

*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**

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Москва – 2022**

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

**Научные руководители:**

**Костенев Сергей Владимирович** – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник отдела лазерной рефракционной хирургии ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздрава России.

**Борзенко Сергей Анатольевич** – доктор медицинских наук, академик РАЕН, руководитель Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России

**Официальные оппоненты:**

**Калинников Юрий Юрьевич** – доктор медицинских наук, профессор кафедры глазных болезней ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России

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

**Ведущая организация:** ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения Российской Федерации

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

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

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук

И.А. Мушкова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

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 (Спаро Р.М. 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 данного исследования.

### **Цель исследования**

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

### **Задачи исследования**

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 исследования**

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 1.5M 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 результатов исследования**

1. Разработанный протокол криоконсервации децеллюляризованного лентикулярного материала (ДЛМ) 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.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Разработанная технология криоконсервации ДЛМ – 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 материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ, из них 3 статьи – в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

## **Структура и объем диссертации**

Диссертационное исследование изложено на 177 страницах машинописного текста, иллюстрировано 53 рисунками и 23 таблицами. Список литературы включает 205 источников, из них 30 отечественных и 175 иностранных. Диссертация состоит из введения, 4-х глав, включая обзор литературы, материалы и методы и 2 главы собственных исследований, обсуждения результатов и заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

Эффективность и безопасность разработанного собственного протокола криоконсервации ДЛМ изучена на экспериментальных моделях: культура клеток стромы, кадаверной роговице человека. Критериями отбора доноров для проведения эксперимента были: возраст доноров составлял 58 лет, время от момента смерти донора до начала экспериментальных исследований не более 16-ти часов, показатели адреналиновой пробы А, В (культура клеток) и С (кадаверная роговица человека), морфологические показатели роговицы 3 по классификации Борзенка С.А. (2008).

Дизайн исследования включал четыре последовательных этапа: первый этап Исследование физических показателей нативного ЛМ в транспортировочной среде, а также исследование физических, ультраструктурных и генетических свойств децеллюляризованного ЛМ, второй этап Исследование физических и ультраструктурных показателей криоконсервированного ДЛМ, третий этап Исследование цитотоксических свойств криоконсервированного ДЛМ в присутствии культуры клеток донорской роговицы и четвертый этап Математическое обоснование основных параметров ЛМ, необходимого для коррекции гиперметропии и его практическая реализация в эксперименте *ex vivo*.

В соответствии с положениями Хельсинкской декларации у всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на использование ЛМ в научных целях. Все этапы экспериментального исследования осуществлялись в соответствии с официально принятыми процедурами и специальным разрешением в рамках законодательства РФ, на основании лицензии Федеральной государственной службы по надзору за Здравоохранением (ФС-34-01-000011-18 от 19.09.2018 г.), которая позволяет использовать ткани, выделенные из трупных человеческих глаз для целей трансплантации и научных исследований.

### ***Первый этап***

На первом этапе исследовали физические показатели нативного ЛМ в транспортировочной среде, а также исследовали физические, ультраструктурные и генетические свойства децеллюляризованного ЛМ.

Для определения прозрачности нативного ЛМ в транспортировочных средах был использован спектрофотометр Multiskan GO (Thermo Scientific, США). Измерение проводили в диапазоне длины волны 380–780 нм, с шагом 10 нм. Для анализа данных в качестве расчетного значения было использовано среднее значение для всей группы по 41 точке прозрачности полученного волнового спектра. Для выбора лучшей среды для транспортировки нативного ЛМ были сформированы 4 группы:

1. «Раствор для хранения роговицы» (ООО НЭП «Микрохирургия глаза», Москва) (n=15)
2. «Средство для консервации заднего послойного трансплантата донорской роговицы» (n=12)
3. Когезивный вискоэластик (КВ) (ALCON Laboratories Inc, США) (n=12)
4. Дисперсный вискоэластик (ДВ) (ALCON Laboratories Inc, США) (n=14)

Для изучения эффективности децеллюляризации ЛМ использовали 3 протокола, описанные в известной литературе:

1. 1,5 М раствор натрия хлорида с нуклеазами (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.

2. 0,1% раствор SDS (SDS) - 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.

3. 0,25% раствор Трипсин-ЭДТА с нуклеазами и двойным отмыванием в гипотрис-буфере (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.

Исследование прозрачности ЛМ для различных протоколов децеллюляризации проводилось с помощью спектрофотометра Multiskan GO (Thermo Scientific, США) по вышеописанной методике. Для изучения прозрачности ЛМ, полученного с помощью разных протоколов децеллюляризации были сформированы 4 группы: группа № 1, содержала нативные образцы и являлась контролем (n=21), опытная группа № 2 NaCl (n=21), опытная группа № 3 SDS (n=22), опытная группа № 4 Трипсин-ЭДТА (n=27), Для гистологического анализа выполняли серии 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). В зависимости от используемого красителя были сформированы 4 группы: контрольная группа № 1 с нативными образцами (n=5), опытная группа № 2 NaCl (n=5), опытная группа № 3 SDS (n=5), опытная группа № 4 Трипсин-ЭДТА (n=5).

Для иммуногистохимического анализа проводили оценку ядерного присутствия и экспрессию коллагена I, III, V и VI типов. Результаты оценивали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа «Fluo View FV10i» (Olympus, Япония). В соответствии с этим были сформированы 4 группы: контрольная группа № 1 с нативными образцами (n=5), опытная группа № 2 NaCl (n=5), опытная группа № 3 SDS (n=5), опытная группа № 4 Трипсин-ЭДТА (n=5).

Ультраструктурные параметры нативного ЛМ и ДЛМ оценивали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с целью определения толщины фибриллы коллагенового волокна (сканирующий электронный микроскоп «6000plus», Jeol, Япония). В соответствии с используемым протоколом децеллюляризации были сформированы 4 группы: контрольная группа № 1 с нативными образцами (n=5), опытная группа № 2 NaCl (n=5), опытная группа № 3 SDS (n=5), опытная группа № 4 Трипсин-ЭДТА (n=5).

Для определения остаточной ДНК в ткани использовали флуориметр Qubit 2.0 (Invitrogen, США) и набор для анализа Qubit dsDNAHS High-Sensitivity Assay Kit (Invitrogen, США). Процедура измерения производилась согласно инструкции компании-производителя. ДНК выделяли из образцов с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Были сформированы 4 группы: контрольная группа № 1 с нативными образцами (n=10), опытная группа № 2 NaCl (n=10), опытная группа № 3 SDS (n=10), опытная группа № 4 Трипсин-ЭДТА (n=10).

### ***Второй этап***

На втором этапе исследовали физические и ультраструктурные показатели криоконсервированного ДЛМ.

Для оценки прозрачности и толщины фибрилл коллагеновых волокон криоконсервированных ДЛМ использовали спектрофотометрический метод и СЭМ, согласно вышеописанной методике. В качестве детергентов применяли протоколы децеллюляризации NaCl и SDS. В качестве криопротекторов использовали растворы ДМСО, Криодерм и глицерин.

Для спектрофотометрического анализа были сформированы 7 групп: группа № 1 являлась контролем (n=25), опытная группа № 2 NaCl–ДМСО (n=18), опытная группа № 3 SDS–ДМСО (n=16), опытная группа № 4 NaCl–Криодерм (n=17), опытная группа № 5 SDS–Криодерм (n=18), опытная группа № 6 NaCl–глицерин (n=19), опытная группа № 7 SDS–глицерин (n=21).

Для анализа СЭМ также были сформированы 1 контрольная группа и 6 опытных групп: группа № 1 являлась контролем (n=3), опытная группа № 2 NaCl–ДМСО (n=3), опытная группа № 3 SDS–ДМСО (n=3), опытная группа № 4 NaCl–

Криодерм (n=3), опытная группа № 5 SDS–Криодерм (n=3), опытная группа № 6 NaCl–глицерин (n=3), опытная группа № 7 SDS–глицерин (n=3).

***Протокол криоконсервации децеллюляризованного лентиккулярного материала с использованием ДМСО и Криодерм***

Данный протокол выполнялся в стерильных условиях ламинарного бокса II класса безопасности. Образцы переносили в криопробирки (Corning, США), содержащие 1 мл 90% «Раствора для хранения роговицы» (ООО НЭП «Микрохирургия глаза», Москва) и 10% ДМСО (PanReac AppliChem, Германия) либо раствор Криодерма на основе глицерина (ПанЭко, Россия). Далее криопробирки помещали в контейнер для криоконсервации Cool Cell LX (Bioscience, США) и в низкотемпературный холодильник (-80 °С) на ночь. На следующий день контейнер переносили в Сосуд Дьюара (Cryo Diffusion, Франция) с жидким азотом с температурой -196°С. В день эксперимента проводили трехкратный цикл отмывания в растворе PBS в течение 12-15 часов.

***Протокол криоконсервации децеллюляризованного лентиккулярного материала с использованием глицерина***

Образцы переносили в криопробирки (Corning, США), содержащие 1 мл 100% раствора глицерина (PanReac AppliChem, Германия). Затем криопробирки помещали в контейнер для криоконсервации Cool Cell LX (Bioscience, США) и помещали в низкотемпературный холодильник) при температуре -80 °С на трое суток. Далее образцы изымали из холодильника и размораживали на водяной бане (+37 °С) в течение 5 минут. В конце их трижды отмывали в растворе PBS в течение 15 минут.

### ***Третий этап***

На третьем этапе исследовали цитотоксические свойства криоконсервированного ДЛМ в присутствии культуры клеток донорской роговицы.

***Культура кератоцитов***

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

Для изучения токсического воздействия криоконсервированного ДЛМ (протокол NaCl–ДМСО) была использована 2D клеточная культура кератоцитов 3-4 пассажа. В данном исследовании использовались тест «Live and Dead», метод «ДНК-комет» и МТТ-тест (по три образца для каждого метода исследования). Жизнеспособность кератоцитов (3-е суток культивирования) исследовали с помощью флуоресцентного красителя «Live and Dead» (Abcam, Великобритания) на проточном цитофлуориметре Cyto Flex (Beckman Coulter, США).

Анализ повреждения ДНК вследствие возможного токсического воздействия криоконсервированного ДЛМ на кератоциты (3-е суток культивирования) проводили с помощью метода «ДНК-комет» на лазерно-сканирующем конфокальном микроскопе Olympus FV 10i (Olympus, Япония).

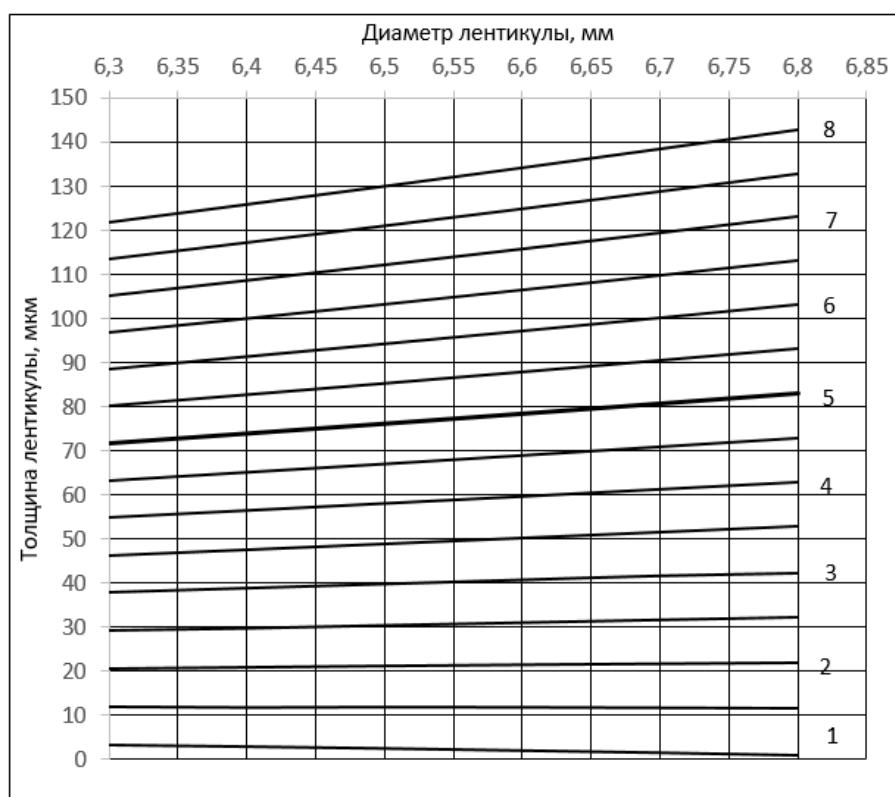
Колориметрический анализ выживаемости кератоцитов (1-е, 3-е, 5-е, 7-е и 9-е сутки культивирования) исследовали с помощью МТТ-теста на спектрофотометре Multiskan GO (Thermo Scientific, США).

### *Четвертый этап*

На четвертом этапе проводили математическое обоснование основных параметров ЛМ, необходимого для коррекции гиперметропии и его практическую реализацию в эксперименте *ex vivo*.

Была разработана математическая формула для расчета толщины ЛМ необходимого для коррекции гиперметропии. Данная формула была рассчитана на основании трех основных параметров: требуемого рефракционного эффекта на роговице, значений кератометрии интактной роговицы и диаметра ЛМ. А также на основании четырех дополнительных параметров: коэффициент перевода оптической силы роговицы в радиус кривизны равный значению 337,5, переводной коэффициент равный 1000, значение средней конической константы роговицы до операции равное 0,8 и значение средней конической константы роговицы после операции равное 1,2.

С учетом формулы была разработана диаграмма для коррекции гиперметропии (рисунок 1).



**Рисунок 1 - Диаграмма для выбора линтикулярного материала из банка, где хранятся образцы**

В данной диаграмме по вертикальной оси отложены значения толщины ЛМ в мкм, а по горизонтальной оси значения диаметра ЛМ в мм (рисунок 1). Цифрами от 1 до 8 указаны значения требуемого рефракционного эффекта на роговице, представленные в дптр. Для каждого значения требуемого рефракционного эффекта на роговице рассчитана своя кривая в соответствии с вышеприведенной математической формулой.

### ***Подготовка и применение криоконсервированного лентиккулярного материала для интрастромальной кератофакии***

С учетом возникновения отека ткани после процессов децеллюляризации и криоконсервации. Исследованы дегидратирующие свойства ДВ (ALCON Laboratories Inc, США) и КВ (ALCON Laboratories Inc, США) на оптической когерентном томографии (ОКТ) iVue 100 (Optovue, США) с интервалом исследования каждые 10 минут на протяжении 60 минут. В качестве контрольной толщины ЛМ служили данные, полученные из лазера при проведении операции СМАЙЛ в рамках опытных групп для ДВ (n=22) и КВ (n=23). Для ОКТ исследования образцы сначала помещали и центрировали на жесткой газопроницаемой контактной линзе, с последующей ее фиксацией к искусственной передней камере глаза, установленной на горизонтальной поверхности стола. Линзу прибора ОКТ устанавливали перпендикулярно поверхности ЛМ. Возможность такого расположения головной части прибора ОКТ позволило без затруднений проводить пахиметрию образцов. Регистрировались значения толщины ЛМ в центре.

Для экспериментального исследования *ex vivo* использовались кадаверные глаза (n=10) и ЛМ, который хранился в ГТБ (n=10). ЛМ (n=10) был получен при коррекции миопии со средним значением  $-4,6 \pm 0,96$  дптр. В день эксперимента ЛМ извлекали из сосуда Дьюара, где они хранились в жидком азоте при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$ . Далее после их размораживания на водяной бане при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$  проводили трехкратный цикл отмывания. 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 раствора 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.

Имплантацию ЛМ проводили в условиях операционного блока в два этапа. На первом этапе с помощью фемтосекундного лазера FS200 WaveLight (Alcon, США). 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. Перед процедурой имплантации, ЛМ предварительно дегидратировали в ДВ.

### ***Морфометрические исследования до- и после имплантации ЛМ в строму роговицы кадаверного глаза***

Измерение параметров центральной толщины ЛМ и роговицы кадаверного глаза осуществлялось с помощью ОКТ RTVue 100 (Optovue, США).

Анализ передней поверхности роговицы кадаверного глаза проводили с помощью компьютерной кератопографии Pentacam (Oculus, Германия). Учитывались значения  $K_m$  (дптр) в пределах 7-миллиметровой зоны. На этапах до- и после имплантации ЛМ в роговицу глаза добивались достижения состояния клинической нормотензии с помощью вращения винта на держателе, фиксирующего трупный глаз.

В качестве описательной статистики 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. При оценке результатов статистически значимыми считали результаты при значениях  $p \leq 0,05$ . Статистическую обработку полученных данных и визуализацию данных при помощи программы GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, Inc., США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Результаты первого этапа*

В данном разделе представлены результаты исследования физических показателей нативного ЛМ в транспортировочной среде, а также данные исследования физических, ультраструктурных и генетических свойств децеллюляризованного ЛМ.

В зарубежной и отечественной 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 ГТБ перед спектрофотометрическим исследованием ЛМ дегидратируют в глицерине, с целью устранения отека тканей. Предполагается, что при спектрофотометрическом анализе данный отек может повлиять на точность измерения прозрачности ткани.

По результатам исследования прозрачности нативного ЛМ в разных транспортировочных средах, было выявлено следующее: группа ДВ -  $89,35 \pm 2,38\%$  ( $89,6$  ( $88,22-90,5$ )), группа КВ -  $87,64 \pm 2,28\%$  ( $87,89$  ( $86,65-88,9$ )), группа «Средство для консервации заднего послойного трансплантата донорской роговицы» -  $84,85 \pm 2,47\%$  ( $85,43$  ( $83,65-86,21$ )); группа «Раствор для хранения

роговицы» -  $82,54 \pm 2,57\%$  ( $82,56$  ( $80,84-84,1$ )). Было доказано, что использование ДВ в качестве среды для транспортировки нативных образцов дает наилучшие результаты прозрачности  $89,35 \pm 2,38\%$  ( $89,6$  ( $88,22-90,5$ )). Таким образом, использование ДВ для транспортировки ЛМ упрощает процедуру спектрофотометрического измерения прозрачности ткани, проводя ее в один этап.

Результаты эффективности известных протоколов децеллюляризации показали следующее:

При спектрофотометрическом анализе данных было выявлено, что наиболее приближенными к контрольной группе ( $89,50\% \pm 4,72$  ( $90,45$  ( $85,88-93,34$ ))) были группы №2 NaCl ( $88,89 \pm 3,57\%$  ( $88,95$  ( $86,34-91,55$ ))) и №3 SDS ( $87,26 \pm 3,15\%$  ( $87,25$  ( $85,24-88,83$ ))) ( $p \geq 0,05$ ), а в группе №4 Трипсин-ЭДТА наблюдалось значимое снижение прозрачности ( $47,64 \pm 12,88\%$  ( $47,24$  ( $43,64-55,94$ ))) при сравнении с контролем ( $p \leq 0,05$ ).

Статистический анализ данных не выявил значимой разницы при сравнении контрольной группы № 1 с группой № 2 NaCl ( $89,50 \pm 4,72\%$  против  $88,89 \pm 3,57\%$ ; ( $90,45$  ( $85,88-93,34$ ))) против ( $88,95$  ( $86,34-91,55$ )); группы № 1 с группой № 3 SDS ( $89,50 \pm 4,72\%$  против  $87,26 \pm 3,15\%$ ; ( $90,45$  ( $85,88-93,34$ ))) против ( $87,25$  ( $85,24-88,83$ )); группы № 2 NaCl с группой № 3 SDS ( $88,89 \pm 3,57\%$  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 Трипсин-ЭДТА ( $47,64 \pm 12,88\%$  ( $47,24$  ( $43,64-55,94$ ))) с каждой из остальных групп,  $p \leq 0,05$ .

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 группах № 2 NaCl и № 3 SDS. В группе № 4 Трипсин-ЭДТА на фоне полного отсутствия ядер и клеток наблюдалось значительное повреждение структуры матрикса. Флуоресцентное окрашивание ядерным красителем показало, что ЛМ, подвергшиеся децеллюляризации в группах № 2 NaCl, № 3 SDS, № 4 Трипсин-ЭДТА окрашиваются негативно. При этом, в контрольной группе отмечалось характерное свечение ядер. Кроме того, по результатам иммуногистохимического анализа в контрольной и во всех опытных группах отмечалась положительная экспрессия коллагена I, III, V и VI типов. В группе № 4 Трипсин-ЭДТА отмечалось разрушение структуры коллагена исследуемых типов.

Результаты анализа СЭМ показали, что наиболее близкий к контролю ( $2,30 \pm 0,40$  мкм ( $2,26$  ( $2,03-2,63$ ))) являлся результат группы № 2 NaCl ( $1,96 \pm 0,46$  мкм ( $1,9$  ( $1,69-2,21$ ))), а наибольшая толщина фибрилл коллагеновых волокон наблюдалась в группе № 4 Трипсин-ЭДТА ( $4,19 \pm 0,56$  мкм ( $4,13$  ( $3,85-4,54$ ))). Статистически значимые различия наблюдались при сравнении группы № 2 NaCl 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 SDS 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 Трипсин-ЭДТА с группой № 1 ( $4,19 \pm 0,56$  мкм против  $2,30 \pm 0,40$  мкм; ( $4,13$  ( $3,85-4,54$ ))) против ( $2,26$  ( $2,03-2,63$ ))). Парное сравнение опытных групп между собой выявило статистически значимые различия,  $p \leq 0,05$ .

Анализ содержания остаточной ДНК, продемонстрировал эффективное снижение количества фрагментов ДНК в ткани для опытных групп № 2 NaCl ( $39,34 \pm 8,65$  нг/мг ( $41,99$  ( $38,57-44,67$ )), № 3 SDS ( $37,07 \pm 6,19$  нг/мг ( $39,74$  ( $36,72-42,75$ )), № 4 Трипсин-ЭДТА ( $13,42 \pm 7,4$  нг/мг ( $11,45$  ( $8,47-16,86$ ))) в сравнении с контрольными образцами  $132,18 \pm 44,17$  нг/мг ( $128,5$  ( $102,02-154,48$ )),  $p \leq 0,05$ .

Таким образом, суммируя результаты проведенного сравнительного анализа известных способов децеллюляризации ЛМ было выявлено два наиболее оптимальных протокола: 1) 1,5М NaCl с нуклеазами, 2) 0,1% раствор SDS. Данное обстоятельство позволило нам продолжить доклиническое изучение физических и ультраструктурных показателей криоконсервационной среды для децеллюляризованным вышеуказанными протоколом лентикулярного материала.

### *Результаты второго этапа*

В данном разделе представлены результаты исследования физических и ультраструктурных показателей криоконсервированного ДЛМ.

По результатам спектрофотометрии можно сделать вывод, что в рамках протокола децеллюляризации с использованием NaCl в трех криопротекторах опытная группа № 2 NaCl–ДМСО ( $89,44 \pm 2,68\%$  ( $89,52$  ( $87,99-91,18$ ))) является наиболее оптимальной по прозрачности в сравнении с опытными группами № 4 NaCl–Криодерм ( $86,83 \pm 2,67\%$  ( $86,72$  ( $85,21-88,59$ ))) и № 6 NaCl–глицерин ( $83,09 \pm 2,97\%$  ( $82,94$  ( $81,37-85,1$ ))). Статистически не различались следующие группы: группа № 2 NaCl–ДМСО 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 NaCl–Криодерм 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 NaCl–глицерин различалась с контрольной группой № 1 ( $83,09 \pm 2,97\%$  против  $89,48 \pm 3,5\%$ ; ( $82,94$  ( $81,37-85,1$ )) против  $89,67$  ( $87,84-91,80$ )),  $p \leq 0,05$ .

Результаты анализа прозрачности в рамках протокола SDS выявили статистическое различие контрольной группы со всеми опытными группами,  $p \leq 0,05$ . Тем не менее статистической разницы не было выявлено при сравнении следующих групп: группа № 3 SDS–ДМСО с группой № 7 SDS–глицерин ( $83,96 \pm 2,26\%$  против  $82,56 \pm 2,74\%$ ; ( $84,05$  ( $83,00-85,11$ )) против  $82,84$  ( $80,49-84,00$ )); группа № 5 SDS–Криодерм с группой № 7 SDS–глицерин ( $81,15 \pm 2,44\%$  против  $82,56 \pm 2,74\%$ ; ( $81,81$  ( $79,46-82,84$ )) против  $82,84$  ( $80,49-84,00$ )). При этом группа № 3 SDS–ДМСО и группа № 5 SDS–Криодерм статистически различались между собой,  $p \leq 0,05$ .

Образцы в группе № 3 SDS–ДМСО ( $83,96 \pm 2,26\%$  ( $84,05$  ( $83,00-85,11$ ))) показали неудовлетворительные показатели прозрачности в сравнении с группой № 2 NaCl–ДМСО ( $89,44 \pm 2,68\%$  ( $89,52$  ( $87,99-91,18$ ))) и с контрольной группой № 1 ( $89,48 \pm 3,5\%$   $89,67$  ( $87,84-91,80$ )).

Проведенное исследование СЭМ показало, что группа № 2 NaCl–ДМСО ( $2,45 \pm 0,36$  мкм ( $2,46$  ( $2,26-2,73$ ))) статистически не различалась с контрольной группой № 1 ( $2,36 \pm 0,37$  мкм ( $2,32$  ( $2,09-2,65$ ))),  $p \geq 0,05$ .

В результате статистически значимое различие было выявлено при сравнении следующих групп: контрольная группа № 1 с группой № 3 SDS–ДМСО ( $2,36 \pm 0,37$  против  $2,99 \pm 0,80$ ; ( $2,32$  ( $2,09-2,65$ ))) против ( $2,96$  ( $2,34-3,55$ )); группа № 1 с группой № 5 SDS–Криодерм ( $2,36 \pm 0,37$  против  $3,21 \pm 0,60$ ; ( $2,32$  ( $2,09-2,65$ ))) против ( $3,36$  ( $2,85-3,6$ )); группа № 1 с группой № 6 NaCl–глицерин ( $2,36 \pm 0,37$  против  $4,04 \pm 0,55$ ; ( $2,32$  ( $2,09-2,65$ ))) против ( $4,19$  ( $3,57-4,53$ )); группа № 1 с группой № 7 SDS–глицерин ( $2,36 \pm 0,37$  против  $4,09 \pm 0,52$ ; ( $2,32$  ( $2,09-2,65$ ))) против ( $4,08$  ( $3,77-4,5$ )); группа № 2 NaCl–ДМСО с группой № 5 SDS–Криодерм ( $2,45 \pm 0,36$  против  $3,21 \pm 0,60$ ; ( $2,46$  ( $2,26-2,73$ ))) против ( $3,36$  ( $2,85-3,6$ )); группа № 2 NaCl–ДМСО с группой № 6 NaCl–глицерин ( $2,45 \pm 0,36$  против  $4,04 \pm 0,55$ ; ( $2,46$  ( $2,26-2,73$ ))) против ( $4,19$  ( $3,57-4,53$ )); группа № 2 NaCl–ДМСО с группой № 7 SDS–глицерин ( $2,45 \pm 0,36$  против  $4,09 \pm 0,52$ ; ( $2,46$  ( $2,26-2,73$ ))) против ( $4,08$  ( $3,77-4,5$ )); группа № 3 SDS–ДМСО с группой № 4 NaCl–Криодерм ( $2,99 \pm 0,8$  против  $2,07 \pm 0,44$ ; ( $2,96$  ( $2,34-3,55$ ))) против ( $2,19$  ( $1,65-2,45$ )); группы № 3 SDS–ДМСО с группой № 6 NaCl–глицерин; № 3 SDS–ДМСО с группой № 7 SDS–глицерин; группа № 4 NaCl–Криодерм с группой № 5 SDS–Криодерм; группа № 4 NaCl–Криодерм с группой № 6 NaCl–глицерин; группа № 4 NaCl–Криодерм с группой № 7 SDS–глицерин; группа № 5 SDS–Криодерм с группой № 6 NaCl–глицерин; группа № 5 SDS–Криодерм с группой № 7 SDS–глицерин также статистически различались.

Сравнительный анализ не выявил достоверной статистической разницы при сравнении следующих групп: контрольная группа № 1 с группой группа № 2 NaCl–ДМСО; контрольная группа № 1 с группой № 4 NaCl–Криодерм; группа № 2 NaCl–ДМСО с группой № 3 SDS–ДМСО; группа № 2 NaCl–ДМСО с группой № 4 NaCl–Криодерм; группа № 3 SDS–ДМСО с группой № 5 SDS–Криодерм; группа № 6 NaCl–глицерин с группой № 7 SDS–глицерин.

В группах № 6 NaCl–глицерин ( $4,04 \pm 0,55$  мкм ( $4,19$  ( $3,57-4,53$ ))) и № 7 SDS–глицерин ( $4,09 \pm 0,52$  мкм ( $4,08$  ( $3,77-4,5$ ))) происходило утолщение фибрилл коллагеновых волокон на фоне грубого нарушения их ультраструктуры. Полученные данные СЭМ сопоставимы с результатами спектрофотометрического исследования прозрачности децеллюляризованных ЛМ после криоконсервации в трех криопротекторах. В связи с чем, можно предположить о существующей взаимосвязи между толщиной фибрилл коллагеновых волокон и светопропускной способностью образцов.

Таким образом, протокол криоконсервации ДЛМ (NaCl–ДМСО), позволяет получать роговичную ткань с высокими прозрачными свойствами с сохраненным коллагеновым каркасом, что дало нам возможность перейти к следующему этапу диссертационного исследования – изучение токсического влияния данного протокола на культуру кератоцитов в эксперименте *in vitro*.



### ***Результаты третьего этапа***

В данном разделе оценивалось влияние криоконсервированного ДЛМ на жизнеспособность культуры клеток донорской роговицы

По результатам тестирования «Live and Dead» (опыт – живые клетки в %-х 86; 89; 91 и мертвые клетки в %-х 14; 11; 9, контроль – живые клетки в %-х 95; 92; 89 и мертвые клетки в %-х 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, а количество мертвых клеток было минимальным.

При исследовании МТТ-теста было выявлено, что жизнеспособность кератоцитов сохраняется в течение 9 суток наблюдения (в опытной группе количество жизнеспособных клеток 160.000; 165.000; 166.000; в контрольной группе количество жизнеспособных клеток 129.800, 125.000, 126.000).

Таким образом, на основании проведенных культуральных и иммуногистохимических методов исследований, были изучены цитотоксические свойства криоконсервированного лентикулярного материала после децеллюляризации. Протокол криоконсервации ДЛМ (NaCl–ДМСО) не вызывает токсического воздействия на кератоциты, в связи с чем, данный протокол может быть рекомендован для будущего его применения в клинике.

### ***Результаты четвертого этапа***

В данном разделе исследования представлены результаты математического обоснования основных параметров ЛМ, необходимого для коррекции гиперметропии и его практической реализации в эксперименте *ex vivo*.

Неспецифический отек, возникающий после криоконсервации ДЛМ ограничивает возможности применения данного материала для интрастромальной кератофакии. В связи с чем, в данной части исследования изучали дегидратирующие возможности ДВ и КВ с помощью ОКТ (Optovue, iVue 100, США).

По результатам пахиметрии были определены оптимальные сроки дегидратации для группы ДВ, где толщина ЛМ постепенно уменьшалась и в интервале от 30 минут до 60 минут (30 минут-114,18±17,6мкм (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 становилась постоянной и находилась 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 наблюдалось постепенное снижение толщины ЛМ, в интервале от 30 минут до 60 минут показатели становились постоянными (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)) ( $p \leq 0,05$ ). Применение КВ не приводило к достаточному дегидратирующему эффекту ЛМ.

Стоит отметить, что 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 с учетом разработанных математической формулы и диаграммы.

Достижение эффекта необходимого для коррекции гиперметропии осуществлялось путем имплантации ЛМ под фемтосекундный клапан (130 мкм), который формировался на внешней поверхности интактной роговицы кадаверного глаза. ЛМ (n=10) был получен при коррекции миопии со средним значением  $-4,6 \pm 0,96$  дптр. Перед имплантацией в роговицу кадаверного глаза (n=10), образцы (n=10) предварительно помещали в ДВ за 30 минут до начала хирургического этапа.

Результаты эксперимента *ex vivo* представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Результаты ОКТ и Pentacam и достигнутый рефракционный эффект на роговице кадаверного глаза

№ образца (кадаверный глаз)	Диаметр ЛМ (мм)	Методы исследования			Достигнутая коррекция
		ОКТ - (мкм)	Pentacam - $K_m$ (дптр)		
		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 2. Результаты ОКТ (мкм) исследования до- и после имплантации ЛМ в роговицу кадаверного глаза

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	Толщина роговицы после имплантации ЛМ
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

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 (протокол NaCl–ДМСО) и позволяет использовать данный роговичный материал для интрастромальной кератофакии при коррекции гиперметропии. Поверхностная имплантация криоконсервированного ДЛМ (протокол NaCl–ДМСО), полученного в результате коррекции миопии в среднем  $-4,6 \pm 0,96$  дптр под фемтоклапан (130 мкм) также способствует достижению целевого рефракционного эффекта.

## ВЫВОДЫ

1. Оптимизированные протоколы децеллюляризации лентикулярного материала – 1.5М 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Костенев С.В. Применение лентикулярной ткани в рефракционной хирургии роговицы / С. В. Костенев, С. А. Борзенко, В. Г. Ли, П.О. Носиров // Офтальмохирургия.-2021.- №1.-С.68-72.**
2. **Борзенко С.А. Разработка протокола децеллюляризации роговичной лентикулы / С. А. Борзенко, С. В. Костенев, А. В. Дога, В. Г. Ли, Д. С. Островский, М. Х. Хубецова // Современные проблемы науки и образования.-2021.- №2.-С.119.**
3. **Борзенко С.А. Сравнительный анализ протоколов децеллюляризации лентикулярной ткани роговицы / С. А. Борзенко, С. В. Костенев, А. В. Дога, А. В. Шацких, В. Г. Ли, Д. С. Островский, М. Х. Хубецова // Вестник трансплантологии и искусственных органов.- 2021.- Т.23. - №2. - с.137-146.**

4. **Борзенко С. А.** Оптимизация протокола децеллюляризации лентикулы роговицы / **С. А. Борзенко, С. В. Костенев, В. Г. Ли, Д. С. Островский, М. Х. Хубецова** // материалы Республиканской научно-практической конференции «Новые технологии в офтальмологии 2021».- Казань.- 2021. – С.26-30.
5. **Борзенко С.А.** Поиск оптимальных условий для хранения роговичных тканеинженерных конструкций / **С. А. Борзенко, С. В. Костенев, А. В. Дога, В. Г. Ли, Д. С. Островский, М. Х. Хубецова** // Точка зрения. Восток - Запад.- 2021.- №2. - с.68-71.
6. **Борзенко С. А.** Возможность применения криопротекторов для хранения роговичных тканеинженерных конструкций / **С. А. Борзенко, С. В. Костенев, В. Г. Ли, Д. С. Островский, М. Х. Хубецова** // Современные технологии в офтальмологии.- 2021.- №2(37). - с.220-223.

### **БИОГРАФИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ**

Ли Валерий Герасимович, в 2016 году окончил Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ, г. Томск). по специальности «Лечебное дело». В 2015-2016 годах занимал призовые места на Всероссийской студенческой олимпиаде по офтальмологии (г. Новосибирск).

В 2016-2018 годах проходил ординатуру по специальности «Офтальмология» на базе ФГАУ «НМИЦ «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

В 2018-2021 годах проходил аспирантуру по направлению «Глазные болезни» в отделе лазерной рефракционной хирургии и на базе Центра Фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем Головной организации ФГАУ «НМИЦ «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Автор 7 научных публикаций и 2 патентов на изобретение, из них по теме диссертации опубликованы 6 печатных работ, из которых 3 – в периодических изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ для публикации материалов, используемых в диссертационных работах на соискание ученой степени кандидата/доктора наук. Победитель (I место в секции «Фундаментальные и прикладные исследования в офтальмологии») в рамках Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые/Федоровские чтения», г. Москва, 2021 г.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

<b>Km</b>	Средний показатель кератометрии
<b>NaCl</b>	Протокол децеллюляризации лентикулы с 1,5 М раствором хлорида натрия с ДНКазой 5 Ед/мл и РНКазой 5 Ед/мл
<b>PBS</b>	Фосфатно-буферный солевой раствор
<b>SDS</b>	Протокол децеллюляризации лентикулы с 0,1% раствором додецилсульфат натрия
<b>ВКМ</b>	Внеклеточный матрикс
<b>ГТБ</b>	Глазной тканевой банк
<b>ДВ</b>	Дисперсный вискоэластик
<b>ДЛМ</b>	Децеллюляризованный лентикулярный материал
<b>ДМСО</b>	Диметилсульфоксид
<b>дптр</b>	Диоптрия
<b>КВ</b>	Когезивный вискоэластик
<b>Криодерм</b>	Среда Криодерм на основе глицерина
<b>ЛМ</b>	Лентикулярный материал
<b>ОКТ</b>	Оптический когерентный томограф
<b>СМАЙЛ</b>	(Small Incision Lenticule Extraction — SMILE) запатентованное название технологии фемтосекундной интрастромальной экстракции лентикулы через малый разрез фирмы «Carl Zeiss» проводимое на фемтосекундном лазере «VisuMax»
<b>СЭМ</b>	Сканирующая электронная микроскопия
<b>Трипсин-ЭДТА</b>	Протокол децеллюляризации лентикулы с 0,25% раствора Трипсин-ЭДТА, гипотоническим трис-буферным раствором №2 (рН 7.2) и ДНКазой 50 Ед/мл с РНКазой 1 Ед/мл