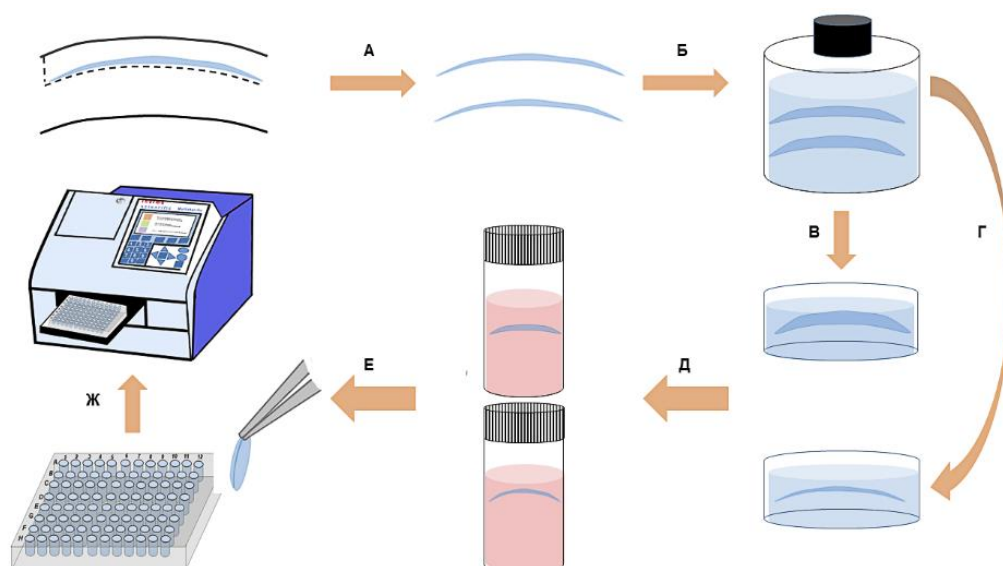


Рисунок 7– Подготовленные образцы для флуориметрии с выделенной ДНК

2.3. Криоконсервация децеллюляризованного лентиккулярного материала

Спектрофотометрия для дегидратированного децеллюляризованного лентиккулярного материала перед его криоконсервацией

На данном этапе исследований изучали влияние предварительной дегидратации ЛМ на сохранение прозрачности перед криозамораживанием (Рисунок 8). В качестве криопротектора использовался ДМСО (PanReas AppliChem, Германия) [71, 125]. Дегидратация осуществлялась с помощью ДВ. Для децеллюляризации, использовали протокол с 1,5М NaCl с ДНКазой 5 Ед/мл и РНКазой 5 Ед/мл как наиболее эффективный в отношении удаления клеточных компонентов и сохранении прозрачности ЛМ [163, 196]. Прозрачные свойства исследовали с помощью метода спектрофотометрии, описанным в главе 2.2.



А – транспортировка ЛМ из операционного блока в лабораторию

Б – выполнение протокола децеллюляризации

В – децеллюляризованный ЛМ (ДЛМ) без добавления ДВ

Г – ДЛМ с добавлением ДВ

Д – хранение ДЛМ в растворе ДМСО

Е – перенос ДЛМ после криоконсервации в 96–луночный планшет

Ж – анализ прозрачности образцов на спектрофотометре

Рисунок 8– Схема этапов работы с лентикулярным материалом

Было сформировано три группы. Две группы были опытные (децеллюляризованные образцы без дегидратации и с предварительной их дегидратацией перед криоконсервацией), а одна являлась контрольной (нативные ЛМ) (Таблица 6). В группе с предварительной дегидратацией образцы помещали в ДВ от 30 минут до 1 часа. Данные спектрофотометра собирались и анализировались в соответствии с представленной формулой в главе 2.2.

Таблица 6 – Распределение образцов для спектрофотометрического исследования

Метод исследования	Контроль	ДЛМ без добавления ДВ перед хранением	ДЛМ с добавлением ДВ перед хранением
Спектрофотометрия	25	19	19

2.3.1. Протокол криоконсервации децеллюляризованного лентикулярного материала с использованием ДМСО

Данный протокол выполнялся в стерильных условиях ламинарного бокса II класса безопасности. Образцы опытных групп сначала отмывали трехкратно в PBS по 5 минут с последующим их переносом в криопробирки (Corning, США), содержащие 1 мл 90% «Раствора для хранения роговицы» (ООО НЭП «Микрохирургия глаза», Москва) и 10% ДМСО (PanReac AppliChem, Германия). Далее криопробирки помещали в контейнер для криоконсервации Cool Cell LX (Biocision, США) и в низкотемпературный холодильник (-80 °C) на ночь. Снижение температуры осуществлялось постепенно со скоростью 1°C в минуту. На следующий день контейнер переносили в Сосуд Дьюара (Cryo Diffusion, Франция) с жидким азотом с температурой -196°C. Затем через 2 дня образцы сначала размораживали на водяной бане при +37 °C в течение 5 мин. В день эксперимента проводили трехкратный цикл отмывания образцов: сначала трехкратно по 5 минут отмывали в растворе PBS; далее отмывали в PBS при постоянном встряхивании в термошейкере при комнатной температуре в течение 12-15 часов; на следующий день трижды отмывали в PBS по 5 минут.

Спектрофотометрия и сканирующая электронная микроскопия для разных протоколов криоконсервации децеллюляризованного лентикулярного материала

Для оценки прозрачности и толщины фибрилл коллагеновых волокон криоконсервированных ДЛМ использовали спектрофотометрический метод и метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). В качестве детергентов применяли протокол с 1,5М NaCl + ДНКаза 5 Ед/мл РНКаза 5 Ед/мл (NaCl) и 0,1% раствор SDS (SDS) [163, 196]. Данные протоколы децеллюляризации были описаны в главе 2.2. Для криоконсервации образцов использовали следующие среды: Криодерм на основе глицерина (ПанЭко, Россия) (Криодерм), раствор ДМСО (PanReac AppliChem, Германия), 100% раствор глицерина (PanReac AppliChem, Германия). Перед криоконсервацией не проводили предварительную

дегидратацию децеллюляризованных ЛМ. Для выбора лучшего протокола криоконсервации были сформированы 6 опытных групп согласно используемому детергентному веществу и криопротектору, и 1 контрольная с нативными образцами (Таблица 7).

Таблица 7 – Распределение образцов в зависимости от детергента и криопротектора

№ группы	Действующий детергент и криопротектор	Спектрофотометрия	СЭМ
		Количество образцов	Количество образцов
1	Контроль	25	3
2	NaCl–DMCO	18	3
3	SDS–DMCO	16	3
4	NaCl–Криодерм	17	3
5	SDS–Криодерм	18	3
6	NaCl–глицерин	19	3
7	SDS–глицерин	21	3

Для устранения отека образцов, возникающего после криоконсервации ДЛМ, использовался ДВ. Для оценки светопропускания ЛМ предварительно дегидратировали в ДВ от 30 минут до 1 часа. Спектрофотометрическое исследование проводилось согласно протоколу, представленному в главе 2.2.

Состояние фибриллы коллагенового волокна проводилась в соответствии с протоколом, описанным в главе 2.2. Анализ данных проводился в пяти случайно выбранных точках центральной зоны (3 мм) образца.

2.3.2. Описание протоколов криоконсервации децеллюляризованного лентикулярного материала

На данном этапе проводился подбор оптимальных криопротекторов, позволяющих сохранить высокие показатели прозрачности и структурную организацию коллагенового каркаса ЛМ.

Протокол криоконсервации децеллюляризованного лентикулярного материала (NaCl и SDS) с использованием ДМСО

Описание протокола хранения образцов в ДМСО для протоколов децеллюляризации NaCl и SDS был аналогичен, протоколу, где изучали влияние предварительной дегидратации ЛМ на сохранение прозрачности перед криозамораживанием, описанным в главе 2.3.1.

Протокол криоконсервации децеллюляризованного лентикулярного материала (NaCl и SDS) с использованием среды Криодерм

Криодерм на основе глицерина (ПанЭко, Россия) является отечественной разработкой. Как заявляет компания–производитель данной среды, ее можно использовать для криоконсервации клеток и тканей в хирургии и офтальмологии при создании запасов трансплантатов роговицы и кожи [210]. Хотя производитель рекомендует хранить клетки при температуре $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. В данном исследовании мы использовали более глубокую температуру заморозки для длительного хранения образцов. Последовательность выполнения процедуры хранения образцов в среде Криодерм не отличалась от протокола криоконсервации в ДМСО. Протокол хранения образцов в ДМСО был описан в главе 2.3.1.

Протокол криоконсервации децеллюляризованного лентикулярного материала (NaCl и SDS) с использованием глицерина

После трехкратного отмывания ДЛМ в PBS образцы переносили в криопробирки (Corning, США), содержащие 1 мл 100% раствора глицерина (PanReas AppliChem, Германия). Затем криопробирки помещали в контейнер для криоконсервации Cool Cell LX (Biocision, США) и помещали в низкотемпературный холодильник при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ на трое суток. Далее образцы изымали из холодильника и размораживали на водяной бане ($+37\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 5 минут. В конце их трижды отмывали в растворе PBS по 5 минут (Рисунок 9).

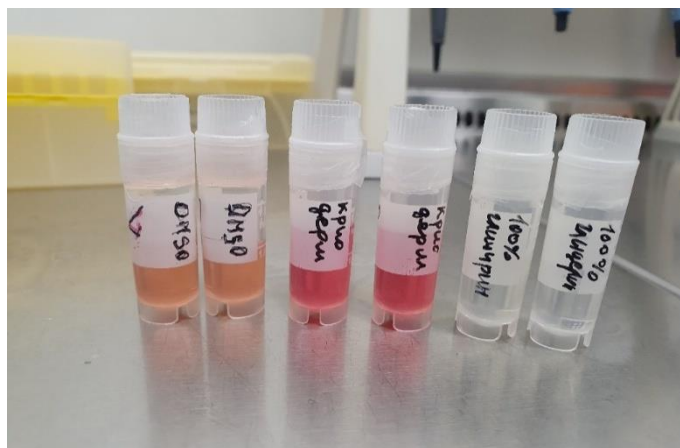


Рисунок 9– Образцы, подготовленные для криоконсервации

Подтверждение стерильности криоконсервированного лентикулярного материала после децеллюляризации

Поскольку все предшествующие этапы работы с ЛМ проводились в условиях стерильности, поэтому для ее подтверждения проводили анализ стерильности образцов с помощью санитарно-бактериологического исследования. Для данного исследования были выбраны пять случайно выбранных образцов, которые хранились в сосуде Дьюара при температуре -196°C (срок хранения 14-21 суток). Контроль предоставленного материала проводился на базе головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России в соответствии с изменениями №3 к статье Государственной фармакопеи XI издания «Методы микробиологического контроля лекарственных средств» (ГФ XI, вып.2, с.187) под руководством Табунова В.С. Посев проводился на жидкую тиогликолевую среду (инкубация при температуре $20-22^{\circ}\text{C}$) и жидкую среду Сабуро (инкубация при температуре $36,5^{\circ}\text{C}$) для определения микробной обсемененности, а также для выявления плесневых и дрожжевых грибов. Учет контроля стерильности проводился в течение 14 суток.

2.4. Цитотоксичность криоконсервированного лентикулярного материала после децеллюляризации в присутствии кератоцитов

Выделение кератоцитов человека и их культивирование

Для получения первичной культуры клеток кератоцитов использовали строму РСД без переднего эпителия и десцеметовой мембраны. РСД как источник клеточного материала для экспериментальной работы был предоставлен ГТБ головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России (заведующая, к.м.н., М. Х. Хубецова) с соблюдением всех действующих протоколов в рамках законодательства РФ. Возраст донора составлял 58 лет, время от момента смерти составляло 16 часов, показатели трансплантатбельности кадаверного материала по Борзенку С.А. – 3 А и В [4].

Для выделения первичной культуры клеток кератоцитов использовали кусочки стромы РСД, полученные путем ее разделения гистологическим лезвием на 8 равных частей. Затем проводили ферментативную дезагрегацию кусочков стромы роговицы. Для этого фрагменты переносили в пробирку типа Эппендорф и добавляли 1 мл DMEM/F12 и коллагеназы II типа в концентрации 10 мг/мл. Далее пробирку типа Эппендорф помещали в центрифугу SL-40 R (Thermo Scientific, Германия), с использованием следующих параметров: 1800 об/мин при температуре + 37 °С в течение 20 мин. Полученные фрагменты переносили в чашки Петри (35 мм) и заливали питательной средой, состоящей из 89% DMEM/F12 (Sigma Aldrich, Канада), 10% Эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США) (FBS), 1% смеси антибиотиков (MP Biomedicals, США) и 0,1 ммоль/л Аскорбиновой кислоты (ПанЭко, Россия).

Культивирование клеток стромы роговицы проводили в стандартных условиях (при температуре +37°С, 5% CO₂, влажность 95%) в инкубаторе NU-5510 (Nu-Aire, США). При достижении 80% уровня конfluenceности клетки пассировали. Полную смену питательной среды проводили раз в три дня. Визуальный контроль роста клеток осуществлялся с помощью инвертированного светового фазово-контрастного микроскопа Olympus IX-81. Для получения необходимого количества клеток (2 млн.) культуру пассировали в чашках Петри (100 мм) до получения культуры клеток 3-4-го пассажа по стандартной схеме [26].

Для экспериментальной работы культуру клеток извлекали из чашки Петри. Для этого в ней заменяли питательную среду на 0,25% раствор Трипсина - ЭДТА и раствор Версена (в соотношении 1:1) и инкубировали в стандартных нормотермических условиях в течение 5 минут; полученную суспензию клеток переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали в режиме 1800 об/мин при температуре +37°C (5 мин), супернатант удаляли аспиратором. Осадок разбавляли в 1 мл питательной среды с FBS и переносили в 15 мл пробирку (Corning, США). Подсчет клеток в суспензии проводили с помощью автоматического счетчика клеток Luna II (Logos biosystems, Корея), после чего данную суспензию разбавляли питательной средой чтобы получить необходимую концентрацию клеток (20 тыс. клеток в 1 мл питательной среды).

Тест «Live and Dead»

Оценку жизнеспособности полученной культуры клеток в присутствии ДЛМ после криоконсервации проводили с помощью проточного цитофлуориметра. Для этого образцы окрашивали флуоресцентным красителем «Live and Dead» (Abcam, Великобритания). Тест «Live and Dead» является коммерческим набором, состоящим из двух флуоресцентных красителей: живые клетки – зеленый цвет (Ex.494; Em.515), мертвые клетки – красный цвет (Ex.528; Em.617).

В рамках данного исследования на этапе пассирования отбирали пробу с плотностью клеток $1 \times 10^5 / \text{см}^2$. В исследовании было использовано 3 образца, которые переносили по одному на дно каждой лунки 24-луночного планшета (Costar, США). Затем сверху добавляли питательную среду, содержащую суспензию клеток плотностью $1 \times 10^5 / \text{см}^2$ и инкубировали 3 суток при температуре +37°C. Для контроля роста клеточной культуры в 3 пустые лунки планшета вносили суспензию клеток с питательной средой ($1 \times 10^5 / \text{см}^2$). Инкубация проходила в течение 3 суток (t +37°C).

Через 3 суток из планшета аспиратором отбирали питательную среду с клетками, добавляли в лунку с ЛМ 0,25% раствор Трипсин-Версена (1:1). Далее проводили инкубацию при температуре +37°C (5 мин). После того, как при

визуальном подтверждении убеждались, что клетки отошли от пластика планшета, их забирали пипеткой и переносили в 15 мл пробирку и центрифугировали в режиме 1200 об/мин при температуре +37°C (5 мин). Надосадочную жидкость удаляли аспиратором, в полученный осадок добавляли 1 мл питательной среды. Из пробирки удалялся ЛМ.

Далее пробирку со смесью центрифугировали (1100 обор/мин в течение 5 мин), надосадочную жидкость удаляли и добавляли раствор Cell Wash (BD, США) в объеме 1 мл. Затем их повторно центрифугировали (1100 обор/мин, в течение 5 мин) и полученный осадок разбавляли в 100 мкл раствора PBS с 1% раствором «Live and Dead». Инкубация проходила в темноте при комнатной температуре в течение 10 минут. Анализ осуществлялся с помощью проточного цитофлуориметра Cyto Flex (Beckman Coulter, США) (Рисунок 10).

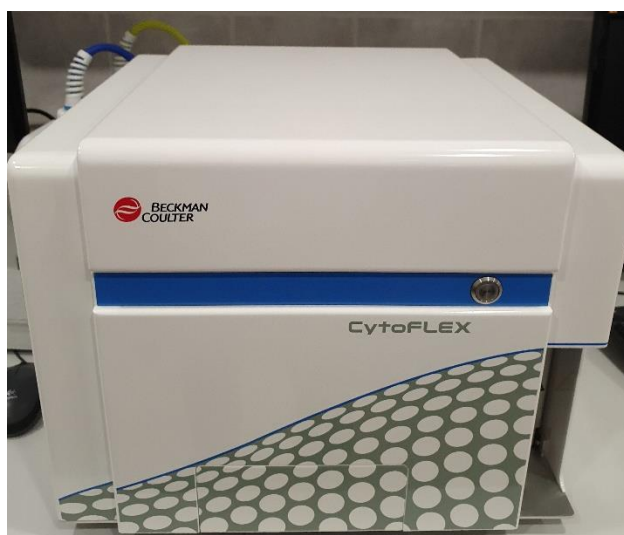


Рисунок 10 – Проточный цитофлуориметр Cyto Flex (Beckman Coulter, США)

Метод «ДНК-комет»

Метод «ДНК-комет» позволяет определить повреждение ДНК вследствие возможного токсического воздействия ДЛМ после криохранения на клетки стромы. В основе метода лежит регистрация разной подвижности поврежденной ДНК индивидуальных лизированных клеток в агарозном геле при постоянном действии электрического поля. При этом происходит миграция ДНК к аноду, с

последующим образованием электрофоретического следа, который визуально напоминает «хвост кометы». Ее параметры зависят от степени повреждения ДНК.

Подготовительный этап включал в себя подготовку 24-луночного планшета, в 3 лунки которого вносили суспензию клеточной культуры с питательной средой, предварительно облученной ультрафиолетом (10 минут) – Контроль UV. Данный показатель демонстрирует уровень максимально возможной гибели кератоцитов.

Далее помещали 3 образца, по одному в каждую лунку и питательную среду с культурой кератоцитов плотностью $1 \times 10^5 / \text{см}^2$. В другие 3 лунки вносили только суспензию с клеточной культурой и питательной средой. Планшет с образцами инкубировали 3 суток при температуре $+37^\circ\text{C}$. Затем через 3 суток питательную среду с клетками убирали и добавляли в каждую лунку планшета 0,25% раствор Трипсина-Версена (1:1). Далее проводили инкубацию в течение 5 минут при температуре $+37^\circ\text{C}$. Затем полученную суспензию с образцами переносили в 15 мл пробирку и центрифугировали (1200 обор/мин, 5 мин, $t +37^\circ\text{C}$), надосадочную жидкость убирали, а полученный осадок разбавляли в 1 мл питательной среды. ЛМ убирали из планшета. Пробирку со суспензией переносили на предметные стекла, покрытые слоем агарозы и охлаждали при температуре $+4^\circ\text{C}$ в течение 10 минут. Затем образцы переносили в лизирующий раствор (2,5 М NaCl, 10мМ Трис, 100мМ ЭДТА). Инкубацию проводили в течение 1 часа при температуре $+4^\circ\text{C}$. Таким образом, полученные препараты помещали в щелочной раствор ($\text{pH} > 13$) с последующим проведением электрофореза (1В на 1 см, 20 мин), для нейтрализации использовали раствор PBS ($\text{pH} = 7.4$). Окрашивание препаратов проводили с помощью раствора этидиума бромида в дистиллированной воде, в темных условиях с экспозицией 2 часа при температуре $+4^\circ\text{C}$.

Препараты анализировали с помощью лазерно-сканирующего конфокального микроскопа Olympus FV 10i (Olympus, Япония). Для анализа полученных изображений использовали встроенное программное обеспечение микроскопа.

Изображения ДНК- комет разделили на 5 условных типов. Данное разделение требуется, чтобы получить количественные данные. Индекс ДНК – комет рассчитывали с помощью математической формулы:

$$I_{dc} = \frac{(0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4)}{\Sigma}$$

где I_{dc} – индекс ДНК-комет

n_0 до n_4 – количество ДНК-комет каждого типа

Σ -общая сумма ДНК-комет

МТТ– тест

МТТ тест– колориметрический анализ выживаемости клеток, позволяющий в данных условиях культивирования клеток проводить оценку их метаболической активности. Метод основан на способности митохондриальных дегидрогеназ живых клеток превращать водорастворимый желтый 3-(4,5-диметилтиазолин-2)-2,5дифенилтетразолий (МТТ) бромид в фиолетовые нерастворимые в воде кристаллы формазана. Далее органические растворители (изопропанол или диметилсульфоксид) переводят фиолетовые кристаллы формазана в растворенное состояние и по интенсивности окрашивания и оптической плотности раствора судят о количестве жизнеспособных клеток, которые определяются с помощью метода спектрофотометрии.

В начале исследования 3 образца с помощью гистологического лезвия измельчали (размер фрагментов ЛМ около 1 мм). Затем полученные измельченные фрагменты образцов в равном объеме переносили на дно 3 лунок 24-луночного планшета. Далее сверху добавляли питательную среду, содержащую культуру клеток кератоцитов плотностью 20.000 клеток на лунку – опыт. В отдельные 3 лунки планшета была добавлена питательная среда с культурой клеток кератоцитов (плотность = 20.000 клеток на лунку) – контроль. Далее планшет инкубировали в течение 1 суток при температуре +37°C. Затем измеряли оптическую плотность контроля и опыта с помощью спектрофотометра Multiskan GO (Thermo Scientific,

США) при длинах волн 570 нм и 620 нм. Данные спектрофотометра рассчитывались по следующей формуле:

$$E = A_{570} - A_{620},$$

где E – оптическая плотность

A₅₇₀ – значение при длине волны 570 нм

A₆₂₀ – значение при длине волны 620 нм

Количество жизнеспособных клеток ($N_{ж}$) рассчитывается следующим образом:

$$N_{ж} = E_{\text{опыта}} / E_{\text{контроля}}$$

Через 1 сутки планшет доставали из инкубатора и помещали в Ламинарный бокс II класса безопасности. С помощью дозатора убирали полученную смесь из планшета. Смесь промывали в растворе PBS (pH 7,4). В каждую лунку планшета добавляли 300 мкл МТТ-бромид с концентрацией 0,25 мг/мл в FBS. Планшет с экспериментальной смесью и красителем помещали в инкубатор NU-5510 (Nu-Aire, США) на 30 минут, после этого среду с МТТ-бромидом убирали, в каждую лунку с экспериментальной смесью добавляли изопропанол-2. После инкубации смеси с изопропанолом-2 в течение 10 минут проводилось измерение оптической плотности спектрофотометром в соответствии с вышеприведенной формулой. Анализ данных проводился на 1, 3, 5, 7 и 9 сутки.

2.5. Подготовка и применение криоконсервированного лентиккулярного материала для интрастромальной кератофакии

Дегидратирующие возможности разных вискоэластиков на толщину криоконсервированного лентиккулярного материала

Известно, что процессы децеллюляризации и криоконсервации ЛМ вызывают неспецифический отек ткани. В связи с данным фактом актуальным является поиск дегидратирующей среды, способной вернуть исходную толщину ЛМ. В данной работе для дегидратации были использованы две среды:

1. Дисперсный вискоэластик (ДВ), массой 600.000 Дальтон, в состав которого входит и 3,0% гиалуронат натрия и 4,0% хондроитин сульфат
2. Когезивный вискоэластик (КВ), массой 2.500.000 Дальтон, содержащего 1,0% гиалуронат натрия

Образцы помещали в отдельные пробирки типа Эппендорф, содержащие 1 мл ДВ и 1 мл КВ. Данные параметров толщины образцов были получены с помощью метода оптической когерентной томографии iVue 100 (Optovue, США). Данные из прибора оптической когерентной томографии (ОКТ) собирались 1 раз после криоконсервации децеллюляризованного ЛМ и 6 раз (каждые 10 минут в течение 1 часа) после добавления вискоэластиков к образцам. (Таблица 8). В качестве исходной толщины ЛМ служили данные, полученные из лазера при проведении операции СМАЙЛ.

Таблица 8– Распределение ЛМ в зависимости от среды для дегидратации

	Среда для дегидратации	
	дисперсный вискоэластик (ДВ)	когезивный вискоэластик (КВ)
Количество образцов	22	23

Образцы сначала помещали и центрировали на жесткой газопроницаемой контактной линзе (ЖГЛ), с последующей фиксацией ЖГЛ к искусственной передней камере глаза (ИПК). Затем ИПК оставляли на горизонтальной поверхности стола. Линзу прибора ОКТ устанавливали перпендикулярно поверхности ЛМ (Рисунок 11). Возможность такого расположения головной части прибора ОКТ позволило без затруднений проводить пахиметрию образцов. Регистрировались значения толщины ЛМ в центре (место наибольшей толщины образца). Исследование проводилось с помощью программы Cross-Line Raster.



Рисунок 11 – Расположение головной части прибора ОКТ над ИПК

Дизайн экспериментального исследования *ex vivo* имеет следующий вид:

1. Отбор кадаверных глаз
2. Имплантация ЛМ в строму роговицы кадаверных глаз

Отбор кадаверных глаз

Характеристика донорского материала

Для экспериментальных исследований в данной работе использовался донорский материал – кадаверные глаза (n=10).

При заборе и заготовке кадаверных глаз человека для целей трансплантации и научных исследований, руководствовались специальным разрешением и официально принятыми процедурами в рамках законодательства РФ, на основании лицензии Федеральной государственной службы по надзору за Здравоохранением от 30.04.2008 № 99-01-005317 и от 18.02.2013 № ФС-99-01-008251 ГТБ ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургии глаза» им. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Согласно установленному режиму работы кадаверные глазные яблоки поступают в ГТБ головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургии глаза» им. С.Н. Федорова» Минздрава России из танатологических отделений Бюро судебно – медицинской экспертизы согласно действующему договору. Данные о

возрасте, поле доноров и времени их смерти были предоставлены ответственным сотрудником Бюро судебно - медицинской экспертизы.

Перед введением кадаверного глаза в эксперимент проводилась серологическая диагностика трупов-доноров на инфицированность вирусами ВИЧ I/II, гепатитов В и С, RW, в условиях микробиологической лаборатории головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургии глаза» им. С.Н. Федорова» Минздрава России по образцам венозной крови, поставляемым вместе с тканями глазных яблок от доноров–трупов. После прохождения проверки на инфекционную безопасность, сотрудником ГТБ проводилась оценка морфологического показателя трансплантабельности по Борзенку С.А. [4].

Для выполнения экспериментального исследования кадаверные глаза отбирали по следующим критериям: средний возраст доноров до 58 лет, время от момента смерти до имплантации ЛМ не более 16 часов, показатели адреналиновой пробы – С, морфологический показатель 3 по классификации Борзенка С.А. [4]. Предварительно в условиях операционного бокса под ламинаром (Ламинарный бокс I класса безопасности Frontron L-F (Pokrok výrobné družstvo Žilina (Чехословакия)) проводили удаление отечного переднего эпителия с помощью роговичного скребца-скарификатора с соблюдением всех норм стерильности. Далее дезэпителизованный кадаверный глаз помещали в стерильный флакон, содержащий 30 мл «Раствора для хранения роговицы» (среда Борзенка-Мороз) (ООО НЭП «Микрохирургия глаза», Москва) и переносили в контейнере в отдел лазерной рефракционной хирургии и операционный блок головной организации головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургии глаза» им. С.Н. Федорова» Минздрава России, где проводились морфометрические исследования роговицы кадаверного глаза до- и после имплантации ЛМ в ее строму. Вместе с кадаверными глазами транспортировались также заранее подготовленные пробирки типа Эппендорф, содержащие ЛМ в 1 мл раствора PBS и пробирки, содержащие 1 мл ДВ без ЛМ.

Имплантация лентикулярного материала в строму роговицы кадаверных глаз

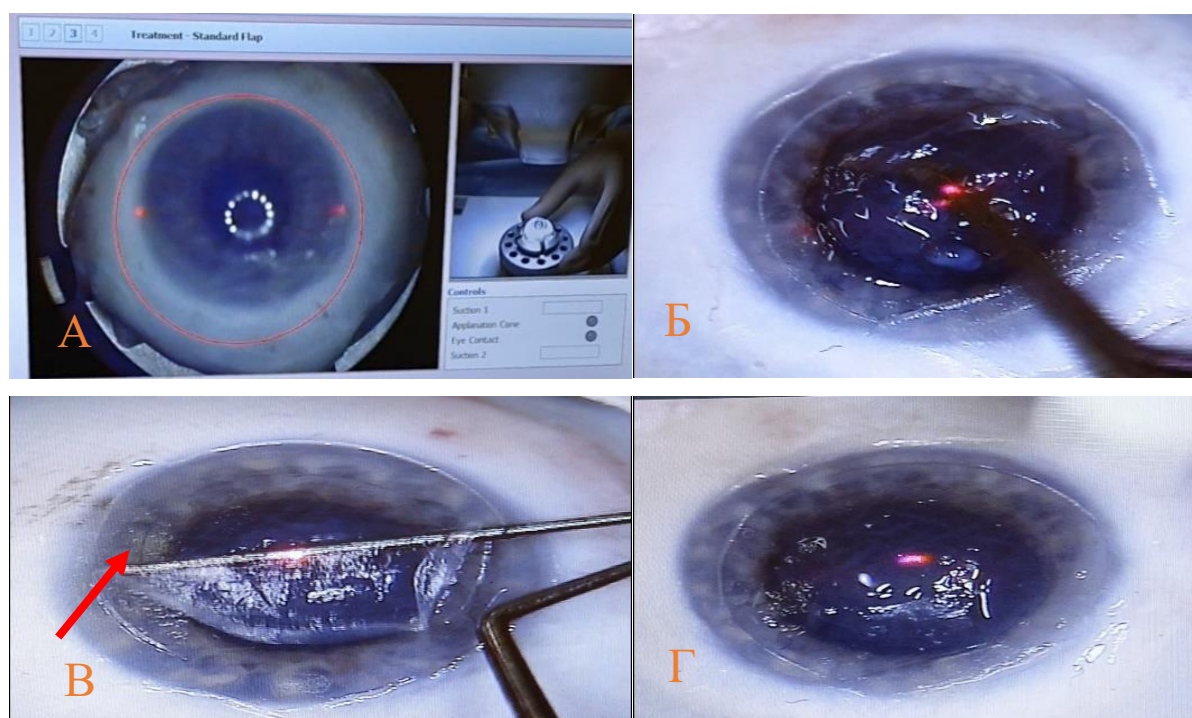
В условиях операционного блока зафиксированный в держателе глаз устанавливали в проекции головки лазера (Рисунок 12). Предварительно подготовленный ЛМ в 1 мл PBS переносили в пробирку типа Эппендорф с ДВ за 30 минут до начала процедуры формирования клапана.



Рисунок 12– Головка фемтосекундного лазера FS200 WaveLight (Alcon, США) над кадаверным глазом

С помощью фемтосекундного лазера FS200 WaveLight (Alcon, США) для формирования клапана были выбраны следующие параметры: энергия излучения 0,8 мкДж, частота повторения 200 кГц, длительность импульса 350 фемтосекунд, ширина канала 1,5 мм, угол бокового разреза 90°, диаметр клапана 9,0 мм, толщина клапана 130 мкм (Рисунок 13). После завершения процедуры клапан откидывали. ЛМ извлекали из пробирки с ДВ, помещали на ватный тупфер и под визуальным контролем микроскопа расправляли его на тупфере передней поверхностью вверх. Ориентиром передней поверхности образца был узел шовного материала, расположенный на его периферии. После расправления ЛМ данный шовный узел отсекали микроножницами. Далее его переносили на стромальное ложе роговицы, сохраняя при этом ориентацию лентикулы передней поверхностью вверх и центрировали ее относительно зрачка. Клапан возвращали на исходное место. В

конце процедуры с помощью ватного тупфера производили разглаживание поверхности роговицы кадаверного глаза.



А – формирование фемто-клапана

Б – расправление ЛМ в стромальном ложе роговицы

В – возвращение клапана в исходное положение (стрелкой указан край образца)

Г – образец после имплантации в строму роговицы

Рисунок 13– Этапы имплантации ЛМ под роговичный клапан

Морфометрические особенности изменения роговицы до- и после имплантации лентикулярного материала в строму роговицы

Морфометрические исследования проводились до- и после имплантации ЛМ в строму роговицы с помощью следующих методов: оптическая когерентная томография (ОКТ), компьютерная топография роговицы (Pentacam). Для экспериментального исследования *ex vivo* было использовано 10 кадаверных глаз и 10 образцов лентикулярного материала. ЛМ (n=10) был получен при коррекции миопии среднее значение которого составляло $-4,6 \pm 0,96$ дптр.

Лентикулярный материал извлекали из сосуда Дьюара, где они хранились в жидком азоте при температуре -196°C . Далее после их размораживания на водяной бане при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ проводили цикл отмывания, описанный в главе 2.3.1.

Срок от момента хранения образцов до их использования составлял от 7 до 21 суток. В день эксперимента образцы, помещенные в пробирку типа Эппендорф с раствором 1мл PBS вместе с кадаверными глазами, были помещены в контейнер с дальнейшей их транспортировкой в отдел лазерной рефракционной хирургии и операционный блок головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургии глаза» им. С.Н. Федорова» Минздрава России. Помимо этого, в день эксперимента заранее были подготовлены пробирки с 1 мл ДВ. Для эксперимента использовались образцы (n=10), полученные при сферической коррекции миопии после операции СМАЙЛ.

Измерение параметров толщины ЛМ и роговицы кадаверных глаз осуществлялось в области центральной оси с помощью оптического когерентного томографа RTVue 100 (Optovue, США).

Компьютерную кератотопографию осуществляли с использованием анализатора переднего сегмента глаза Pentacam (Occlusus, Германия). С помощью кератотопографических карт (4 Maps Refractive) проводили анализ сагиттальной кривизны (передней поверхности) роговицы кадаверного глаза значений K_m в пределах 7-миллиметровой зоны (дптр).

На этапах до- и после имплантации ЛМ в роговицу кадаверного глаза добивались достижения состояния клинической нормотензии с помощью вращения винта на держателе (Экспериментально-техническое производство «Микрохирургия глаза», Россия), в котором был зафиксирован трупный глаз (тонометрия по Маклакову около 15 мм.рт.ст.).

2.6. Статистические методы

Статистическую обработку проводили с помощью среды для статистических вычислений R версии 4.0.2. (R Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия). Визуализацию данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, Inc., США). Использовали среднее со стандартным отклонением ($M \pm SD$) и медиану с межквартильным размахом (Me (1-3 квартили)).

Нормальность распределения переменных оценивалась с использованием теста Шапиро-Уилка. Гомогенность дисперсий оценивалась с помощью теста Бартлетта.

Для множественных выборок с нормальным распределением и гомогенной дисперсией использовали дисперсионный анализ с апостериорными сравнениями методом Тьюки. Для нормально распределенных данных с гетерогенной дисперсией использовали критерий Уэлча. Зависимые выборки оценивали парным t-критерием. Для ненормально распределенных выборок с гетерогенными дисперсиями использовали непараметрические методы: тест Краскелла-Уоллиса с post-hoc анализом попарных сравнений с помощью теста Данна. Во всех случаях множественных сравнений была использована поправка Холма

Для принятия достоверных различий был принят критический уровень значимости $p < 0,05$.

2.7. Список используемого лабораторного оборудования и расходных материалов в экспериментах *in vitro* и *ex vivo*

В таблице 9 представлен перечень используемого в работе лабораторного оборудования. В нижеприведенных таблицах 10 и 11 представлены используемые среды и реактивы, а также расходные материалы.

Таблица 9– Лабораторное оборудование

Оборудование	Производитель
Ламинарный бокс I класса безопасности Frontron L-F	Pokrok výrobné družstvo Žilina, Чехословакия
Ламинарный бокс II класса безопасности MSC- Advantage	Thermo Fisher Scientific, Германия
Центрифуга SL-40 R	
Инвертированный световой фазово-контрастный микроскоп IX81 с интегрированной цифровой фотокамерой XC10	Olympus, Япония

Продолжение таблицы 9

Оборудование	Производитель
Лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Fluo View FV10i	Olympus, Япония
Спектрофотометр Multiskan GO	Thermo Scientific, США
Криостат HM525 NX	Thermo scientific, Великобритания
Термошейкер TS-100	Biosan, Латвия
Осушитель Critical Point Dryer Quorum k850	Quorum Technologies, Великобритания
Напылительная установка Smart Coater SPI	SPI Supplies, США
Сканирующий электронный микроскоп – 6000plus	Jeol, Япония
Флуориметр Qubit 2.0	Invitrogen, США
Контейнер для криоконсервации Cool Cell LX	Biocision, США
Низкотемпературный холодильник MDF-U3286S (- 80°C)	Sanyo, Япония
Сосуд Дьюара	Cryo Diffusion, Франция
Оптический когерентный томограф iVue 100	Optovue, США
Оптический когерентный томограф RTVue 100	
Компьютерный кератотопограф Pentacam	Occulus, Германия
Инкубатор NU-5510	Nu-Aire, США
Автоматический счетчик клеток Luna II	Logos biosystems, Корея
Проточный цитофлуориметр Cyto Flex	Beckman Coulter, США

Таблица 10 – Реактивы, используемые в работе

Реактивы	Производитель
«Раствор для хранения роговицы» (среда Борзенка- Мороз)	ООО НЭП «Микрохирургия глаза», Москва

Продолжение таблицы 10

Реактивы	Производитель
Когезивный вискоэластик Provisc (Duovisc)	ALCON Laboratories Inc, США
Дисперсный вискоэластик Viscoat (Duovisc)	
Хлорид натрия (NaCl)	PanReac AppliChem, Германия
Трисбуферный раствор	
Раствор глицерина	
Tween-20	
Triton X-100	
Диметилсульфоксид (ДМСО)	
Ядерный краситель Hoechst	
Фосфатно-солевой буфер (PBS)	
Аскорбиновая кислота	
0,25% раствор Трипсина - ЭДТА	
Раствор Версена	
МТТ-бромид	
Изопропанол-2	
Додецилсульфат натрия (SDS)	Sigma-Aldrich, США
Раствор ДНКазы	
Раствор РНКазы	
Этидиум бромид	ДиаЭм, Россия
Агароза	
Трипсин-ЭДТА	Thermo Fisher Scientific, США
Коллагеназа II типа	
Реактив Shandon Cryomatrix	
Бычий сывороточный альбумин (BSA)	
Первичные антитела к коллагену I, III, V и VI типов Вторичные антитела к коллагену I, III, V и VI типов	Абсам, Великобритания

Продолжение таблицы 10

Реактивы	Производитель
Маркеры «Live and Dead»	QIAGEN, Германия
Набор для выделения ДНК из образцов DNeasy Blood & Tissue Kit	
Набор для анализа ДНК Qubit dsDNAHS (High-Sensitivity) Assay Kit	Invitrogen, США
Эмбриональная телячья сыворотка (FBS)	HyClone, Thermo Scientific, США
Смесь антибиотиков (пенициллин 10000 МЕ/мл, стрептомицин 10000 мкг/мл, амфотерицин В 25 мкг/мл)	MP Biomedicals, LLC, США
Cell Wash	BD, США
Базовая среда DMEM/F12	Sigma Aldrich, Канада

Таблица 11 – Лабораторная посуда, используемая в работе

Посуда	Производитель
Пробирки типа Эппендорф	GenFollower, Китай
слайды Polysine	Thermo scientific, Великобритания
Криопробирки 2 мл	Corning, США
Чашка Петри 100 мм	
Пробирки центрифужные 15 мл	
Планшет 24-луночный	Costar, США
Пробирки для проточника 12x75	Beckman Coulter, США

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ РАЗРАБОТКИ ТЕХНОЛОГИИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННОГО ЛЕНТИКУЛЯРНОГО МАТЕРИАЛА И ОЦЕНКА ЕГО ЦИТОТОКСИЧНОСТИ В ПРИСУТСТВИИ КЕРАТОЦИТОВ

Целью данной главы является разработка технологии криоконсервации децеллюляризованного ЛМ и оценка его цитотоксичности. Для достижения этой цели необходимо было решить следующие проблемы:

1. Выбор наиболее оптимального протокола децеллюляризации лентиккулярного материала, позволяющего получать прозрачную, бесклеточную роговичную ткань с минимальным повреждением ВКМ, с учетом данных, полученных с помощью физического, генетического и иммуногистохимического методов исследований.

2. Сохранение высоких показателей прозрачности материала при низком уровне повреждения ультраструктуры матрикса после криоконсервации децеллюляризованного лентиккулярного материала, на основании данных анализов, полученных с помощью методов спектрофотометрии и сканирующей электронной микроскопии.

3. Потенциальная цитотоксичность лентиккулярного материала, прошедшего процедуру децеллюляризации и криоконсервации, в присутствии кератоцитов, с учетом результатов, полученных с помощью культуральных и иммуногистохимических методов исследований.

3.1. Сравнительный анализ эффективности различных протоколов децеллюляризации лентиккулярного материала

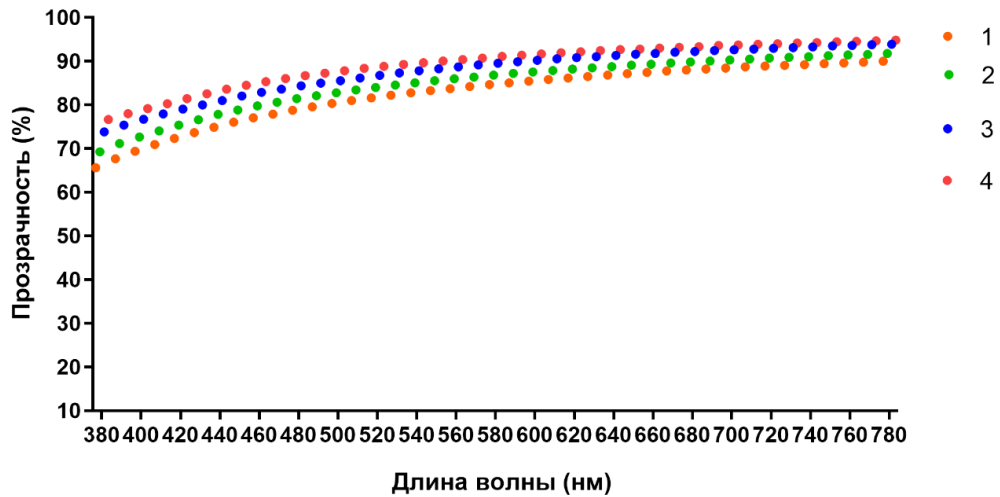
Сравнительный анализ эффективности различных протоколов децеллюляризации ЛМ был проведен в следующих направлениях:

– Прозрачность нативного ЛМ в транспортировочных средах в процессе его переноса из операционного блока до лаборатории ГТБ методом спектрофотометрии.

- Прозрачность децеллюляризованного и нативного ЛМ с помощью спектрофотометрического метода исследования.
- Наличие либо отсутствие клеточных компонентов, а также сохранность общей коллагеновой структуры матрикса с помощью гистологического окрашивания децеллюляризованного и нативного ЛМ.
- Экспрессия коллагена I, III, V и VI типов, а также наличие или отсутствие ядерных компонентов с помощью флюоресцентного окрашивания децеллюляризованного и нативного ЛМ.
- Ультраструктура коллагенового матрикса децеллюляризованного и нативного ЛМ с помощью сканирующей электронной микроскопии.
- Остаточное содержание ДНК в децеллюляризованном и нативном ЛМ с помощью флуориметрического метода.

3.1.1 Результаты исследования прозрачности лентикулярного материала в разных транспортировочных средах

Исследование лучшей среды для транспортировки ЛМ в рамках прозрачности проводили с помощью спектрофотометрического метода. Графический и внешний вид полученных данных представлен на рисунке 14 и 15.



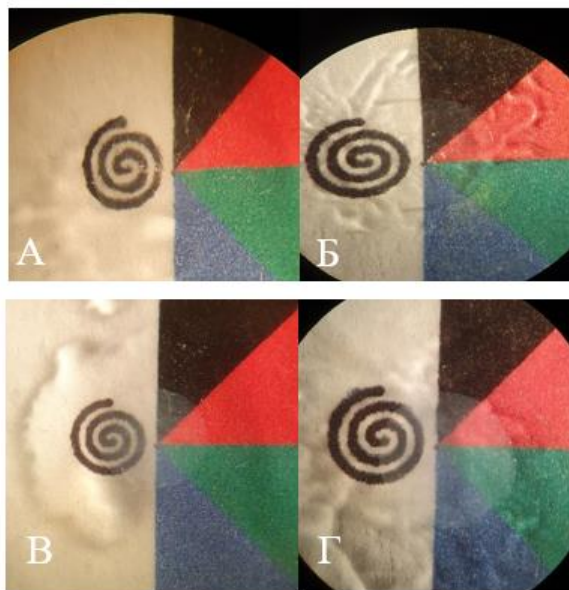
1 – «Раствор для хранения роговицы» (среда Борзенка-Мороз)

2 – «Средство для консервации заднего послойного трансплантата донорской роговицы»

3 – Когезивный вискоэластик (КВ)

4 – Дисперсный вискоэластик (ДВ)

Рисунок 14 –Спектральное пропускание (%) в диапазоне длины волны 380-780 нм



А – дисперсный вискоэластик (ДВ)

Б – когезивный вискоэластик (КВ)

В – «Средство для консервации заднего послойного трансплантата донорской роговицы»

Г – «Раствор для хранения роговицы» (среда Борзенка-Мороз)

Рисунок 15– Фотографии нативных образцов в разных средах

Результаты сравнения экспериментальных групп между собой подвергли статистическому анализу (Таблица 12).

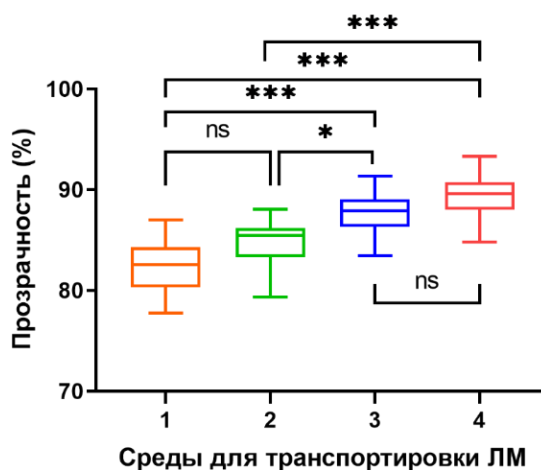
Таблица 12– Распределение значения статистической достоверности p полученных результатов в экспериментальных группах

№ группы	1	2	3	4
1		0.08	<0,001*	<0,001*
2	0.08		<0,001*	0.03*
3	<0,001*	<0,001*		0,2
4	<0,001*	0.03*	0,2	

* $p \leq 0,05$, статистически значимые различия, дисперсионный анализ с апостериорными сравнениями с поправкой Тьюки

С учетом полученных данных можно утверждать об отсутствии статистически значимой разницы при сравнении группы 1 с группой 2 ($82,54 \pm 2,57\%$ против $84,85 \pm 2,47\%$; ($82,56$ ($80,84-84,1$)) против ($85,43$ ($83,65-86,21$))) и группы 3 с группой 4 ($87,64 \pm 2,28\%$ против $89,35 \pm 2,38\%$; ($87,89$ ($86,65-88,9$)) против ($89,6$ ($88,22-90,5$))) (Рисунок 16). Статистически значимое различие определялось при сравнении группы 1 с группами 3 и 4 ($p \leq 0,05$), а также группы 2 с группами 3 и 4 ($p \leq 0,05$). По изменению прозрачных свойств ЛМ, исследуемые группы располагаются в порядке снижения признака следующим образом: группа 4, группа 3, группа 2, группа 1.

Обобщая результаты проведенного спектрофотометрического анализа прозрачности ЛМ нами была выбрана группа 4 в качестве среды для транспортировки ЛМ.



ns ($p \geq 0,05$) – отсутствие статистически значимой разницы

* ($p \leq 0,05$) – статистически значимая разница

*** ($p \leq 0,001$) – статистически максимально значимая разница

1 – «Раствор для хранения роговицы» (среда Борзенка-Мороз)

2 – «Средство для консервации заднего послойного трансплантата донорской роговицы»

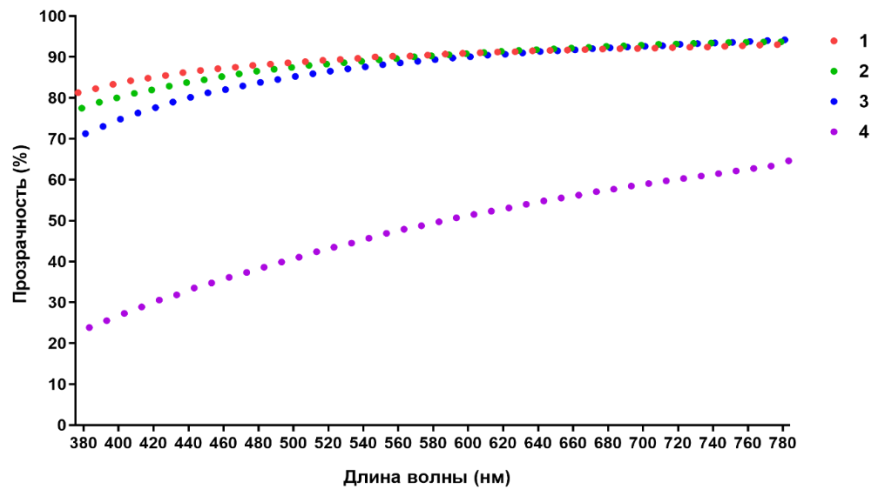
3 – Когезивный вискоэластик (КВ)

4 – Дисперсный вискоэластик (ДВ)

Рисунок 16– Средние значения прозрачности для разных сред

3.1.2. Результаты спектрофотометрии прозрачности ЛМ после децеллюляризации

В данной части работы проводили сравнение разных протоколов децеллюляризации ЛМ в рамках прозрачности. Графический и внешний вид полученных данных представлены на рисунке 17 и 18.



1– нативные образцы

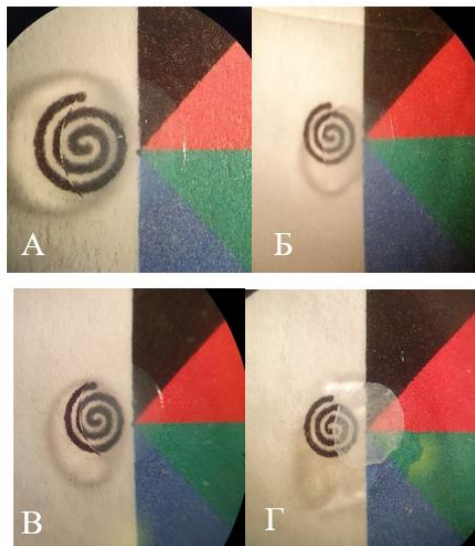
2– протокол с использованием 1,5M NaCl с нуклеазами (NaCl)

3– протокол с 0,1% SDS (SDS)

4– протокол с 0,25% Трипсин-ЭДТА с нуклеазами и двойным отмыванием в гипотрисбуфере (Трипсин-ЭДТА)

Рисунок 17 –Спектральное пропускание (%) в диапазоне длины волны 380 – 780

нм



А – нативный образец

Б –NaCl

В –SDS

Г –Трипсин-ЭДТА

Рисунок 18– Фотографии ЛМ после децеллюляризации

Различия полученных данных в исследуемых группах подвергли статистической обработке (Таблица 13).

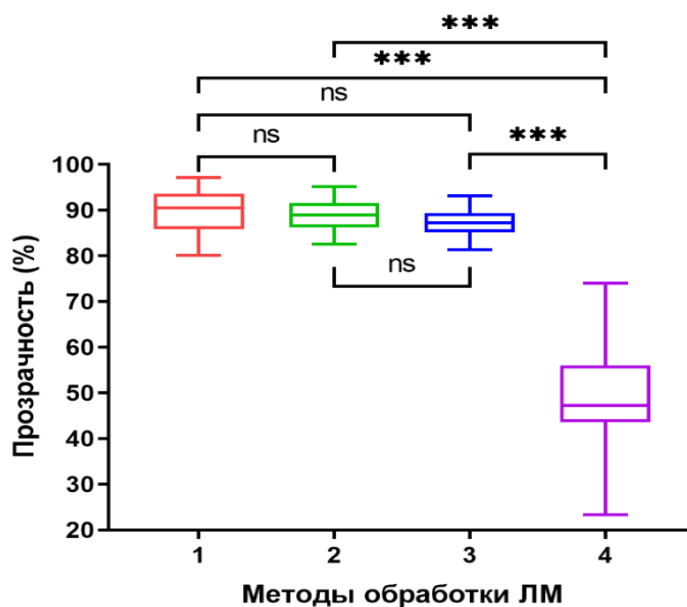
Таблица 13– Распределение числовых значений статистической достоверности p полученных результатов в исследуемых группах

№ группы	1	2	3	4
1		0,64	0,23	<0,001*
2	0,64		0,24	<0,001*
3	0,23	0,24		<0,001*
4	<0,001*	<0,001*	<0,001*	

* $p \leq 0,05$ статистически значимые различия, попарные сравнения с помощью критерия Уэлча с последующей post-hoc поправкой Холма на множественные сравнения

С учетом полученных данных можно утверждать об отсутствии статистически значимой разницы при сравнении группы 1 с группой 2 ($89,50 \pm 4,72\%$ против $88,89 \pm 3,57\%$; (90,45 (85,88-93,34)) против (88,95 (86,34-91,55))); группы 1 с группой 3 ($89,50 \pm 4,72\%$ против $87,26 \pm 3,15\%$; (90,45 (85,88-93,34)) против (87,25 (85,24-88,83))); группы 2 с группой 3 ($88,89 \pm 3,57\%$ против $87,26 \pm 3,15\%$; (88,95 (86,34-91,55)) против (87,25 (85,24-88,83))). Статистически значимая разница определялась при сравнении группы 4 ($47,64 \pm 12,88\%$ (47,24 (43,64-55,94)) с каждой из остальных групп, $p \leq 0,05$ (Рисунок 19).

Проведенное спектрофотометрическое исследование прозрачности ЛМ после децеллюляризации показало, что в группе 4 прозрачность была значительно снижена по сравнению с группой 1, а наиболее приближенными к контролю были результаты в группах 2 и 3 (Рисунок 17). Однако спектрофотометрически прозрачность протокола в группе 2 на ближнем и средневолновом участках спектра выше, чем у протокола в группе 3.



ns ($p \geq 0,05$) – отсутствие статистически значимой разницы

*** ($p \leq 0,001$) – статистически максимально значимая разница

1– нативные образцы; 2– NaCl; 3– SDS; 4– Трипсин-ЭДТА

Рисунок 19– Средние значения прозрачности для разных протоколов децеллюляризации ЛМ

3.1.3. Результаты гистологического анализа

При гистологическом окрашивании гематоксилином и эозином, по методу Ван-Гизон и альциановым синим выявлено полное удаление клеточных компонентов и отсутствие значимого повреждения структуры ВКМ в полученном ацеллюлярном матриксе в группах 2 и 3. Группа 4 на фоне полного отсутствия клеток и клеточных ядер характеризуется значительным повреждением структуры матрикса (Рисунок 20).

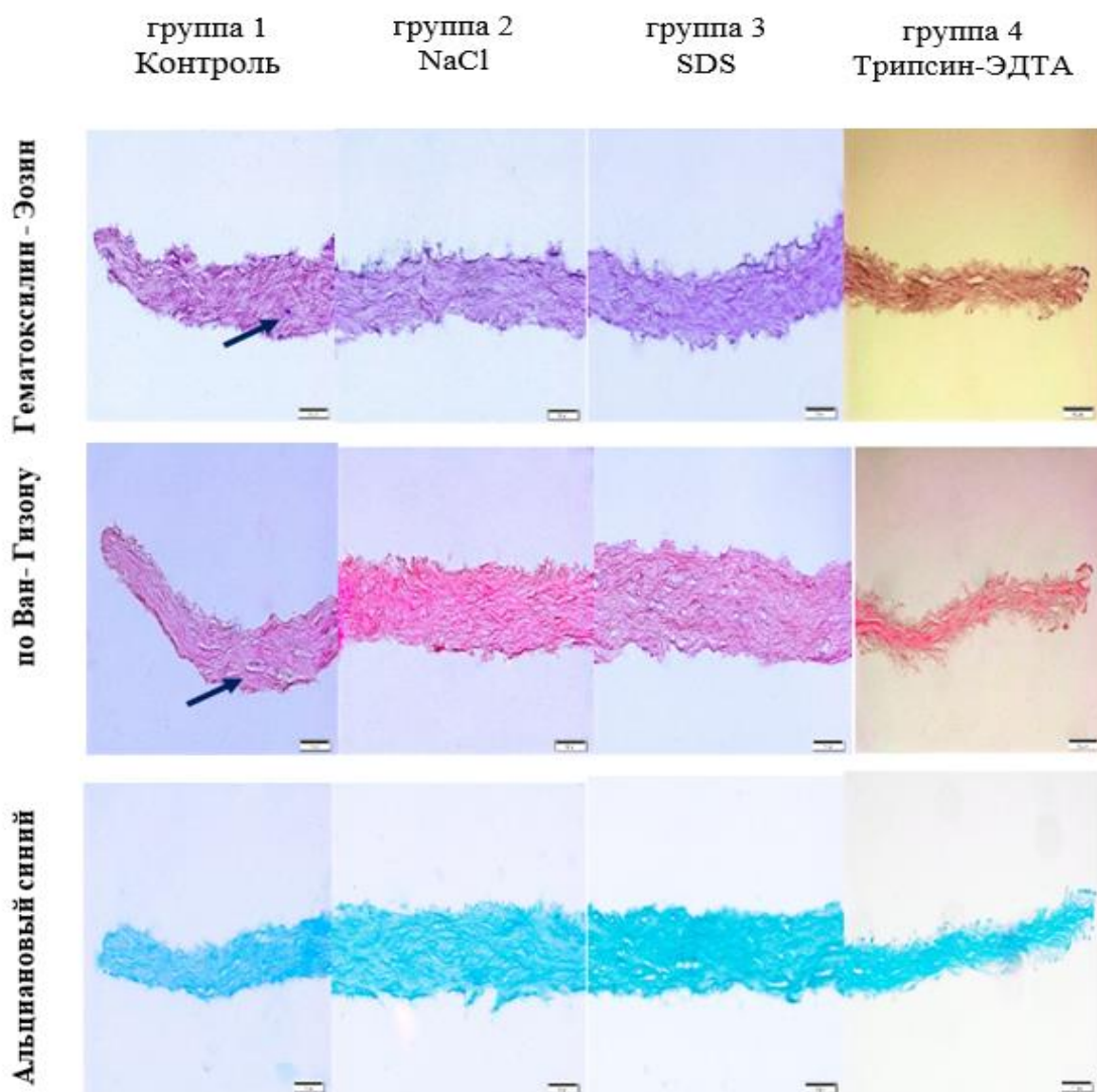
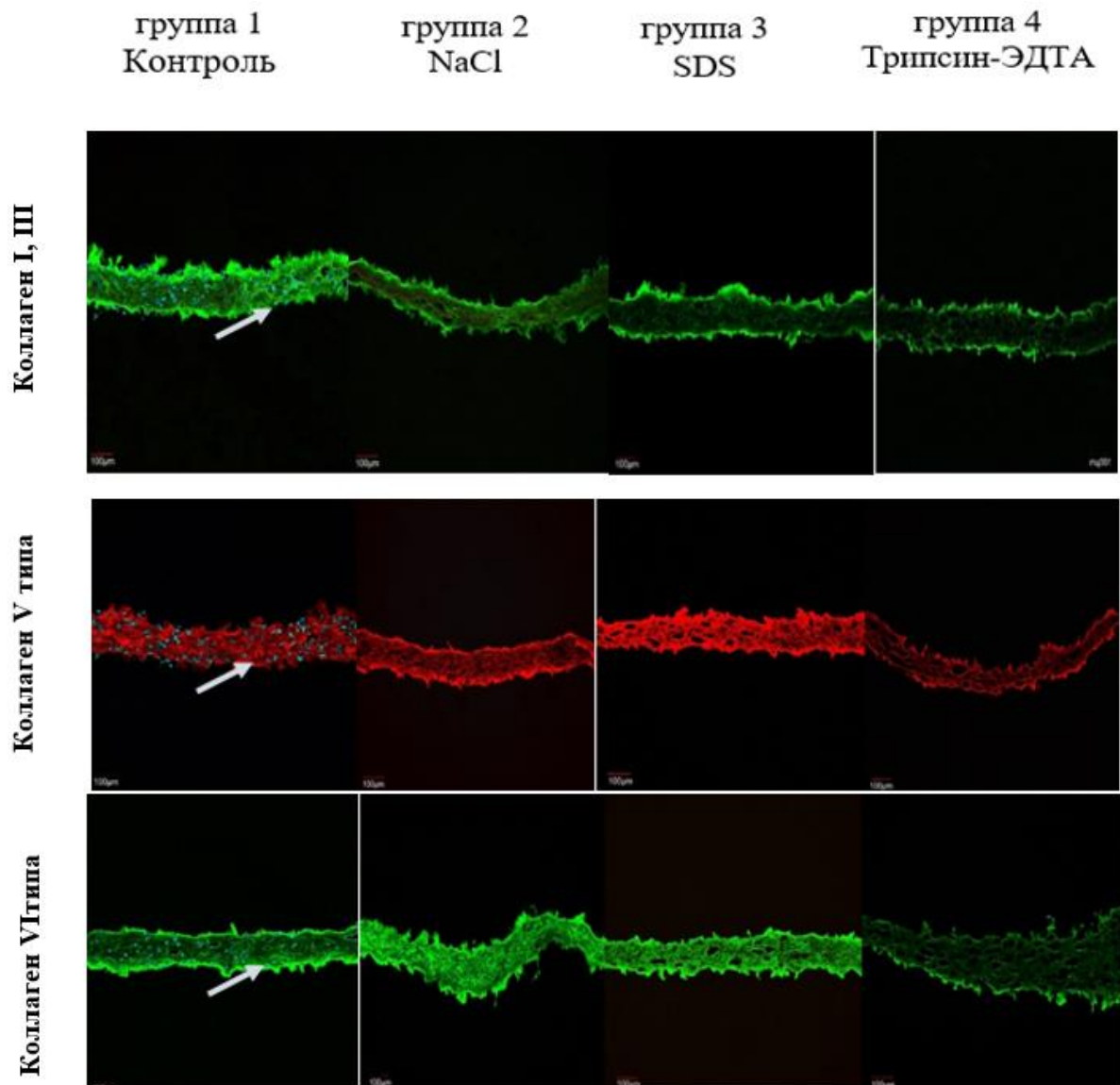


Рисунок 20 – Гистологическая картина нативных и децеллюляризованных ЛМ (стрелками указаны клеточные компоненты)

3.1.4. Результаты иммуногистохимического анализа

Флюоресцентное окрашивание ядер красителем Hoechst показало, что ЛМ, подвергшиеся децеллюляризации в группах 2, 3, 4 окрашиваются негативно. При этом, в группе 1 определяется характерное свечение ядер. Кроме того, по данным ИГХ в контрольной и экспериментальных группах отмечалась положительная экспрессия коллагена I, III, V и VI типов (Рисунок 21). В группе 4 отмечалось разрушение структуры коллагена I, III, V и VI типов.

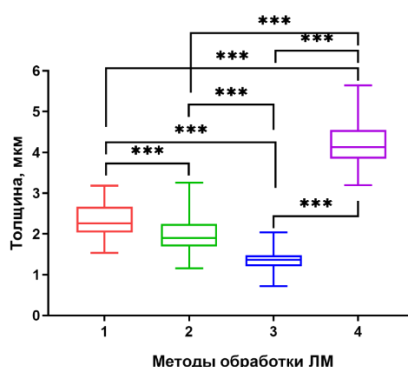


Синяя флуоресценция – ядерные компоненты (указаны белой стрелкой); зеленая – коллаген I, III и VI типов; красная флуоресценция – коллаген V типа. x 100

Рисунок 21 – Иммуногистохимический анализ нативных и децеллюляризированных ЛМ

3.1.5. Результаты сканирующей электронной микроскопии

При анализе толщины фибрилл коллагеновых волокон образцов были выявлены различия, как между контрольной и опытными группами, так и при попарном сравнении опытных групп между собой, $p \leq 0,05$ (Рисунок 22).



*** ($p \leq 0,001$) – статистически максимально значимая разница

1– нативные образцы

2– NaCl

3– SDS

4– Трипсин-ЭДТА

Рисунок 22 – Влияние различных методов децеллюляризации на толщину фибрилл коллагеновых волокон

Статистически значимые различия наблюдались при сравнении группы 2 с группой 1 ($1,96 \pm 0,46$ мкм против $2,30 \pm 0,40$ мкм; (1,9 (1,69-2,21)) против (2,26 (2,03-2,63))), группы 3 с группой 1 ($1,36 \pm 0,25$ мкм против $2,30 \pm 0,40$ мкм; (1,36 (1,21-1,47)) против (2,26 (2,03-2,63))), группы 4 с группой 1 ($4,19 \pm 0,56$ мкм против $2,30 \pm 0,4$ мкм 0; (4,13 (3,85-4,54)) против (2,26 (2,03-2,63))). Попарное сравнение опытных групп между собой выявило статистически значимые различия, $p \leq 0,05$ (Рисунок 22).

Различия полученных данных ИГХ в исследуемых группах подвергли статистической обработке (Таблица 14).

Таблица 14 – Распределение числовых значений статистически значимой достоверной разницы p полученных результатов в исследуемых группах

№ группы	1	2	3	4
1		<0,001*	<0,001*	<0,001*
2	<0,001*		<0,001*	<0,001*
3	<0,001*	<0,001*		<0,001*
4	<0,001*	<0,001*	<0,001*	

* $p \leq 0,05$ статистически значимые различия, попарное сравнение групп t-критерием Уэлча с поправкой Холма

На рисунке 23 видно, что группа 3 из-за отсутствия достаточного объема коллагеновых волокон, в основном представлена разволокненными фибриллами. В группе 4 отмечалось заметное утолщение фибрилл коллагеновых волокон, вызванное грубым нарушением их ультраструктуры. В группе 2 выявлено незначительное изменение состояния фибрилл коллагеновых волокон.

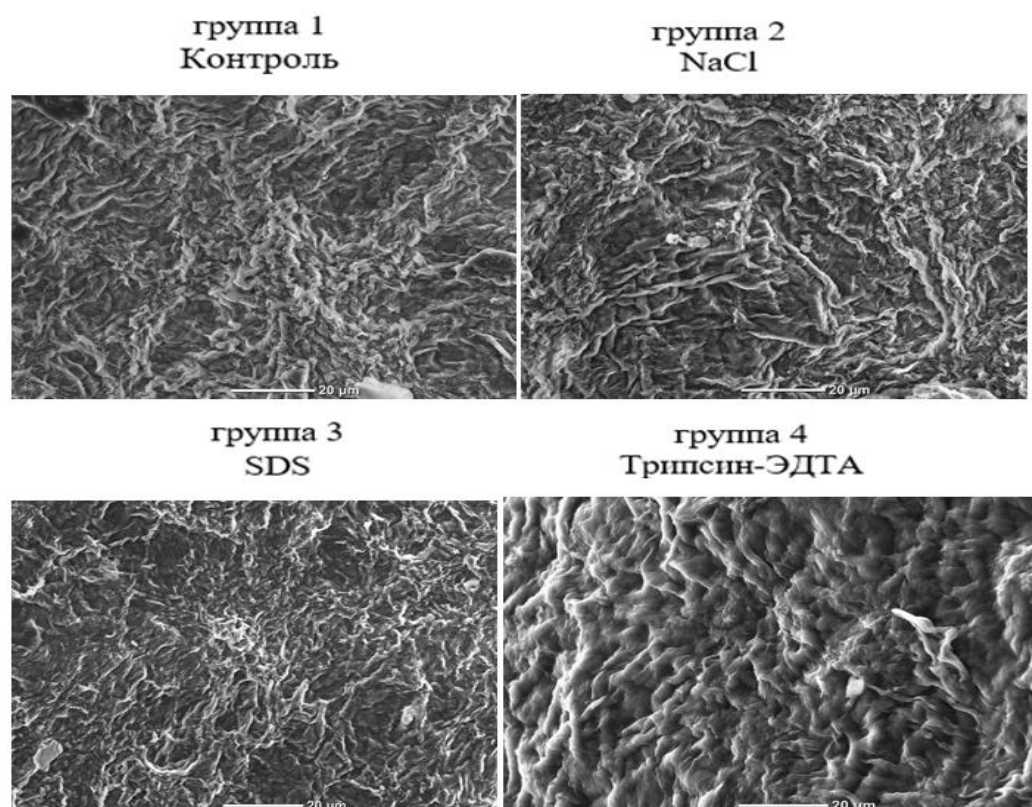


Рисунок – 23. Коллагеновая ультраструктура ВКМ. Сканирующая электронная микроскопия. x 1000

3.1.6. Результаты анализа содержания ДНК

Результаты ДНК-анализа нативного и ДЛМ выявили статистические различия, как между экспериментальными группами и контролем, так и экспериментальными группами между собой, $p \leq 0,05$: группа 2 с группой 1 ($39,34 \pm 8,65$ нг/мг против $132,18 \pm 44,17$ нг/мг; $(41,99 (38,57-44,67))$ против $(128,5 (102,02-154,48))$), группа 3 с группой 1 ($37,07 \pm 6,19$ нг/мг против $132,18 \pm 44,17$ нг/мг; $(39,74 (36,72-42,75))$ против $(128,5 (102,02-154,48))$), группа 4 с группой 1 ($13,42 \pm 7,4$

нг/мг против $132,18 \pm 44,17$ нг/мг; (11,45 (8,47-16,86)) против (128,5 (102,02-154,48)).

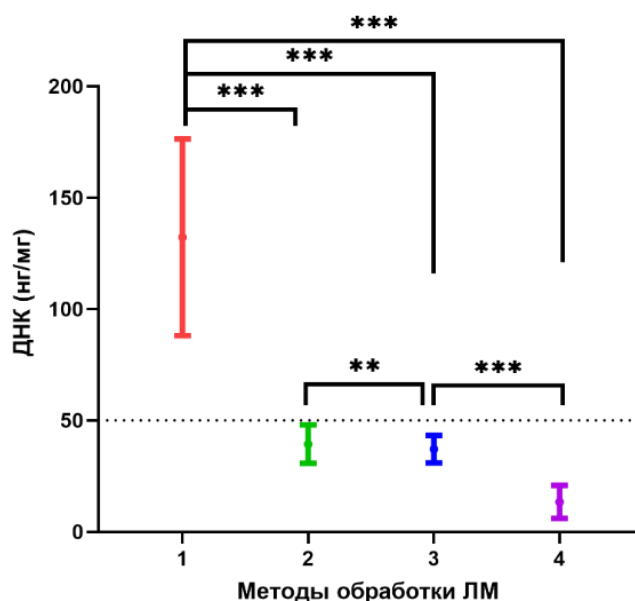
При сравнении опытных групп между собой статистически значимые различия были выявлены во всех случаях (Таблица 15).

Таблица 15 – Распределение числовых значений статистически значимой достоверной разницы p полученных результатов в исследуемых группах

№ группы	1	2	3	4
1		<0,001*	<0,001*	<0,001*
2	<0,001*		<0,001*	<0,001*
3	<0,001*	<0,001*		<0,001*
4	<0,001*	<0,001*	<0,001*	

* $p \leq 0,05$ статистически значимые различия, попарное сравнение групп t-критерием Уэлча с поправкой Холма

Во всех протоколах после обработки образцов содержание остаточного ДНК было меньше 50 (нг/мг), что соответствовало критериям эффективности децеллюляризации органов и тканей, предложенных Старо с соавторами [54]. Содержание остаточных фрагментов ДНК было наименьшим в группе 4 Трипсин-ЭДТА (Рисунок 24).



** ($p \leq 0,01$) – статистически очень значимая разница

*** ($p \leq 0,001$) – статистически максимально значимая разница

1– нативные образцы

2– NaCl

3– SDS

4– Трипсин-ЭДТА

Рисунок –24. Определение количества остаточного содержания ДНК (нг/мг) в зависимости от протокола децеллюляризации

Таким образом, в результате проведенного спектрофотометрического исследования прозрачности материала было доказано, что транспортировка образцов в ДВ позволяет сохранять высокую прозрачность образцов и упрощает процедуру измерения прозрачных свойств роговичной ткани. Использование ДВ в качестве среды для транспортировки материала оправдано, с одной стороны, в связи с постоянным его наличием в операционных блоках и широкому применению в офтальмохирургической практике. С другой стороны, благодаря дегидратационным свойствам, ДВ является альтернативой раствору глицерина, который также используется для устранения неспецифического отека ЛМ перед спектрофотометрическим измерением его прозрачности, в случае если образцы были доставлены из операционной в лабораторию в растворах PBS или иных средах для хранения роговицы, способных вызвать отек роговичной ткани и

снижающие ее прозрачность. В результате сравнения различных протоколов децеллюляризации на основе детергентов, наибольшую эффективность показали растворы 1,5М NaCl с нуклеазами и 0.1% SDS. По результатам физического, генетического и иммуногистохимического анализов данные протоколы позволили практически полностью удалять клеточные компоненты и фрагменты ДНК из ткани. При этом структура ВКМ не была значимо изменена, что и определило высокую прозрачность ткани.

3.2. Результаты оценки различных протоколов криоконсервации децеллюляризованного лентикулярного материала

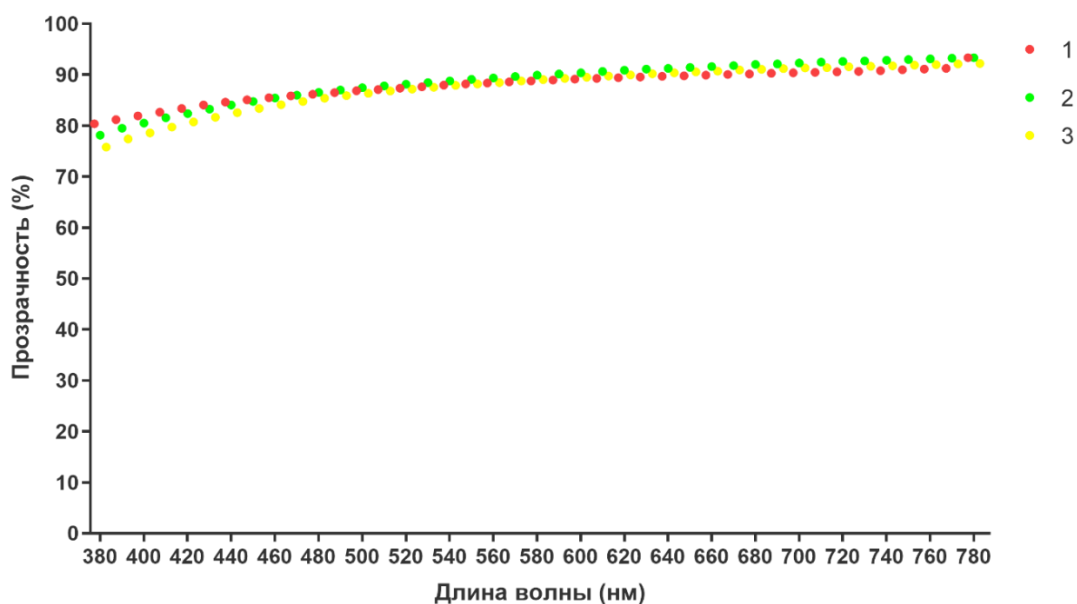
Анализ разработанной технологии криоконсервации децеллюляризованного ЛМ был проведен в следующих направлениях:

- Влияние предварительной дегидратации ЛМ на его прозрачность перед хранением в криопротекторе с помощью метода спектрофотометрии
- Прозрачность децеллюляризованного ЛМ в трех криопротекторах с помощью метода спектрофотометрии
- Изучение ультраструктурных характеристик децеллюляризованного ЛМ в трех криопротекторах с помощью метода сканирующей электронной микроскопии
- Изучение стерильности ЛМ, прошедшего децеллюляризацию и криоконсервацию с помощью Санитарно-бактериологического исследования

3.2.1. Оценка результатов влияния дегидратации на прозрачность децеллюляризованного лентикулярного материала перед криоконсервацией

Результаты влияния предварительной дегидратации на прозрачность ДЛМ перед криоконсервацией показали, что в группе 3 при сравнении с группой 1

прозрачность незначительно снижена на ближнем спектре видимого света, а наиболее приближена к контрольной группе являлась группа 2 (Рисунок 25 и 26).

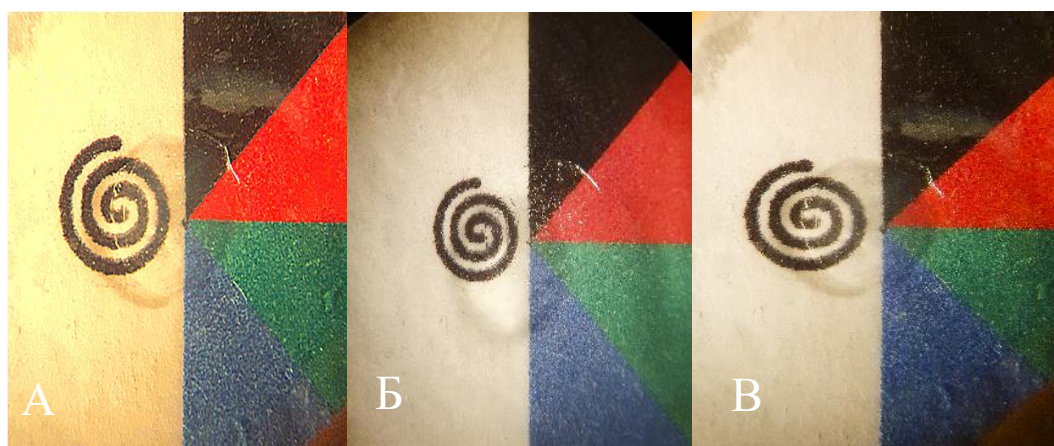


1 – нативные образцы

2 – группа без предварительной дегидратации ДВ (NaCl-ДМСО без ДВ)

3 – группа с предварительной дегидратацией ДВ (NaCl-ДМСО с ДВ)

Рисунок 25 – Спектральное пропускание (%) в диапазоне длины волны 380 – 780 нм



А – контрольная группа

Б – группа без предварительной дегидратации ДВ (NaCl-ДМСО без ДВ)

В – группа с предварительной дегидратацией ДВ (NaCl-ДМСО с ДВ)

Рисунок 26 – Фотографии нативных и децеллюляризованных ЛМ после криоконсервации

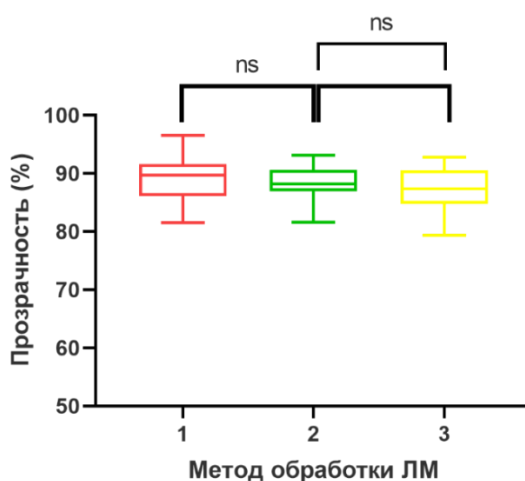
Однако, проведенный анализ не выявил статистически значимых различий при сравнении как контрольной группы с опытными, так и опытными группами между собой: группа 1 с группой 3 ($89,23 \pm 3,89\%$ против $88,33 \pm 2,84\%$; (($89,69$ ($86,19-91,60$)) против $88,19$ ($87,13-90,10$)); группа 1 с группой 2 ($89,23 \pm 3,89\%$ против $87,47 \pm 3,71\%$; (($89,69$ ($86,19-91,60$)) против $87,40$ ($86,19-90,55$)); группа 3 с группой 2 ($88,33 \pm 2,84\%$ против $87,47 \pm 3,71\%$; ($88,19$ ($87,13-90,10$)) против $87,40$ ($86,19-90,55$)) (Рисунок 27, Таблица 16).

Таким образом использование дегидратирующей среды перед хранением не является обязательным условием.

Таблица 16– Распределение числовых значений статистической достоверности p полученных результатов в исследуемых группах

№ группы	1	2	3
1		0,68	0,23
2	0,68		0,72
3	0,23	0,72	

($p \geq 0,05$) – отсутствие статистически значимой разницы, дисперсионный анализ с апостериорными сравнениями с поправкой Тьюки.



ns ($p \geq 0,05$) – отсутствие статистически значимой разницы

1 – нативные образцы

2 – NaCl-ДМСО без ДВ

3 – NaCl-ДМСО с ДВ

Рисунок 27 – Графики сравнения прозрачности контрольной и опытных групп

3.2.2. Результаты спектрофотометрии

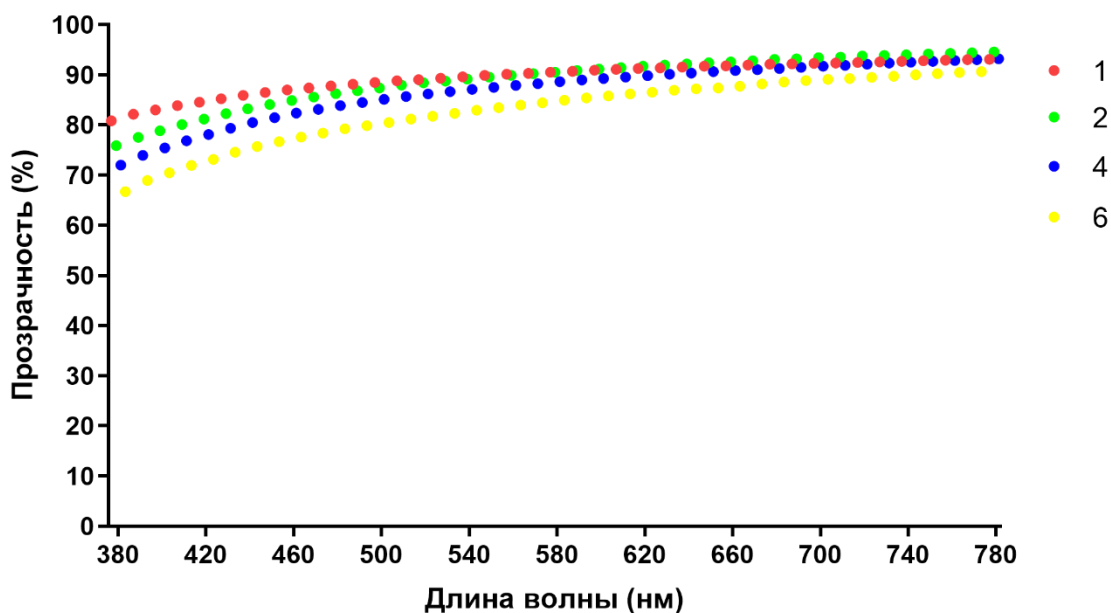
Результаты прозрачности сначала оценивали для отдельного протокола децеллюляризации ЛМ в NaCl и SDS, сохраненных в трех разных криопротекторах, чтобы выявить наиболее прозрачный в этих группах. Затем проводили сравнение лучших опытных групп с нативными образцами. Различия полученных данных спектрофотометрии в исследуемых группах подвергли статистической обработке (Таблица 17).

Таблица 17– Распределение числовых значений статистической достоверности p полученных результатов в исследуемых группах

№ группы	1	2	3	4	5	6	7
1		0,99	<0,001*	0,052	<0,001*	<0,001*	<0,001*
2	0,99		<0,001*	0,02*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
3	<0,001*	<0,001*		0,06	<0,01*	0,97	0,75
4	0,052	0,02*	0,06		<0,001*	<0,001*	<0,001*
5	<0,001*	<0,001*	<0,01*	<0,001*		0,36	0,71
6	<0,001*	<0,001*	0,97	<0,001*	0,36		0,99
7	<0,001*	<0,001*	0,75	<0,001*	0,71	0,99	

* $p \leq 0,05$ статистически значимые различия, дисперсионный анализ с апостериорными сравнениями с поправкой Тьюки

Так, при сравнении опытных групп в рамках протокола децеллюляризации с использованием NaCl в трех криопротекторах было выявлено, что группа 2 демонстрирует лучшую прозрачность в сравнении с группой 4 и с группой 6. (Рисунок 28).



1 – группа 1 (нативные образцы)

2 – группа 2 (NaCl-ДМСО)

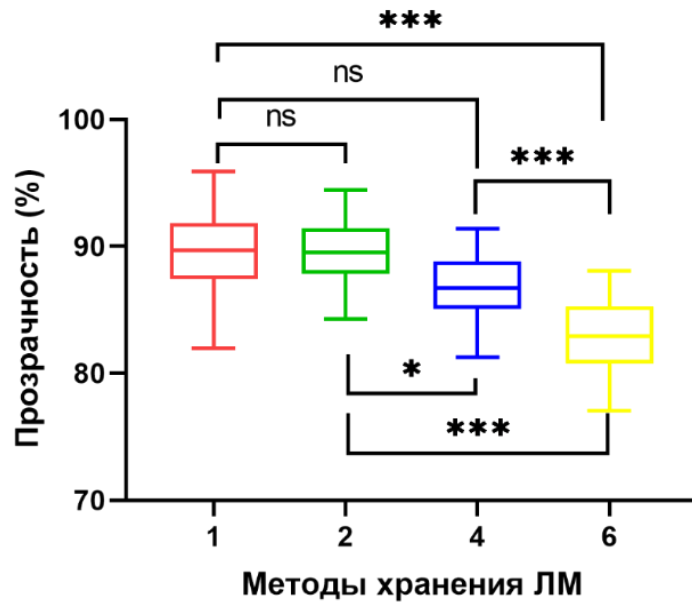
4 – группа 4 (NaCl-Криодерм)

6 – группа 6 (NaCl-глицерин)

Рисунок 28 – Спектральное пропускание (%) в диапазоне длины волны 380 – 780 нм

Опытные группы 2, 4 и 6 статистически различались между собой $p \leq 0,05$ (Рисунок 29). Однако, группы 2 и 4 при сравнении с контрольной группой не различаются, группа 6 различалась с контрольной и с опытными группами.

Статистически не различались следующие группы: группа 2 с группой 1 ($89,44 \pm 2,68\%$ против $89,48 \pm 3,5\%$; ((89,52 (87,99–91,18))) против 89,67 (87,84–91,80)); группа 4 с группой 1 ($86,83 \pm 2,67\%$ против $89,48 \pm 3,5\%$; ((86,72 (85,21–88,59))) против 89,67 (87,84–91,80)). Группа 6 различалась с контрольной группой ($83,09 \pm 2,97\%$ против $89,48 \pm 3,5\%$; ((82,94 (81,37–85,1))) против 89,67 (87,84–91,80)).



ns ($p \geq 0,05$) – отсутствие статистически значимой разницы

* $p \leq 0,05$ статистически значимая разница

***($p \leq 0,001$) – статистически максимально значимая разница

1 – группа 1 (нативные образцы)

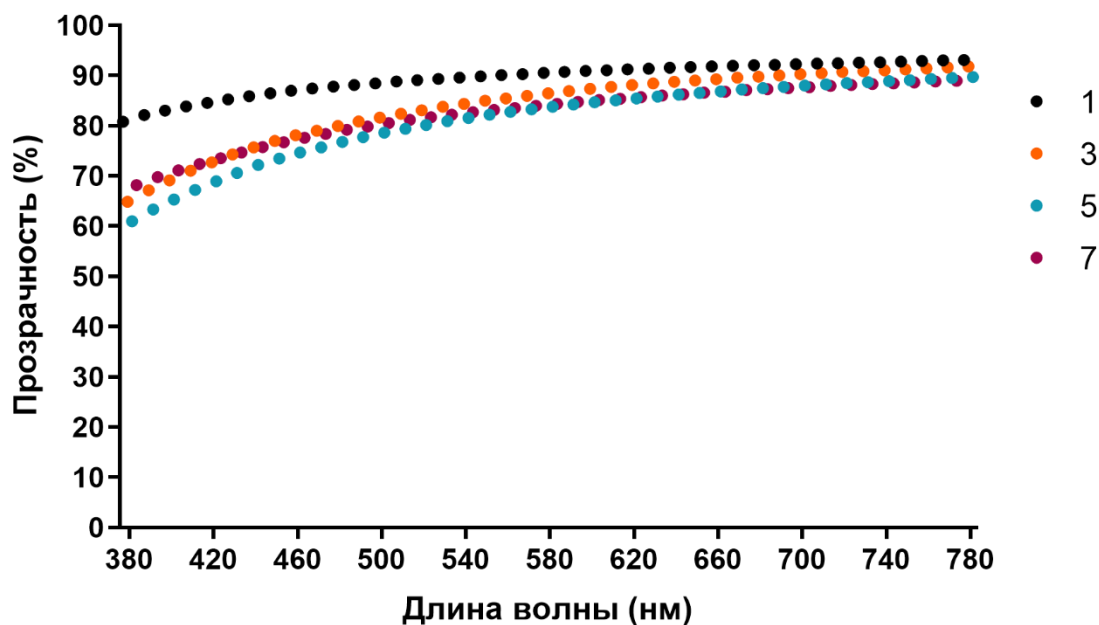
2 – группа 2 (NaCl-ДМСО)

4 – группа 4 (NaCl-Криодерм)

6 – группа 6 (NaCl-Глицерин)

Рисунок 29 – Графики сравнения прозрачности контрольных и опытных групп для протокола NaCl

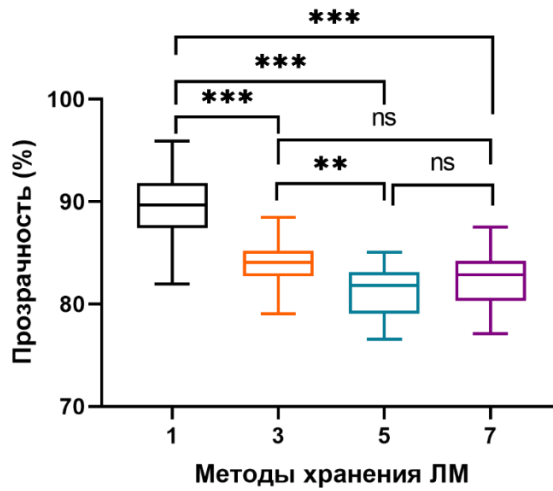
Сравнение опытных групп в рамках протокола децеллюляризации с использованием SDS выявило, что группа 3 демонстрирует лучшую прозрачность в сравнении с группой 5 и с группой 7 (Рисунок 30).



- 1 – группа 1 (нативные образцы)
- 3 – группа 3 (SDS-ДМСО)
- 5 – группа 5 (SDS -Криодерм)
- 7 – группа 7 (SDS -глицерин)

Рисунок 30 – Спектральное пропускание (%) в диапазоне длины волны 380 – 780 нм

Контрольная группа статистически различалась со всеми опытными группами $p \leq 0,05$ в рамках протокола SDS (Рисунок 31). Тем не менее статистической разницы не было выявлено при сравнении следующих групп: группа 3 с группой 7 ($83,96 \pm 2,26\%$ против $82,56 \pm 2,74\%$; ((84,05 (83,00–85,11)) против $82,84$ (80,49–84,00)); группа 5 с группой 7 ($81,15 \pm 2,44\%$ против $82,56 \pm 2,74\%$; ((81,81 (79,46–82,84)) против $82,84$ (80,49–84,00)). При этом группа 3 и группа 5 статистически различались между собой $p \leq 0,05$.



ns ($p \geq 0,05$) – отсутствие статистически значимой разницы

* $p \leq 0,05$ статистически значимая разница

**($p \leq 0,01$) – статистически очень значимая разница

1 – группа 1 (нативные образцы)

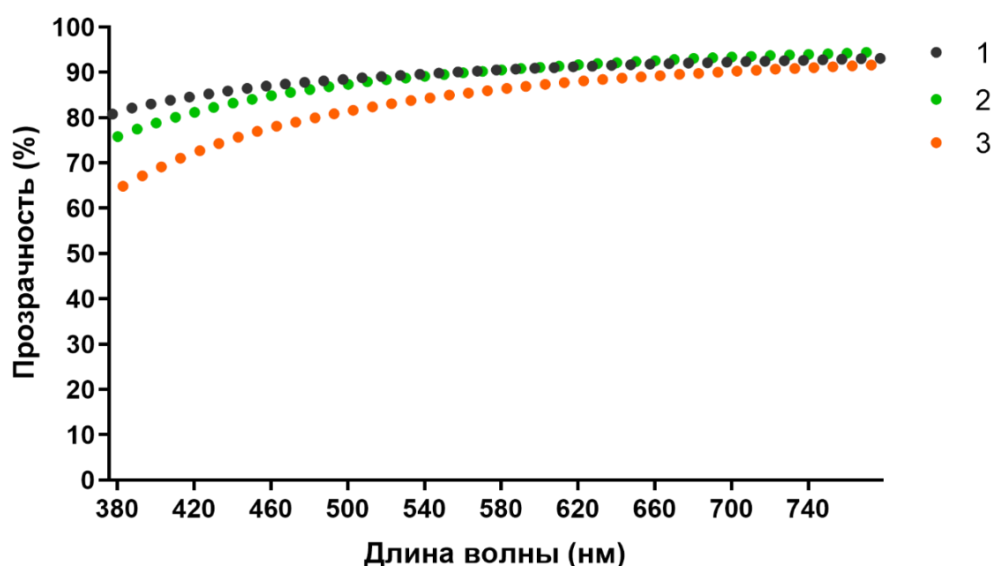
3 – группа 3 (SDS-ДМСО)

5 – группа 5 (SDS -Криодерм)

7 – группа 7 (SDS -глицерин)

Рисунок 31 – График сравнения прозрачности контрольных и опытных групп для протокола SDS

Таким образом, в рамках каждого протокола децеллюляризации были выявлены лучшие группы по прозрачности: группа 2 (NaCl–ДМСО) и группа 3 (SDS–ДМСО) (Рисунок 32 и 33).



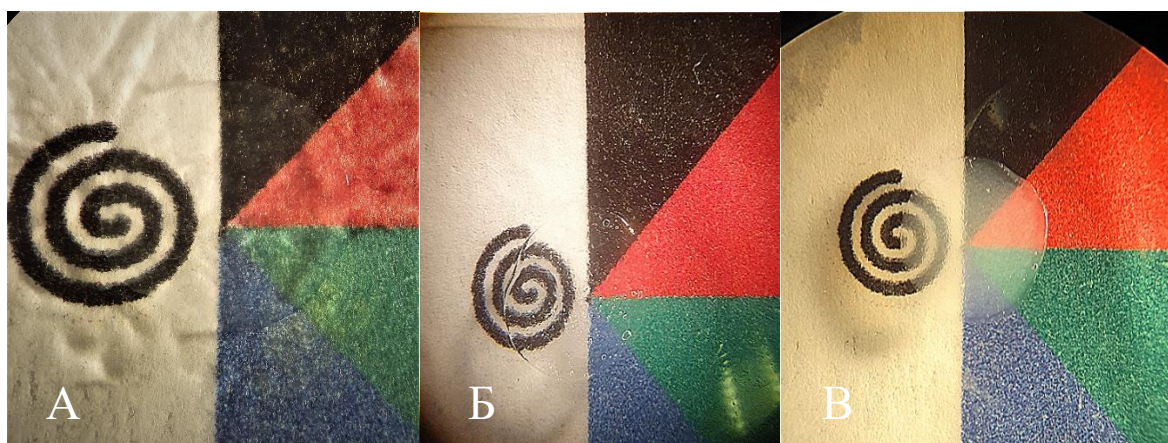
1 – группа 1 (нативные образцы)

2 – группа 2 (NaCl-ДМСО)

3 – группа 3 (SDS-ДМСО)

Рисунок 32 – Спектральное пропускание (%) в диапазоне длины волны 380 – 780

нм



А – группа 1 (нативные образцы)

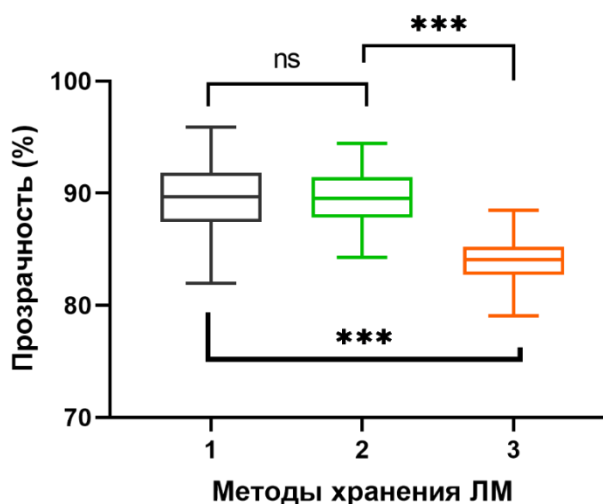
Б – группа 2 (NaCl-ДМСО)

В – группа 3 (SDS-ДМСО)

Рисунок 33 – Фотографии нативных образцов и лучших опытных групп для протоколов NaCl и SDS

При сравнении лучших опытных групп между собой и с контрольной группой было выявлено следующее: группы 3–2 и группы 3–1 имели статистически

достоверную разницу $p \leq 0,05$. При этом группы 1–2 не различались $p \geq 0,05$ (Рисунок 34).



ns ($p \geq 0,05$) – отсутствие статистически значимой разницы

*** ($p \leq 0,001$) – статистически максимально значимая разница

1 – группа 1 (нативные образцы)

2 – группа 2 (NaCl-ДМСО)

3 – группа 3 (SDS-ДМСО)

Рисунок 34 – График сравнения прозрачности контрольных и лучших опытных групп для протоколов NaCl и SDS

Таким образом, по результатам спектрофотометрии можно сделать вывод, что группа 2 (NaCl-ДМСО) является наиболее оптимальной по прозрачности в сравнении с другими опытными группами. Хотя группа 3 (SDS-ДМСО) показала лучшие результаты при сравнении с другими консервационными средами в рамках протокола SDS. Тем не менее, образцы в группе 3 показали неудовлетворительные показатели прозрачности в сравнении с группой 2 (NaCl-ДМСО) и группой 1 (нативные образцы).

3.2.3. Результаты сканирующей электронной микроскопии

Анализ ультраструктуры ВКМ ДЛМ после хранения в разных криопротекторах с помощью метода СЭМ показал различия полученных данных в исследуемых группах при статистической обработке (Таблица 18).

Таблица 18– Распределение числовых значений статистической достоверности p полученных результатов в исследуемых группах

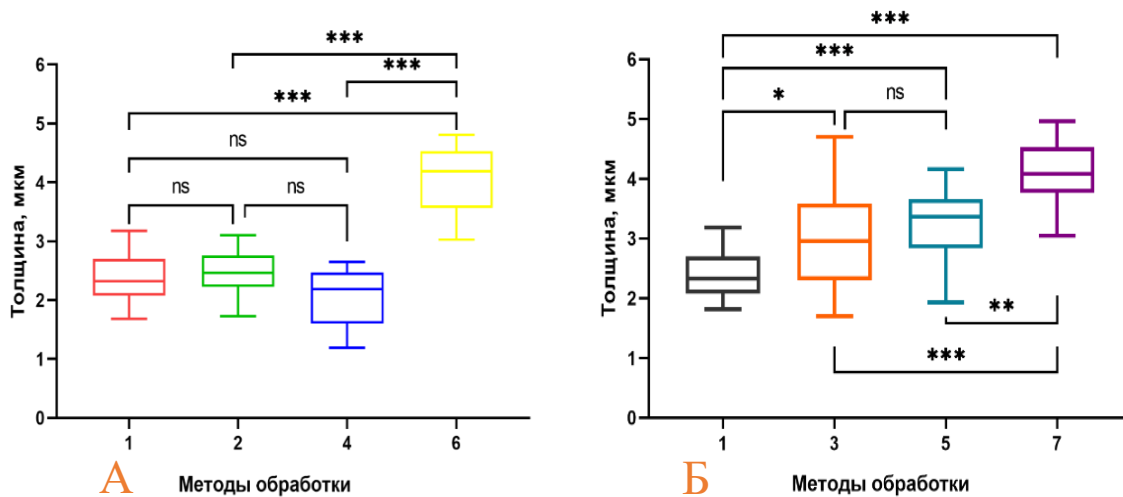
№ группы	1	2	3	4	5	6	7
1		1	0,03*	1	<0,001*	<0,001*	<0,001*
2	1		0,13	0,45	<0,001*	<0,001*	<0,001*
3	0,03*	0,13		<0,001*	1	<0,001*	<0,001*
4	1	0,45	<0,001*		<0,001*	<0,001*	<0,001*
5	<0,001*	<0,001*	1	<0,001*		0,017*	<0,01*
6	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,017*		1
7	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,01*	1	

* $p < 0,05$ статистически значимые различия, тест Краскела-Уоллиса с последующим post-hoc анализом попарных сравнений с помощью теста Данна с поправкой Холма на множественные сравнения

Использовали непараметрические методы анализа из-за наличия ненормально распределенных данных. В результате статистически значимое уменьшение толщины фибрилл коллагеновых волокон образцов было выявлено при сравнении следующих групп: группа 1 с группой 3 ($2,36 \pm 0,37$ мкм против $2,99 \pm 0,80$ мкм; (2,32 (2,09-2,65)) против (2,96 (2,34-3,55))); группа 1 с группой 5 ($2,36 \pm 0,37$ мкм против $3,21 \pm 0,6$ мкм; (2,32 (2,09-2,65)) против (3,36 (2,85-3,6))); группа 1 с группой 6 ($2,36 \pm 0,37$ мкм против $4,04 \pm 0,55$; (2,32 (2,09-2,65)) против (4,19 (3,57-4,53))); группа 1 с группой 7 ($2,36 \pm 0,37$ мкм против $4,09 \pm 0,52$ мкм; (2,32 (2,09-2,65)) против (4,08 (3,77-4,5))); группа 2 с группой 5 ($2,45 \pm 0,36$ мкм против $3,21 \pm 0,60$ мкм; (2,46 (2,26-2,73)) против (3,36 (2,85-3,6))); группа 2 с группой 6 ($2,45 \pm 0,36$ мкм против $4,04 \pm 0,55$ мкм; (2,46 (2,26-2,73)) против (4,19 (3,57-4,53))); группа 2 с группой 7 ($2,45 \pm 0,36$ мкм против $4,09 \pm 0,52$ мкм; (2,46 (2,26-2,73)) против (4,08 (3,77-4,5))); группа 3 с группой 4 ($2,99 \pm 0,8$ мкм против $2,07 \pm 0,44$ мкм; (2,96

(2,34-3,55)) против (2,19 (1,65-2,45)); группы 3–6; 3–7; 4–5; 4–6; 4–7; 5–6; 5–7 также статистически различались $p \leq 0,05$. Сравнительный анализ не выявил достоверной статистической разницы при сравнении следующих групп: 1–2; 1–4; 2–3; 2–4; 3–5; 6–7.

Графический вид полученных данных сравнения протоколов децеллюляризации для NaCl и SDS после криоконсервации в трех криопротекторах представлен на рисунке 35.



А – протокол NaCl в трех криопротекторах

Б – протокол SDS в трех криопротекторах

Рисунок 35– Влияние различных методов хранения децеллюляризованного ЛМ на толщину фибрилл коллагеновых волокон

На рисунке 36 видно, что в группе 4 (NaCl–Криодерм) отмечалось истончение фибрилл, что оказывало влияние на их архитектуру. В группе 6 (NaCl–глицерин) происходило утолщение фибрилл коллагеновых волокон на фоне грубого нарушения их ультраструктуры. В группе 2 (NaCl–ДМСО) состояние фибрилл коллагеновых волокон было схожим с нативными образцами (контроль).

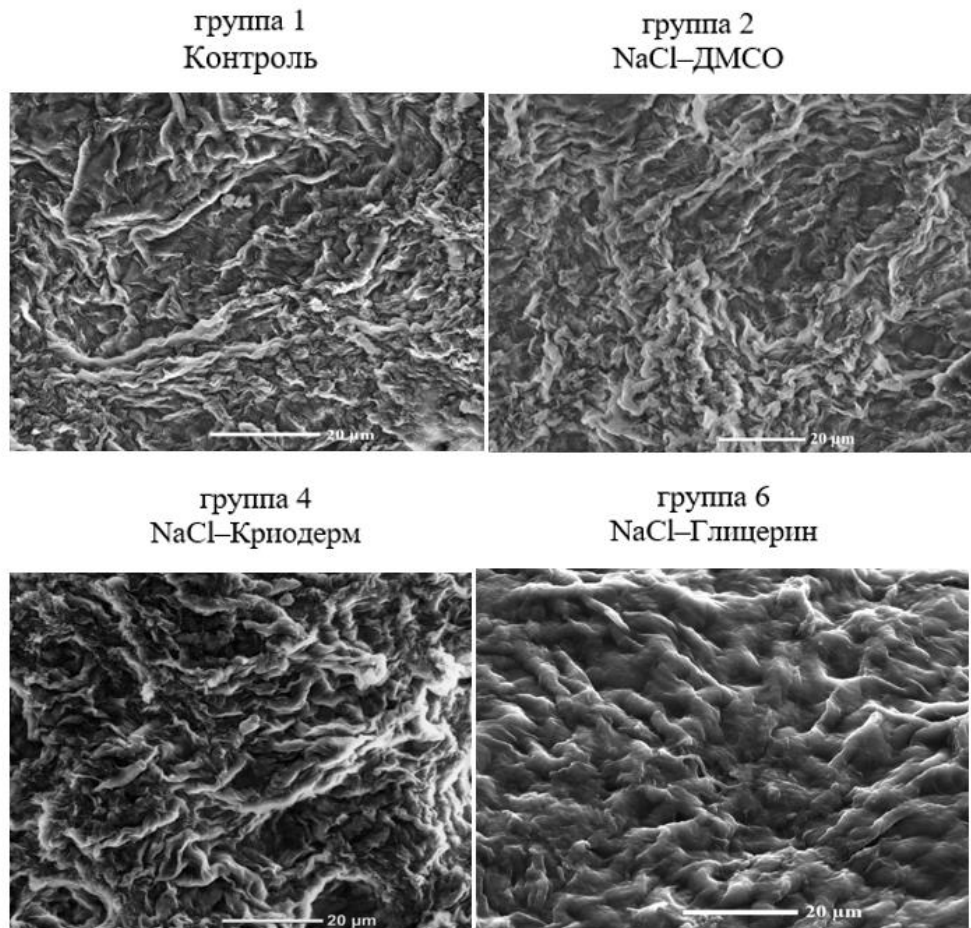


Рисунок – 36. Ультраструктура фибрилл коллагеновых волокон для протокола NaCl. Сканирующая электронная микроскопия. x 1000

Согласно полученным данным СЭМ, проведенный анализ показал, что хранение децеллюляризованного образца протокола SDS в трех криопротекторах приводит к значимому изменению ультраструктуры коллагеновых волокон при сравнении с контролем, особенно заметно в группе SDS глицерин (Рисунок 37)

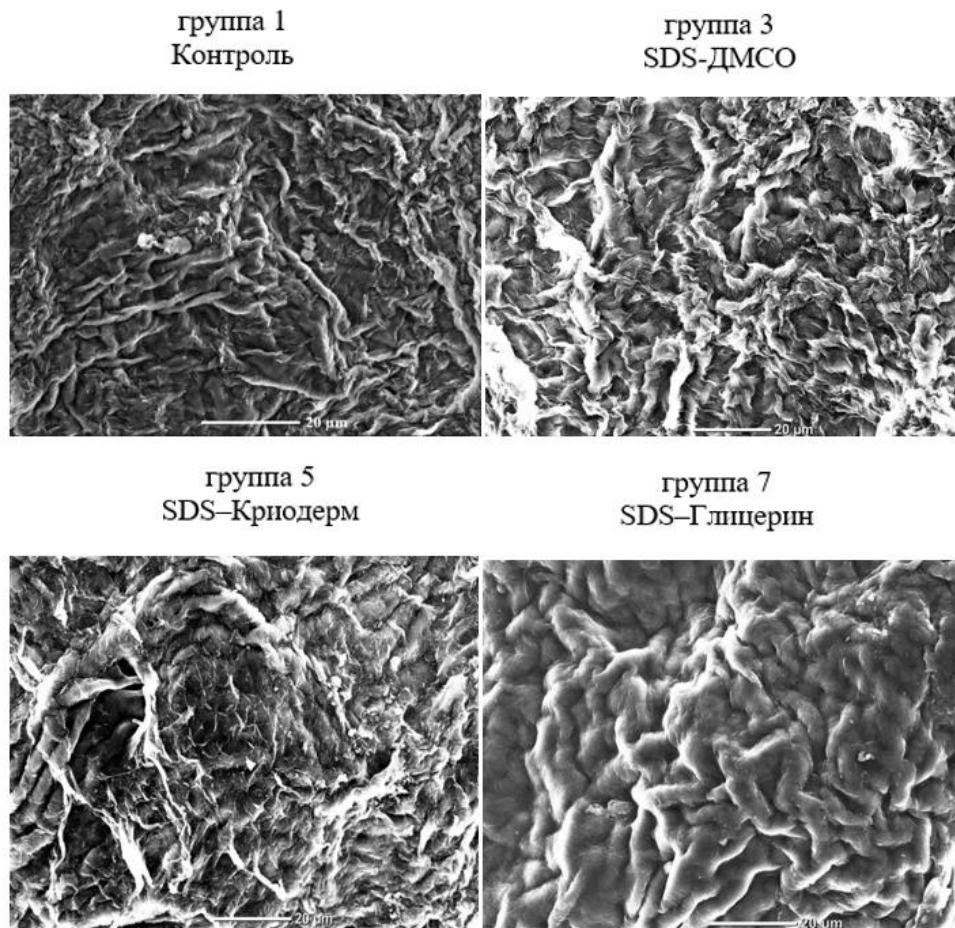


Рисунок – 37. Ультраструктура фибрилл коллагеновых волокон для протокола SDS. Сканирующая электронная микроскопия. x 1000

Хотя группа 4 (NaCl–Криодерм) и группа 2 (NaCl–ДМСО) статистически не различались между собой и с контрольной группой ($p \geq 0,05$). Тем не менее, в группе 4 отмечалось незначительное изменение состояния фибрилл, а криопротектор глицерин является непригодным для хранения ЛМ, обработанного протоколами NaCl и SDS. Полученные данные СЭМ сопоставимы с результатами спектрофотометрического исследования прозрачности децеллюляризованных ЛМ после криоконсервации в трех протекторах. В связи с чем, можно предположить о существующей взаимосвязи между толщиной фибрилл коллагеновых волокон и светопропускной способностью образцов.

3.2.4. Результаты анализа стерильности криоконсервированного лентикулярного материала после децеллюляризации

По результатам Санитарно-бактериологического исследования образцов на стерильность в течение 14 дней наблюдения было установлено, что во всех исследуемых образцах визуально не отмечался рост колоний патогенных микроорганизмов (Рисунок 38).

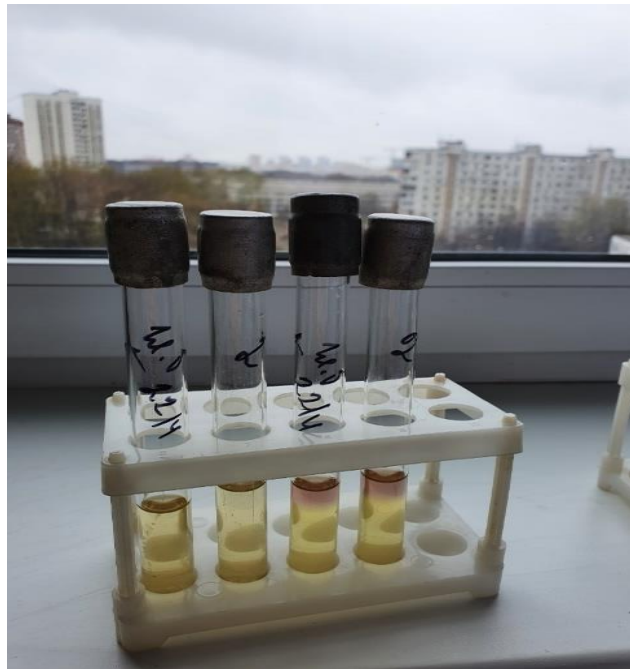


Рисунок 38 Пробирки с питательной средой и образцами на 14 день наблюдения

Таким образом из приведенных выше результатов видно, что добавление ДВ к децеллюляризованным ЛМ перед его криоконсервацией не является обязательным условием сохранности высокой прозрачности образцов. Разработанный протокол криоконсервации ЛМ (1,5М NaCl с нуклеазами в ДМСО) позволяет получать образцы с высокими показателями прозрачности при минимальном нарушении ультраструктуры фибрилл коллагенового матрикса стромы роговицы. Использование глицерина в качестве криопротектора для децеллюляризованного ЛМ (протоколы NaCl и SDS) вызывает грубое нарушение ультраструктуры матрикса и снижение прозрачности образцов, что было подтверждено данными спектрофотометрии и сканирующей электронной микроскопии. Применение протоколов децеллюляризации с SDS в трех

криопротекторах не обеспечивают необходимой прозрачности роговичной ткани, что было подтверждено результатами спектрофотометрического анализа. Данные протоколы не способны обеспечить высокую прозрачность ЛМ без нарушения ультраструктуры матрикса. Соблюдение строгих условий стерильности на всех этапах подготовки образцов создают благоприятные условия для потенциального применения данных ЛМ в клинических исследованиях.

3.3. Результаты оценки цитотоксичности криоконсервированного лентикулярного материала после децеллюляризации в присутствии кератоцитов

Анализ результатов культивирования кератоцитов в присутствии криоконсервированного лентикулярного материала после децеллюляризации был проведен в следующих направлениях:

- Выживаемость кератоцитов в присутствии криоконсервированного образца после децеллюляризации с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания маркером «Live and Dead»
- Изучение токсического воздействия криоконсервированного образца после децеллюляризации на кератоциты с помощью метода определения повреждения ДНК – метод «ДНК-комет»
- Жизнеспособность кератоцитов в присутствии криоконсервированного ЛМ после децеллюляризации с помощью МТТ–теста

3.3.1. Результаты теста «Live and Dead»

Исследование на цитотоксичность полученной культуры кератоцитов в присутствии ДЛМ после хранения в ДМСО (NaCl-ДМСО) проводили с помощью проточного цитофлуориметра с применением набора «Live and Dead» (Рисунок 39).

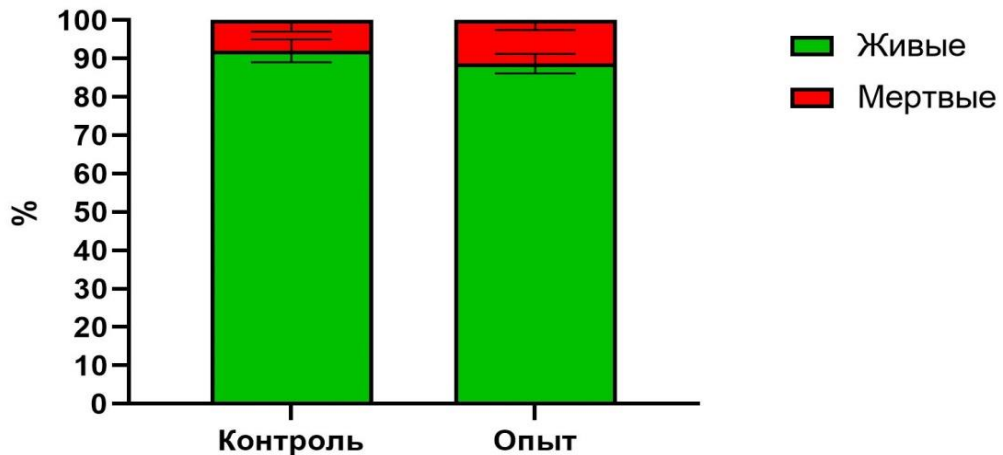


Рисунок 39 – Распределение (%) живых и мертвых клеток в контрольной и опытной группах

Во время проведения лазерной сканирующей конфокальной микроскопии после окрашивания суспензии в контрольных и опытных лунках планшета маркером «Live and Dead» было выявлено, что культура клеток в присутствии ДЛМ после криоаморазивания сохраняет свою жизнеспособность в течение 3 суток наблюдения. Опытные группы в основном были представлены жизнеспособными клетками. Количество мертвых клеток было минимально и не превышало критических значений (Таблица 19).

Таблица 19 – Количество (%) живых и мертвых клеток в лунках, содержащих контрольную и опытную группу

	Живые клетки (%)			Мертвые клетки (%)		
	1	2	3	1	2	3
№ лунки						
лунки с контрольной группой	95	92	89	5	8	11
№ лунки	4	5	6	4	5	6
лунки с опытной группой	86	89	91	14	11	9

3.3.2. Результаты метода «ДНК комет»

В данной части исследования для оценки цитотоксичности был использован метод «ДНК комет», позволяющий проводить детекцию поврежденной ДНК, что в свою очередь, может привести к запуску процессов апоптоза или некроза.

Анализ полученных результатов «ДНК-комет» показал, что ДЛМ после хранения в ДМСО (NaCl-ДМСО) не вызывают выраженных процессов гибели культивируемых клеток (Таблица 20).

Таблица 20 – Результаты «ДНК комет» (усл. ед)

Контроль UV	Контроль	Опыт
3,6 (усл. ед)	0,5698 (усл. ед)	0,6253 (усл. ед)

Контроль UV – клеточная культура с питательной средой, которая находилась в экспозиции под ультрафиолетом в течение 10 минут (уровень максимально возможной гибели клеток). Для опыта использовали суспензию клеток, состоящей в прошлом из обработанного ЛМ и культуры кератоцитов. (Рисунок 40). Для контроля использовали культуру кератоцитов с питательной средой.

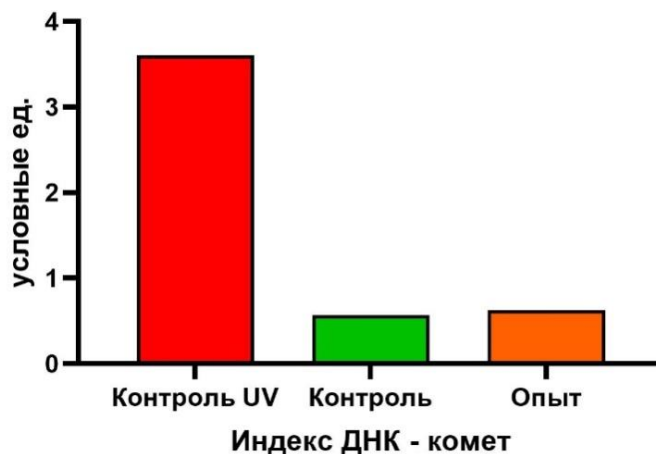


Рисунок 40 – Сравнение индекса «ДНК-комет» (усл. ед) для отрицательного контроля UV, опыта и контроля

3.3.3. Результаты МТТ-теста

МТТ–анализ отражает интенсивность окислительно-восстановительных процессов в клетках. Учитывая, что только клетки с живыми митохондриями могут осуществлять метаболические процессы, в этой связи интенсивность окрашивания зависит от степени неповрежденности митохондрий. Измерение концентрации формазана в растворе после взаимодействия с изопропанолом–2 позволяет оценить количество жизнеспособных клеток. Результаты МТТ-анализа представлены в графическом виде, где показано количество жизнеспособных клеток для опытной и контрольной групп в течение 9 суток наблюдения (Рисунок 41).

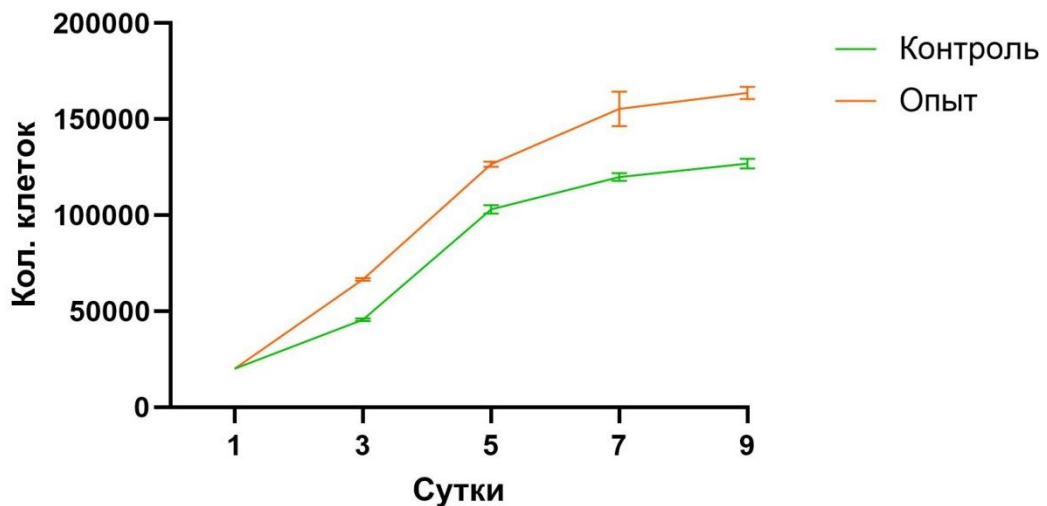


Рисунок 41 – График оценки жизнеспособности опытной и контрольной групп на 1, 3, 5, 7, 9 сутки исследования.

Результаты МТТ–теста в течение 9 суток наблюдения показали отсутствие токсических воздействий как в опытной группе, так и в контрольной группе. Напротив, количество жизнеспособных клеток в контроле и в опыте увеличивалось с течением времени наблюдения (Таблица 21).

Таблица 21 – Результаты МТТ–теста

№ лунки	Контроль			Опыт		
	1	2	3	4	5	6
Срок наблюдения (сутки)	Количество клеток					
1	20.000	20.000	20.000	20.000	20.000	20.000
3	44.800	46.300	45.600	66.800	65.900	67.100
5	101.250	102.600	105.600	126.80	127.900	125.200
7	119.600	118.100	122.000	145.000	162.000	159.000
9	129.800	125.000	126.000	160.000	165.000	166.000

Таким образом, было установлено, что при культивировании кератоцитов в присутствии криоконсервированного лентикулярного материала после децеллюляризации (1.5M NaCl с нуклеазами в ДМСО) жизнеспособность клеток сохраняется в течение 9 суток по данным МТТ-теста (опыт – 1 сутки: 20.000; 20.000; 20.000, 9 сутки: 160.000; 165.000; 166.000; контроль – 1 сутки: 20.000; 20.000; 20.000, 9 сутки: 129.800; 125.000; 126.000). По результатам тестирования «Live and Dead» (опыт – живые клетки (%) 86; 89; 91 и «мертвые» клетки (%) 14; 11; 9, контроль – живые клетки (%) 95; 92; 89 и «мертвые» клетки (%) 5; 8; 11) и метода «ДНК-комет» (опыт – 0,6253 усл. ед, контроль – 0,5698 усл. ед) установлено, что кератоциты сохраняли свою жизнеспособность в течение 3-х суток наблюдения, количество «мертвых» клеток было наименьшим и не превышало уровня критических значений. На основании проведенных культуральных и иммуногистохимических методов исследований, были изучены цитотоксические свойства криоконсервированного лентикулярного материала после децеллюляризации. Протокол криоконсервации ДЛМ (1.5MNaCl с нуклеазами в ДМСО) не вызывает токсического воздействия на кератоциты, в связи с чем, данный протокол может быть рекомендован для будущего его применения в клинике.

При подведении итогов по 3-ей главе настоящего исследования был разработан протокол криоконсервации децеллюляризованного лентикулярного материала, позволяющий получать прозрачную, ацеллюлярную ткань с сохраненным коллагеновым каркасом при отсутствии выраженного цитотоксического воздействия на кератоциты в эксперименте *in vitro*. Это дало возможность перейти к следующему этапу диссертационного исследования – имплантации криоконсервированного ДЛМ в строму роговицы с целью коррекции гиперметропии, на основе разработанных математической формулы и диаграммы.

ГЛАВА 4. МАТЕМАТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ОСНОВНЫХ ПАРАМЕТРОВ ЛЕНТИКУЛЯРНОГО МАТЕРИАЛА И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ КОРРЕКЦИИ ГИПЕРМЕТРОПИИ ПРИ ИНТРАСТРОМАЛЬНОЙ КЕРАТОФАКИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ EX VIVO

Целью данной главы является разработка математической формулы и диаграммы, учитывающих параметры лентикулярного материала для достижения коррекции гиперметропии при интрастромальной кератофакии, показанных в эксперименте *ex vivo*. Для достижения этой цели необходимо было решить следующие вопросы:

1. Разработка математической модели и диаграммы, необходимых для коррекции гиперметропии, учитывающих значения толщины и диаметра ЛМ, требуемого рефракционного эффекта, а также значений кератометрии интактной роговицы
2. Проблема, связанная с морфометрической оценкой роговиц после интрастромальной имплантации криоконсервированного ЛМ с учетом математического моделирования, необходимого для достижения желаемой целевой рефракции глаза в эксперименте *ex vivo*

4.1. Разработка математической формулы и диаграммы для расчета параметров лентикулярного материала, необходимого для коррекции гиперметропии при интрастромальной кератофакии

При разработке формулы и диаграммы для расчета параметров лентикулярного материала с целью обеспечения требуемого рефракционного эффекта на роговице был проведен анализ в следующих направлениях:

- Изучение влияния таких факторов, как толщина и диаметр ЛМ, а также требуемый рефракционный эффект на роговице и значения кератометрии

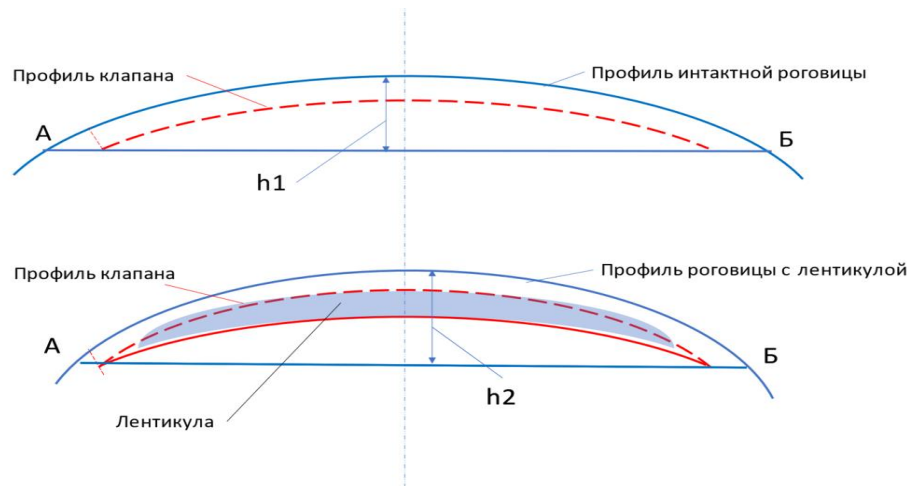
интактной роговицы, на усиление кривизны роговицы после имплантации образцов в ее строму, необходимые для разработки математической формулы

- Изучение необходимых параметров образцов из банка хранения ЛМ путем создания диаграммы, с учетом разработанной математической формулы для коррекции гиперметропии при интрастромальной кератофакии
- Для подтверждения результатов, учитывающих разработанные математическую формулу и диаграмму, было проведено сравнение предлагаемых методик с данными, полученными после кераторефракционной операции по технологии СМАЙЛ

4.1.1. Разработка математической формулы, показывающей влияние параметров глаза и лентикулярного материала на рефракционный эффект роговицы

Коррекция гиперметропии осуществляется путем имплантации ЛМ под клапан, который формируется на внешней поверхности интактной роговицы, в соответствии с законом Барракера (Рисунок 42). Согласно этому закону, эффект «плюс - ткань» приводит к изменениям рефракционной силы роговицы [44].

На первом этапе на передней поверхности интактной роговицы формируется клапан на длине хорды АБ. Высота сегмента h_1 отсекаемая хордой АБ, может быть рассчитана по геометрическим формулам при заданных длине хорды и радиусе кривизны передней поверхности интактной роговицы (верхняя часть рисунка 42). Далее под клапан имплантируется ЛМ, имеющий максимальную толщину по центральной оси. Предполагается, что клапан плотно облегает ЛМ, повторяя его сферический профиль. В результате высота сегмента h_2 , отсекаемая хордой АБ увеличивается на толщину ЛМ (нижняя часть рисунка 42). При этом увеличивается кривизна внешней поверхности роговицы, за счет чего достигается требуемый рефракционный эффект.



Верхняя часть рисунка – формирование клапана на передней поверхности интактной роговицы (профиль клапана выделен красным пунктиром)
 Нижняя часть рисунка – профиль роговицы после имплантации ЛМ под клапан (лентикула выделена голубым цветом)

h_1 и h_2 – высоты сегментов отсекаемых хордой АБ в обоих случаях

Рисунок 42 – Показаны этапы операции.

Из рисунка 42 видно, что максимальная толщина ЛМ (H_L) по центральной оси может быть определена как разность высот сегментов отсекаемых хордой АБ на передней поверхности интактной роговицы до и после имплантации:

$$H_L = h_2 - h_1,$$

где H_L – толщина лентикулярного материала

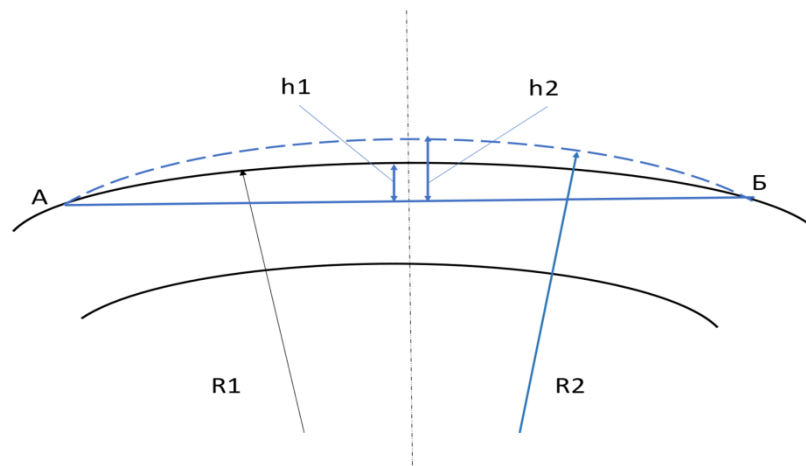
h_1 и h_2 – высоты сегментов отсекаемых хордой АБ в обоих случаях

При выводе формулы и проведении расчетов были сделаны следующие допущения и предположения:

1. Если считать, что имплантация ЛМ происходит в более верхних слоях стромы роговицы, это означает, что радиус кривизны задней поверхности роговицы при имплантации ЛМ не изменяется.

2. Считается, что показатель преломления ЛМ такой же, как и у стромы роговицы, то есть, изменяется единственная оптическая преломляющая поверхность - передняя, на границе сред «роговица-воздух».
3. Как указывалось выше, облегание имплантата считается идеальным, краевые эффекты на клапане не учитываются.
4. Так как толщина ЛМ намного меньше его диаметра, а разрез стромы под клапан выполняется максимально приближенным к его диаметру, то в качестве длины хорды приближенно принимается диаметр ЛМ (S), скорректированный на коническую константу роговицы.

Фактически, задача вычисления толщины ЛМ (H_L) сводится к чисто геометрической задаче определения высот сегментов h_1 и h_2 при заданных длине хорды АБ и радиусах кривизны передней поверхности роговицы (R_1, R_2) (Рисунок 43). Отметим, что радиус передней поверхности после имплантации ЛМ R_2 определяет требуемый рефракционный результат.



R_1 – радиус кривизны передней поверхности интактной роговицы

R_2 – радиус кривизны передней поверхности роговицы поле имплантации ЛМ

h_1 - высота сегмента, отсекаемая хордой АБ, на интактной роговице

h_2 – высота сегмента, отсекаемая хордой АБ, после имплантации ЛМ

Рисунок 43 – Дальнейший расчет толщины ЛМ (ЛМ на рисунке не указан)

Определение исходных данных для расчета:

1. В качестве длины хорды АБ принимался S (мм), скорректированный на среднюю коническую константу роговицы.
2. Радиус кривизны интактной роговицы, R_1 (мм), рассчитывался на основании данных кератометрии глаза до операции (K) в дптр. K – среднее значение кератометрии в центре роговицы. Коэффициент перевода оптической силы в радиус кривизны (дптр в мм) принимался, на основании сопоставления 2-х шкал кератометра в дптр и в мм, равным 337,5.
3. Радиус кривизны передней поверхности роговицы R_2 после имплантации ЛМ, определялся на основании кератометрии глаза (K) до операции, скорректированной на заданный рефракционный эффект, приведенный к поверхности роговицы (Ef , дптр).
4. Заданный рефракционный эффект, приведенный к поверхности роговицы (Ef) может быть определен с помощью очковой коррекции, пересчитанной на вертексное расстояние (12 мм).

Конечная формула для расчета толщины ЛМ (H_L) необходимого для коррекции гиперметропии имеет следующий вид:

$$H_L = \left(\frac{\left(\frac{337,5}{K} - \sqrt{\left(\frac{337,5}{K} \right)^2 - 0,8 \left(\frac{S}{2} \right)^2} \right)}{0,8} - \frac{\left(\frac{337,5}{K - Ef} - \sqrt{\left(\frac{337,5}{K - Ef} \right)^2 - 1,2 \left(\frac{S}{2} \right)^2} \right)}{1,2} \right) \times 1000$$

где 337,5 – коэффициент перевода оптической силы роговицы (дптр) в радиус кривизны (мм)

0,8 – значение средней конической константы роговицы до операции

1,2 – значение средней конической константы роговицы после операции

1000 – переводной коэффициент (мкм)

H_L – толщина лентикулярного материала (мкм)

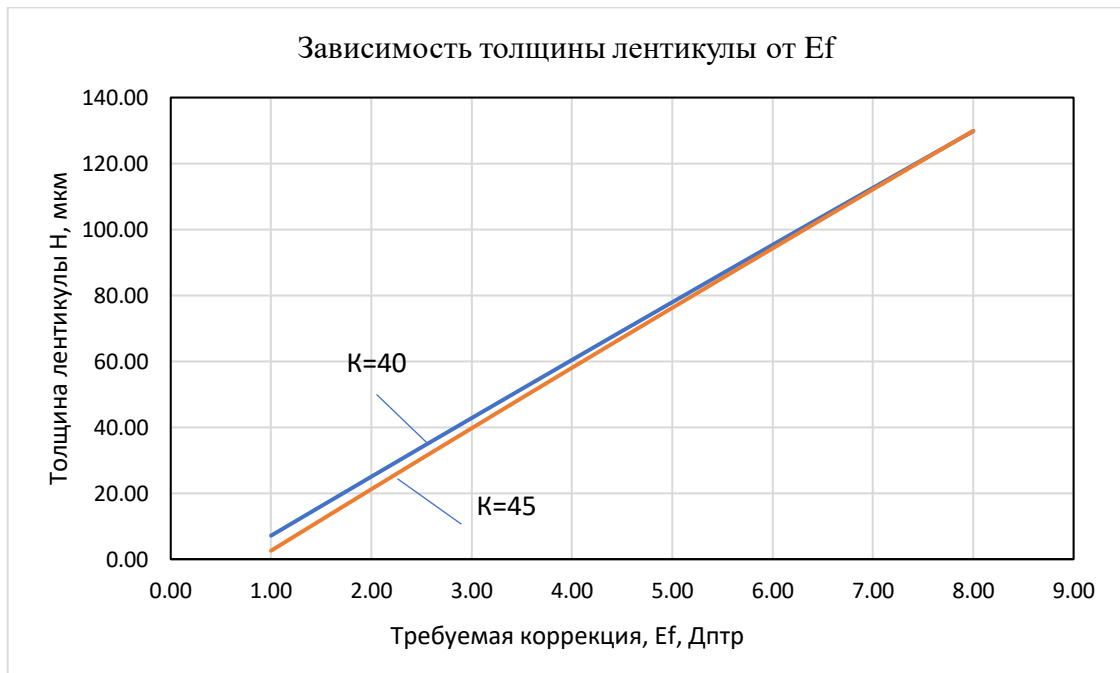
K – среднее значение кератометрии в центре роговицы (дптр)

S – диаметр лентикулярного материала (мм)

E_f – заданный рефракционный эффект, приведенный к поверхности роговицы (дптр)

Формула была использована далее для параметрического исследования влияния K , E_f и S на N_L , а также для оценки влияния погрешности исходных параметров на величину рефракционного эффекта.

Из представленной выше формулы видно, что N_L зависит от трех основных параметров: требуемого рефракционного эффекта на роговице (E_f), значений кератометрии интактной роговицы (K) и диаметра ЛМ (S) (Рисунок 44). Возможный диапазон изменений K принимался от 40 дптр до 45 дптр, S был постоянным и составлял 6.5 мм.



верхняя линия $K=40$ (синий цвет)

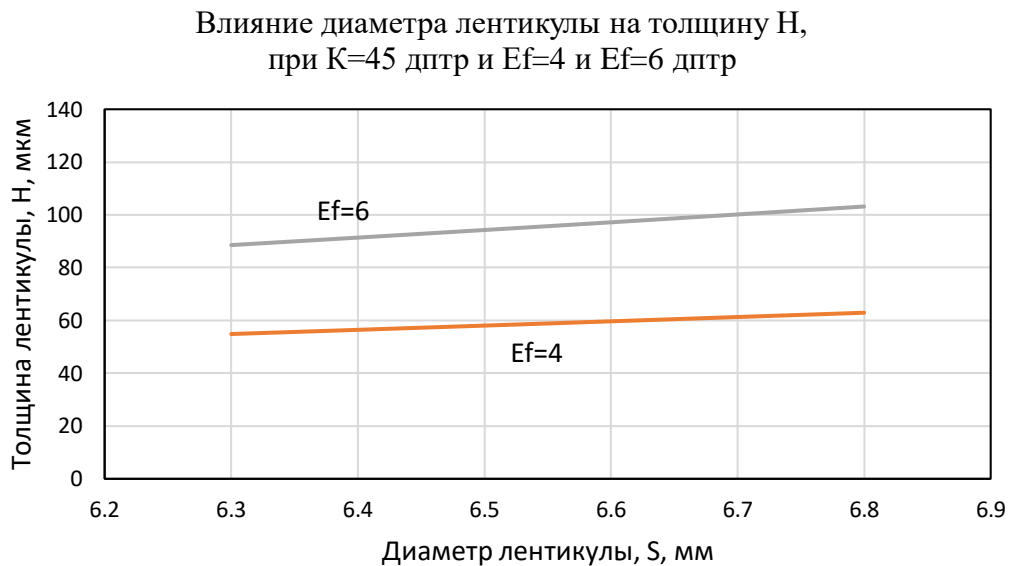
нижняя линия $K=45$ (красный цвет)

Рисунок 44 – Зависимость N_L (мкм) от рефракционного эффекта на роговице E_f (дптр.) при $S=6,5$ мм

На представленном графике видно, что изменение рефракционного эффекта от 1 дптр до 8 дптр, требует практически линейного увеличения толщины ЛМ от 10 мкм до 140 мкм. При этом влияние оптической силы интактной роговицы K в диапазоне от 40 дптр до 45 дптр, (при изменении примерно на 11%) слабо влияет

на толщину ЛМ. Следует иметь в виду, что на практике величина рефракционного эффекта не является величиной независимой, и должна определяться для каждого глаза индивидуально для каждого значения K с помощью очковой коррекции, скорректированной на вертексное расстояние (12 мм). Кроме того, необходимо учитывать не только недостаточность оптической силы передней поверхности роговицы, но и эффект короткого глаза.

На рисунке 45 представлен график, показывающий влияние диаметра ЛМ (S) на его толщину H_L при заданных значениях рефракционного эффекта $E_f = 4$ и $E_f = 6$.



$E_f = 4$ (красная линия)

$E_f = 6$ (серая линия)

Рисунок 45 – Зависимость заданных значений рефракционного эффекта от толщины ЛМ и его диаметра

Из графика видно, что значения E_f зависят от увеличения S сопряженного с увеличением H_L . Так, при $E_f = 6$ дптр увеличение S от 6,3 мм до 6,8 мм, что в процентном отношении составит 8%, потребует увеличения H_L соответственно от 88,5 мкм до 103,1 мкм или почти на 16%. Эти данные необходимо учитывать при выборе образца из банка ЛМ.

4.1.2. Диаграмма для выбора образца из банка лентичулярного материала для коррекции гиперметропии

После того, как на основе очковой коррекции, с последующим пересчетом на вертексное расстояние, определено значение требуемого рефракционного эффекта на роговице E_f , встает задача подбора соответствующего ЛМ из банка хранилищ. Очевидно, что не всегда удастся подобрать ЛМ с параметрами N_L и S в точности равными тем, которые, согласно расчетам, обеспечат требуемый рефракционный эффект. В связи с этим возникает вопрос насколько значимо будет отклонение рефракционного эффекта от запланированного, при отклонении параметров ЛМ от их оптимальных значений.

Для этого нами были составлены диаграмма значений E_f в системе координат N_L и S (Рисунок 46). По вертикальной оси отложены значения N_L (мкм), по горизонтальной оси – S (мм). Цифрами от 1 до 8 указаны значения требуемого рефракционного эффекта на роговице E_f (дптр), которые определяются на основании очковой коррекции с пересчетом на вертексное расстояние. Диапазон возможных значений коррекции рефракции на роговице, который может встретиться на практике, принимался равным от 1 дптр до 8 дптр. Для каждого значения E_f рассчитана своя кривая по выше приведенной формуле.

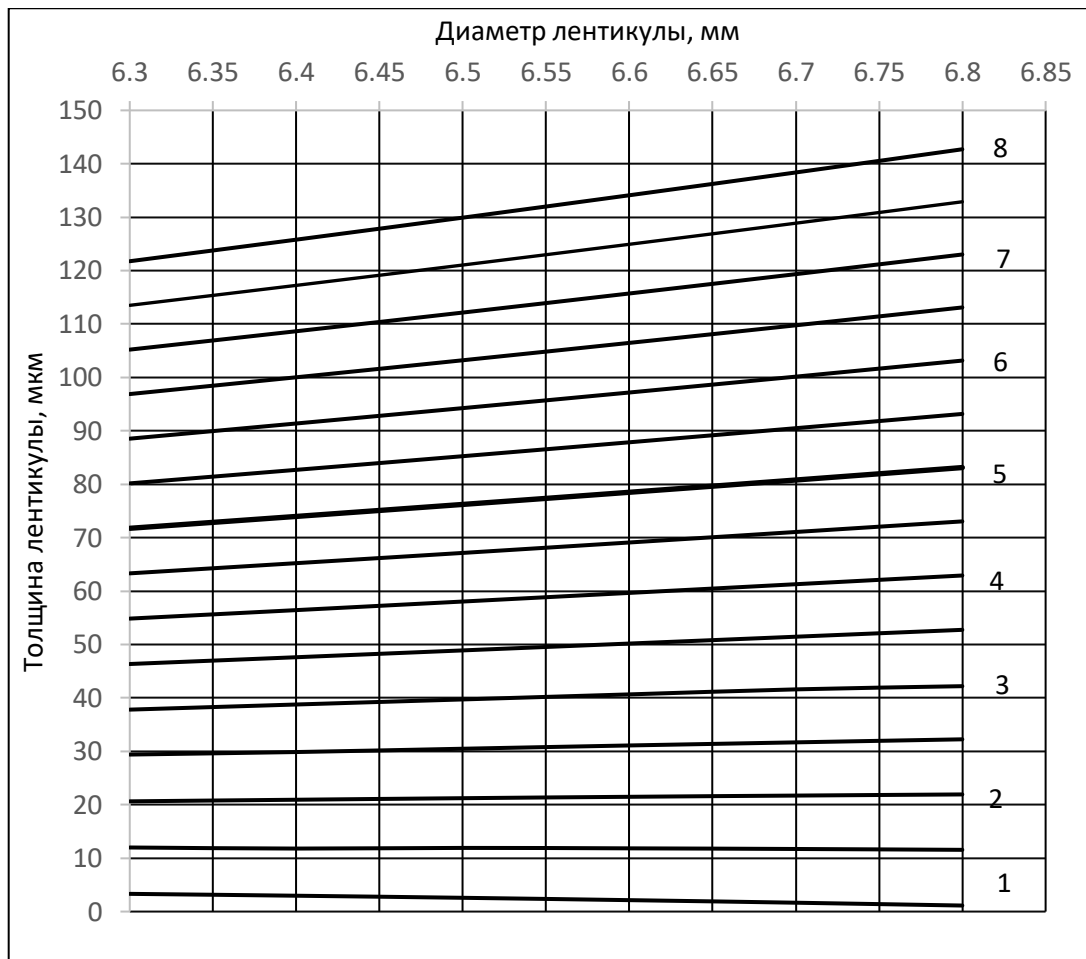


Рисунок 46 – Диаграмма для выбора ЛМ из банка, где хранятся образцы

Из графика видно, что для каждого значения E_f , соответствующая N_d (мкм) лежит в достаточно узких пределах и зависит от S (мм). Так, например, при $E_f = 5$ дптр N_d (мкм) должна лежать в пределах от 71 мкм до 83 мкм в зависимости от его S (мм), который может изменяться от 6,3 мм до 6,8 мм. При этом, чем «толще» образец, тем больше должен быть его диаметр.

Данная диаграмма также позволяет оценить возможное отклонение рефракционного эффекта при выборе ЛМ. Допустим, что величина требуемой коррекции рефракции составляет 6 дптр. В соответствии с диаграммой для коррекции 6 дптр требуется образец с параметрами N_d от 88 мкм до 103 мкм: = 113 мкм, при S = от 6,3 мм до 6,8 мм. Предположим, что в банке хранилищ имеется ЛМ, полученный при коррекции сферической миопии 6 дптр с параметрами: N_d = 113 мкм, S = 6,5 мм. В данном случае при имплантации в строму роговицы образца

с этими параметрами ($H_L = 113$ мкм, $S = 6,5$ мм) мы рискуем получить эффект гиперкоррекции, примерно равной 1 дптр (Рисунок 47)

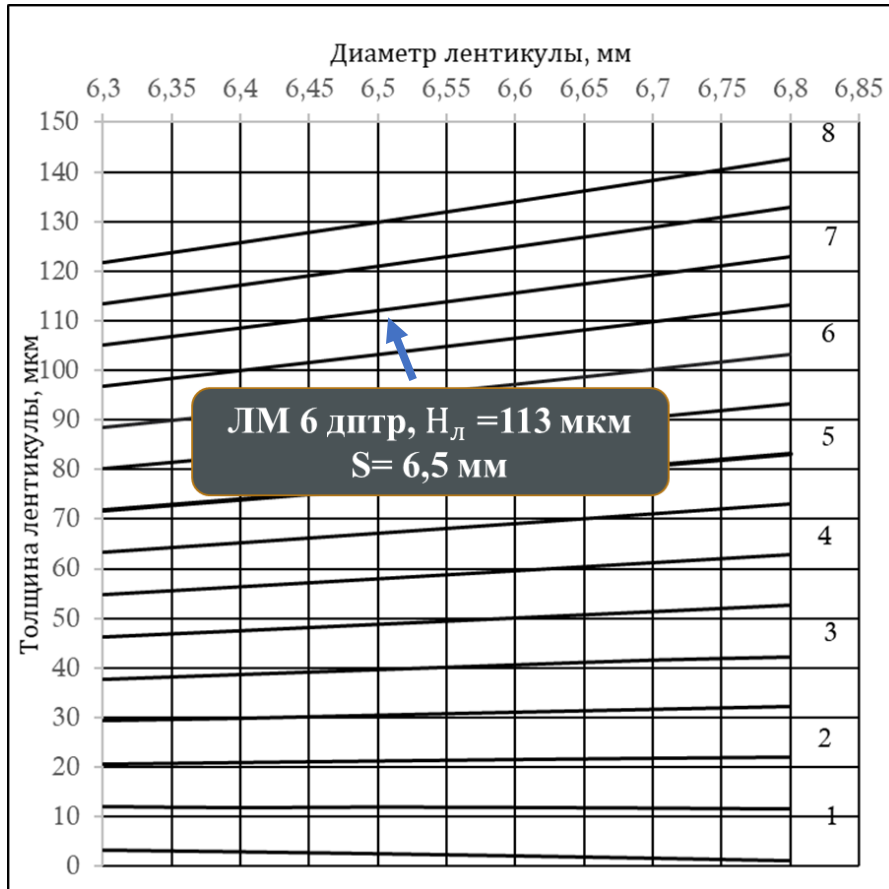


Рисунок 47 – Результат эффекта гиперкоррекции (1 дптр) при имплантации ЛМ 6 дптр с $H_L = 113$ мкм, $S = 6,5$ мм в строму роговицы глаза

Однако, следует отметить, что в случае гиперкоррекции возможна дополнительная абляция образца после поднятия лоскута, с целью уменьшения рефракционного эффекта. Возможность дополнительной абляции аутологичной ЛМ после поднятия лоскута для уменьшения рефракционного эффекта была реализована в клинике на базе головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. В соответствии с этим был получен патент РФ на изобретение № 2733319 с приоритетом от 01.10.2020. «Способ коррекции высокой степени миопии у пациентов с тонкой роговицей». Авторы: Костенев С.В., Борзенко С.А., Мушкова И.А., Ли В.Г.

4.1.3 Сравнение предлагаемой методики математического моделирования с расчетами из другого источника

В данном разделе проводилось сравнение предлагаемой методики математического моделирования с расчетами, полученными после операции СМАЙЛ. Если исходить из предположения, что разработанные выше формула и диаграмма могут быть применимы не только в случае коррекции гиперметропии путем имплантации ЛМ в строму роговицы, но и в случае коррекции миопии посредством формирования и удаления лентиккулы, как при методике СМАЙЛ. В последнем случае, высота сегмента (h) не увеличивается, а наоборот уменьшается, что приводит к отрицательному значению коррекции рефракции на роговице, позволяющей корригировать миопию. При этом методика расчета и сама формула не изменяются. Кроме того, что в качестве требуемого рефракционного эффекта на роговице задается отрицательное значение E_f . При этом расчетная величина N_L будет иметь отрицательное значение. Знак «-» перед N_L указывает на то, что ЛМ должна быть удалена, соответственно толщина роговицы по центральной оси будет уменьшена.

На рисунке 48 показана зависимость N_L от положительного и отрицательного рефракционного эффекта E_f на роговице (сплошная красная линия), рассчитанная по предлагаемой методике. Область положительных значений E_f и N_L , соответствует области коррекции гиперметропии, область со знаком «-» коррекции миопии. Если распространить результаты расчетов в область миопии, мы получаем возможность провести их сравнение с расчетами компьютера, которым оснащена лазерная установка VisuMax («Carl Zeiss Meditec», Германия). Для этого были взяты расчетные параметры лазера N_L и S в случаях ранее проведенной коррекции миопии и миопического астигматизма с помощью технологии СМАЙЛ. Количество образцов для графического представления составляло 30 штук. Были выбраны расчетные данные с постоянным $S = 6,5$ мм; диапазоном рефракционного эффекта на роговице от -2 дптр до -8 дптр, которому соответствует диапазон изменения N_L от 60 до 130 мкм. При этом отбирались расчетные данные с

цилиндром не более $-0,5$ дптр. Используемые для сравнения данные лазера после СМАЙЛ показаны на рисунке 48 точками синего цвета. Знак « \leftarrow » перед значениями N_d указывает на то, что ЛМ будут удалены из стромы роговицы.

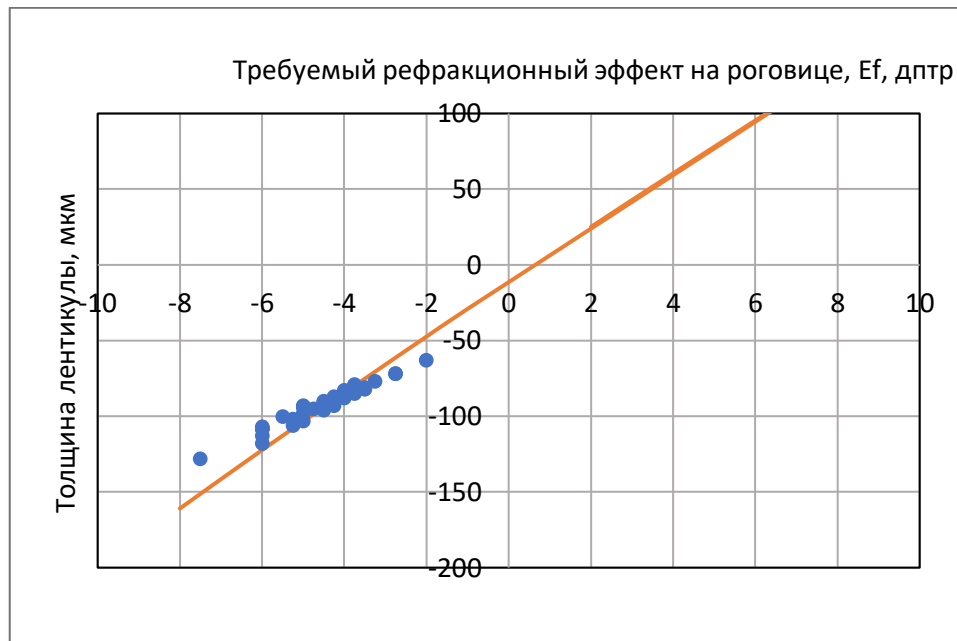


Рисунок 48 – Зависимость толщины ЛМ, от требуемого рефракционного эффекта на роговице

Результаты сравнения на рисунке 48 показывают, что в области коррекции миопии (знак « \leftarrow ») расчеты по предлагаемой методике удовлетворительно совпадают с компьютерными расчетами лазерной установки VisuMax («Carl Zeiss Meditec», Германия).

Таким образом, разработанная формула на основе математического моделирования позволяет функционально связать толщину линтикулярного материала и его диаметра с ожидаемым рефракционным эффектом на роговице после интрастромальной имплантации линтикулярного материала. Для оценки ожидаемого рефракционного эффекта была разработана диаграмма, позволяющая выбирать линтикулярный материал с заданными параметрами толщины и диаметра для коррекции гиперметропии. Для достижения поставленной цели потребовалось провести расчет и анализ наиболее важных параметров линтикулярного материала. Для этого нами были выделены следующие параметры ЛМ: значения толщины и его диаметра, требуемого рефракционного эффекта, значения кератометрии интактной роговицы. Разработка математической модели, функционально

связывающей параметры образца с рефракционным эффектом и параметрами глаза позволило установить степень их влияния на целевой рефракционный эффект, а также выявить наиболее значимые величины, на которые следует обратить внимание при проведении клинических исследований. Кроме того, на основании разработанных математической модели и диаграммы появилась возможность оценить величину ожидаемой погрешности рефракционного эффекта, связанную с возможным отклонением параметров образцов от их оптимальных значений при выборе ЛМ из банка. Следует отметить, что математическое моделирование сложных рефракционных процессов, связанных с хирургическим вмешательством в строму роговицы живого глаза, сопряжены с рядом упрощений и допущений, которые не учитывают таких возможных последствий, как послеоперационные адаптационные процессы. Тем не менее, в условиях новизны разрабатываемого метода, отсутствия широкой клинической практики, методы математического моделирования по сути являются наиболее доступным источником для предварительной оценки ожидаемого рефракционного эффекта.

4.2. Результаты морфометрических изменений до- и после имплантации криоконсервированного лентикулярного материала в кадаверный глаз человека для коррекции гиперметропии

Анализ результатов морфометрических изменений после интрастромальной имплантации криоконсервированного лентикулярного материала был проведен в следующих направлениях:

– Изучение влияния дегидратирующих свойств разных вискоэластиков на толщину криоконсервированных ЛМ с помощью оптической когерентной томографии для возвращения к исходной толщине образца, и позволяющих использовать данный материал после дегидратации, с учетом разработанных математической формулы и диаграммы для коррекции гиперметропии при интрастромальной кератофакии

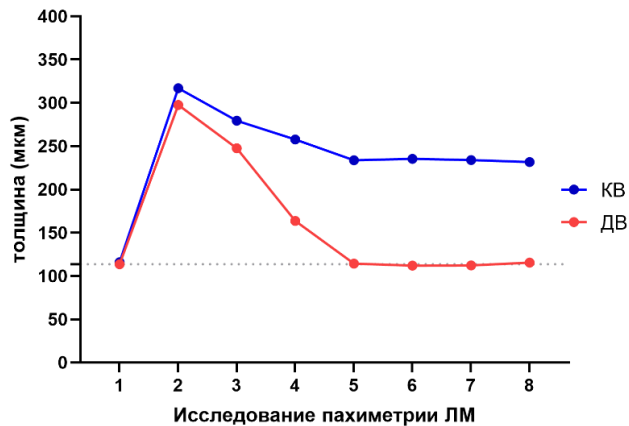
– Изучение возможности усиления рефракции глаза, а также ее толщины до- и после имплантации ЛМ в строму роговицы с помощью методов сканирующей кератотопографии и оптической когерентной томографии, с учетом разработанных математической формулы и диаграммы

4.2.1. Результаты изучения влияния дегидратации на толщину криоконсервированного лентикулярного материала после децеллюляризации

Неспецифический отек, возникающий после децеллюляризации и криоконсервации ЛМ ограничивает возможности применения данного материала для интрастромальной кератофакии. В связи с чем, в данной части исследования изучали дегидратирующие возможности ДВ и КВ с помощью оптического когерентного томографа (Optovue, iVue 100, США). Как видно из рисунка 49 в группе ДВ толщина ЛМ постепенно уменьшается. В интервале от 30 минут до 60 минут (30 минут-114,18±17,6 мкм (114,5 (103,75-120,7), 40 минут-111,9±16,7 мкм (111,5 (102,75-117,75), 50 минут-112,18±16,8 мкм (113 (100,5-121,5), 60 минут-115,36±17,8 мкм (118 (104-122,5)) она становится постоянной и находится на уровне приближенным к исходным данным толщины (113,54±18,49 мкм (115 (104-120,75), полученным из фемтосекундного лазера VisuMax («Carl Zeiss Meditec», Германия). Статистический анализ попарного сравнения групп с парным t-критерием и с поправкой Холма для множественных сравнений не выявил различий данных от 30 минут до 60 минут с исходными данными лазера ($p \geq 0,05$).

В группе с использованием КВ также наблюдается постепенное снижение толщины образцов, в интервале от 30 минут до 60 минут показатели также выходят на плато (30 минут-233,69±38,03 мкм (245 (210-254), 40 минут-235,3±38,06 мкм (246 (214-257), 50 минут-233,91±38,78 мкм (244 (211-254,5), 60 минут-231,52±38,49 мкм (246 (204,5-253,5)). Статистический анализ выявил различия при сравнении данных от 30 минут до 60 минут с данными лазера (115,78±18,05 мкм (119 (106,5-

125,5) ($p \leq 0,05$). Тем не менее, применение КВ приводит к недостаточному дегидратирующему эффекту (Рисунок 49).



КВ – когезивный вискоэластик

ДВ – дисперсный вискоэластик

1-исходная толщина ЛМ (данные лазера)

2-толщина криоконсервированного ДЛМ

значения от 3 до 8 соответствуют времени измерения толщины образцов после добавления вискоэластиков к ним

(измерения проводились каждые 10 мин, в течение 60 минут)

Рисунок 49 – Исследование пахиметрии (мкм) образцов после добавления к ним разных вискоэластиков

Использование ДВ (от 30 минут до 60 минут) в качестве дегидратирующей среды, с целью возвращения к исходной толщине отечного криоконсервированного ДЛМ (NaCl-ДМСО) является целесообразным и позволит применять данный материал для интрастромальной кератофакии.

4.2.2. Результаты изучения возможности усиления рефракции глаза, а также его толщины до- и после имплантации ЛМ в строму роговицы

Достижение эффекта необходимого для коррекции гиперметропии осуществлялось путем имплантации ЛМ под фемтосекундный клапан (130 мкм), который формировался на внешней поверхности интактной роговицы кадаверного

глаза с учетом разработанных формулы и диаграммы представленных в главе 4.1. ЛМ (n=10) был получен при коррекции миопии среднее значение которого составляло $-4,6 \pm 0,96$ дптр. Перед имплантацией в роговицу кадаверного глаза (n=10), образцы (n=10) предварительно помещали в ДВ за 30 минут до начала хирургического этапа.

Морфометрические изменения кадаверных глаз определялись до- и после имплантации ЛМ в строму роговицы, которые изучали с помощью методов Pentacam в пределах 7-миллиметровой зоны (K_m , дптр) и ОКТ (центр образца, мкм) при постоянной нормотензии глаза (тонометрия по Маклакову, около 15 мм.рт.ст.)

Результаты эксперимента *ex vivo* представлены в таблицах 22 и 23.

Таблица 22 –Результаты Pentacam - средние значения передней поверхности роговицы K_m (дптр) в 7-миллиметровой зоне до- и после имплантации ЛМ в кадаверный глаз при толщине и диаметре образцов после добавления ДВ к ним, а также достигнутая коррекция гиперметропии с учетом разработанной диаграммы.

№ образца (кадаверный глаз)	Диаметр ЛМ (мм)	Методы исследования			Достигнутая коррекция
		ОКТ - (мкм)	Pentacam – K_m (дптр) в 7-миллиметровой зоне (кадаверный глаз)		
		Толщина ЛМ после имплантации в кадаверный глаз	До имплантации ЛМ	После имплантации ЛМ	
1	6,5	94	44,8	51,2	+6,0
2	6,5	77	45,8	50,6	+5,0
3	6,5	66	44,2	48,7	+4,5
4	6,5	103	43,4	49,9	+6,5
5	6,5	113	44,5	51,7	+7,0
6	6,5	104	45,1	51,5	+6,5
7	6,5	85	43,7	49,2	+5,5
8	6,5	114	44,4	51,3	+7,0
9	6,7	89	45,1	50,6	+5,5
10	6,5	122	44,1	51,6	+7,5

Таблица 23 – Результаты ОКТ (мкм) исследования до- и после имплантации ЛМ

Метод исследования	ОКТ - толщина в центре образца (мкм)			
	Исходная толщина ЛМ до имплантации (данные лазера)	Толщина ЛМ после имплантации в кадаверный глаз	Толщина роговицы до имплантации ЛМ (кадаверный глаз)	Толщина роговицы после имплантации ЛМ (кадаверный глаз)
№ образца				
1	94	94	702	796
2	76	77	722	799
3	68	66	713	779
4	102	103	705	808
5	111	113	710	823
6	103	104	707	811
7	85	85	705	790
8	112	114	698	812
9	90	89	731	820
10	120	122	714	836

Пример 1

Согласно предложенной диаграмме (представленной в главе 4.1.2.) для коррекции гиперметропии в +6 дптр потребуется имплантировать ЛМ с параметрами толщины от 88 до 103 мкм в зависимости от диаметра от 6,3 до 6,8 мм. С учетом формулы и диаграммы для коррекции гиперметропии +6 дптр в хранилище образцов ГТБ имеется образец, полученный после операции СМАЙЛ при коррекции миопии -4,5 дптр со следующими параметрами: толщина 94 мкм, диаметр 6,5 мм.

В день эксперимента ex vivo после доставки образца в отдел лазерной рефракционной хирургии головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургии глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России производили измерения исходной толщины роговицы кадаверного глаза (ОКТ, мкм) и кривизны передней поверхности роговицы K_m (Pentacam, 4 MapsRefractive, дптр) в 7-миллиметровой зоне. Далее образец переносили из пробирки, содержащей 1 мл

раствора PBS в пробирку с 1 мл ДВ за 30 минут до начала хирургической процедуры. Измерения до- и после имплантации ЛМ проводились в условиях нормотензии глаза (около 15 мм.рт. ст.).

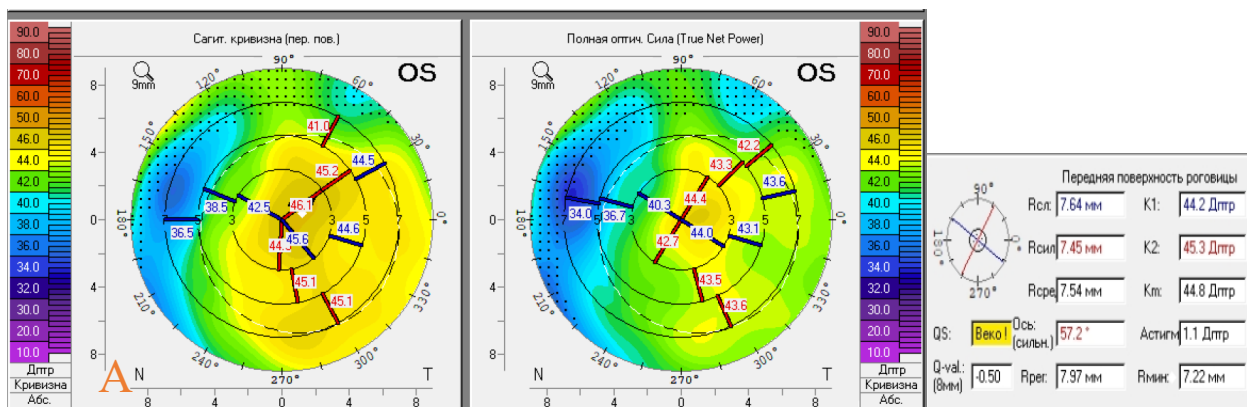
В условиях операционной кадаверные глаза, зафиксированные в держателе (Экспериментально-техническое производство «Микрохирургия глаза», Россия) устанавливали под головной частью фемтосекундного лазера FS200 WaveLight (Alcon, США) (ФСЛ).

Операция состояла из двух этапов. На первом этапе с помощью ФСЛ формировали клапан на ножке (130 мкм) с последующим его откидыванием. На втором этапе образец переносили и центрировали на стромальном ложе роговицы с ориентацией материала передней поверхностью вверх. После этого клапан возвращали на место и накладывали МКЛ.

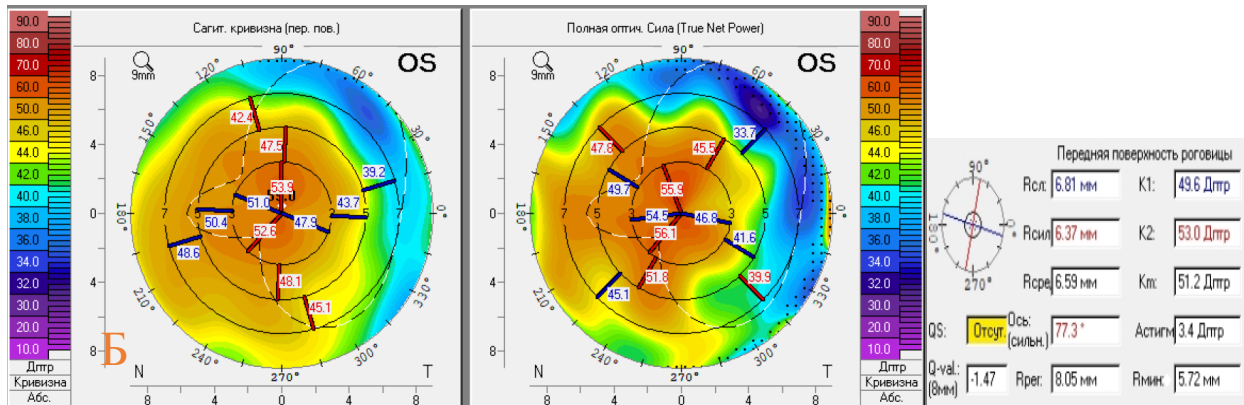
Далее повторяли процедуру измерения толщины кадаверного глаза после имплантации ЛМ (ОКТ, мкм) и передней кривизны роговицы K_m (Pentacam, 4 MapsRefractive, дптр) в 7-миллиметровой зоне.

По результатам Pentacam среднее значение передней кривизны роговицы кадаверного глаза (K_m) до имплантации ЛМ составляло 44,8 дптр, после имплантации ЛМ показатели K_m составляли 51,2 дптр, что соответствовало изменениям передней кривизны роговицы около 6 дптр (Рисунок 50).

До имплантации



После имплантации



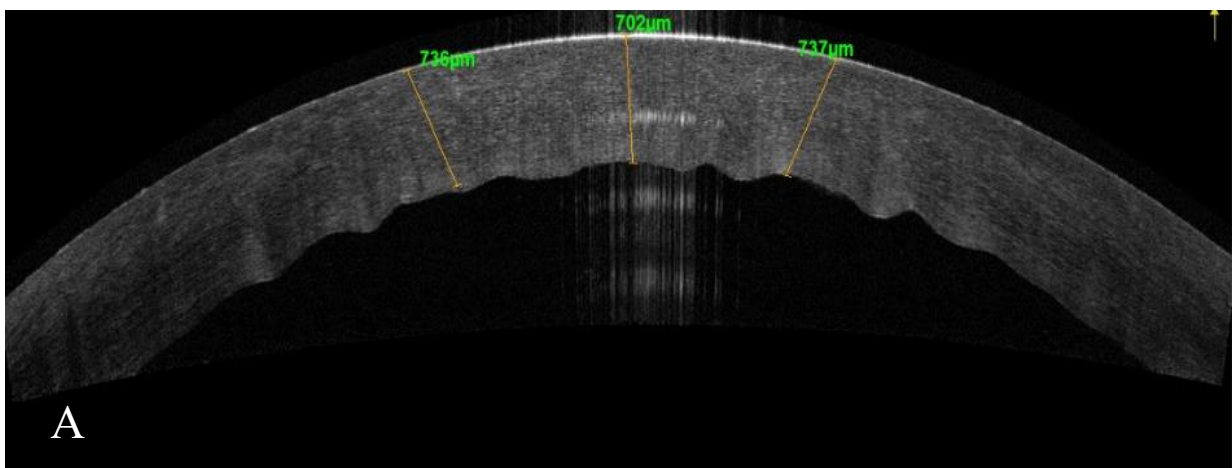
А – результаты кератотопографии до имплантации лентикулярного материала в строму роговицы

Б – результаты кератотопографии после имплантации лентикулярного материала в строму роговицы

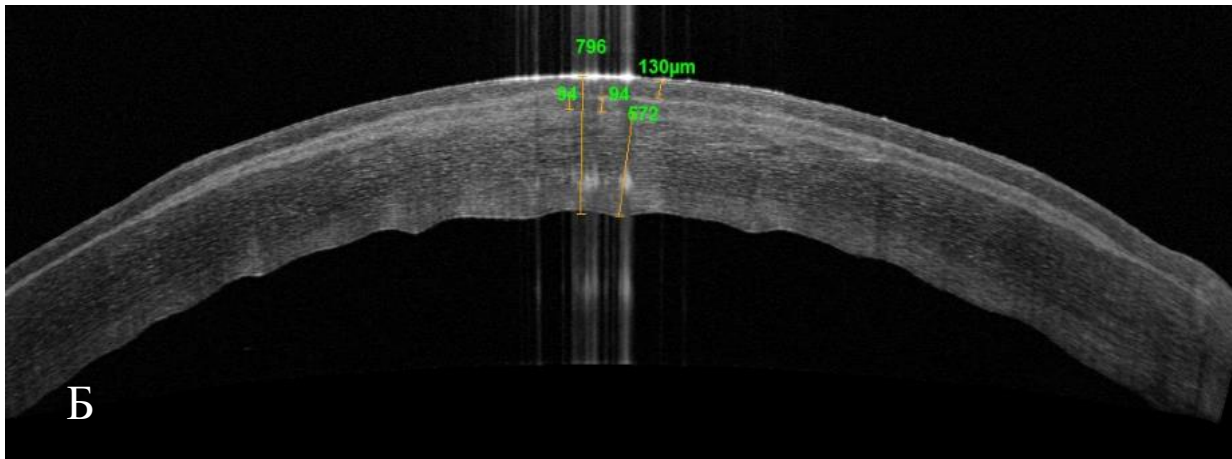
Рисунок 50 – Пример 1. Результаты Pentacam среднее значение передней кривизны роговицы кадаверного глаза (*Kt*, дптр) до- и после имплантации образца в строму роговицы кадаверного глаза

Показатели толщины ЛМ (его толщина 94 мкм, диаметр 6,5 мм), измеренной с помощью ОКТ также изменились: до имплантации толщина роговицы составляла 702 мкм, после имплантации ЛМ толщина составляла 796 мкм, с учетом толщины клапана (130 мкм) сформированного ФСЛ (Рисунок 51).

До имплантации



После имплантации



А – толщина роговицы до имплантации ЛМ в ее строму

Б – толщина роговицы после имплантации ЛМ в ее строму

Рисунок 51 – Пример 1. Результаты ОКТ (мкм) до- и после имплантации образцов в строму роговицы кадаверного глаза

Пример 2

С учетом предложенной диаграммы (представленной в главе 4.1.2.) для коррекции гиперметропии в +5 дптр потребуется имплантировать ЛМ с параметрами толщины от 71 до 83 мкм в зависимости от диаметра от 6,3 до 6,8 мм. С учетом формулы и диаграммы для коррекции гиперметропии +5 дптр в хранилище образцов ГТБ имеется криоконсервированный ДЛМ (NaCl-ДМСО), полученный при коррекции миопии -3,5 дптр. со следующими параметрами: толщина 76 мкм, диаметр 6,5 мм.

В день эксперимента образец транспортировался из ГТБ головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургии глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России в отдел лазерной рефракционной хирургии, где производили измерения исходной толщины кадаверного глаза (ОКТ, мкм) и кривизны передней поверхности роговицы K_m (Pentacam, 4 MapsRefractive, дптр).

Затем образец переносили из пробирки, содержащей 1 мл раствора PBS в пробирку с 1 мл ДВза 30 минут до начала хирургического этапа эксперимента *ex vivo*. Измерения до- и после имплантации образцов проводились в условиях клинической нормотензии (около 15 мм.рт. ст.).

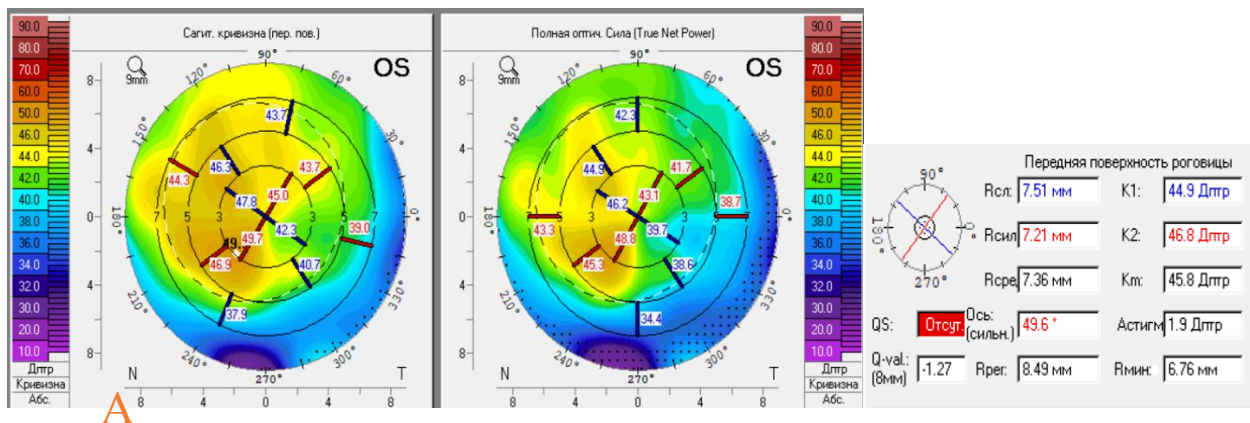
В операционной кадаверные глаза, фиксированные в держателе (Экспериментально-техническое производство «Микрохирургия глаза», Россия) устанавливали под головной частью ФСЛ.

Операция состояла из двух этапов: на первом этапе формировали клапан на ножке (130 мкм) с помощью ФСЛ с последующим его откидыванием. Вторым этапом, образец переносили на стромальное ложе роговицы с его центрацией относительно зрачка. Далее клапан возвращали на исходное место и накладывали МКЛ.

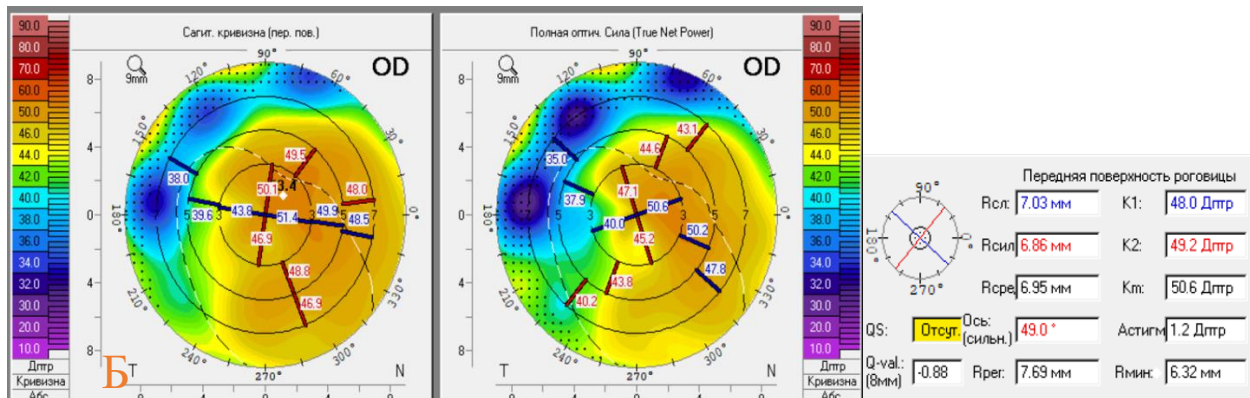
Затем повторяли процедуру измерения толщины кадаверного глаза после имплантации образцов (ОКТ, мкм) и передней кривизны роговицы K_m (Pentacam, 4 MapsRefractive, дптр).

Результаты исследования Pentacam показали, что среднее значение передней кривизны роговицы (K_m) до- и после имплантации ЛМ изменилось с 45,8 дптр до 50,6 дптр, что соответствовало изменениям среднего значения передней кривизны роговицы K_m около 5 дптр (Рисунок 52).

До имплантации



После имплантации



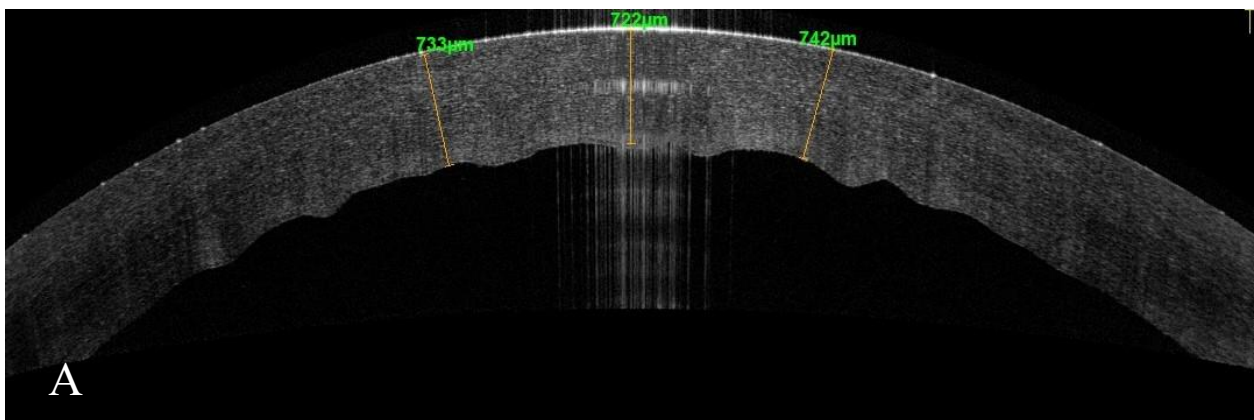
А – результаты кератотопографии до имплантации ЛМ в строму роговицы

Б – результаты кератотопографии после имплантации ЛМ в строму роговицы

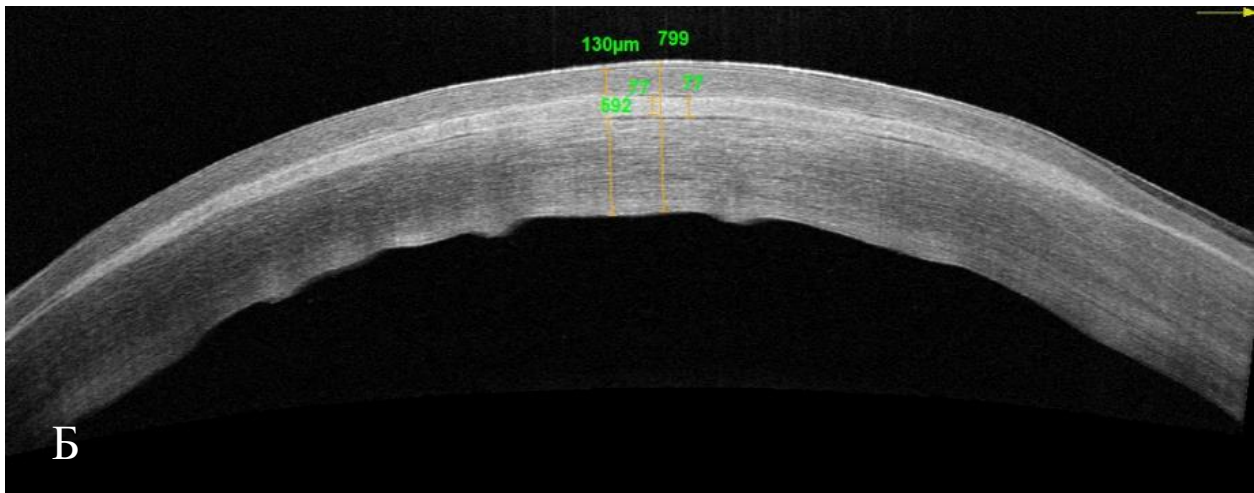
Рисунок 52 – Пример 2. Результаты Pentacam среднее значение передней кривизны роговицы кадаверного глаза (K_m , дптр) до- и после имплантации образцов в строму роговицы кадаверного глаза

Показатели изменения толщины роговицы (параметры образца ЛМ после добавления ДВ: толщина 77 мкм, диаметр 6,5 мм), измеренной с помощью ОКТ также изменились с 722 мкм до 799 мкм до- и после имплантации ЛМ, соответственно (Рисунок 53).

До имплантации



После имплантации



А – толщина роговицы до имплантации ЛМ в ее строму

Б – толщина роговицы после имплантации ЛМ в ее строму

Рисунок 53 – Пример 2. Результаты ОКТ (мкм) до- и после имплантации образцов в строму роговицы

Таким образом, предложенные формула и диаграмма для расчета могут быть рекомендованы для предварительной оценки ожидаемого рефракционного эффекта, при коррекции гиперметропии путем имплантации ЛМ в строму роговицы кадаверного глаза. Применение ДВ в качестве дегидратирующей среды в интервале от 30 минут до 60 минут, приводит к возвращению исходной толщины набухшего после криоконсервации ДЛМ (1,5М NaCl с нуклеазами в ДМСО) и позволяет использовать данный роговичный материал для интрастромальной кератофакии при коррекции гиперметропии. Поверхностная имплантация ДЛМ после криоконсервации (1,5М NaCl с нуклеазами в ДМСО), полученного в результате коррекции миопии в среднем $-4,6 \pm 0,96$ дптр под фемтоклапан (130 мкм) способствует достижению целевой коррекции гиперметропии в среднем $+6,1 \pm 0,96$ дптр в соответствии с разработанными формулой и диаграммой. Для использования в клинике с целью коррекции гиперметропии рекомендуется применять ЛМ с меньшей диоптрийной силой, чем ожидаемая коррекция. Так, для

коррекции гиперметропии от +2,0 дптр до +4,0 дптр рекомендуется применять интраокулярные способы коррекции или лазерную кераторефракционную хирургию из-за более прогнозируемых постоперационных результатов. Данная необходимость продиктована тем, что для коррекции гиперметропии в +4,0 дптр потребуется ЛМ со следующими параметрами: толщина от 56 мкм до 62 мкм, диаметр от 6,3 мм до 6,8 мм, что соответствует диоптрийной силе образца около 2,5 дптр, полученного при сферической коррекции миопии по технологии СМАЙЛ. В клинической практике технология СМАЙЛ для коррекции миопии слабой степени проводится значительно реже по сравнению с операциями по поводу миопии средней и высокой степеней. Следует отметить, что при накоплении клинического материала потребуются некоторые корректировки диаграмм с учетом механизмов заживления послеоперационной раны и эффекта ремоделирования переднего эпителия роговицы в послеоперационном периоде, однако сама методология выбора материала с учетом использования разработанной математической формулы останется неизменной.

При подведении итогов по 4-ой главе настоящего исследования были разработаны математически обоснованные формула и диаграмма, учитывающие параметры лентикулярного материала и исходной роговицы, позволяющие добиваться коррекции гиперметропии при интрастромальной кератофакции в эксперименте *ex vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящий момент проблема нехватки донорской роговичной ткани в глазных банках является актуальной [69]. Недавнее глобальное исследование показало, что на каждые 70 человек, нуждающихся в пересадке донорской роговицы, приходится только один роговичный трансплантат. Однако, несмотря на бессосудистую природу роговицы, отторжение роговицы является наиболее частой причиной осложнений после ее трансплантации [178, 177].

Фемтосекундная лазерная технология СМАЙЛ (Small Incision Lenticule Extraction – SMILE), позволяет корригировать миопию и миопический астигматизм путем формирования в строме лентикулярного материала с последующим его извлечением. В данной ситуации ЛМ является побочным продуктом технологии СМАЙЛ, что в условиях острого дефицита донорской роговичной ткани открывает широкие возможности для его использования в клинической практике, а именно для интрастромальной кератофакии [137, 37]. Известно, что еще со времен Х. Барракера предпринимались попытки использовать донорский роговичный материал после криоконсервации для интрастромальной кератофакии [44, 176, 99]. Однако для данной технологии было характерно наличие следующих осложнений: отсутствие стабильности послеоперационной рефракции, появление послеоперационного астигматизма, а также высокая частота случаев врастания эпителия и отека роговицы. Важно отметить, что технологии криосохранения роговичных тканей с тех пор постоянно развивались. Тем не менее, принципы для понимания рефракционной интрастромальной кератофакии, заложенные Х. Барракером выдержали испытание временем и до сих пор являются актуальными при лечении различных видов кератэктазий, гиперметропии, пресбиопии и миопического астигматизма [153].

В современной литературе существуют данные о применении ЛМ, полученного по технологии СМАЙЛ в качестве истинного трансплантата для

интрастромальной кератофакии при лечении различных видов кератэктазий, гиперметропии, пресбиопии, а также для иных терапевтических целей [155]. Однако в большинстве случаев использования ЛМ речь идет о его аллогенной трансплантации [165]. Данный факт означает наличие остаточных ядерных и клеточных компонентов в ткани, что обуславливает увеличение риска развития реакций иммунологического отторжения. С целью решения данной проблемы используются методы децеллюляризации, относящиеся к технологиям тканевой инженерии и регенеративной медицины. Однако, имеющиеся на сегодняшний день данные о децеллюляризации ЛМ носят противоречивый характер и единого мнения по предпочтительному использованию конкретного протокола обработки роговичного материала на данный момент не существует.

В зарубежной литературе также имеются данные о криоконсервации аллогенного ЛМ для решения проблем, связанных с нехваткой донорского материала в глазных банках [71, 37, 155, 125]. В 2019 году сингапурские исследователи высказали идею о создании банка хранилищ для криосохраненных децеллюляризованных ЛМ [155]. Данная идея так и не нашла своей практической реализации в связи с наличием ограничивающих факторов, включающих следующие проблемы: отсутствие оптимального протокола децеллюляризации ЛМ, отсутствие протокола криоконсервации ДЛМ и потенциальной токсичности ДЛМ после криоконсервации. Кроме того, также существуют проблемы отсутствия точных математических формул и диаграмм, учитывающих параметры лентикулярного материала с целью усиления рефракции глаза при интрастромальной кератофакии. Поэтому на данный момент особенно перспективным является создание банка криосохраненных децеллюляризованных ЛМ, позволяющем создать большой пул роговичной ткани в короткие сроки с потенциально неограниченным сроком хранения. В связи с необходимостью разработки оптимальных условий для децеллюляризации ЛМ с последующей его криоконсервацией для использования в рефракционной хирургии роговицы были сформулированы цели и задачи настоящего исследования.

Цель исследования: Разработать технологию криоконсервации децеллюляризованного лентикулярного материала, полученного в процессе фемтосекундных лазерных рефракционных операций, для коррекции гиперметропии в эксперименте.

Задачи

1. Провести сравнительный анализ известных способов децеллюляризации роговичной ткани и выявить из них наиболее оптимальный для лентикулярного материала методами физического, генетического и иммуногистохимического анализов.

2. Разработать протокол криоконсервации децеллюляризованного лентикулярного материала на основании физических и ультраструктурных характеристик методами спектрофотометрии и сканирующей электронной микроскопии.

3. Изучить цитотоксические свойства криоконсервированного лентикулярного материала в присутствии кератоцитов с помощью культуральных и иммуногистохимических методов исследований.

4. На основании математического моделирования произвести расчет параметров лентикулярного материала необходимого для его имплантации в строму роговицы с целью коррекции гиперметропии.

5. Произвести морфометрическую оценку роговиц кадаверных глаз человека после имплантации криоконсервированного лентикулярного материала с учетом результатов математического моделирования методами оптической когерентной томографии и сканирующей кератотопографии.

Исследование было проведено в 2 этапа, соответственно поставленным задачам.

На первом этапе для разработки протокола криоконсервации ДЛМ сначала требовалось выбрать наиболее оптимальный протокол децеллюляризации ЛМ из известных в литературе. Дополнительно в рамках первого этапа проводили сравнение прозрачности нативных образцов в разных транспортировочных средах. Для этого ЛМ переносили в транспортировочных средах из операционной до

лаборатории ГТБ, где проводили спектрофотометрический анализ образцов с целью выбора среды, обеспечивающей большую прозрачность. В зарубежной практике, как правило, транспортировка ЛМ из операционной до лаборатории проводится в два этапа: на первом этапе образцы помещаются во флаконы с раствором PBS или со средой для хранения роговицы, на втором этапе после доставки материала в лабораторию ГБ перед спектрофотометрическим исследованием ЛМ дегидратируют в глицерине, с целью устранения неспецифического отека тканей [89, 196, 195]. Предполагается, что при спектрофотометрическом анализе данный отек может повлиять на точность измерения прозрачности роговичной ткани. В зависимости от используемой среды для транспортировки ЛМ было сформировано 4 группы: группа 1 – «Раствор для хранения роговицы» (среда Борзенка-Мороз) (n=15), группа 2 – «Средство для консервации заднего послойного трансплантата донорской роговицы» (n=12), группа 3 – КВ (n=12), группа 4 – ДВ (n=14). В исследовании в качестве альтернативы глицерину использовались КВ и ДВ.

По результатам исследования прозрачности образцов, исследуемые группы располагались в порядке снижения признака следующим образом: группа 4 - $89,35 \pm 2,38\%$ (89,6 (88,22-90,5)), группа 3 - $87,64 \pm 2,28\%$ (87,89 (86,65-88,9)), группа 2 - $84,85 \pm 2,47\%$ (85,43 (83,65-86,21)); группа 1 - $82,54 \pm 2,57\%$ (82,56 (80,84-84,1)). Было доказано, что использование ДВ в качестве среды для транспортировки образцов дает наилучшие результаты прозрачности $89,35 \pm 2,38\%$ (89,6 (88,22-90,5)). В доступной литературе отсутствуют данные, где проводились исследования в области изучения прозрачности нативного ЛМ в различных транспортировочных средах для спектрофотометрического анализа. Возможно, данное обстоятельство связано с тем, что двухэтапность использования разных сред (PBS, либо среда для хранения роговицы и глицерин) для спектрофотометрического анализа ЛМ не вызывает значимых затруднений для исследования прозрачности роговичной ткани. Однако, в данном исследовании впервые показано, что применение одного ДВ в качестве транспортировочной среды для спектрофотометрии, позволяет проводить измерение прозрачности ЛМ в один этап, тем самым упрощая данную

процедуру. Кроме того, использование ДВ является оправданным, поскольку данная среда нетоксична, обладает по аналогии с глицерином дегидратирующими свойствами и часто используется в офтальмохирургии, что означает ее высокую доступность в операционном блоке. Тем не менее, выбор транспортировочной среды и этапность для спектрофотометрического анализа прозрачности нативных ЛМ остается на усмотрение исследователя.

С целью выбора оптимального протокола децеллюляризации были использованы разные протоколы, и в соответствии с этим были сформированы 4 группы: 1) контроль (нативные образцы); 2) 1,5М раствор NaCl с нуклеазами (NaCl); 3) 0,1% раствор SDS (SDS); 4) 0,25% раствор Трипсин-ЭДТА с нуклеазами и двойным отмыванием в гипотоническом трисбуфере (Трипсин-ЭДТА). Оценку результатов эффективности децеллюляризации проводили с помощью спектрофотометрии, гистологического и иммуногистохимического анализов, СЭМ, а также ДНК-анализа.

При спектрофотометрическом анализе данных было выявлено, что наиболее приближенными к контрольной группе были группы 2 и 3 ($p \geq 0,05$), а в группе 4 наблюдалось значимое снижение прозрачности при сравнении с контролем ($p \leq 0,05$). При проведении гистологического и иммуногистохимического анализов все протоколы децеллюляризации эффективно удаляли клеточный и ядерный материалы. Тем не менее, при сохранности основных компонентов ВКМ в группах 2 и 3, в группе 4 отмечалось значимое повреждение ВКМ.

При анализе СЭМ было показано, что наиболее близкий к контролю являлся результат группы 2, а наибольшая толщина фибрилл коллагеновых волокон наблюдалась в группе 4. Анализ содержания остаточной ДНК, продемонстрировал эффективность всех протоколов децеллюляризации (меньше 50 нг/мг), что соответствовало предложенным Старо с соавт. (2011) требованиям [54]. В группе 4 отмечалось самое низкое содержание остаточного ДНК $13,42 \pm 7,4$ нг/мг (11,45 (8,47-16,86)). В доступной литературе встречаются противоречивые данные при сравнении одних и тех же протоколов децеллюляризации [195, 163]. В настоящем исследовании показано, что протоколы децеллюляризации (NaCl и SDS)

обеспечивают удаление клеточных компонентов из роговичной ткани, ее высокую прозрачность при сохранности ультраструктуры ВКМ, что соответствовало данным литературы [195, 196, 163]. Протокол децеллюляризации – Трипсин-ЭДТА не подтвердил результаты исследователей Nuh M. I. с соавт. (2018), где используемые растворы 0,25% и 0,5% Трипсин-ЭДТА с нуклеазами и двойным отмыванием в гипотрис-буфере показали свою эффективность в сохранении прозрачности ЛМ, удалении ядер и ДНК из ткани [89]. В настоящей работе было показано, что протокол 0,25% Трипсин-ЭДТА с нуклеазами в гипотрис буфере приводит к эффективному удалению клеточных элементов из ЛМ и значимому снижению уровня ДНК- фрагментов в ДЛМ. Однако, вместе с тем, данный протокол оказывал разрушительное воздействие на ультраструктуру ВКМ, что приводило к снижению прозрачности лентикулярного материала. Кроме того, мы считаем, что любое дополнительное введение детергентного вещества к исходному раствору для децеллюляризации вызывало увеличение суммарного агрессивного воздействия на структуру ВКМ роговичной ткани, и как следствие приводило к снижению ее прозрачности [47]. Так, в протоколе с Трипсином-ЭДТА использовались 4 детергентных компонента: 1) Трипсин – фермент; 2) ЭДТА – хелатирующий агент; 3) нуклеазы – ферменты, фрагментирующие ДНК; 4) гипотонический трисбуфер – раствор способный лизировать клетки через осмотический шок, увеличивая при этом проникновение реагентов внутрь ткани [142].

Таким образом, в соответствии с поставленной 1-ой задачей с помощью физического, генетического и иммуногистохимического анализов при проведенном сравнительном анализе известных способов децеллюляризации ЛМ были выявлены 2 наиболее оптимальных протокола – 1) 1,5М NaCl с нуклеазами, 2) 0,1% раствор SDS.

Для решения 2-ой задачи в рамках 1-ого этапа исследования для разработки протокола криоконсервации ДЛМ сначала изучали влияние дегидратации ДЛМ перед его хранением в ДМСО на его прозрачность с помощью спектрофотометрии. Для этого проводили сравнение прозрачности ДЛМ перед хранением в DMSO без

добавления ДВ (NaCl-ДМСО без ДВ) и с добавлением ДВ к образцам (NaCl-ДМСО с ДВ). В соответствии с этим были сформированы три группы: группа 1 – нативные образцы (n=25); группа 2 – NaCl-ДМСО без ДВ (n=19); группа 3 – NaCl-ДМСО с ДВ (n=19). Результаты сравнения групп между собой и контрольной группой не выявили статистически значимой разницы ($p \geq 0,05$). По-видимому, ДВ, обволакивая ткань создает дополнительные ограничивающие условия для проникновения криопротектора в коллагеновые волокна. Хотя, группа 2 является отечной, криопротектор ДМСО лучше проникает в ткань из-за отсутствия барьера в виде ДВ. Известно, что ДМСО является мембранопроникающим криопротектором, способным образовывать прочные водородные связи с молекулами воды, тем самым препятствуя избыточной кристаллизации ткани [13]. Таким образом, дегидратация ДЛМ в ДВ перед его хранением в ДМСО не является обязательным условием для получения образцов с высокими показателями прозрачности.

Далее в исследовании при разработке протокола криоконсервации ДЛМ (NaCl и SDS) использовали три среды (криопротекторы): ДМСО, Криодерм и глицерин. Оценивали результаты прозрачности и ультраструктуры матрикса образцов с помощью методов спектрофотометрии и СЭМ. В соответствии с этим было сформировано 7 групп: 1) Контроль (n=25); 2) NaCl-ДМСО (n=18); 3) SDS-ДМСО (n=16); 4) NaCl-Криодерм (n=17); 5) SDS-Криодерм (n=18); 6) NaCl-глицерин (n=19); 7) SDS-глицерин (n=21). Для метода СЭМ использовалось по 3 образца каждой группы.

Суммируя данные спектрофотометрического исследования, было установлено, что группа 2 (NaCl-ДМСО) является наиболее оптимальной в рамках прозрачности $89,44 \pm 2,68\%$ ($89,52$ ($87,99-91,18$)). По результатам оценки СЭМ анализ данных не выявил достоверной статистической разницы при сравнении следующих групп: 1-2; 1-4; 2-3; 2-4; 3-5; 6-7 ($p \geq 0,05$). Проведенный анализ также показал, что использование криопротектора глицерина является непригодным для хранения образцов, прошедших процедуру децеллюляризации в NaCl и SDS. Wilson с соавт. (2016) сообщали, что глицерин вызывает дополнительную

дезорганизацию коллагена и может маскировать структурные повреждения, вызванные процедурой децеллюляризации [189]. Для группы 2 (NaCl–ДМСО) было характерно схожее состояние фибрилл коллагеновых волокон с группой нативных образцов.

Для подтверждения стерильности было проведено Санитарно-бактериологическое исследование образцов NaCl–ДМСО (n=5). Контроль результатов исследования показал, что в течение 14 суток наблюдения во всех случаях не было выявлено роста патогенных колоний микроорганизмов.

Таким образом, в соответствии с поставленной 2-ой задачей на основании результатов данных спектрофотометрии и СЭМ был *разработан протокол криоконсервации децеллюляризованного ЛМ* (NaCl–ДМСО), позволяющий получить высокие показатели прозрачности образцов при минимальном нарушении ультраструктуры коллагенового матрикса:

1. Протокол децеллюляризации с использованием 1,5М раствора NaCl с ДНКазой 5 Ед/мл и РНКазой 5 Ед/мл (см. глава 2.2., Таблица 3)
2. Отмывание от детергентов в 1 мл раствора PBS (трехкратно) по 5 минут
3. Перенос образца в криопробирку, содержащую 1 мл 90% «Раствора для хранения роговицы» (ООО НЭП «Микрохирургия глаза», Москва) и 10% ДМСО (PanReac AppliChem, Германия).
4. Помещение криопробирки в контейнер для криоконсервации Cool Cell LX (Biocision, США) с последующим его переносом в низкотемпературный морозильник (-80 °С) на ночь.
5. На следующий день изъятие криопробирки из контейнера и перенос ее в сосуд Дьюара (Cryo Diffusion, Франция) с жидким азотом с температурой -196°С. Хранение до начала эксперимента.
6. В день эксперимента изъятие криопробирки из Сосуда Дьюара и размораживание на водяной бане при +37 °С в течение 5 минут.
7. Проведение трехкратного цикла отмывания образца от криопротектора: 1) отмывание (трижды) в 1 мл раствора PBS по 5 минут; 2) помещение образца в термошейкер с последующим отмыванием в 1 мл раствора

PBS при комнатной температуре в течение ночи; 3) на следующий день трехкратное отмывание в 1 мл PBS по 5 минут.

В литературе существуют данные о криоконсервации нативного лентикулярного материала, где в качестве криопротекторов использовались ДМСО и глицерин [137, 71, 125]. Важно отметить, что во всех вышеприведенных исследованиях речь шла об аллогенной трансплантации нативного ЛМ. Данный факт увеличивает риск отторжения ткани при имплантации нативного ЛМ в строму роговицы из-за наличия в нем клеток [54]. Liu с соавторами (2017) показали хорошую прозрачность нативных ЛМ в глицерине, сохраненных в течение 4 недель при комнатной температуре [125]. В нашей работе для долгосрочного хранения децеллюляризованного ЛМ (NaCl и SDS) использовали глицерин при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Данные протоколы криоконсервации (NaCl-глицерин и SDS-глицерин) приводили к разрушению ультратруктуры матрикса и снижению прозрачности образцов. Кроме того, все протоколы криоконсервации на основе децеллюляризованного ЛМ с помощью SDS показали низкую прозрачность образцов и нарушение структуры коллагенового матрикса, что было подтверждено данными спектрофотометрии и СЭМ. Так как известно, что структура SDS аналогична структуре фосфолипидной мембраны (имеет гидрофильную головную группу и гидрофобный хвост) [95]. Вероятнее всего, после отмывания ткани от детергентов, в ткани присутствует небольшая концентрация SDS. С помощью гидрофильной группы SDS происходит процесс дополнительного связывания молекул SDS с молекулами воды, что является критичным моментом при замораживании ткани. По-видимому, избыточное связывание молекул SDS с водой и их взаимодействие с криопротектором приводит к повышенному образованию кристаллов льда в роговичной ткани, и как следствие вызывает снижение ее прозрачности при размораживании.

В описанной литературе отсутствуют данные о разработке протокола криоконсервации для децеллюляризованного лентикулярного материала. Это может быть связано с тем, что для разработки данного протокола требуется создать определенные условия: логистическая проблема доставки ЛМ из операционной

медицинского учреждения до лаборатории ГТБ, доступность к специализированному и дорогостоящему лабораторному оборудованию, наличие специальных расходных материалов, подготовленные специалисты. В действительности соблюдение всех условий для успешной реализации данного проекта является труднодостижимой целью. Реализация разработки протокола криоконсервации ДЛМ в головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. С.Н. Федорова» Минздрава России стала возможной благодаря одновременному наличию в структуре учреждения операционного блока и лаборатории ГТБ, учитывающих все вышеприведенные условия.

В связи с необходимостью изучения потенциальной токсичности полученного ДЛМ после криоконсервации (NaCl-ДМСО) для его предполагаемого клинического использования, в данной работе в соответствии с поставленной 3-ей задачей исследования была изучена жизнеспособность и выживаемость кератоцитов в присутствии криоконсервированного ДЛМ (NaCl-ДМСО) с помощью теста «Live and Dead», метода «ДНК-комет» и МТТ-теста. Так, на основании вышеприведенных методов исследования цитотоксичности было выявлено сохранение жизнеспособности клеточной культуры кератоцитов на всем сроке наблюдения (9 суток) по результатам МТТ-теста; и до 3-х суток по результатам теста «Live and Dead» и метода «ДНК-комет». Таким образом, использование криоконсервированного ДЛМ (NaCl-ДМСО) в присутствии кератоцитов не вызывает выраженного цитотоксического эффекта.

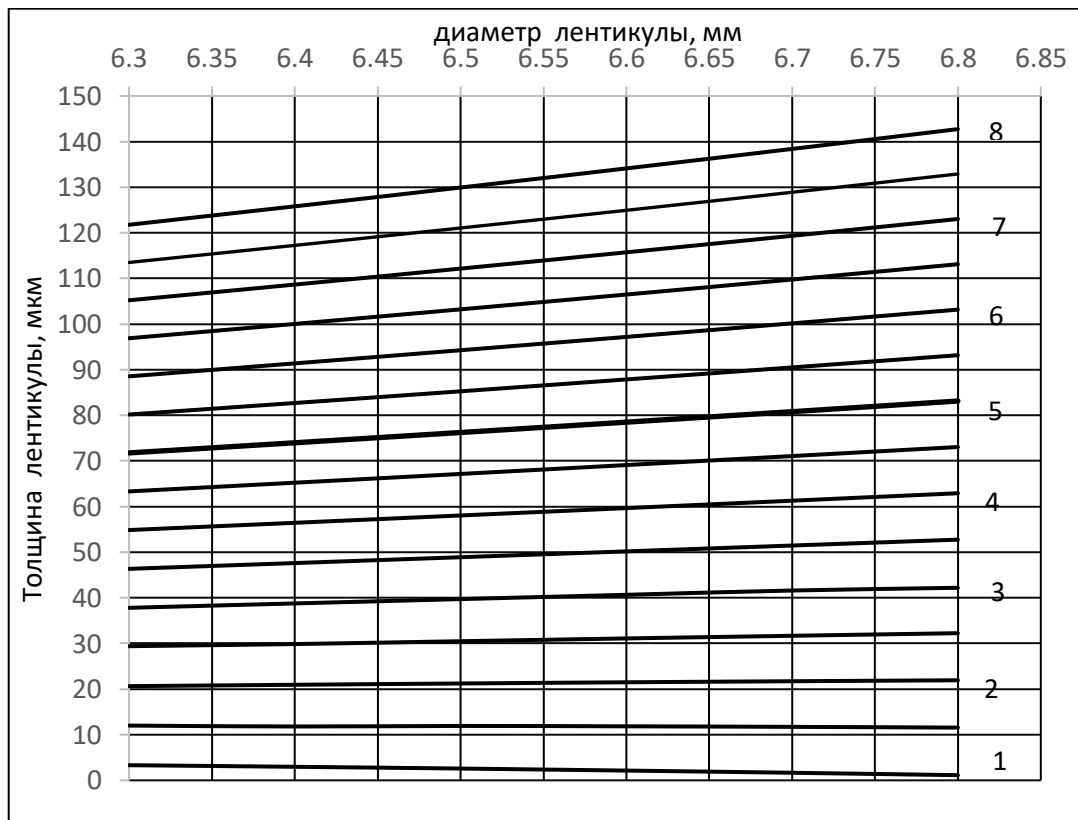
Второй этап включал в себя разработку математической формулы и диаграммы, на основе параметров лентикулярного материала, необходимых для достижения гиперметропической коррекции при интрастромальной кератофакии, которые были показаны в эксперименте *ex vivo*.

В соответствии с поставленной 4-ой задачей исследования была выведена математическая формула для проведения практических расчетов:

$$H_n = \left(\frac{\left(\frac{337,5}{K} - \sqrt{\left(\frac{337,5}{K} \right)^2 - 0,8 \left(\frac{S}{2} \right)^2} \right)}{0,8} - \frac{\left(\frac{337,5}{K - Ef} - \sqrt{\left(\frac{337,5}{K - Ef} \right)^2 - 1,2 \left(\frac{S}{2} \right)^2} \right)}{1,2} \right) \times 1000$$

где 337,5 – коэффициент перевода оптической силы роговицы (дптр) в радиус кривизны (мм); 0,8 – значение средней конической константы роговицы до операции; 1,2 – значение средней конической константы роговицы после операции; 1000 – переводной коэффициент (мкм); H_n – толщина лентиккулярного материала (мкм); K – среднее значение кератометрии в центре роговицы (дптр); S – диаметр лентиккулярного материала (мм); Ef – заданный рефракционный эффект, приведенный к поверхности роговицы (дптр).

На основании данной формулы была разработана диаграмма для выбора образца из банка ЛМ необходимого для коррекции гиперметропии при интрастромальной кератофаки:



Таким образом, разработанные математическая формула и диаграмма, учитывающие параметры ЛМ для его имплантации в строму роговицы с целью коррекции гиперметропии позволили перейти к 5-ой задаче исследования.

Так как вышеприведенные формула и диаграмма, учитывали толщину ЛМ схожую с толщиной образцов, полученной при проведении кераторефракционной операции СМАЙЛ. В связи с этим, перед началом эксперимента *ex vivo* необходимо было вернуть увеличенную толщину ЛМ после криоконсервации к исходным его параметрам для успешной имплантации образцов в строму роговицы. Для решения данной проблемы изучали влияние разных вискоэластиков на криоконсервированный ДЛМ (NaCl-ДМСО). В соответствии с этим, для устранения неспецифического отека криоконсервированного ДЛМ были использованы ДВ (n=22) и КВ (n=23). Измерение толщины образцов проводили с помощью метода ОКТ.

Результаты данного исследования показали, что после добавления ДВ к образцам, их толщина постепенно уменьшается, и в интервале от 30 минут до 60 минут выходит на плато, возвращаясь при этом к исходной толщине ($p \geq 0,05$). Использование КВ не приводит к достаточному дегидратирующему эффекту. Феномен дегидратирующего свойства ДВ можно объяснить составом данного вискоэластика: 3,0% гиалуронат натрия и 4,0% хондроитин сульфат. Хондроитин сульфат успешно используется как агент, стабилизирующий отек роговичного трансплантата и входит в состав «Раствора для хранения роговицы» (среда Борзенка-Мороз) [5]. В существующей литературе данные о применении ДВ в качестве дегидратирующей среды для криоконсервированного ДЛМ (NaCl-ДМСО) отсутствуют.

В эксперименте *ex vivo* морфометрические изменения роговиц (n=10) определялись до- и после имплантации образца NaCl-ДМСО в ДВ (n=10) в строму роговицы, которые исследовали с помощью методов кератотопографии Pentacam в пределах 7-миллиметровой зоны (K_m , дптр) и ОКТ (центр образца, мкм) при постоянной клинической нормотензии глаза (тонометрия по Маклакову, около 15 мм.рт.ст.)

Так, в соответствии с разработанной формулой и диаграммой для коррекции гиперметропии в + 6 дптр в банке образцов имеется ЛМ с параметрами: H_d 94 мкм, S 6,5 мм, полученный после операции СМАЙЛ при коррекции миопии 4,5 дптр. Результаты кератотопографии показали, изменение среднего значения передней кривизны роговицы кадаверного глаза (K_m) до- и после имплантации образца с 44,8 дптр до 51,2 дптр, что соответствовало усилению рефракции роговицы около 6 дптр. Исследование ОКТ также выявило изменение толщины роговицы до- и после имплантации с 702 мкм до 796 мкм, с учетом толщины фемто-клапана (130 мкм). В существующей литературе. Результаты настоящего исследования соответствуют данным литературы в отношении теории, в соответствии с которой, сила имплантированного ЛМ (дптр), полученной при коррекции миопии после операции СМАЙЛ, должна быть меньше, чем предполагаемый рефракционный результат [112]. Рядом исследователей также было изучено влияние глубины трансплантации ЛМ в строму роговицы (100 мкм, 110 мкм, 120 мкм, 160 мкм), необходимой для коррекции гиперметропии [122, 187, 126, 203, 148, 173, 112, 56, 138]. Было установлено, что трансплантация ЛМ на глубину 160 мкм приводит к снижению рефракционного эффекта, и наоборот, поверхностная имплантация ЛМ в строму роговицы приводила к усилению рефракции глаза [187, 56]. В настоящей работе поверхностная имплантация образца в строму роговицы – на глубину 130 мкм, учитывающая его параметры согласно разработанной формуле и диаграмме, позволила достичь целевой рефракции глаза. Таким образом, разработанные формула и диаграмма для расчета ЛМ с целью коррекции гиперметропии при интрастромальной кератофакции могут быть востребованы на начальном этапе клинических исследований.

Таким образом, можно сделать заключение: оптимальные протоколы децеллюляризации, полученные при сравнительном анализе известных методов позволяют создавать бесклеточные каркасы с высокими прозрачными свойствами, что подтверждается данными спектрофотометрии, гистологического анализа, иммуногистохимического анализа, сканирующей электронной микроскопии и ДНК-анализа. Разработанный протокол криоконсервации

децеллюляризованного лентикулярного материала является безопасным, характеризуется высокими показателями прозрачности без грубого нарушения ультраструктуры коллагенового каркаса, что подтверждается данными спектрофотометрии и сканирующей-электронной микроскопии. Кроме того, данный протокол не оказывает выраженного цитотоксического воздействия на кератоциты.

Разработанные математическая формула и диаграмма позволяют достигать целевого рефракционного эффекта на роговице кадаверных глаз при интрастромальной кератофакии, что подтверждается данными ОКТ и Pentacam.

Проведенное доклиническое исследование децеллюляризованного лентикулярного материала, прошедшего криоконсервацию, подтверждает высокую эффективность и безопасность данных образцов в рефракционной хирургии роговицы и является перспективным для дальнейших экспериментальных исследований с целью внедрения в клиническую практику для лечения различных патологических состояний роговицы.

ВЫВОДЫ

1. Оптимизированные протоколы децеллюляризации лентикулярного материала – 1.5M NaCl с нуклеазами и 0,1% SDS являются воспроизводимыми, образцы данных протоколов обладают низкой иммуногенностью и приводят к низкому содержанию остаточной ДНК ($39,34 \pm 8,65$ нг/мг для NaCl и $37,07 \pm 6,19$ для SDS), а также удалению клеточных и ядерных компонентов на фоне сохранности основных компонентов матрикса, что обуславливает хорошие показатели прозрачности материала ($88,89 \pm 3,57\%$ для NaCl и $87,26 \pm 3,15\%$ для SDS) схожих с нативной тканью ($89,50 \pm 4,72\%$).

2. Разработанный протокол криоконсервации децеллюляризованного лентикулярного материала (NaCl – ДМСО) характеризуется высокими показателями прозрачности ($89,44 \pm 2,68\%$) и не вызывает изменений в толщине фибриллы коллагенового волокна ВКМ ($2,45 \pm 0,36$ мкм) при сравнении с контрольными образцами ($2,36 \pm 0,37$ мкм).

3. Доказано, что кератоциты в присутствии криоконсервированного лентикулярного материала после децеллюляризации на всех исследуемых сроках показали высокую выживаемость и отсутствие значимого цитотоксического эффекта: Полученные положительные результаты МТТ-теста (на 9–е сутки наблюдения жизнеспособные клетки – 160.000; 165.000; 166.000 согласуются с результатами метода «ДНК комет» (0,6253 усл. ед) и теста «Live and Dead» (живые клетки в %-х 86; 89; 91 и мертвые клетки в %-х 14; 11; 9).

4. На основе математического моделирования была разработана формула для расчета толщины лентикулярного материала с целью коррекции гиперметропии и рассчитанная на основе трех основных параметров: требуемого рефракционного эффекта на роговице, значений кератометрии интактной роговицы и диаметра ЛМ. И четырех дополнительных параметров: коэффициента перевода оптической силы роговицы в радиус кривизны, переводного коэффициента,

значения средней конической константы роговицы до операции и значения средней конической константы роговицы после операции. Данная математическая формула была заложена в основу для создания диаграммы, позволяющая достигать целевой коррекции гиперметропии от +1,0 до +8,0 дптр с учетом толщины и диаметра лентикулярного материала от 6,3 до 6,8 мм.

5. В экспериментальном исследовании на кадаверных глазах ($n=10$) на основании компьютерной топографии роговицы и оптической когерентной томографии при имплантации лентикулярного материала ($n=10$), полученного при коррекции миопии в среднем $-4,6 \pm 0,96$ дптр было выявлено изменение среднего значения кривизны передней поверхности роговицы K_m с 44,5 дптр до 50,63 дптр, а также среднее изменение толщины роговицы кадаверного глаза до и после имплантации образца с 710,7 мкм до 807,4 мкм, приводящее к коррекции гиперметропии в среднем $+6,15 \pm 0,96$ дптр. Поверхностная имплантация лентикулярного материала в слои стромы (глубина 130 мкм), а также разработанная диаграмма позволяет с высокой точностью достигать целевого рефракционного эффекта в эксперименте на кадаверных глазах.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При использовании спектрофотометрического метода исследования прозрачности образцов целесообразно использовать дисперсный вискоэластик в качестве среды, устраняющей неспецифический отек ткани.

2. Трехкратный цикл отмывания в фосфатно-солевом буферном растворе в течение 12-15 часов позволит успешно удалить детергенты и криопротекторы из лентикулярного материала и, соответственно, снизить их токсическое воздействие на клетки и ткани реципиента.

3. Предварительная дегидратация децеллюляризованного лентикулярного материала перед его хранением в ДМСО в дисперсном вискоэластике ухудшает проникновение криопротектора вглубь ткани. Однако, данный факт не приводит к ухудшению прозрачных свойств образцов.

4. Строгое соблюдение условий стерильности на всех этапах работы с образцами обеспечивает безопасность его использования в клинической практике.

5. Для коррекции гиперметропии в клинической практике рекомендуется использовать лентикулярный материал с меньшей диоптрийной силой, чем ожидаемая коррекция. Так, согласно разработанной диаграмме для ожидаемой коррекции гиперметропии +4,0 дптр потребуется образец толщиной от 56 мкм до 62 мкм в зависимости от диаметра от 6,3 мм до 6,8 мм, что соответствует диоптрийной силе лентикулярного материала около 2,5 дптр, полученной при миопической коррекции методом СМАЙЛ. В клинической практике операции СМАЙЛ для коррекции миопии слабой степени проводятся значительно реже по сравнению с операциями для миопии средней и высокой степеней. Таким образом, для коррекции гиперметропии от +2 дптр до +4 дптр предпочтительнее использовать лазерную рефракционную хирургию или интраокулярные методы коррекции из-за более прогнозируемых послеоперационных результатов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БЛОК – бандажная лечебно-оптическая кератопластика

ВКМ – внеклеточный матрикс

ГАГ – гликозаминогликаны

ГБ – глазной банк

ГППК – глубокая передняя послойная кератопластика

ГТБ – глазной тканевой банк

ДВ – дисперсный вискоэластик

ДЛМ – децеллюляризованный лентикулярный материал

ДЛМ+МСК–ЖТ – децеллюляризованный лентикулярный материал, заселенный мезенхимальными стволовыми клетками жировой ткани человека

ДМСО – диметилсульфоксид

дптр – диоптрия

ИСК –интрастромальный карман

КВ – когезивный вискоэластик

Криодерм– среда Криодерм на основе глицерина

КС – кератоконус

ЛАЗИК – лазерный кератомилез in situ (Laser in situ keratomileusis)

ЛМ – лентикулярный материал

М – моль

М-К среда –синтетическая среда McCarey-Kaufman

мкм – микрометр

мм³ – кубический миллиметр

мм – миллиметр

МСК–ЖТ – мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани человека

нм – нанометр

ОКТ – оптическая когерентная томография

ППК – Передняя послойная кератопластика

РСД – роговично-склеральный диск

СМАЙЛ (SMall Incision Lenticule Extraction — SMILE) – запатентованное название технологии фемтосекундной интрастромальной экстракции лентикулы через малый разрез фирмы «Carl Zeiss» проводимое на фемтосекундном лазере «VisuMax»

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ТБС – трансплантация боуменоваго слоя

Трипсин-ЭДТА – протокол децеллюляризации лентикулярного материала с использованием 0,25% раствора Трипсин-ЭДТА + гипотонический трис-буферный раствор (рН 7.2) + ДНКаза 50 Ед/мл и РНКаза 1 Ед/мл + гипотонический трис-буферный раствор (рН 7.2)

ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России – Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Фёдорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

ФИЛИ – (Femtosecondlaser Intrastromal Lenticular Implantation - FILI) – оригинальная методика фемтосекундной интрастромальной имплантации лентикулы

ФЛЕКС – (Femtosecond Lenticule Extraction — FLEx) – фемтосекундная интрастромальная экстракция лентикулы

ФСЛ – фемтосекундный лазер FS200 WaveLight (Alcon, США)

ЦФПМБП – Центр фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ax – ось цилиндра

CHAPS – 3-[(3-холамидопропил) диметриламмоний]-1-пропансульфонат

су_l – цилиндрический компонент рефракции

FBS – эмбриональная бычья сыворотка

K_m – средний показатель кератометрии

NaCl – протокол децеллюляризации 1,5 М раствор хлорида натрия с ДНКазой 5 Ед/мл и РНКазой 5 Ед/мл

Neu5Gc – чужеродный для человека эпитоп N-гликолил-нейраминавая кислота

PBS – фосфатно-буферный солевой раствор

SD – дезоксихолат натрия

SDS – додецилсульфат натрия

sph – сферический компонент рефракции

α-GAL – чужеродный для человека эпитоп Gala1-3galβ1-4GlcNAc-R

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляев, В.С. Межслойная пересадка роговицы (современное состояние, перспективы) / В.С. Беляев, В.В. Кравчинина, Н.В. Душин. – Текст: непосредственный // Офтальмологический журнал. – 1983. – №2. – С. 94-98.
2. Блаватская, Е.Д. Применение интраламеллярной гомопластики с целью ослабления рефракции глаза / Е.Д. Блаватская. – Текст: непосредственный // Офтальмологический журнал. – 1966. – № 7. — С. 530-537.
3. Бенделик, Е.К. Контузии глаза: клинико-биохимические исследования, аспекты патогенеза: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Е.К.Бенделик. – текст: непосредственный // М., 1998. – 42 с.
4. Борзенко, С.А. Медико-технологические и методологические основы эффективной деятельности глазных тканевых банков России в обеспечении операций по сквозной трансплантации роговицы: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / С.А.Борзенко. – текст: непосредственный // М., 2008. – 306 с.
5. Борзенко, С.А. О возможности совершенствования консервации донорских роговиц путем применения регуляторных пептидов / С.А. Борзенко, О.И. Ролик, Н.А.Онищенко, Ю.А.Комах. –Текст: непосредственный //Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2011. – Т 13. – №4. – С. 101-105.
6. Борзенко, С.А.Безфидерная культура эпителия слизистой губы человека для тканевой инженерии и регенеративной медицины / С.А. Борзенко, Б.Э. Малюгин, М.Ю. Герасимов [и др.]. –Текст: непосредственный //Вестник Российской академии медицинских наук. – 2020. – Т.75. – №5. – С. 561-570.
7. Вит, В.В. Строение зрительной системы человека / В.В. Вит. – Текст: непосредственный // – Одесса: Астропринт,2003. – 368 с.
8. Воронин, Г.А.Методы консервации донорских роговиц / Г.А.Воронин, Г. А. Осипян, С. В. Труфанов [и др.]. – Текст: непосредственный// Вестник офтальмологии. – 2018. – Т.134. – №5 (2). – С. 238-243

9. Гончар, П.А. Межслойная рефракционная тоннельная кератопластика в коррекции близорукости и астигматизма / П.А. Гончар, В.С. Беляев, В.В.Кравнинина[и др.]. – Текст: непосредственный// Вестник офтальмологии. – 1988. – Т.104. – №4 (4). – С. 25-30
10. Грищенко, В.И. Достижения криобиологии и криомедицины во имя здоровья нации / В.И. Грищенко. – Текст: непосредственный // Проблемы криобиологии. –2008. – Т.18. – № 3. – С. 269-274.
11. Егорова, Н.С. Технологии создания, оценка биосовместимости и безопасности коллагенового матрикса в составе биоинженерной клеточной конструкции / Н.С. Егорова, Е.В.Ченцова, С.В. Флора [и др.]. – Текст: непосредственный //Российский офтальмологический журнал. – 2017. – Т.10. – № 2. – С. 71-77.
12. Калинин, Ю.Ю. Клинико-функциональные результаты этапного комбинированного хирургического лечения пеллюцидной дегенерации роговицы / Ю.Ю. Калинин, Д.В. Невров, С.Ю. Калиникова, И.С.Ткаченко. – Текст: непосредственный //Офтальмология. – 2021. – Т.18. – №1. – С. 54-60.
13. Костяев, А. А. Токсичность криопротекторов и криоконсервантов на их основе для компонентов крови и костного мозга (обзорная статья) / А.А. Костяев, А.К. Мартусевич, А.А. Андреев.Текст: непосредственный // Научное обозрение. Медицинскиенауки. – 2016. – № 6. – С. 54-74.
14. Мамиконян, В.Р. Интерламеллярная бандажная кератопластика для лечения прогрессирующего кератоконуса (предварительное сообщение) / В.Р. Мамиконян, С.Э. Аветисов, Г.А. Осипян [и др.]. – Текст: непосредственный //Вестник офтальмологии. – 2015. – Т.131. – №1. – С. 18-23.
15. Морхат, И.В. Методика расчетов изменения рефракции при рефракционной интраламеллярной кератопластике твердым аллопластическим материалом / И.В. Морхат, Л.Е. Медведская.– Текст: непосредственный //Проблемы офтальмологии. – Киев, 1976. – С. 54-55.
16. Оганесян, О.Г. Сравнительный анализ результатов трансплантации боуменоваго слоя без и после кросслинкинга при прогрессирующем кератоконусе

/ О.Г. Оганесян, В.Р. Гетадарян, П.В. Макаров. – Текст: непосредственный //Офтальмологические ведомости. – 2020. – Т.13. – №1. – С. 17-27.

17. Осипян, Г.А. Возможности межслойной кератопластики в реабилитации пациентов с кератоконусом / Г.А. Осипян, Х.Храйстин. – Текст: непосредственный //Офтальмология. – 2019. – Т.16. – №2. – С. 169-173.

18. Островский, Д.С. Возможность применения полимерных материалов различного дизайна при создании передних слоев стромы искусственной роговицы / Д.С. Островский, С.А. Борзенко, И.И. Агапов [и др.].– Текст: непосредственный // Современные технологии в офтальмологии.– 2020. – №4 (35). – С. 260-261.

19. Патент РФ №2069951. Среда для консервации роговицы глаза / Федоров С.Н., Мороз З.И., Борзенко С.А., Комах Ю.А.; Заявитель и патентообладатель ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России»; Заявл. 26.02.1993 г.

20. Патент РФ №2676311. Средство для консервации заднего послойного трансплантата донорской роговицы / Борзенко С.А., Малюгин Б.Э., Тонаева Х.Д. [и др.]; Заявитель и патентообладатель ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России»; Заявл. 15.02.2018 г.

21. Патент РФ № 2505303. Способ получения биотрансплантата для роговицы / Герасимов М.Ю., Рахматуллин Р.Р, Макеев О.Г. [и др.]; Заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «Офтальмологические биотехнологии»; Заявл. 13.09.2011 г.

22. Патент РФ № 2739452. Материал для кератопластики / Анисимов С.И., Анисимова Н.С., Попов И.А.; Заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «Дубна-Биофарм»; Заявл. 12.08.2020 г.

23. Смирнов, А.В. Клиническое применение криоконсервированных жизнеспособных аутодермотрансплантатов при лечении больных со скальпированными и рвано-ушибленными ранами / А.В. Смирнов, В.Ф. Зубрицкий, А.Н. Ивашкин, Е.М. Фоминых. – Текст: непосредственный //Медицинский вестник МВД. – 2011. № 3. – С. 12-14.

24. Старцева, О.И. Децеллюляризация органов и тканей / О.И. Старцева, М.Е. Синельников, Ю.В. Бабаева, В.В. Трущенко. – Текст: непосредственный // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2019. – № 8. – С. 59-62.
25. Филатов В.П. Роговица трупа, как материал для пересадки / В.П.Филатов. – Текст: непосредственный // Советский вестник офтальмологии. – 1934. – т.4. – №2. – С.222 - 224.
26. Фрешни, Р. Я. Культура животных клеток: практическое руководство / Р. Я. Фрешни; пер. с 5-го англ. изд. Ю. Н. Хомякова, Т. И. Хомяковой. – Москва: Издательство «БИНОМ. Лаборатория знаний», 2010. – 691 с.
27. Фролов, М.А.Межслойная секторальная кератопластика в хирургической коррекции астигматизма / М.А.Фролов, В.С. Беляев, Н.В.Душин. – Текст: непосредственный //Вестник офтальмологии. – 1996. – № 2. –С. 15-18.
28. Хубецова, М.Х. Характеристика 2D-культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток лимба, полученной с использованием бессывороточной питательной среды / М.Х. Хубецова, Д.С. Островский, С.А. Борзенко. – Текст: непосредственный // Современные технологии в офтальмологии. – 2020. – № 4 (35). – С. 267-268.
29. Ченцова, Е.В. Применение биоконструкции с культивированными клетками буккального эпителия в лечении пациентов с повреждениями роговицы / Е.В. Ченцова, А.О. Петрова, Н.С. Егорова [и др.]. – Текст: непосредственный // Современные технологии в офтальмологии. – 2020. – № 4(35). – С. 46-47.
30. Шелудченко, В.М.Бандажная лечебно-оптическая кератопластика в лечении ятрогенной кератэктазии / В.М. Шелудченко, Г.А. Осипян, Н.Ю. Юсеф [и др.].– Текст: непосредственный // Вестник офтальмологии. – 2019. – Т.135. – № 5. – С. 171-176.
31. Ahearne, M. Application of UVA-riboflavin crosslinking to enhance the mechanical properties of extracellular matrix derived hydrogels / M. Ahearne, A.Coyle. – Text: immediate // J. Mech Behav Biomed Mater. – 2016. – Vol.54. – P.259-267.
32. Alaminos, M. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold / M. Alaminos, M. Del Carmen Sanchez-Quevedo, J.I. Munoz-

Avila [et al.]. – Text: immediate // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2006. – Vol.47, №8. – P.3311-3317.

33. Alio del Barrio, J.L. Acellular human corneal matrix sheets seeded with human adipose-derived mesenchymal stem cells integrate functionally in an experimental animal model / Alio del Barrio, M. Chiesa, N. Garagorri [et al.]. – Text: immediate // Exp Eye Res. – 2015. – Vol.132. – P.91-100.

34. Alio del Barrio, J.L. Corneal Stroma Enhancement With Decellularized Stromal Laminae With or Without Stem Cell Recellularization for Advanced Keratoconus / J.L. Alio del Barrio, M. El Zarif, A. Azaar [et al.]. – Text: immediate // Am J Ophthalmol. – 2018. – Vol.186. – P.47-58.

35. Alio del Barrio, J.L. Regenerative Surgery of the Corneal Stroma for Advanced Keratoconus: 1-Year Outcomes / J.L. Alio del Barrio, M. El Zarif, A. Azaar [et al.]. – Text: immediate // Am J Ophthalmol. – 2019. – Vol.203. – P.53-68.

36. Amano, S. Decellularizing corneal stroma using N₂ gas / S. Amano, N. Shimomura, S. Yokoo [et al.]. – Text: immediate // Mol Vis. – 2008. Vol.14, №14. – P.878-882.

37. Angunawela, R.I. Refractive lenticule re-implantation after myopic ReLEx: a feasibility study of stromal restoration after refractive surgery in a rabbit model / R.I. Angunawela, A.K. Riau, S.S. Chaurasia [et al.]. – Text: immediate // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2012. – Vol.53, №8. – P.4975-4985.

38. Anseth, A. Glycosaminoglycans in corneal regeneration / A. Anseth. – Text: immediate // Exp Eye Res. – 1961. Vol.1. – P.122-127.

39. Armitage, J. Cryopreservation for corneal storage / J. Armitage. – Text: immediate // Dev Ophthalmol. – 2009. – Vol.43. – P.63-69.

40. Armitage, W.J. Factors influencing the suitability of organ-cultured corneas for transplantation / W.J. Armitage, D.L. Easty. – Text: immediate // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 1997. – Vol.38, №1. – P.16-24.

41. Armitage, W.J. High-risk Corneal Transplantation: Recent Developments and Future Possibilities. Transplantation / W.J. Armitage, C. Goodchild, M.D. Griffin [et al.]. – Text: immediate // Transplantation. – 2019. – Vol.103, №12. – P.2468-2447.

42. Armitage, W.J. Preservation of Human Cornea / W.J. Armitage. – Text: immediate // *Transfus Med Hemother.* – 2011. – Vol.38, №2. – P.143-147.
43. Barraquer, C. Myopic keratomileusis: short-term results / C. Barraquer, A.M. Gutierrez, A. Espinosa. – Text: immediate // *Refract Corneal Surg.* – 1989. – Vol.5, №5. – P.307-313.
44. Barraquer, J.I. Queratomileusis y queratofakia / J.I. Barraquer. – Bogota: Instituto Barraquer de America, 1980.
45. Best, B.P. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions / B.P. Best. – Text: immediate // *Rejuvenation Res.* – 2015. – Vol.18, №5. – P.422-436.
46. Bhandari, V. Application of the SMILE-derived glued lenticule patch graft in microperforations and partial-thickness corneal defects / V. Bhandari, S. Ganesh, S. Brar, R. Pandey. – Text: immediate // *Cornea.* – 2016. – Vol.35, №3. – P.408-412.
47. Bianchi, J. Alpha-gal syndrome: Implications for cardiovascular disease / J. Bianchi, A. Walters, Z.W. Fitch, J.W. Turek. – Text: electronic // globalcardiologyscienceandpractice.com. 2019; <https://globalcardiologyscienceandpractice.com/index.php/gcsp/article/view/394>
48. Bojic, S. Winter is coming: the future of cryopreservation / S. Bojic, A. Murray, B.L. Bentley [et al.]. – Text: immediate // *BMC Biol.* – 2021. – Vol.19, №1. – P.56
49. Bonanno, J.A. Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump / J.A. Bonanno. – Text: immediate // *Exp. Eye Res.* – 2012. – Vol.95. – P.2-7.
50. Boulze Pankert, M. Biocompatibility and functionality of a tissue-engineered living corneal stroma transplanted in the feline eye / M. Boulze Pankert, B. Goyer, F. Zaguia [et al.]. – Text: immediate // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2014. – Vol.55. – P.6908-6920.
51. Bray, L.J. A dual-layer silk fibroin scaffold for reconstructing the human corneal limbus / L.J. Bray, K.A. George, D.W. Hutmacher [et al.]. – Text: immediate // *Biomaterials.* – 2012. – Vol.33, №13. – P.3529-3538.

52. Choi, J.S. Bioengineering endothelialized neo-corneas using donor-derived corneal endothelial cells and decellularized corneal stroma / J.S. Choi, J.K. Williams, M. Greven [et al.]. – Text: immediate // *Biomaterials*. – 2010. – Vol.31, №26. – P.6738-6745.
53. Cohen, D. Distribution of non-gal antigens in pig cornea: relevance to corneal xenotransplantation / D. Cohen, Y. Miyagawa, R. Mehra [et al.]. – Text: immediate // *Cornea*. – 2014. – Vol.33, №4. – P.390-397
54. Crapo, P.M. An overview of tissue and whole organ decellularization processes / P.M. Crapo, T.W. Gilbert, S.F. Badylak. – Text: immediate // *Biomaterials*. – 2011. – Vol.32, №12. – P.3233-3243.
55. Dai, Y. Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs / Y. Dai, T.D. Vaught, J. Boone [et al.]. – Text: immediate // *Nat Biotechnol*. – 2002. – Vol.20, №3. – P.251-255
56. Damgaard, I.B. Biological lenticule implantation for correction of hyperopia: an ex vivo study in human corneas / I.B. Damgaard, A. Ivarsen, J. Hjortdal. – Text: immediate // *J Refract Surg*. – 2018. – Vol.34, №4. – P.245-252.
57. Devasahayam, R. Implementation of organ culture storage of donor corneas: a 3 year study of its impact on the corneal transplant wait list at the Lions New South Wales Eye Bank / R. Devasahayam, P. Georges, C. Hodge [et al.]. – Text: immediate // *Cell Tissue Bank*. – 2016. – Vol.17, №3. – P.377-385.
58. Diao, J.M. Construction of a human corneal stromal equivalent with non-transfected human corneal stromal cells and acellular porcine corneal stromata / J.M. Diao, X. Pang, Y. Qiu [et al.]. – Text: immediate // *Exp Eye Res*. – 2015. – Vol.132. – P.216-244.
59. Drozhzhyna, G.I. Notfallkeratoplastik mit porcinen Xenotransplantaten bei nekrotisierender Keratitis [Emergency Keratoplasty with Porcine Xenografts in Necrotizing Keratitis] / G.I. Drozhzhyna, T.B. Gaidamaka, C. Cursiefen [et al.]. – Text: immediate // *Klin Monbl Augenheilkd*. – 2017. – Vol.234, №11. – P.1387-1395.
60. Du, L. Histological evaluation and biomechanical characterisation of an acellular porcine cornea scaffold / L. Du, X. Wu, K. Pang, Y. Yang – Text: immediate // *Br J Ophthalmol*. – 2011. – Vol.95, №3. – P.410-414.

61. Dua, H.S. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer) / H.S. Dua, L.A. Faraj, D.G. Said [et al.]. – Text: immediate // *Ophthalmology*. – 2013. – Vol.120, №9. – P.1778-1785.
62. Fagerholm, P. A biosynthetic alternative to human donor tissue for inducing corneal regeneration: 24-month follow-up of a phase 1 clinical study / P. Fagerholm, N.S. Lagali, K. Merrett [et al.]. – Text: electronic // *Sci Transl Med*. – 2010. – Vol.2, №46. – 46ra61
63. Fasolo, A. Femtosecond laser-assisted implantation of corneal stroma lenticule for keratoconus / A. Fasolo, A. Galzignato, E. Pedrotti [et al.]. – Text: immediate // *Int Ophthalmol*. – 2021. – Vol.41, №5. – P.1949-1957.
64. Fernandez-Perez, J. Decellularization and recellularization of cornea: Progress towards a donor alternative / J. Fernandez-Perez, M.Ahearne. – Text: immediate // *Methods*. – 2020. – Vol.171. – P.86-96.
65. Friedlander, M.H. Keratophakia using preserved lenticules / M.H. Friedlander, L.F. Rich, T.P. Werblin [et al.]. – Text: immediate // *Ophthalmology*. – 1980. – Vol.87, №7. – P.687-692.
66. Fu, Y. Reconstruction of a tissue-engineered cornea with porcine corneal acellular matrix as the scaffold / Y. Fu, X. Fan, P. Chen [et al.]. – Text: immediate // *Cells Tissues Organs*. – 2010. – Vol.191, №3. – P.193-203.
67. Fuest, M. Prospects and Challenges of Translational Corneal Bioprinting / M. Fuest, G.H. Yam, J.S. Mehta, D.F. Duarte Campos. – Text: immediate // *Bioengineering (Basel)*. – 2020. – Vol.7, №3. – P.71
68. Fuller, B.J. The effects of cooling on mammalian cells. In: Fuller B.J., Grout B.W.W. (eds.) *Clinical Applications of Cryobiology* / B.J. Fuller. – Boca Raton: CRC Press, 1991. – 1-22 p.
69. Gain, P. Global survey of corneal transplantation and eye banking / P. Gain, R. Jullienne, Z. He [et al.]. – Text: immediate // *JAMA Ophthalmol*. – 2016. – Vol.134, №2. – P.167-173.
70. Ganesh, S. Clinical outcomes of small incision lenticule extraction with accelerated crosslinking (ReLEx SMILE Xtra) in patients with thin corneas and

borderline topography/ S. Ganesh, S. Brar. – Text: electronic // J Ophthalmol. – 2015. – Vol.2015. – 263412

71. Ganesh, S. Cryopreservation of extracted corneal lenticles after small incision lenticule extraction for potential use in human subjects / S. Ganesh, S. Brar, P.A. Rao. – Text: immediate // Cornea. – 2014. – Vol.33, №12. – P.1355-1362.

72. Ganesh, S. Refractive lenticule extraction small incision lenticule extraction: A new refractive surgery paradigm / S. Ganesh, S. Brar, R.R. Arra. – Text: immediate // Indian J Ophthalmol. – 2018. – Vol.66, №1. – P.10-19.

73. Gao, D. Mechanisms of cryoinjury in living cells / D. Gao, J.K. Critser. – Text: immediate // ILAR J. – 2000. – Vol.41, №4. – P.187-196.

74. Gilbert, T.W. Decellularization of tissues and organs / T.W. Gilbert, T.L. Sellaro, S.F. Badylak. – Text: immediate // Biomaterials. – 2006. – Vol.27, №19. – P.3675-3683.

75. Gonzalez-Andrades, M. Generation of bioengineered corneas with decellularized xenografts and human keratocytes / M. Gonzalez-Andrades, J. de la Cruz Cardona, A.M. Ionescu [et al.]. – Text: immediate // Investig. Ophthalmol. – 2011. – Vol.52, №1. – P.215-222.

76. Gouveia, R.M. Controlling the 3D architecture of Self-Lifting Auto-generated Tissue Equivalents (SLATEs) for optimized corneal graft composition and stability / R.M. Gouveia, E. Gonzalez-Andrades, J.C. Cardona [et al.]. – Text: immediate // Biomaterials. – 2017. – Vol.121. – P.205-219.

77. Guerin, L.P. The Human Tissue-Engineered Cornea (hTEC): Recent Progress / L.P. Guerin, G. Le-Bel, P. Desjardins [et al.]. – Text: electronic // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol.22, №3. – 1291.

78. Guler, S. Supercritical Carbon Dioxide-Assisted Decellularization of Aorta and Cornea / S. Guler, B. Aslan, P. Hosseinian, H.M. Aydin. – Text: immediate // Tissue Eng Part C Methods. – 2017. – Vol.23, №9. – P.540-547.

79. Guo, X. Morphologic Characterization of Organized Extracellular Matrix Deposition by Ascorbic Acid–Stimulated Human Corneal Fibroblasts / X. Guo, A.E.

Hutcheon, S.A. Melotti [et al.]. – Text: immediate // *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* – 2007. – Vol.48, №9. – P.4050-4060.

80. Hara, H. Xenotransplantation--the future of corneal transplantation? / H. Hara, D.K. Cooper. – Text: immediate // *Cornea.* – 2011. – Vol.30, №4. – P.371-378.

81. Hashimoto, Y. Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering / Y. Hashimoto, S. Funamoto, S. Sasaki [et al.]. – Text: immediate // *Biomaterials.* – 2010. – Vol.31, №14. – P.3941-3948.

82. Hashimoto, Y. Ultrastructural analysis of the decellularized cornea after interlamellar keratoplasty and microkeratome-assisted anterior lamellar keratoplasty in a rabbit model / Y. Hashimoto, S. Hattori, S. Sasaki [et al.]. – Text: immediate // *Sci Rep.* – 2016. – Vol.6. – 27734

83. He, Z. Cutting and Decellularization of Multiple Corneal Stromal Lamellae for the Bioengineering of Endothelial Grafts / Z. He, F. Forest, A. Bernard [et al.]. – Text: immediate // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2016. – Vol.57, №15. – P.6639-6651.

84. Heinzelmann, S. Graft dislocation and graft failure following Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK) using precut tissue: a retrospective cohort study / S. Heinzelmann, D. Bohringer, P. Eberwein [et al.]. – Text: immediate // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* – 2017. – Vol.255, №11. – P.127-133.

85. Hong, H. Decellularized corneal lenticule embedded compressed collagen: Toward a suturable collagenous construct for limbal reconstruction / H. Hong, M.I. Huh, S.M. Park [et al.]. – Text: electronic // *Biofabrication.* – 2018. – Vol.10, №4. – 045001

86. Hsueh, Y.J. Extracellular Matrix Protein Coating of Processed Fish Scales Improves Human Corneal Endothelial Cell Adhesion and Proliferation / Y.J. Hsueh, D.H. Ma, K.S. Ma [et al.]. – Text: electronic // *Transl Vis Sci Technol.* – 2019. – Vol.8, №3. – 27

87. Huang, D. Peripheral deep anterior lamellar keratoplasty using a cryopreserved donor cornea for Terrien's marginal degeneration / D. Huang, W. Qiu, B. Zhang [et al.]. Text: immediate // *J Zhejiang Univ Sci B.* – 2014. – Vol.15, №12. – P.1055-1063.

88. Huang, Y.H. Preparation of acellular scaffold for corneal tissue engineering by supercritical carbon dioxide extraction technology / Y.H. Huang, F.W. Tseng, W.H. Chang [et al.]. Text: immediate // *Acta Biomater.* – 2017. – Vol.58. – P.238-243.
89. Huh, M.I. Generation of Femtosecond Laser-Cut Decellularized Corneal Lenticule Using Hypotonic Trypsin- EDTA Solution for Corneal Tissue Engineering / M.I. Huh, K.P. Lee, J. Kim [et al.]. Text: electronic // *J Ophthalmol.* – 2018. – Vol.2018. – 2590536.
90. Isaacson, A. 3D bioprinting of a corneal stroma equivalent / A. Isaacson, S. Swioklo, C.J. Connon. Text: immediate // *Exp Eye Res.* – 2018. – Vol.173. – P.188-193.
91. Isidan, A. Decellularization methods for developing porcine corneal xenografts and future perspectives / A. Isidan, S. Liu, P. Li [et al.]. Text: electronic // *Xenotransplantation.* – 2019. – Vol.26, №6. – e12564.
92. Jacob, S. Fibrin glue-assisted closure of macroperforation in predescemetic deep anterior lamellar keratoplasty with a donor obtained from small incision lenticule extraction / S. Jacob, P. Dhawan, M. Tsatsos [et al.]. Text: immediate // *Cornea.* – 2019. – Vol.38, №6. – P.775-779.
93. Jacob, S. Preliminary Evidence of Successful Near Vision Enhancement With a New Technique: PrEsbyopic Allogenic Refractive Lenticule (PEARL) Corneal Inlay Using a SMILE Lenticule / S. Jacob, D.A. Kumar, A. Agarwal [et al.]. Text: immediate // *J Refract Surg.* – 2017. – Vol.33, №4. – P.224-229.
94. Jadidi, K. Keratoconus treatment using femtosecond-assisted intrastromal corneal graft (FAISCG) surgery: a case series / K. Jadidi, S.A. Mosavi. – Text: immediate // *Int Med Case Rep J.* – 2018. – Vol.11. – P.9-15.
95. Jafari, M. The Molecular Basis of the Sodium Dodecyl Sulfate Effect on Human Ubiquitin Structure: A Molecular Dynamics Simulation Study / M. Jafari, F. Mehrnejad, F. Rahimi, S.M. Asghari. – Text: electronic // *Sci Rep.* – 2018. – Vol.8, №1. – 2150.
96. Jang, J.H. Tectonic Deep Anterior Lamellar Keratoplasty in Impending Corneal Perforation Using Cryopreserved Cornea / J.H. Jang, S.D. Chang. – Text: immediate // *Korean J Ophthalmol.* – 2011. – Vol.25, №2. – P.132-135.

97. Jang, T.H. Cryopreservation and its clinical applications / T.H. Jang, S.C. Park, J.H. Yang [et al.]. Text: immediate // Integr Med Res. – 2017. – Vol.6, №1. – P.12-18.
98. Javadi, M.A. Deep anterior lamellar keratoplasty using fresh versus cryopreserved corneas / M.A. Javadi, S. Feizi, F. Javadi [et al.]. Text: immediate // Ophthalmology. – 2014. – Vol.121, №2. – P.610-611.
99. Jester, J.V. Keratophakia and keratomileusis: histopathologic, ultrastructural, and experimental studies / J.V. Jester, M.M. Rodrigues, R.A. Villasenor, D.J. Schanzlin. – Text: immediate // Ophthalmology. – 1984. – Vol.91, №7. – P.793-805.
100. Jin, H. Small-Incision Femtosecond Laser-Assisted Intracorneal Concave Lenticule Implantation in Patients With Keratoconus / H. Jin, M. He, H. Liu [et al.]. Text: immediate // Cornea. – 2019. – Vol.38, №4. – P.446-453.
101. Jones, G.L.A. European eye bank association / G.L.A. Jones, D. Ponzin, E. Pels [et al.]. Text: immediate // Dev Ophthalmol. – 2009. – Vol.43. – P.15-21.
102. Kaufman, H.E. Optisol corneal storage medium / H.E. Kaufman, R.W. Beuerman, T.L. Steinemann [et al.]. Text: immediate // Arch Ophthalmol. – 1991. – Vol.109, №6. – P.864-868.
103. Keane, T.J. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response / T.J. Keane, R. Londono, N.J. Turner, S.F. Badylak. – Text: immediate // Biomaterials. – 2012. – Vol.33, №6. – P.1771-1781.
104. Keshvardoostchokami, M. Electrospun Nanofibers of Natural and Synthetic Polymers as Artificial Extracellular Matrix for Tissue Engineering / M. Keshvardoostchokami, S.S. Majidi, P. Huo [et al.].
105. Kim, H. Characterization of cornea-specific bioink: high transparency, improved in vivo safety / H. Kim, M.N. Park, J. Kim [et al.]. – Text: electronic // J Tissue Eng. – 2019. – Vol.10. – 2041731418823382
106. Kureshi, A.K. Human corneal stromal stem cells support limbal epithelial cells cultured on RAFT tissue equivalents / A.K. Kureshi, M. Dziasko, J.L. Funderburgh, J.T. Daniels. – Text: electronic // Sci Rep. – 2015. – Vol.5. – 16186

107. Kuwahara, Y. Studies on the long-term preservation of the cornea for penetrating keratoplasty / Y. Kuwahara, M. Sakanoue, M. Hayashi [et al.]. Text: immediate // Nippon Ganka Gakkai Zasshi. – 1965. – Vol.69. – P.1751-1840.

108. Lambert, N.G. The structure and evolution of eye banking: a review on eye banks' historical, present, and future contribution to corneal transplantation / N.G. Lambert, W.D. Chamberlain. – Text: electronic // Journal of Biorepository Science for Applied Medicine. – 2017. – Vol.2017, №5. – P.23-40.

109. Lazaridis, A. Refractive Lenticule Transplantation for Correction of Iatrogenic Hyperopia and High Astigmatism After LASIK / A. Lazaridis, D.Z. Reinstein, T.J. Archer [et al.]. Text: immediate // J Refract Surg. – 2016. – Vol.32, №11. – P.780-786.

110. Lee, W. A comparison of three methods of decellularization of pig corneas to reduce immunogenicity / W. Lee, Y. Miyagawa, C. Long [et al.]. Text: immediate // Int J Ophthalmol. – 2014. – Vol.7, №4. – P.587-593.

111. Levis, H.J. Plastic compressed collagen as a biomimetic substrate for human limbal epithelial cell culture / H.J. Levis, R.A. Brown, J.T. Daniels. – Text: immediate // Biomaterials. – 2010. – Vol.31, №30. – P.7726-7737.

112. Li, M. Predictive formula for refraction of autologous lenticule implantation for hyperopia correction / M. Li, M. Li, L. Sun. – Text: immediate // J Refract Surg. – 2017. – Vol.33, №12. – P.827– 833.

113. Li, M. Treatment of corneal ectasia by implantation of an allogenic corneal lenticule / M. Li, F. Zhao, M. Li. – Text: immediate // J Refract Surg. – 2018. – Vol.34, №5. – P.347–350.

114. Li, N. Tectonic lamellar keratoplasty with acellular corneal stroma in high-risk corneal transplantation / N. Li, X. Wang, P. Wan [et al.]. Text: immediate // Mol. Vis. – 2011. – Vol.17. – P. 1909-1917.

115. Li, Q. Preparation and Biomechanical Properties of an Acellular Porcine Corneal Stroma / Q. Li, H. Wang, Z. Dai [et al.]. Text: immediate // Cornea. – 2017. – Vol.36, №11. – P. 1343-1351.

116. Li, S. Healing characteristics of acellular porcine corneal stroma following therapeutic keratoplasty / S. Li, Y. Deng, B. Tian [et al.]. Text: electronic // Xenotransplantation. – 2020. – Vol.27, №2. – e12566.

117. Li, S. Risk factors influencing survival of acellular porcine corneal stroma in infectious keratitis: a prospective clinical study / S. Li, M. Li, L. Gu[et al.]. Text: electronic // J Transl Med. – 2019. – Vol.17, №1. – 434.

118. Liang, G. Comparison of the Different Preservative Methods for Refractive Lenticules following SMILE / G. Liang, L. Wang, Z. Pan, F. Zhang. – Text: immediate // Curr Eye Res. – 2019. – Vol.44, №8. – P. 832-839.

119. Lim, C.H. LASIK following small incision lenticule extraction (SMILE) lenticule reimplantation: a feasibility study of a novel method for treatment of presbyopia / C.H. Lim, A.K. Riau, N.C. Lwin [et al.]. Text: electronic // PLoS One. – 2013. – Vol.8, №12. – e83046

120. Lin, X.C. Lamellar keratoplasty with a graft of lyophilized acellular porcine corneal stroma in the rabbit / X.C. Lin, Y.N. Hui, Y.S. Wang [et al.]. Text: immediate // Vet Ophthalmol. – 2008. – Vol.11, №2. – P. 61-66.

121. Lindstrom, R.L. Advances in corneal preservation / R.L. Lindstrom. – Text: immediate // Trans Am Ophthalmol Soc. – 1990. – Vol.88. – P. 555-648.

122. Liu, R. Femtosecond laser-assisted corneal small incision allogenic intrastromal lenticule reimplantation in monkeys: a pilot study / R. Liu, J. Zhao, Y. Xu [et al.]. Text: immediate // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2015. – Vol.56, №6. – P.3715-3720.

123. Liu, W. Recombinant human collagen for tissue engineered corneal substitutes / W. Liu, K. Merrett, M. Griffith [et al.]. Text: immediate // Biomaterials. – 2008. – Vol.29, №9. – P.1147-1158.

124. Liu, Y.C. Biological corneal inlay for presbyopia derived from small incision lenticule extraction (SMILE) / Y.C. Liu, E.P.W. Teo, H.P. Ang [et al.]. Text: electronic // Sci Rep. – 2018. – Vol.8, №1. – 1831

125. Liu, Y.C. Corneal lenticule storage before reimplantation / Y.C. Liu, G.P. Williams, B.L. George [et al.]. Text: electronic // Mol Vis. – 2017. – Vol.23. – P. 753-764.

126. Liu, Y.C. Higher-Order-Aberrations Following Hyperopia Treatment: Small Incision Lenticule Extraction, Laser-Assisted In Situ Keratomileusis and Lenticule Implantation / Y.C. Liu, J. Wen, E.P.W. Teo [et al.]. Text: electronic // *Transl Vis Sci Technol.* – 2018. – Vol.7, №2. – 15

127. Luo, H. Construction of tissueengineered cornea composed of amniotic epithelial cells and acellular porcine cornea for treating corneal alkali burn / H. Luo, Y. Lu, T. Wu [et al.]. Text: immediate // *Biomaterials.* – 2013. – Vol.34, №28. – P.6748-6759.

128. Ma, X.Y. Corneal Stroma Regeneration with Acellular Corneal Stroma Sheets and Keratocytes in a Rabbit Model / X.Y. Ma, Y. Zhang, D. Zhu [et al.]. Text: electronic // *PLoS One.* – 2015. – Vol.10, №7. – e0132705

129. Magitot, A. Recherches experimentales sur la survie possible de la cornee en dehors de l'organisme et la keratoplastie differee / A. Magitot. – Text: immediate // *Ann Ocul.* – 1911. – Vol.146. – P.1.

130. Maguen, E. Keratophakia with lyophilized cornea lathed at room temperature: new techniques and experimental surgical results / E. Maguen, S. Pinhas, S.M. Verity, A. Nesburn. – Text: immediate // *Ophthalmic Surg.* – 1983. – Vol.14, №9. – P.759-762.

131. Mastropasqua, L. Femtosecond Laser-Assisted Stromal Lenticule Addition Keratoplasty for the Treatment of Advanced Keratoconus: A Preliminary Study / L. Mastropasqua, M. Nubile, N. Salgari, R. Mastropasqua. – Text: immediate // *J Refract Surg.* – 2018. – Vol.34, №1. – P.36-44.

132. Matthyssen, S. Corneal regeneration: A review of stromal replacements /S. Matthyssen, B. Van den Bogerd, S.N. Dhubhghaill [et al.]. Text: immediate // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2018. – Vol.69. – P.31-41.

133. Maurice, D.M. The location of the fluid pump in the cornea / D.M. Maurice. – Text: immediate // *J Physiol.* – 1972. – Vol.221, №1. – P.43-54.

134. McFetridge, P.S. Preparation of porcine carotid arteries for vascular tissue engineering applications / P.S. McFetridge, J.W. Daniel, T. Bodamyali. – Text: immediate // *J Biomed Mater Res A.* – 2004. – Vol.70, №2. – P.224-234.

135. McIntosh Ambrose, W. Collagen vitrigel membranes for the in vitro reconstruction of separate corneal epithelial, stromal, and endothelial cell layers / W. McIntosh Ambrose, A. Salahuddin, S. So [et al.]. Text: immediate // J Biomed Mater Res B Appl Biomater. – 2009. – Vol.90, №2. – P.818-831.

136. McTiernan, C.D. LiQD Cornea: Pro-regeneration collagen mimetics as patches and alternatives to corneal transplantation / C.D. McTiernan, F.C. Simpson, M. Haagdoorens [et al.]. Text: electronic // J Sci Adv. – 2020. – Vol.6, №25. – eaba2187

137. Mohamed-Noriega, K. Cornea lenticule viability and structural integrity after refractive lenticule extraction (ReLEx) and cryopreservation / K. Mohamed-Noriega, K.P. Toh, R. Poh [et al.]. Text: immediate // Mol Vis. – 2011. – Vol.17. – P.3437-3449.

138. Moshirfar, M. A modified small-incision lenticule intrastromal keratoplasty (sLIKE) for the correction of high hyperopia: a description of a new surgical technique and comparison to lenticule intrastromal keratoplasty (LIKE) / M. Moshirfar, T.J. Shah, M. Masud [et al.]. Text: immediate // Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol. – 2018. – Vol.7, №2. – P.48-56.

139. Nagata, S. Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells / S. Nagata, R. Hanayama, K. Kawane. – Text: immediate // Cell. – 2010. – Vol.140, №5. – P.619-360.

140. Nara, S Preservation of biomacromolecular composition and ultrastructure of a decellularized cornea using a perfusion bioreactor / S. Nara, S. Chameettachal, S. Midha [et al.]. Text: immediate // RSC Adv. – 2016. – Vol.6. – P.2225-2240.

141. Nosrati, H. Biopolymer-based scaffolds for corneal stromal regeneration: A review / H. Nosrati, K. Ashrafi-Dehkordi, Z. Alizadeh [et al.]. Text: immediate // Polim Med. – 2018. – Vol.50, №2. – P.57-64.

142. Oh, J.Y. Processing porcine cornea for biomedical applications / J.Y. Oh, M.K. Kim, H.J. Lee [et al.]. Text: immediate // Tissue Eng Part C Methods. – 2009. – Vol.15, №4. – P.635-645.

143. Pant, O.P. Tectonic keratoplasty using femtosecond laser lenticule in pediatric patients with corneal perforation secondary to blepharokeratoconjunctivitis: a

case report and literature review / O.P. Pant, J.L. Hao, D.D. Zhou, C.W. Lu. – Text: immediate // *J Int Med Res.* – 2019. – Vol.47, №5. – P.2312-2320.

144. Pegg, D.E. Principles of cryopreservation / D.E. Pegg. – Text: immediate // *Methods Mol Biol.* – 2007. – Vol.368. – P.39-57.

145. Pels, E. Organ-culture preservation of human corneas / E. Pels, Y. Schuchard. – Text: immediate // *Doc Ophthalmol.* – 1983. – Vol.56, №1-2. – P.147-153.

146. Polisetti, N. A decellularized human corneal scaffold for anterior corneal surface reconstruction / N. Polisetti, A. Schmid, U. Schlotzer-Schrehardt [et al.]. Text: electronic // *Sci Rep.* – 2021. – Vol.11, №1. – 2992.

147. Ponce Marquez, S. Decellularization of bovine corneas for tissue engineering applications / S. Ponce Marquez, V.S. Martínez, W. McIntosh Ambrose [et al.]. Text: immediate // *Acta Biomater.* – 2009. – Vol.5, №6. – P.1839-4187.

148. Pradhan, K.R. Femtosecond laser-assisted keyhole endokeratophakia: correction of hyperopia by implantation of an allogeneic lenticule obtained by SMILE from a myopic donor / K.R. Pradhan, D.Z. Reinstein, G.I. Carp [et al.]. Text: immediate // *J Refract Surg.* – 2013. – Vol.29, №11. – P.777-872.

149. Proulx, S. Tissue engineering of feline corneal endothelium using a devitalized human cornea as carrier / S. Proulx, C. Audet, Jd. Uwamaliya [et al.]. Text: immediate // *Tissue Eng Part A.* – 2009. – Vol.15, №7. – P.1709-1718.

150. Qin, S. Decellularized Human Stromal Lenticules Combine with Corneal Epithelial-Like Cells: A New Resource for Corneal Tissue Engineering / S. Qin, S. Zheng, B. Qi [et al.]. Text: electronic // *Stem Cells Int.* – 2019. – Vol.2019. – 4252514

151. Rafat, M. PEG-stabilized carbodiimide crosslinked collagen-chitosan hydrogels for corneal tissue engineering / M. Rafat, F. Li, P. Fagerholm [et al.]. Text: immediate // *Biomaterials.* – 2008. – Vol.29, №29. – P.3960-3972.

152. Rama, P. Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency / P. Rama, S. Bonini, A. Lambiase [et al.]. Text: immediate // *Transplantation.* – 2001. – Vol.72, №9. – P.1478-1485.

153. Riau, A.K. Femtosecond laser-assisted stromal keratophakia for keratoconus: A systemic review and meta-analysis / A.K. Riau, H.M. Htoon, J.L. Alio Del Barrio [et al.]. Text: immediate // *Int Ophthalmol.* – 2021. – Vol.41, №5. – P.1965-1979.
154. Riau, A.K. Reversible femtosecond laser-assisted myopia correction: a non-human primate study of lenticule re-implantation after refractive lenticule extraction / A.K. Riau, R.I. Angunawela, S.S. Chaurasia [et al.]. Text: electronic // *PLoS One.* – 2013. – Vol.8, №6. – e67058
155. Riau, A.K. Stromal keratophakia: Corneal inlay implantation / A.K. Riau, Y.C. Liu, G.H.F. Yam, J.S. Mehta. – Text: electronic // *Prog Retin Eye Res.* – 2020. – Vol.75. – 100780
156. Rich, L.F. Keratocyte survival in keratophakia lenticules / L.F. Rich, M.H. Friedlander, H.E. Kaufman, N. Granet. – Text: immediate // *Arch Ophthalmol.* – 1981. – Vol.99, №4. – P.677-680.
157. Richter, K. Experimental evidence for the influence of molecular crowding on nuclear architecture / K. Richter, M. Nessling, P. Lichter. – Text: immediate // *J Cell Sci.* – 2007. – Vol.120, №9. – P.1673-1680.
158. Rose, J.B. Gelatin-Based Materials in Ocular Tissue Engineering / J.B. Rose, S. Pacelli, A.J.E. Haj [et al.]. Text: immediate // *Materials (Basel).* – 2014. – Vol.7, №4. – P.3106-3135.
159. Sachdev, M.S. Tailored stromal expansion with a refractive lenticule for crosslinking the ultrathin cornea / M.S. Sachdev, D. Gupta, G. Sachdev, R. Sachdev. – Text: immediate // *J Cataract Refract Surg.* – 2015. – Vol.41, №5. – P.918-923.
160. Sasaki, S. In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas / S. Sasaki, S. Funamoto, Y. Hashimoto [et al.]. Text: immediate // *Mol Vis.* – 2009. – Vol.15. – P.2022-2028.
161. Sato, E.H. Current Status of Corneal Storage. V World Cornea Congress: Program abstracts. – Washington, 2005. – p. 16

162. Sekundo, W. Small incision corneal refractive surgery using the small incision lenticule extraction (SMILE) procedure for the correction of myopia and myopic astigmatism: results of a 6 months prospective study / W. Sekundo, K.S. Kunert, M. Blum. – Text: immediate // *Br J Ophthalmol.* – 2011. – Vol.95, №3. – P.335-339.

163. Shafiq, M.A. Decellularized human cornea for reconstructing the corneal epithelium and anterior stroma / M.A. Shafiq, R.A. Gemeinhart, B.Y. Yue, A.R. Djalilian. – Text: immediate // *Tissue Eng Part C Methods.* – 2012. – Vol.18, №5. – P.340-348.

164. Shah, R. Results of small incision lenticule extraction: All-in-one femtosecond laser refractive surgery / R. Shah., S. Shah., S.Sengupta. – Text: immediate // *J Cataract Refract Surg.* – 2011. – Vol.37, №1. – P.127-137.

165. Shang, Y.F. New progress in the reuse of human corneal stromal lenticules from SMILE / Y.F. Shang, F.J. Zhang. – Text: immediate // *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* – 2020. – Vol.56, №2. – P.144-148.

166. Shao, Y. A novel method in preparation of acellular porcine corneal stroma tissue for lamellar keratoplasty / Y. Shao, J. Tang, Y. Zhou [et al.]. Text: immediate // *Am J Transl Res.* – 2015. – Vol.7, №12. – P.2612-2269.

167. Shao, Y. Evaluation of novel decellularizing corneal stroma for cornea tissue engineering applications / Y. Shao, Y. Yu, C.G. Pei [et al.]. Text: immediate // *Int J Ophthalmol.* – 2012. – Vol.5, №4. – P.415-418.

168. Shi, W. Protectively Decellularized Porcine Cornea versus Human Donor Cornea for Lamellar Transplantation / W. Shi, Q. Zhou, H. Gao[et al.]. Text: immediate // *Adv. Funct. Mater.* – 2019. – Vol.29, №37. – 1902491

169. Shi, Y. Comprehensive evaluation of decellularized porcine corneal after clinical transplantation / Y. Shi, T. Bikkuzin, Z. Song [et al.]. Text: electronic // *Xenotransplantation.* – 2017. – Vol.24, №6. – e12338

170. Song, Y.J., Case series: use of stromal lenticule as patch graft / Y.J. Song, S. Kim, G.J. Yoon. – Text: immediate // *Am J Ophthalmol Case Rep.* – 2018. – Vol.12. – P.79-82.

171. Sorkio, A. Human stem cell based corneal tissue mimicking structures using laserassisted 3D bioprinting and functional bioinks / A. Sorkio, L. Koch, L. Koivusalo [et al.]. Text: immediate // *Biomaterials*. – 2018. – Vol.171. – P.57-71.

172. Sridhar, M.S. Anatomy of cornea and ocular surface / MS. Sridhar. – Text: immediate // *Indian J Ophthalmol*. – 2018. – Vol.66, №2. – P.190-194.

173. Sun, L. The safety and predictability of implanting autologous lenticule obtained by SMILE for hyperopia / L. Sun, P. Yao, M. Li [et al.]. Text: immediate // *J Refract Surg*. – 2015. – Vol.31, №6. – P.374–379.

174. Sun, Y. Reversible femtosecond laser-assisted endokeratophakia using cryopreserved allogeneic corneal lenticule / Y. Sun, T. Zhang, Y. Zhou [et al.]. Text: immediate // *J Refract Surg*. – 2016. – Vol.32, №8. – P.569–576.

175. Swinger, C.A. Comparison of results obtained with keratophakia, hypermetropic keratomileusis, intraocular lens implantation, and extended-wear contact lenses / C.A. Swinger. – Text: immediate // *Intern.Ophthalmol.Clin*. – 1983. – Vol.23, №3. – P.59-74.

176. Swinger, C.A. Keratophakia and keratomileusis—clinical results / C.A. Swinger, J.I. Barraquer. – Text: immediate // *Ophthalmology*. – 1981. – Vol.88, №8. – P.709-715.

177. Tan, D.T. Corneal transplantation / D.T. Tan, J.K. Dart, E.J. Holland, S. Kinoshita. – Text: immediate // *Lancet*. – 2012. – Vol.379, №9827. – P.1749-1761.

178. Taravella, M. Corneal graft rejection / M. Taravella, W.G. Gensheimer. – Text: electronic // *EMedicine*. 2016; <https://emedicine.medscape.com/article/1193505-print>.

179. Trias, E. Banking of corneal stromal lenticules: a risk–analysis assessment with the EuroGTP II interactive tool / E. Trias, P. Gallon, S. Ferrari [et al.]. Text: immediate // *Cell Tissue Bank*. – 2020. – Vol.21, №2. – P.189–204.

180. Turchyn, M. Clinical efficacy of therapeutic keratoplasty using corneal xenografts in patients with corneal ulcers / M. Turchyn, M. Marushchak, I. Krynytska, I. Klishch. – Text: immediate // *Rom J Ophthalmol*. – 2019. – Vol.63, №3. – P.257-263.

181. Uzunalli, G. Bioactive self-assembled peptide nanofibers for corneal stroma regeneration / G. Uzunalli, Z. Soran, T.S. Erkal [et al.]. Text: immediate // *Acta Biomater.* – 2014. – Vol.10, №3. – P.1156–1166.
182. Van den Bogerd, B. Characterizing human decellularized crystalline lens capsules as a scaffold for corneal endothelial tissue engineering / B. Van den Bogerd, S. Ni Dhubhghaill, N. Zakaria. – Text: electronic // *J Tissue Eng Regen Med.* – 2018. – Vol.12, №4. – e2020-e2028.
183. Wang, S. In vitro 3D corneal tissue model with epithelium, stroma, and innervation / S. Wang, C.E. Ghezzi, R. Gomes [et al.]. Text: immediate // *Biomaterials.* – 2017. – Vol.112. – P.1–9.
184. Wang, Y. Partial thickness cornea tissue from small incision lenticule extraction: a novel patch graft in glaucoma drainage implant surgery / Y. Wang, X. Li, W. Huang [et al.]. Text: electronic // *Medicine (Baltimore).* – 2019. – Vol.98, №9. – e14500
185. Witcher, J.P. Corneal blindness: a global perspective / J.P. Witcher, M. Srinivasan, M.P. Upadhyay. – Text: immediate // *Bull World Health Organ.* – 2001. – Vol.79, №3. – P. 214–221.
186. Williams, A.M. Awareness and attitudes toward corneal donation: challenges and opportunities / A.M. Williams, K.W. Muir. – Text: immediate // *Clin Ophthalmol.* – 2018. – Vol.12. – P. 1049-1059.
187. Williams, G.P. Hyperopic refractive correction by LASIK, SMILE or lenticule reimplantation in a non-human primate model / G.P. Williams, B. Wu, Y.C. Liu [et al.]. Text: electronic // *PLoS One.* – 2018. – Vol.13, №3. – e0194209
188. Williams, K.A. Clinical and experimental aspects of corneal transplantation / K.A. Williams, D.J. Coster. – Text: immediate // *Trans Rev.* – 1993. – Vol.7, №1. – P. 44-64.
189. Wilson, S.L. Corneal Decellularization: A Method of Recycling Unsuitable Donor Tissue for Clinical Translation? / S.L. Wilson, L.E. Sidney, S.E. Dunphy [et al.]. Text: immediate // *Curr. Eye Res.* – 2016. – Vol.41, №6. – P.769-782.

190. Wolfe, J. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane- solute-water systems. *Cryobiology* / J. Wolfe, G. Bryant. – Text: immediate // *Cryobiology*. – 1999. – Vol.39, №2. – P.103-129.
191. Xia, F. Optical transmittance and ultrastructure of SMILE-derived lenticules subjected to three different preservative methods / F. Xia, J. Zhao, D. Fu [et al.]. Text: electronic // *Exp Eye Res*. – 2020. – Vol.201 – 108357
192. Xiao, J. Construction of the recellularized corneal stroma using porous acellular corneal scaffold / J. Xiao, H. Duan, Z. Liu [et al.]. Text: immediate // *Biomaterials*. – 2011. – Vol.32, №29. – P.6962–6971.
193. Xu, B. Construction of Anterior Hemi-Corneal Equivalents Using Nontransfected Human Corneal Cells and Transplantation in Dog Models / B. Xu, Z. Song, T. Fan. – Text: immediate // *Artif Organs*. – 2017. – Vol.41, №11. – P.1004-1016.
194. Xu, Y.G. Development of a rabbit corneal equivalent using an acellular corneal matrix of a porcine substrate / Y.G. Xu, Y.S. Xu, C. Huang [et al.]. Text: immediate // *B Mol. Vis*. – 2008. – Vol.14. – P.2180–2189.
195. Yam, G.H. Decellularization of human stromal refractive lenticules for corneal tissue engineering / G.H. Yam, N.Z. Yusoff, T.W. Goh [et al.]. Text: electronic // *Sci Rep*. – 2016. – Vol.6. – P.26339
196. Yin, H. Construction of a Corneal Stromal Equivalent with SMILE-Derived Lenticules and Fibrin Glue / H. Yin, P. Qiu, F. Wu [et al.]. Text: electronic // *Sci Rep*. – 2016. – Vol.6. – 33848
197. Yoeruek, E. Decellularization of porcine corneas and repopulation with human corneal cells for tissue-engineered xenografts / E. Yoeruek, T. Bayyoud, C. Maurus [et al.]. Text: electronic // *Acta Ophthalmol*. – 2012. – Vol.90, №2. – e125-31
198. Yoon, C.H. Corneal xenotransplantation: Where are we standing? / C.H. Yoon, H.J. Choi, M.K. Kim. – Text: electronic // *Prog Retin Eye Res*. – 2021. – Vol.80. – 100876
199. Zavala, E.Y. Refractive keratoplasty: lathing and cryopreservation / E.Y. Zavala, P.S. Binder, J.K. Deg, S.D. Baumgartner. – Text: immediate // *CLAO J*. – 1985. – Vol.11, №2. – P.1155-162.

200. Zhang, C. Survival and integration of tissue-engineered corneal stroma in a model of corneal ulcer / C. Zhang, X. Nie, D. Hu [et al.]. Text: immediate // *Cell Tissue Res.* – 2007. – Vol.329, №2. – P.249–257.
201. Zhang, M.C. Lamellar keratoplasty treatment of fungal corneal ulcers with acellular porcine corneal stroma / M.C. Zhang, X. Liu, Y. Jin. – Text: immediate // *Am J Transplant.* – 2015. – Vol.15, №4. – P.1068-1075.
202. Zhang, Z. Bioengineered multilayered human corneas from discarded human corneal tissue / Z. Zhang, G Niu, J.S. Choi [et al.]. Text: electronic // *Biomed. Mater.* – 2015. – Vol.10, №3. – 035012
203. Zhao, J. Two-year observation of morphologic and histopathologic changes in the monkey cornea following small incision allogenic lenticule implantation / J. Zhao, R. Liu, Y. Shen [et al.]. Text: electronic // *Exp Eye Res.* – 2020. – Vol.192. – 107935.
204. Zheng, J. Short-term results of acellular porcine corneal stroma keratoplasty for herpes simplex keratitis / J. Zheng, X. Huang, Y. Zhang [et al.]. Text: electronic // *Xenotransplantation.* – 2019. – Vol.26, №4. – e12509
205. Zhou, Y. Development and characterization of acellular porcine corneal matrix using sodium dodecylsulfate / Y. Zhou, Z. Wu, J. Ge [et al.]. Text: immediate // *Cornea.* – 2011. – Vol.30, №1. – P.73–82.