

На правах рукописи

Кузьмичев Константин Николаевич

**КЛИНИКО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ  
ТЕХНОЛОГИИ ЗАДНЕЙ ПОСЛОЙНОЙ КЕРАТОПЛАСТИКИ С  
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УЛЬТРАТОНКОГО ТРАНСПЛАНТАТА,  
ЗАГОТОВЛЕННОГО С ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ПОВЕРХНОСТИ  
РОГОВИЦЫ С ПОМОЩЬЮ НИЗКОЧАСТОТНОГО  
ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРА**

3.1.5 – Офтальмология (медицинские науки)

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва 2022

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

**Научный руководитель:**

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

**Официальные оппоненты:**

**Шелудченко Вячеслав Михайлович** – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАЕН, главный научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней»

**Пашинова Надежда Федоровна** – доктор медицинских наук, академик РАЕН, главный врач московской офтальмологической клиники «Эксимер»

**Ведущая организация:**

ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России.

Защита диссертации состоится «16» мая 2022 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 21.1.021.01 при ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России по адресу: 127486, Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59А.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 202\_\_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор медицинских наук

И.А. Мушкова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Эндотелиальная дистрофия (ЭД) роговицы различной этиологии (псевдофакичная буллезная кератопатия (ПБК), дистрофия роговицы Фукса (ДФ) является одним из ведущих показаний к кератопластике (Tan D., Mehta J. 2007).

По данным Ассоциации глазных банков США за 2019 год, процент выполнения задней автоматизированной послойной кератопластики (ЗАПК) был равным 34% от количества всех выполненных кератопластик в стране (Eye Bank Association of America: Statistical report on eye banking activity for 2019).

В Российской Федерации на 2016 год в среднем патология роговицы среди взрослого населения составляет 2% от количества всех инвалидов по зрению (Нероев В.В. 2017).

Автоматизированная задняя послойная кератопластика, также известная как DSAЕК (Descemet's Stripping Automated Endotelial Keratoplasty) – «Золотой стандарт» лечения ЭД, однако наиболее высокие зрительные функции можно получить лишь при использовании так называемого ультратонкого трансплантата, характеризующегося центральной толщиной, не превышающей 130 мкм. По данным Neff KD, et al. острота зрения 0,8 достигается у всех пациентов с ультратонким трансплантатом и в 71% – 1,0, в то время как использование более толстого трансплантата только в 50% случаев дает 0,8 и в 19% – 1,0 (Neff KD, et al. 2011).

Изготовление трансплантата такого рода общепринятым методом с помощью механического микрокератома сопряжено с большим количеством технических сложностей. Частота перфорации во время второго среза микрокератомом достигает 18% (Sikder S, Nordgren RN, et al. 2011). Нередко трансплантат получается более толстым, что отрицательно сказывается на зрительных функциях пациента, либо происходит перфорация и роговица

выбраковывается, что совершенно не допустимо в современных условиях дефицита донорского материала. (Малюгин Б.Э., Мороз З.И., Ковшун Е.В., Дроздов И.В. 2010; Busin M., Patel A.K., Scorgia V., Ponzin D. 2012; Sikder S., Nordgren R.N., Neravetla S.R., Moshirfar M. 2011).

Альтернативным методом заготовки трансплантата является применение для его выкраивания фемтосекундного лазера (ФСЛ). Данная методика является более точной, однако при формировании трансплантата с передней поверхности роговицы имеет ряд тех же недостатков, что и традиционная с применением микрокератома: большая толщина периферической части трансплантата по сравнению с центральной, что приводит к гиперметропическому сдвигу рефракции пациента; слабая предсказуемость итоговой толщины трансплантата, связанная с тем, что используемые ультразвуковые и оптические методы исследования толщины донорской роговицы имеют достаточно большую погрешность, связанную с сильной гидратацией донорского материала при хранении в консервационной среде, также, по всей видимости, точность фокусировки лазера падает при увеличении расстояния от источника излучения (Cheng YY, Schouten JS, Tahzib NG, et al. 2009; Cheng YY, van den Berg TJ, Schouten JS, et al. 2011).

Решением проблемы является формирование трансплантата с эндотелиальной поверхности роговицы. Имеется описание такой методики для фемтосекундного лазера Ziess Visumax 500 кГц (Jesper Hjortdal, Esben Nielsen, Anders Vestergaard, Anders Søndergaard. 2012).

Однако у описанного метода имеются недостатки: применение лазерной установки с изогнутым аппланационным интерфейсом и высокой плотностью энергии. Авторы отмечают, что средняя острота зрения пациентов после операции составила 0,3, а максимальная – не превысила 0,5, и связывают это с наличием «хейза» в области интерфейса «донор-реципиент». Такого рода пролиферативный ответ кератоцитов характерен для их активации избыточным энергетическим воздействием. Также изогнутая форма лазерного интерфейса может иметь значение.

Наибольшее распространение для инвертной методики фемтолазерной задней послойной кератопластики (ФЛ-ЗПК) получил высокочастотный ФСЛ – Ziemer Femto LDV Z6, Z8 (Нероев В.В. с соавт., 2013; Mehta J.S. et al., 2014). В России применение данного ФСЛ изучалось достаточно подробно на протяжении последних лет (Погорелова С.С. с соавт., 2016; Яковлева С.С., 2017; Шилова Н.Ф., 2019). Его использование приводит к нулевому проценту выбраковки донорского материала, позволяет заготовить ультратонкий и равномерный донорский материал, а также достичь биологического эффекта операции, но, к сожалению, полученная максимальная острота зрения с трудом достигает 0,5, при этом потеря эндотелиальных клеток также высока.

Каждая из упомянутых выше методик имеет свои недостатки и не дает нам решения всех задач, поставленных перед хирургом в процессе заготовки донорского материала как наиболее важного этапа в процессе проведения задней послойной кератопластики. Что приводит нас к поиску возможного решения имеющихся проблем, связанных с выкраиванием ультратонкого роговичного трансплантата.

Задачей нашего исследования является поиск и разработка стандартизированного, повторяемого, а также безопасного и легко прогнозируемого способа формирования ультратонких донорских роговичных трансплантатов равномерной толщины для задней послойной кератопластики с целью повышения качества заготавливаемого роговичного диска, уменьшения выбраковки материала и улучшения клинико-функциональных результатов операции.

### **Цель исследования**

Разработать в эксперименте и изучить в клинике методику задней послойной кератопластики с использованием ультратонкого донорского роговичного трансплантата, заготовленного с эндотелиальной поверхности роговицы с помощью низкочастотного фемтосекундного лазера.

### Задачи исследования

1. В эксперименте разработать метод заготовки ультратонкого трансплантата для задней послойной кератопластики с эндотелиальной поверхности роговицы с помощью низкочастотного фемтосекундного лазера и определить оптимальные параметры его работы.
2. В эксперименте с применением флуоресцентных красителей изучить воздействие фемтолазерной энергии на эндотелиальные клетки и кератоциты при заготовке ультратонкого трансплантата с эндотелиальной поверхности роговицы с помощью низкочастотного фемтосекундного лазера в сравнительном аспекте с высокочастотным.
3. В эксперименте методом атомно-силовой микроскопии провести сравнительный анализ качества поверхности ультратонкого трансплантата, заготовленного с помощью низкочастотного фемтосекундного лазера в сравнительном аспекте с высокочастотным.
4. Разработать в клинике хирургический этап технологии задней послойной кератопластики с использованием ультратонкого трансплантата, заготовленного с эндотелиальной поверхности роговицы с помощью низкочастотного фемтосекундного лазера
5. На основании анализа клинико-функциональных результатов лечения пациентов с эндотелиальной дистрофией роговицы Фукса и псевдофакичной буллезной кератопатией, прооперированных методом задней послойной кератопластики с применением ультратонкого трансплантата, заготовленного с помощью низкочастотного фемтосекундного лазера в сравнительном аспекте с высокочастотным, доказать эффективность и безопасность новой технологии.
6. На основании методов оптической когерентной томографии и денситометрии роговицы оценить в послеоперационном периоде центральную толщину роговицы, толщину и индекс Ц:П ультратонкого трансплантата, а также оптическую плотность роговицы реципиента для определения восстановления ее прозрачности и равномерности

сформированного трансплантата после задней послойной кератопластики с использованием низкочастотного фемтосекундного лазера в сравнительном аспекте с применением высокочастотного.

### **Научная новизна**

1. Впервые разработан метод заготовки ультратонкого трансплантата с эндотелиальной поверхности с помощью низкочастотного фемтосекундного лазера и определены оптимальные энергетические параметры его работы.
2. Впервые с помощью флуоресцентного красителя исследовано воздействие на эндотелий и кератоциты ультратонкого трансплантата низкочастотного фемтосекундного лазера в сравнительном аспекте с высокочастотным.
3. Впервые методом атомно-силовой микроскопии получены данные о качестве поверхности ультратонкого трансплантата, заготовленного с помощью низкочастотного фемтосекундного лазера в сравнительном аспекте с высокочастотным.
4. Впервые получены сравнительные данные о клинико-функциональных результатах лечения и изучена потеря эндотелиальных клеток в послеоперационном периоде у пациентов с эндотелиальной дистрофией роговицы Фукса и псевдофакичной буллезной кератопатией, прооперированных методом задней послойной кератопластики с применением ультратонкого трансплантата, заготовленного с помощью низкочастотного фемтосекундного лазера в сравнительном аспекте с высокочастотным.
5. Впервые методом оптической когерентной томографии роговицы произведена оценка в послеоперационном периоде центральной толщины роговицы реципиента, а также толщины и индекса Ц:П ультратонкого трансплантата после задней послойной кератопластики с использованием для заготовки трансплантата низкочастотного фемтосекундного лазера в сравнительном аспекте с высокочастотным.

6. Впервые методом денситометрии с помощью ротационной Шаймпфлюг – камеры определена оптическая плотность роговицы реципиента после проведения задней послойной кератопластики с использованием донорского трансплантата, заготовленного с помощью низкочастотного фемтосекундного лазера в сравнительном аспекте с высокочастотным.

### **Практическая значимость**

1. Разработанный метод аппланации низкочастотного фемтосекундного лазера и выкраивания трансплантата позволяет в 100% случаев получить равномерный ультратонкий трансплантат без риска его перфорации.
2. Разработанные параметры работы низкочастотного фемтосекундного лазера (глубина – 130 мкм, энергия – 0,8 мкДж, расстояние между точками – 8 мкм, между рядами – 8 мкм) позволяют получить равномерный по толщине и форме ультратонкий трансплантат с достаточно качественной поверхностью.
3. Экспериментальное изучение воздействия фемтолазерной энергии на кератоциты выявило наличие мертвых клеток вплоть до глубины 117 мкм. Из чего следует, что уменьшение толщины трансплантата менее 100 мкм не является целесообразным, так как может оказывать негативное воздействие на эндотелиальные клетки.

### **Основное положение, выносимое на защиту**

Разработанная технология задней послойной кератопластики, основанная на использовании ультратонкого и равномерного по толщине трансплантата, заготовленного с эндотелиальной поверхности роговицы с помощью оптимизированных настроек низкочастотного фемтосекундного лазера, является безопасной, оказывает минимальное воздействие на структуру и клеточный состав трансплантата и обладает высокой биологической и клинической эффективностью.



### **Внедрение в клиническую практику**

Результаты исследований и разработанная методика внедрены в практическую деятельность головной организации ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России. Результаты и положения работы включены в программу теоретических и практических занятий на циклах тематического усовершенствования врачей и обучения ординаторов на кафедре глазных болезней ИНПО ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России.

### **Апробация работы**

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на XIX и XX Международных научно-практических конференциях «Современные технологии катарактальной и рефракционной хирургии» (Москва, 2018, 2019); на XV и XVI Всероссийских научных конференциях «Федоровские чтения» (Москва 2018, 2019); на XXXVII Конгрессе Европейского общества катарактальных и рефракционных хирургов (Париж 2019); на съезде Всеиндийского общества офтальмологов 2019 (Индор); на конференции «Роговицы онлайн» 2020; на совместной онлайн-конференции Общества офтальмологов России и Всеиндийского общества офтальмологов 2020; на XII Съезде Общества офтальмологов России (2020).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликованы 4 печатные работы в журналах, рецензируемых Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации, из них – 2 статьи, входящие в базу данных Scopus. Получены два патента Российской Федерации на изобретение: № 2689884 от 29.05.2019 и 2727871 от 24.07.2020.

## **Структура и объем работы**

Диссертационная работа изложена на 148 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной материалам и методам, а также двух глав с результатами экспериментальных и клинических исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы. Работа проиллюстрирована 29 рисунками и содержит 29 таблиц. Список использованной литературы включает 263 источника, из них 37 отечественных и 226 иностранных.

Работа выполнена на базе ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации в отделе трансплантационной и оптико-реконструктивной хирургии переднего отрезка глазного яблока и на базе Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем головной организации. Часть экспериментального исследования была выполнена на базе Института окружающей среды и сельскохозяйственной биологии (Х-БИО) Тюменского государственного университета.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материал и методы исследования**

#### *Общая характеристика экспериментального материала*

Первая часть экспериментальной работы включала в себя изучение и сравнительный анализ воздействия на эндотелиальные клетки и кератоциты двух различных фемтолазерных систем.

Для этого методом прижизненного окрашивания с помощью флуоресцентного красителя, после заготовки трансплантата толщиной 130 мкм при помощи двух различных фемтолазерных установок, были исследованы 10 свиных роговиц.

Группа 1 состояла из 5 свиных корнеосклеральных дисков, из которых в последствии были заготовлены ультратонкие трансплантаты с эндотелиальной поверхности роговицы при помощи низкочастотного ФСЛ.

Группа 2 включала 5 свиных корнеосклеральных дисков, из которых впоследствии были заготовлены ультратонкие трансплантаты с эндотелиальной поверхности роговицы при помощи высокочастотного ФСЛ.

Вторая часть экспериментальной работы заключалась в количественной оценке качества формируемой стромальной поверхности трансплантатов, заготовленных при помощи двух различных ФСЛ методом атомно-силовой микроскопии.

В группу 1 были включены 10 кадаверных роговичных дисков, которые были получены после выкраивания ультратонкого роговичного трансплантата при помощи низкочастотного ФСЛ.

В группу 2 были включены 10 кадаверных роговичных дисков, которые были получены после выкраивания ультратонкого роговичного трансплантата с использованием высокочастотного ФСЛ.

#### *Общая характеристика клинического материала*

Исследование основывалось на сравнительном анализе данных клинико-функциональных исследований и результатов хирургического лечения 101 пациента (101 глаза) с дистрофией роговицы Фукса и псевдофакичной буллезной кератоптазией. У пациентов с ДФ также была диагностирована катаракта разной степени выраженности. Всем пациентам была выполнена ФЛ-ЗПК с применением ультратонких трансплантатов, заготовленных при помощи двух различных ФСЛ. Все пациенты, которые вошли в исследование, обратились в головную организацию ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» и МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России с жалобами на выраженное снижение зрения или отсутствие предметного зрения, пациенты с выраженной ПБК также жаловались на слезотечение, светобоязнь, боли.

В зависимости от выявленной клинической патологии и вида хирургического лечения все пациенты были разделены на 4 группы.

**Группа 1А** – пациенты с катарактой и ДФ, которым одномоментно выполнена комбинированная операция ФЛ-ЗПК с использованием низкочастотного ФСЛ + факоемульсификация катаракты (ФЭК) + имплантация интраокулярной линзы (ИОЛ) в капсульный мешок **(25 пациентов, 25 глаз).**

**Группа 1Б** – пациенты с ПБК и артефакцией, которым была выполнена ФЛ-ЗПК с использованием низкочастотного ФСЛ **(24 пациента, 24 глаз).**

**Группа 2А** – пациенты с катарактой и ДФ, которым одномоментно выполнена комбинированная операция ФЛ-ЗПК с использованием высокочастотного ФСЛ + ФЭК + имплантация ИОЛ в капсульный мешок **(27 пациентов, 27 глаз).**

**Группа 2Б** – пациенты с ПБК и артефакцией, которым была выполнена ФЛ-ЗПК с использованием высокочастотного ФСЛ **(25 пациентов, 25 глаз).**

Критериями включения пациентов были наличие эндотелиальной дистрофии роговицы в развитой или далеко зашедшей стадиях, на основании классификации Волкова В.В. и Дронова М.М. (1978), которая также применима к первичной дистрофии роговицы Фукса и отражает поражение и вовлечение основных тканевых структур роговицы пациента. Для групп 1А и 2А критерием включения служило дополнительное наличие возрастной катаракты.

К наличию развитой стадии относились пациенты, которые имели стойкий отек эндотелия и стромы, множественные складки ДМ, что можно было визуализировать при выполнении биомикроскопии. По данным кератопахиметрии, данная стадия характеризовалась центральной толщиной роговицы (ЦТР) >640 мкм.

Пациенты с далеко зашедшей стадией характеризовались наличием выраженного диффузного стромального и эпителиального отека роговицы, буллезностью эпителия. ЦТР находилась в диапазоне от 700 до 1010 мкм.

Пациенты с выраженным роговичным синдромом до операции получали консервативное лечение в виде корнепротекторов и временного ношения мягкой контактной линзы.

Критериями исключения пациентов из исследования были следующие параметры: отказ пациента от участия в исследовании, тяжелое соматическое состояние пациента, выраженные необратимые изменения в строме роговицы, неоперабельная отслойка сетчатки, рубцовая стадия возрастной макулярной дегенерации (ВМД), амблиопия высокой степени, терминальная глаукома, глаукома с некомпенсированным внутриглазным давлением (ВГД).

Всем пациентам было выполнено комплексное клиничко-функциональное обследование, которое включало в себя следующие исследования: визометрия с коррекцией и без, авторефрактометрия, тонометрия, периметрия, электрофизиологические исследования зрительного нерва (определение порогов электрической чувствительности и лабильности), биомикроскопия, офтальмоскопия, ультразвуковая эхобиометрия, кератотопография, подсчет плотности эндотелиальных клеток, оптическая когерентная томография, Шаймпфлюг денситометрия.

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

## **Результаты экспериментальной части**

### *Новая технология заготовки трансплантата с использованием низкочастотного фемтосекундного лазера*

Для заготовки ультратонкого трансплантата использовалась низкочастотная фемтолазерная установка немецкого производства с плоским

аппланационным интерфейсом, который обуславливает равномерное уплощение донорской роговичной ткани – Alcon Wavelight FS 200.

Данный ФСЛ имеет возможность изменять мощность импульсов и расстояние между ними индивидуально в зависимости от глубины реза и поставленных задач, это дает возможность подобрать параметры работы лазера так, чтобы максимально снизить плотность излучаемой энергии на площадь роговичной поверхности (мкДж/мм<sup>2</sup>). Фемтолазерная установка осуществляет свою работу на частоте 200 кГц с энергией импульса от 0,3 до 1,5 мкДж, расстояние между импульсами варьирует от 4 до 12 мкм.

Экспериментальный свиной корнеосклеральный диск, законсервированный в растворе для хранения роговичной ткани производства ООО «Научно-экспериментальное производство Микрохирургия глаза» (Россия, ТУ 9393-013-29039336-2007, регистрационное удостоверение № ФСР2010106650), устанавливали на искусственную переднюю камеру (ИПК) эндотелиальной поверхностью вверх. После закрывания механизма ИПК, выполняли ее заполнение сбалансированным солевым раствором при помощи подключения к ней инфузионной системы. Для этого располагали флакон с солевым раствором на штативе с фиксатором на высоте, обеспечивающей давление внутри системы равное 30 см вод. ст. Данное давление является минимальным для срабатывания датчика в ФСЛ, позволяющего выполнить срез, а также снижает потерю эндотелиальных клеток за счет минимизации силы контакта с аппланационным интерфейсом, обеспечивает равномерную аппланацию и предсказуемый этап фемтодиссекции. Эндотелиальную поверхность роговицы увлажняли путем нанесения на нее консервационной среды.

Готовую для работы роговицу, находящуюся в ИПК, помещали под аппланационный интерфейс лазера. После центровки выполняли процесс аппланации путем вращения джойстика ФСЛ, который, в свою очередь, оснащен электрическим сервоприводом.

Далее, под контролем компьютерной программы, выполняли срез роговицы заданного профиля. Первый срез проводили в ламеллярной плоскости на глубине 130 мкм, второй – в вертикальной плоскости с глубины 150 мкм сверху (в сторону эндотелия) диаметром 8,0 мм под углом 90°. В таком случае происходит перекрывание ламеллярного и вертикального среза друг другом, что обеспечивает качественное отделение полученного трансплантата по краям среза. Для минимизации энергии, которая расходуется на единицу площади поверхности роговицы во время выполнения ламеллярного среза, наиболее оптимальными выявлены ниже представленные параметры ФСЛ: расстояние между точками – 8 мкм, между рядами – 8 мкм, энергия – 0,8 мкДж.

Растровый паттерн. Время формирования среза (контакта интерфейса ФСЛ с эндотелием) занимает 15 сек.

Расчёт проводили по формуле:

$$W = 1000000/a \times b \times E,$$

где  $W$  – плотность энергии на площадь поверхности, мкДж/мм<sup>2</sup>;  $a$  – расстояние между импульсами, мкм;  $b$  – расстояние между рядами, мкм;  $E$  – энергия, мкДж; 1000000 – количество мкм<sup>2</sup> в 1 мм<sup>2</sup>.

Отделение полученного трансплантата от окружающих тканей производили при помощи шпателя. Оставшиеся коллагеновые перемычки во всех случаях были разрушены тупым способом.

*Экспериментальное исследование воздействия фемтолазерной энергии на эндотелиальные клетки и кератоциты при заготовке трансплантата*

Для определения жизнеспособности эндотелия и кератоцитов роговицы применяли флуоресцентный краситель Live and Dead. Для визуализации и изучения результатов окрашивания применяли лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Olympus Fluoview 10i (Olympus, Япония). Подсчет живых и мертвых клеток с полученных изображений осуществлялся при помощи программы ImageJ (National Institutes of Health, США).

Проведенный статистический анализ не выявил статистически значимые различия по остаточному проценту живых эндотелиальных клеток и мертвых между указанными группами ( $p > 0,05$ ).

Процент живых эндотелиальных клеток после выкраивания ультратонкого трансплантата с использованием низкочастотного ФСЛ составил в среднем  $93,2 \pm 5,4\%$ , мертвых –  $6,7 \pm 5,4\%$ . В тех случаях, когда трансплантат заготавливался при помощи высокочастотного, процент живых эндотелиальных клеток был равен  $85,3 \pm 6,3\%$ , мертвых –  $14,6 \pm 6,1\%$ .

По результатам эксперимента, повреждающее воздействие фемтолазерной энергии вне зависимости от вида ФСЛ проникает внутрь стромы трансплантата от непосредственного места формирования среза на глубину до 117 мкм. Выполненный статистический анализ выявил статистически значимые отличия между группами только на глубине от 13 до 52 мкм ( $p < 0,05$ ). В указанном диапазоне большая гибель кератоцитов наблюдалась в группе с применением низкочастотного ФСЛ.

*Экспериментальное изучение качества формируемой стромальной поверхности ультратонкого трансплантата после его заготовки с использованием двух различных фемтолазерных систем*

Сканирование осуществляли при помощи сканирующего микроскопа Certus V (Nano Scan Technologies, Россия). Его выполняли в безвоздушной среде и в контактном режиме, причем образцы были предварительно высушены в эксикаторе. Применялись следующие зонды: MSCT-AUNM (Veeco, США), жесткость балки – 0,01 Н/м, радиус кривизны зонда – 10 нм.

Качество формируемой при помощи лазера поверхности возможно оценить при помощи показателя RMS: чем он выше, тем трансплантат имеет более грубую поверхность, что, возможно, в дальнейшем может сказаться на зрительных функциях пациента.

В группе 1, в которой для выкраивания трансплантата использовался низкочастотный ФСЛ, значение RMS составило  $18,55 \pm 4,59$  мкм.



В группе 2, в которой применялся высокочастотный ФСЛ, значение показателя RMS было равно  $13,9 \pm 5,2$  мкм.

По результатам оценки качества среза, шероховатость после воздействия низкочастотного ФСЛ была больше в сравнении с высокочастотным ( $p < 0,05$ ).

### **Результаты клинической части**

#### *Анализ клинико-функциональных исследований пациентов в послеоперационном периоде*

Во всех случаях операцию завершали полноценной адгезией и запланированной центровкой трансплантата, что свидетельствует об очень высокой предсказуемости и повторяемости ФЛ-ЗПК. Послеоперационный период протекал адекватно. Все пациенты получали стандартные послеоперационные назначения в виде инстилляций антибиотика, стероидного противовоспалительного препарата и кераторепаранта, а также субконъюнктивальные инъекции стероидного препарата.

Во всех группах в послеоперационном периоде на всех сроках наблюдения отмечали увеличение показателей некорригированной остроты зрения (**НКОЗ**) по сравнению со значениями, полученными в дооперационном периоде ( $p < 0,05$ ).

Значения корригированной остроты зрения (**КОЗ**) в послеоперационном периоде были значительно выше во всех группах по сравнению с дооперационными данными. К трем месяцам наблюдения восстановление КОЗ было наиболее стремительным во всех исследуемых группах. На сроке 12 месяцев наилучшие показатели КОЗ были в группах с ДФ и составили 0,6, в группе 1А ( $0,33 \pm 0,16$ ) – у 7 пациентов и в группе 2А ( $0,3 \pm 0,12$ ) – у 5 соответственно. В группах с ПБК наилучшими показателями КОЗ также было достижение 0,6, однако в меньшем количестве случаев: в группе 1Б ( $0,3 \pm 0,1$ ) – у 3 пациентов, в группе 2Б ( $0,29 \pm 0,07$ ) – у 2 пациентов.

При этом статистически значимые различия КОЗ между группами 1А и 2А, а также 1Б и 2Б не были обнаружены ни на одном сроке наблюдения ( $p > 0,05$ ).

*Сравнительный анализ потери плотности эндотелиальных клеток в послеоперационном периоде*

В группах пациентов с ДФ наибольшая потеря плотности эндотелиальных клеток (ПЭК) к сроку наблюдения 1 год наблюдалась в группе 2А, в которой трансплантат был заготовлен при помощи высокочастотного ФСЛ. Также были выявлены статистически значимые различия в плотности эндотелиальных клеток между группами 1А и 2А на всех сроках наблюдения ( $p < 0,05$ ). К сроку наблюдения 12 месяцев эти показатели составили в группе 1А –  $1397,4 \pm 348,7$  кл/мм<sup>2</sup> (48,1±6,7%) и в группе 2А –  $959,01 \pm 240,4$  кл/мм<sup>2</sup> (67,2±4,4%). В группе 1А эти показатели были выше.

В процессе анализа динамики снижения ПЭК в группах пациентов с ПБК были выявлены статистически значимые отличия ( $p < 0,05$ ). В группе 1Б, в которой использовали для заготовки трансплантата низкочастотный ФСЛ, на всех сроках наблюдения ПЭК была выше по сравнению с группой 2Б, в которой применяли высокочастотный ФСЛ. К сроку наблюдения 12 месяцев эти показатели составили в группе 1Б –  $1189,6 \pm 231,2$  кл/мм<sup>2</sup> (59,4±8,1%) и в группе 2Б –  $872,3 \pm 256,9$  кл/мм<sup>2</sup> (70,1±7,8%).

*Сравнительный анализ результатов оптической когерентной томографии роговицы*

На сроке наблюдения 12 месяцев во всех группах регистрировали достоверное уменьшение толщины ЦТР по сравнению с дооперационными данными: в группе 1А – с  $673 \pm 54$  до  $539 \pm 25,3$ , в группе 2А – с  $632 \pm 61$  до  $544 \pm 28,9$ , 1Б – с  $771 \pm 147$  до  $546 \pm 19,4$ , 2Б – с  $809 \pm 153$  до  $545 \pm 25,6$  мкм ( $p < 0,05$ ). Статистически значимые различия в группах с ДФ (1А, 2А) выявлены не были

( $p>0,05$ ). В группах пациентов с ПБК (1Б и 2Б) статистически достоверных различий также выявлено не было ( $p>0,05$ ).

Во всех случаях полученные ультратонкие трансплантаты были равномерными (индекс Ц:П стремился к 1,0).

### *Сравнительный анализ оптической плотности роговицы после выполнения ФЛ-ЗПК*

В послеоперационном периоде на различных сроках наблюдения статистически значимые отличия показателей общей оптической плотности роговицы (TL) в группах 1А ( $18,5\pm 6,3$ ) и 2А ( $19,2\pm 4,01$ ) выявлены не были, так же, как и в группах 1Б ( $20,6\pm 7,5$ ) и 2Б ( $21,3\pm 5,8$ ) ( $p>0,05$ ). Статистически значимые различия показателей оптической плотности переднего, среднего, заднего слоев, а также условленной зоны интерфейса между группами 1А и 2А, 1Б и 2Б выявлены не были ( $p>0,05$ ). На сроке наблюдения 12 месяцев после проведенного оперативного лечения во всех группах величина оптической плотности роговицы была максимально приближена к нормальным значениям денситометрии.

## **ВЫВОДЫ**

1. Новый метод заготовки ультратонкого роговичного трансплантата для задней послойной кератопластики с эндотелиальной поверхности роговицы с помощью низкочастотного фемтосекундного лазера с применением разработанных параметров (расстояние между точками – 8 мкм, между рядами – 8 мкм, энергия – 0,8 мкДж) позволяет достичь качественного формирования трансплантата без риска его перфорации и получить линтикулу предсказуемой толщины и формы.
2. Анализ воздействия фемтолазерной энергии на эндотелиальные клетки роговицы в эксперименте продемонстрировал безопасность методики ФЛ-ЗПК, причем статистически значимая разница между используемыми ФСЛ не была выявлена ( $p>0,05$ ): процент живых клеток после выкраивания с

помощью низкочастотного и высокочастотного ФСЛ составил  $93,2 \pm 5,4\%$  и  $85,3 \pm 6,3\%$  соответственно; мертвые кератоциты вне зависимости от типа ФСЛ встречаются до глубины 117 мкм от непосредственного места формирования среза, значимые отличия между ФСЛ встречаются только на глубине от 13 до 52 мкм ( $p < 0,05$ ): в указанном диапазоне большая гибель кератоцитов наблюдалась в группе с применением низкочастотного ФСЛ.

3. Сравнительный анализ результатов атомно-силовой микроскопии продемонстрировал, что качество поверхности ультратонкого трансплантата после воздействия низкочастотного ФСЛ было статистически значимо ниже в сравнении с высокочастотным ФСЛ ( $p < 0,05$ ).
4. Разработан в клинике хирургический этап технологии задней послойной кератопластики с использованием ультратонкого трансплантата, заготовленного с эндотелиальной поверхности роговицы с помощью низкочастотного фемтосекундного лазера
5. В результате проведения пациентам ФЛ-ЗПК во всех группах отмечали положительную динамику клинико-функциональных показателей. На сроке 12 месяцев после операции наилучший показатель КОЗ во всех группах составил 0,6, при этом наличие КОЗ зрения  $\geq 0,5$  было достигнуто в 28% случаев в группе 1А, 12,5% – в 1Б, 18,5% – в 2А и 8% случаев в группе 2Б, статистически значимые различия КОЗ в послеоперационном периоде в группах пациентов с ДФ, а также с ПБК выявлены не были ( $p > 0,05$ ). Применение низкочастотного ФСЛ позволяет достичь более высоких показателей ПЭК (к 12 мес.  $1397,4 \pm 348,7$  кл/мм<sup>2</sup> – ДФ,  $1189,6 \pm 231,2$  кл/мм<sup>2</sup> – БК) и меньшей потери эндотелиальных клеток (к 12 мес.  $48,1 \pm 6,7\%$  – ДФ,  $59,4 \pm 8,1$  – БК) на всех сроках наблюдения ( $p < 0,05$ ).
6. Во всех группах в послеоперационном периоде методом ОКТ наблюдали равномерную толщину трансплантата, а также уменьшение ЦТР – между исследуемыми группами не были выявлены статистически значимые различия ( $p > 0,05$ ). Показатели оптической плотности роговицы на сроке

наблюдения 12 месяцев были сопоставимы между методиками ( $p > 0,05$ ) и максимально приближены к нормальным значениям денситометрии здоровой роговицы (TL в центральной зоне в группе 1А –  $18,5 \pm 6,3$ , 2А –  $19,2 \pm 4,01$ , 1Б –  $20,6 \pm 7,5$ , 2Б –  $21,3 \pm 5,8$ ), что говорит о высоком качестве формируемой поверхности ультратонкого трансплантата, выкроенного при помощи низкочастотного и высокочастотного ФСЛ, а также о высокой биологической эффективности предложенной технологии.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Для обеспечения предсказуемости процесса аппланации и выкраивания трансплантата, а также минимизации силы контакта стыковочного конуса низкочастотного ФСЛ и эндотелия, следует применять следующую методику: донорский корнеосклеральный диск фиксируют в искусственную переднюю камеру эндотелием вверх, давление внутри камеры должно соответствовать 30 см вод. ст., за счет использования флакона с сбалансированным солевым раствором на штативе с фиксатором на высоте 30 см от уровня искусственной камеры.
2. Для выкраивания ультратонкого трансплантата для ЗПК при помощи низкочастотного ФСЛ оптимальными являются следующие параметры: глубина – 130 мкм, энергия – 0,8 мкДж, расстояние между точками – 8 мкм, между рядами – 8 мкм. Эти параметры позволяют получить равномерный по толщине и форме ультратонкий трансплантат с качественной поверхностью.
3. Уменьшение толщины трансплантата менее 100 мкм не является целесообразным, так как повреждающее действие фемтолазерной энергии (мертвые кератоциты) встречается до глубины 117 мкм от места формирования среза и, следовательно, при уменьшении толщины может оказывать губительное воздействие и на эндотелиальные клетки.

## СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *Публикации в научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ*

1. Паштаев А.Н., Кузьмичев К.Н. О возможностях задней автоматизированной послойной кератопластики с ультратонким трансплантатом (клинический случай) // Практическая медицина. – 2017. – Т. 1 (110), №9. – С. 181–184.

2. Малюгин Б.Э., Паштаев А.Н., Шилова Н.Ф., Кузьмичев К.Н., Катмаков К.И. Результаты задней послойной кератопластики с использованием трансплантатов, выкроенных при помощи 2-х различных фемтосекундных лазерных систем // Офтальмохирургия. – 2020. – № 4. – С. 36–42.

3. Паштаев А.Н., Паштаев Н.П., Поздеева Н.А., Мухина И.В., Измайлова С.Б., Коротченко С.А., Катмаков К.И., Алиева С.С., Кузьмичев К.Н., Малюгин Б.Э. Экспериментальное обоснование применения эксимерного лазера для заготовки ультратонкого трансплантата для задней послойной кератопластики // Офтальмология. – 2020. – Т. 17, № 1. – С. 202–208.

4. Паштаев А.Н., Малюгин Б.Э., Измайлова С.Б., Паштаев Н.П., Кузьмичев К.Н., Алиева С.С., Катмаков К.И. Инвертированная задняя послойная фемтокератопластика: качество поверхности среза роговицы и предварительные клинические результаты // Офтальмология. – 2020. – Т. 17, № 1. С 216-222.

### **Патенты РФ на изобретение по теме диссертации**

1. Малюгин Б.Э., Измайлова С.Б., Поздеева Н.А., Кузьмичев К.Н., Алиева С.С., Шипунов А.А., Катмаков К.И. Способ заготовки ультратонких донорских роговичных трансплантатов для задней послойной кератопластики с эндотелиального доступа с помощью высокоэнергетического фемтосекундного лазера. Пат. 2689884 РФ на изобретение от 29.05.2019.

2. Паштаев А.Н., Малюгин Б.Э., Измайлова С.Б., Алиева С.С., Кузьмичев К.Н. Способ заготовки ультратонких трансплантатов для задней послойной кератопластики. Пат. 2727871 РФ на изобретение от 24.07.2020.

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ДФ – эндотелиальная дистрофия роговицы Фукса

ДР – десцеметорексис

ЗАПК – задней автоматизированной послойной кератопластики

ИОЛ – интраокулярная линза

ИПК – искусственная передняя камера

КОЗ – корригированная острота зрения

ОКТ – оптическая когерентная томография

ПБК – псевдофакичная буллезная кератопатия

ПЭК – плотность эндотелиальных клеток

ФСЛ – фемтосекундный лазер

ФЭК – факоемульсификация катаракты

ЦТР – центральная толщина роговицы

ЭД – эндотелиальная дистрофия роговицы

DSAEK – Descemet's Stripping Automated Endotelial Keratoplasty

### **БИОГРАФИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ**

Кузьмичев Константин Николаевич родился 28 декабря 1993 года в городе Людиново Калужской области. В 2016 году окончил Смоленский государственный медицинский университет по специальности «Лечебное дело». В 2016-2018 годах проходил ординатуру по специальности «Офтальмология» на базе ФГАУ «НМИЦ «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. С 2018 по 2021 год проходил аспирантуру по направлению «Глазные болезни» на базе отдела трансплантационной и оптико-реконструктивной хирургии переднего отрезка глазного яблока Головной организации ФГАУ «НМИЦ «Микрохирургия глаза» им. акад.

С.Н. Федорова» Минздрава России. Автор 4 научных работ, рецензируемых ВАК РФ. Имеет 2 патента РФ на изобретение.