

На правах рукописи

ТКАЧЕНКО ИВАН СЕРГЕЕВИЧ

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ
ТЕХНОЛОГИИ ЗАЩИТЫ ЭНДОТЕЛИЯ РОГОВИЧНОГО
ТРАНСПЛАНТАТА В ХОДЕ ПРОВЕДЕНИЯ ЗАДНЕЙ ПОСЛОЙНОЙ
ФЕМТОКЕРАТОПЛАСТИКИ**

3.1.5. – Офтальмология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2024

Работа выполнена на базе Федерального государственного автономного учреждения «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, член-корреспондент РАН, академик РАЕН, заслуженный деятель науки РФ, заместитель генерального директора по научной работе ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Официальные оппоненты: **Ченцова Екатерина Валериановна** – доктор медицинских наук, профессор, врач-офтальмолог, начальник отдела травматологии и реконструктивной хирургии ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России.

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

Ведущая организация: ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «20» мая 2024 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, 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 «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук

И.А. Мушкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

За последние годы селективная кератопластика, в частности задняя послойная (ЗПК), вытеснила сквозную при лечении различных эндотелиальных дистрофий роговицы и псевдофакичной буллезной кератопатии (Lee W.B., 2009; Dunker S.L., 2021; Dubord P.J., 2013). В 2021 году согласно статистике Американской Ассоциации глазных банков, общее количество заготовок донорских роговичных трансплантатов составляло 79 641 ед., из них на долю трансплантатов для задних послойных кератопластик приходилось 35 532 ед. (2021 Eye banking Statistical report of Eye Bank Association of America). В том же году были приведены аналогичные данные Европейского регистра трансплантации роговицы и клеток, из которых следует, что преобладающим методом трансплантации роговицы в Европе является ЗПК (Dunker S. L., 2021).

На сегодняшний день глобальное распространение получили две методики выкраивания трансплантата для ЗПК: механический с использованием микрокератома – задняя автоматизированная послойная кератопластика (ЗАПК) (Darera I. et al., 2009; Jun B. et al., 2009) и при помощи фемтосекундного лазера (ФЛ-ЗПК), производимая со стороны эндотелиальной поверхности роговицы (Gorovoy M.S., 2021).

Исходная плотность эндотелиальных клеток (ПЭК) трансплантата и динамика потери эндотелиальных клеток (ЭК) в ходе выкраивания и имплантации трансплантата, а также в послеоперационном периоде являются существенно важными с позиций обеспечения долгосрочной прозрачности пересаженной ткани. Рядом отечественных и зарубежных ученых проведен сравнительный анализ динамики потери ЭК в послеоперационном периоде после проведения ЗАПК и ФЛ-ЗПК. Из него следует, что потеря ЭК больше при формировании трансплантата с помощью ФСЛ, чем при использовании микрокератома (Малюгин Б.Э., 2019; Погорелова С.С. с соавт., 2016; Яковлева С.С., 2017; Hjortdal J., 2012), однако при технологии ЗАПК клинико-функциональный результат хуже из-за большой остаточной толщины трансплантата, непредсказуемости выкраивания ввиду риска перфорации и выбраковки ценного донорского материала (Woodward M.A. et al., 2014). В этой связи активное распространение получили работы по сравнению различных

отечественных и иностранных фемтолазерных систем и влияние величин энергии и частоты лазера на качество и потерю ЭК трансплантата (Паштаев А.Н. 2021; Кузьмичев К.Н., 2022; Катмаков К.И., 2020; Нероев В.В. 2013).

Среди возможных причин утраты клеток эндотелия при инвертной технике выкраивания (со стороны эндотелия) является факт непосредственного контакта интерфейса лазера с эндотелиальными клетками (аппланация) (Liu, Y.C., 2014), прямое воздействие лазерного излучения - при повышении энергии клетки страдают в большей степени (Sikder S., Snyder R.W., 2006), толщина трансплантата (при меньшей толщине травма клеток больше) (Малюгин Б.Э., 2013) и работа шпателем в интерфейсе с целью рассечения перемычек и тканевых мостиков, оставшихся после фемтодиссекции (Mehta, J. S., 2008). Также имеет место механическое повреждение клеток в процессе имплантации трансплантата в переднюю камеру через наиболее популярные глайды Бузина (Busin Glide spatula, Moria, France) или Тана (Tan EndoGlide, Coronet, UK) (Busin M., 2008; Bartlomiej J.K., 2013).

На сегодняшний день не предложено достаточно эффективных методов защиты эндотелия роговичного трансплантата в ходе фемтолазерной кератопластики, а также отсутствуют отечественные инжекторы для имплантации трансплантата. Последний имеет потенциал к дальнейшему техническому совершенствованию с учетом имеющихся недостатков наиболее часто применяемых на практике инжекторов.

В связи с вышесказанным представляется актуальным вопрос совершенствования этапов ФЛ-ЗПК, направленных на уменьшение потери ЭК трансплантата, улучшение клинико-функциональных результатов и долгосрочной прозрачности пересаженной роговичной ткани.

Большинство из перечисленных выше методов являются высоко травматичными, либо недостаточно эффективными. Использование в клинической практике клеточных технологий не имеет соответствующих разрешений на территории Российской Федерации. Также на сегодняшний день не предложено комбинированного лечения, подходящего для пациентов с истонченными бельмами. Все вышеприведенные проблемы определили цель и задачи настоящего исследования.

Цель исследования

Разработать, экспериментально и клинически обосновать технологию защиты эндотелия роговичного трансплантата в ходе задней послойной кератопластики с использованием фемтосекундного лазера.

Задачи исследования

1. В эксперименте *ex vivo* разработать технологию защиты эндотелия роговицы на этапе выкраивания заднего послойного трансплантата с помощью фемтосекундного лазера.

2. В эксперименте *ex vivo* на основании изучения жизнеспособности эндотелиальных клеток и кератоцитов, а также характера стромальной поверхности трансплантатов, с использованием витальных красителей и метода сканирующей электронной микроскопии, доказать безопасность и эффективность предложенной технологии защиты эндотелия роговицы от негативного воздействия фемтосекундного лазера.

3. Разработать инжектор-глайд, способствующий защите эндотелия заднего послойного трансплантата роговицы на этапе его имплантации в переднюю камеру глаза.

4. В эксперименте *ex vivo* доказать безопасность и эффективность данной конструкции путем моделирования прохождения заднего послойного трансплантата через предложенный инжектор-глайд на основании изучения жизнеспособности эндотелиальных клеток с помощью витальных красителей.

5. На основании анализа клинико-функциональных результатов оперативного лечения пациентов с эндотелиальной дисфункцией изучить безопасность и эффективность предложенной технологии защиты эндотелия роговичного трансплантата для задней послойной кератопластики с применением фемтосекундного лазера.

Научная новизна

1. Впервые в эксперименте *ex vivo* с помощью витальных красителей и метода сканирующей электронной микроскопии показано, что применение защитного слоя 1% раствора гидроксипропилметилцеллюлозы на этапе аппланации в ходе заготовке заднего послойного трансплантата с помощью

фемтосекундного лазера, обеспечивает эффективную защиту эндотелиальных клеток и не влияет на качество фемтолазерного разреза.

2. Впервые в эксперименте *ex vivo* с применением витальных красителей изучено повреждающее влияние лазерного излучения на кератоциты стромы при заготовке заднего послойного трансплантата и показано протективное воздействие вискоэластика (1% раствора ГПМЦ) на кератоциты в сравнительном аспекте со стандартной технологией и установлена отрицательная корреляционная связь между количеством мертвых кератоцитов и различными глубинами фемтолазерного разреза.

3. Впервые разработан и изготовлен экспериментальный образец инжектора-глайда для имплантации заднего послойного трансплантата роговицы, в эксперименте *ex vivo* при моделировании прохождения заднего послойного трансплантата через инжектор-глайд собственной разработки и глайд Бузина изучена жизнеспособность эндотелиальных клеток с помощью витальных красителей.

4. Впервые на большом клиническом материале изучены закономерности течения операции, послеоперационного периода и отслежены отдаленные результаты задней послойной кератопластики с фемтосекундным сопровождением выполненных по стандартной и усовершенствованной технологиям.

Практическая значимость

1. Разработанная технология защиты эндотелия роговицы на основе создания защитного слоя 1% раствора гидроксипропилметилцеллюлозы на поверхности эндотелиального слоя при заготовке заднего послойного трансплантата с помощью фемтосекундного лазера эффективно защищает эндотелиальные клетки от повреждения при их контакте и не влияет на формирование фемто-разреза, позволяя получить равномерный по толщине и форме ультратонкий трансплантат без риска его перфорации и без снижения качества стромальной поверхности и обеспечивает высокие клинико-функциональные результаты оперативного лечения пациентов с эндотелиальной дисфункцией.

2. Разработанный инжектор-глайд для имплантации заднего послойного трансплантата обеспечивает стабилизацию передней камеры путем герметичного соединения с операционной раной, равномерное складывание и прохождение трансплантата в переднюю камеру и может быть рекомендован к применению в клинической практике.

Основное положение, выносимые на защиту

Разработанная и экспериментально-клинически обоснованная технология защиты эндотелия заднего послойного трансплантата роговицы на этапе его аппланации и контакта с интерфейсом фемтосекундного лазера, заключающаяся в создании защитного слоя 1% раствора гидроксипропилметилцеллюлозы на поверхности трансплантата, а также использование на этапе имплантации разработанной модели инжектора-глайда, обеспечивающего стабилизацию и равномерное введение трансплантата в переднюю камеру, позволяют снизить повреждение эндотелия на этапах заготовки и имплантации заднего послойного трансплантата и обеспечивают долгосрочную клинико-функциональную эффективность лечения пациентов с первичными и вторичными эндотелиальными дистрофиями роговицы.

Внедрение в практику

Результаты исследований и разработанная технология 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 в Институте непрерывного профессионального образования ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России.

Апробация результатов исследования

Результаты работы доложены на: конференции молодых ученых «Актуальные проблемы офтальмологии» в рамках XII съезда общества офтальмологов России (Москва, 2020 г.); республиканской научно-практической

конференции «Новые технологии в офтальмологии» (Казань, 2021 г.); онлайн конференции «Лига молодых офтальмологов» (Уфа, 2021 г.); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Федоровские чтения» (Москва, 2021, 2022 гг.); 21-м, 22-м и 23-м Всероссийских научно-практических конгрессах с международным участием «Современные технологии катарактальной, рефракционной и роговичной хирургии» (Москва, 2021, 2022, 2023 гг.); 26-м Конгрессе европейского общества катарактальных и рефракционных хирургов (ESCRS Winter Meeting) (Португалия, 2022 г.); I-м Дальневосточном офтальмологическом саммите (Владивосток, 2022 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ, из них 2 в рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей Аттестационной Комиссией Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, в том числе 1 статья в журнале, входящем в международную базу данных «Scopus», получены 2 патента Российской Федерации на изобретение: № 2758028 от 25.10.2021, № 2803860 от 21.09.2023.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 160 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной характеристике материалов и методов исследования, двух глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и использованной литературы. Работа иллюстрирована 33 рисунками и 23 таблицами. Список использованной литературы содержит 310 источник, из них – 63 отечественных и 247 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Общая характеристика экспериментального материала

Экспериментальная часть исследовательской работы состоит из 4 экспериментов.

Первый – отбор раствора вискоэластика для защиты эндотелия при заготовке заднего послойного трансплантата ФСЛ, который проводился с использованием КСД донорских кадаверных глаз непригодных для трансплантации, показатель трансплантабельности по С.А. Борзенку – «ЗС» ($n=15$). С помощью ОКТ, интегрированного в ФСЛ LDV Z8 (Ziemer, Швейцария), проводили оценку равномерности распределения различных вискоэластических растворов на эндотелиальной стороне донорских роговиц и непрерывности профиля зоны соприкосновения между головкой лазерного интерфейса и клетками эндотелия в момент контакта с ФСЛ. Для аппланационного этапа отбора ВЭ были использованы 5 видов растворов: Провиск® / Provisc® (Alcon, США) ($n=3$), Вискот® / Viscoat® (Alcon, США) ($n=3$), Осуcoat® (Bausch & Lomb, США) ($n=3$), 2% ГПМЦ «Визитон-ПЭГ» ($n=3$) и 1% ГПМЦ «Визитон-ПЭГ» (ТУ 9398-008-29039336-2009, ООО «НЭП Микрохирургии глаза», РФ) ($n=3$).

Второй – изучение жизнеспособности и морфологических особенностей ультратонкого заднего послойного трансплантата, заготовленного ФСЛ по двум технологиям, которое включало в себя изучение и сравнительный анализ потери ЭК в момент аппланации эндотелия с головкой высокочастотного низкоэнергетического ФСЛ. Для выполнения данной работы нами использованы 32 КСД, полученных из свежезнуклеированных глаз 16 свиней. Следует подчеркнуть, что до забора туши животных не подвергались термической или химической обработке. Время от забоя животного до энуклеации составило в среднем 5 минут, а от энуклеации до выкраивания КСД 6 ± 2 часа. После заготовки полученный материал помещали во флаконы со средой для хранения роговицы (ТУ 9393-013-29039336-2007, ООО «НЭП Микрохирургии глаза»). Время нахождения дисков в среде для консервации роговиц до начала эксперимента составляло в среднем 12 ± 3 часа. Выкраивание трансплантата для ФЛ-ЗПК и другие манипуляции проводили в стерильных условиях в

операционной. Толщина полученных трансплантатов составляла в среднем 125 мкм, диаметр – 8 мм. Один КСД каждого животного являлся контрольным, другой, парный, служил опытным образцом. Оценка жизнеспособности ЭК проводилась методом прижизненного окрашивания с помощью флуоресцентного набора «Ab115347 – Live and Dead Cell Assay» («Живые и Мертвые») (Abscam, Великобритания). Для этого было сформировано 2 группы. **Группа 1 (опытная / основная)** состояла из 16 свежезнуклеированных свиных глаз (КСД от одной пары глаз). Опытную группу составили роговичные трансплантаты, выкроенные с предварительной защитой эндотелия 1% раствором гидроксипропилметилцеллюлозы. **Группа 2 (контрольная)** состояла из 16 свежезнуклеированных свиных глаз (КСД от одной пары глаз). Контрольную группу составили роговичные трансплантаты, выкроенные по стандартной технологии ФЛ-ЗПК без предварительной защиты ЭК.

Третий – разработка и изготовление экспериментального образца устройства для имплантации и изучение жизнеспособности эндотелиальных клеток при моделировании прохождения ультратонкого заднего послойного трансплантата, заготовленного с помощью ФСЛ, через инжектор-глайд собственной разработки и через глайд Бузина. На данном этапе были использованы ультратонкие задние послойные трансплантаты, выкроенные из свиных КСД по стандартной технологии с помощью ФСЛ. Толщина полученных трансплантатов составляла в среднем 125 мкм, диаметр – 8 мм. **Группу 1 (опытная / основная)** составили трансплантаты, проведенные через предложенный инжектор-глайд (n=5). **Группу 2 (контрольную)** – трансплантаты, проведенные через глайд Бузина (n=5).

Для определения относительной потери ПЭК непосредственно перед проведением трансплантата через устройства и после осуществляли окрашивание трипановым синим Membraneblue-Dual® (DORC, Нидерланды). Фоторегистрацию проводили интраоперационно. В ходе анализа данных, изображения донорских трансплантатов переносили в программу ImageJ версии 2.0.0-rc-43/1.50e (National Institutes of Health, США), где проводили количественную оценку площади в %, которая окрашивалась в характерный синий цвет. Далее оценку жизнеспособности ЭК проводили с использованием

флуоресцентного набора «Ab115347 – Live and Dead Cell Assay» («Живые и Мертвые») (Abcam, Великобритания).

Четвертый – экспериментальное моделирование технологии имплантации ультратонкого заднего послойного трансплантата. На данном этапе исследования проводили имплантацию ультратонких задних послойных трансплантатов в кадаверные донорские глаза (показатель трансплантабельности по С.А. Борзенку – «ЗС»), (n=5). Технология имплантации представлена ниже. Визуально оценивали особенности скручивания и прохождение трансплантатов через инжектор-глайд собственной разработки, а также стабильность передней камеры донорского глаза.

Общая характеристика клинического материала

Исследование представляет собой сравнительный анализ данных клиническо-функциональных исследований и результатов хирургического лечения 58 пациентов (58 глаз) с диагнозом дистрофия роговицы Фукса (ДФ), псевдофакичная буллезная кератопатия (ПБК) и болезнь сквозного трансплантата по причине дисфункции эндотелия роговицы (БТ). При двусторонней патологии выбирали глаза, худшие по остроте зрения. Всем пациентам была выполнена ФЛ-ЗПК или одномоментная ФЛ-ЗПК с ФЭК+ИОЛ с применением ультратонких трансплантатов, заготовленных при помощи низкоэнергетического ФСЛ LDV Z8 (Ziemer, Швейцария). Вошедшие в исследование пациенты, обратились в головную организацию ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Минздрава России в период с 2019 по 2022 годы. В зависимости от выявленной клинической патологии и вида хирургического лечения все пациенты были разделены на 4 группы.

Группа 1 (основная) с технологией вископротекции эндотелия роговичного трансплантата. В данную группу вошли пациенты с ДФ, ПБК и БТ. Распределение пациентов осуществлялось по выбранной тактике хирургического лечения.

Группа 1А – пациенты, которым была выполнена одномоментная ФЛ-ЗПК с ФЭК+ИОЛ, n=9 (пациентов / глаз).

Группа 1Б – пациенты, которым была выполнена одномоментная ФЛ-ЗПК, **n=22 (пациентов / глаз)**.

Группа 2 (контрольная) без вископротекции эндотелия роговичного трансплантата. В данную группу вошли пациенты с ДФ, ПБК и БТ. Распределение пациентов осуществлялось по выбранной тактике хирургического лечения.

Группа 2А – пациенты, которым была выполнена одномоментная ФЛ-ЗПК с ФЭК+ИОЛ, **n=6 (пациентов / глаз)**.

Группа 2Б – пациенты, которым была выполнена одномоментная ФЛ-ЗПК **n=21 (пациентов / глаз)**.

Критериями включения пациентов были наличие эндотелиальной дистрофии роговицы развитой и далеко зашедшей стадий определяли по Волкову-Дронову (1978), которая также применима к первичной дистрофии роговицы Фукса и отражает поражение и вовлечение основных тканевых структур роговицы пациента.

Развитая стадия характеризуется стойким отеком стромы и эндотелия, складки ДМ. Центральная толщина роговицы (ЦТР) по данным пахиметрии >640 мкм. Далекозашедшая характеризуется выраженным диффузным отеком стромы с выходом жидкости под эпителий и формированием так называемых булл. ЦТР может быть от 700 до 1010 мкм. Для групп 1А и 2А критерием включения служило дополнительное наличие возрастной катаракты; наличие БТ, вызванной эндотелиальной дисфункцией сквозного трансплантата; наличие информированного согласия пациента на участие в исследовании, согласие на хирургическое лечение и обследования.

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

Критериями исключения пациентов из исследования было наличие сопутствующей офтальмологической патологии: далеко зашедшая или терминальная стадии глаукомы, оперированная глаукома, амблиопия высокой степени, рубцовая форма возрастной макулярной дистрофии, отслойка сетчатки, первичная и вторичная атрофии зрительного нерва; наличие выраженных фиброзных изменений в строме роговицы; недостаточность иридохрусталиковой

диафрагмы; тяжелое общесоматическое состояние пациента, не позволяющее проводить лечение; добровольный отказ пациента от участия в исследовании.

Всем пациентам, включенным в исследование, было проведено до- и послеоперационное офтальмологическое обследование, включающее: биомикроскопию переднего отрезка глазного яблока, проверку остроты зрения без коррекции и с коррекцией, авторефрактометрию, тонометрию, биометрию, периметрию, ультразвуковое исследование заднего отрезка, ОКТ-переднего отрезка глазного яблока (пахиметрическая карта, сагиттальный срез), подсчет плотности эндотелиальных клеток (ПЭК), офтальмоскопию глазного дна, фоторегистрацию глаз.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Statistica 10 («StatSoft», США) и Microsoft Office Excel 2016 («Microsoft», США). Характер распределения данных оценивали с использованием критерия Шапиро-Уилка. Данные представлены в формате Me (Q1; Q3), где Me – медиана, Q1 и Q3 – нижний и верхний квартили соответственно, а также в виде $M \pm SD$, где M – среднее значение, SD (Standard Deviation) – стандартное отклонение. Сравнение значений до и после операции проводили с использованием критерия Вилкоксона. Сравнение данных между группами проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни или t-критерия Стьюдента для независимых выборок (в зависимости от характера распределения данных). Сравнение качественных признаков проводили с применением критерия Хи-квадрат. Статистически значимым принимали уровень достоверности (p) менее 0,05 ($p < 0,05$).

Результаты экспериментальной части

Результаты отбора раствора вискоэластика для этапа заготовки заднего послойного трансплантата с помощью ФСЛ

По данным ОКТ ФСЛ, после использования Провиск® / Provisc® (Alcon), Вискот® / Viscoat® (Alcon), Осуcoat® (Bausch & Lomb) отмечалась неравномерность распределения ВЭ на поверхности эндотелия, которая приводила к множественной складчатости роговицы и ее неровностям в интерфейсе лазера на этапе аппланации. При использовании 2% ГПМЦ

отечественного производства были отмечены единичные неравномерные скопления ВЭ в интерфейсе (рисунок 2). Однако, после использования ВЭ пониженной концентрации – 1 % ГПМЦ была отмечена равномерность распределение ВЭ по поверхности роговицы и непрерывность профиля аппланации по данным ОКТ ФСЛ.

В итоге основываясь на указанном этапе отбора ВЭ для проведения данной экспериментальной и клинической работы был выбран «Визитон-ПЭГ», представляющий собой 1% раствор гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПМЦ) (ТУ 9398-008-29039336-2009, ООО «НЭП Микрохирургии глаза», РФ), который представляет собой дисперсивный, изотонический, апирогенный, вязкоупругий, высокоочищенный гипоаллергенный раствор. 1% ГПМЦ широко используется в хирургии катаракты и глаукомы и достаточно легко удаляется с поверхности ткани. Вискоэластик 1% р-р ГПМЦ при выкраивании и аппланации роговицы в ходе ЗПК, показал наиболее оптимальные результаты по вязкости, толщине и степени стекания с поверхности роговицы, заполнения неравномерностей интерфейса при аппланации в сравнении с другими вышеперечисленными ВЭ.

Результаты изучения жизнеспособности и морфологических особенностей ультратонкого заднего послойного трансплантата, заготовленного ФСЛ по двум технологиям

Результаты оценки аппланации по данным ОКТ ФСЛ

По данным ОКТ ФСЛ во время аппланации во всех образцах опытной и контрольной групп отмечался ровный непрерывный профиль зоны контакта между головкой лазерного интерфейса и клетками эндотелия. Также не выявляли складок эндотелия и стромы роговицы. Существенных различий между группами выявлено не было. На снимках виден плоский интерфейс роговицы и непрерывный плотный контакт эндотелиальной стороны донорской роговицы с лазером.

Результаты оценки относительной потери плотности ЭК после заготовки заднего послойного трансплантата ФСЛ

Использование ТС для исследования относительной потери плотности ЭК после выкраивания трансплантата также не показало визуальных отличий в

опытной и контрольных группах. После работы лазера визуализировался ровный ламеллярный разрез ФСЛ. На интраоперационном ОКТ в группах визуализировали состоятельный и непрерывный горизонтальный лазерный разрез, который был параллелен относительно эндотелиальной поверхности трансплантата. Существенных различий между группами выявлено не было.

Результаты сравнительного анализа оценки жизнеспособности клеток трансплантата в исследуемых группах

По данным конфокальной микроскопии общее количество ЭК в основной и контрольной группах составляло 3945 ± 213 кл/мм² и 3542 ± 138 кл/мм² соответственно.

Плотность живых ЭК в основной группе была статистически значимо больше 3477 кл/мм² (3426; 3719), чем в контрольной группе 2854 кл/мм² (2819; 2879) ($p < 0,001$, критерий Манна-Уитни). В то время как плотность мертвых ЭК наоборот в основной группе статистически значимо меньше 402 кл/мм² (366; 427), чем в контрольной 710 кл/мм² (649; 728) ($p < 0,001$, критерий Манна-Уитни).

При изучении повреждающего воздействия лазерного излучения на кератоциты трансплантата в момент выкраивания было установлено, что в основной группе выявлено статистически значимо большее количество живых клеток на глубине от 0 мкм (соответствует глубине горизонтального фемтолазерного разреза) – 39 (36; 53) кл/мм², 13 мкм – 150 (143; 159,5) кл/мм², до 26 мкм – 309 (249; 310,5) кл/мм² включительно, чем в контрольной ($p < 0,05$).

Вместе с тем выявлено статистически значимо меньшее количество мертвых кератоцитов в основной группе на глубине от 0 мкм – 189 (171; 192) кл/мм², 13 мкм – 158 (154; 162,5) кл/мм², до 26 мкм – 131 (122,5; 144,5) кл/мм² включительно ($p < 0,05$), чем в контрольной на глубине от 0 мкм – 238 (220,5; 243,5) кл/мм², 13 мкм – 209 (183,5; 226) кл/мм², до 26 мкм – 169 (154; 195) кл/мм² включительно. Тем самым выявлено, что в группе с использованием ВЭ повреждение кератоцитов на глубине от 0 мкм (соответствует горизонтальному резу ФСЛ) до 26 мкм – меньше, чем в контрольной группе.

Соотношение живых и мертвых кератоцитов в основной и контрольной группах (%), также демонстрирует, что в основной группе повреждение кератоцитов на нулевой глубине (количество мертвых клеток) составило $82,9\%$,

на глубине 13 мкм 51,3% , 26 мкм 29,8% в сравнении с контрольной группой, где наблюдалось 100% повреждение клеток на глубине 0 мкм.

При изучении зависимости повреждающего воздействия лазерного реза на кератоциты в зависимости от расстояния выявлена статистически значимая положительная корреляционная связь между количеством живых кератоцитов и расстоянием, на котором они находятся от фемтолазерного реза как в основной, так и в контрольной группе. Вместе с тем, выявлена отрицательная корреляционная связь между количеством мертвых кератоцитов и расстоянием, на котором они находятся от фемтолазерного реза как в основной, так и в контрольной группах.

*Результаты сканирующей электронной микроскопии образцов задних
послойный трансплантатов, выкраенных по методике ФЛ-ЗПК*

При анализе изображений СЭМ стромальной стороны трансплантата имелись незначительные единичные разволокнения стромы в обеих группах. Результаты СЭМ эндотелиальной стороны трансплантата демонстрируют сохранение гексагональной формы ЭК трансплантата, имеются единичные клетки с утраченной целостностью клеточных мембран, что сопоставимо подтверждает результаты флуоресцентной сканирующей микроскопии живых и мертвых клеток. В контрольной группе отмечали зоны оголения Десцеметовой мембраны, которые коррелировали с данными о меньшей плотности эндотелиальных клеток, полученных на предыдущем этапе исследования – лазерной сканирующей микроскопии эндотелиальной поверхности трансплантата.

***Результаты разработки экспериментального образца устройства для
имплантации заднего послойного трансплантата и изучения
жизнеспособности ЭК после его использования***

*Результаты изучения относительной потери ПЭК заднего послойного
трансплантата после прохождения через различные устройства для
имплантации*

После выкраивания трансплантатов с помощью ФСЛ и окрашивании эндотелия клеток ТС в основной группе 1 (с использованием нового

модифицированного инжектора) площадь окрашивания нежизнеспособных клеток составила $15,07 \pm 2,27\%$, после прохождения трансплантата через инжектор $17,32 \pm 1,41\%$. После окрашивания эндотелия трансплантатов ТС в контрольной группе 2 (с использованием глайда типа Бузина) площадь окрашивания нежизнеспособных клеток составила $14,98 \pm 2,14\%$, после прохождения трансплантата через глайд $19,88 \pm 2,14\%$.

Результаты изучения жизнеспособности ЭК заднего послойного трансплантата после прохождения через различные устройства для имплантации

По данным конфокальной микроскопии общее количество ЭК в основной и контрольной группах составляло 3292 ± 55 кл/ мм² и 3046 ± 67 кл/ мм² соответственно.

В эксперименте на свиных глазах при проведении трансплантатов через новый модифицированный инжектор (основная группа) плотность живых ЭК составила 2929 ± 38 кл/ мм², что статистически значимо больше, чем в группе с использованием глайда Бузина (контрольная) 2527 ± 34 кл/мм² ($p < 0,001$, t-критерий Стьюдента для независимых выборок). В то время как плотность мертвых ЭК наоборот в основной группе статистически значимо меньше 363 ± 32 кл/ мм², чем в контрольной 519 ± 32 кл/ мм² ($p < 0,001$, t-критерий Стьюдента для независимых выборок) (таблица 12, рисунок 21-23).

Результаты экспериментального моделирования технологии имплантации заднего послойного трансплантата в переднюю камеру донорского глаза с помощью инжектора-глайда собственной разработки

При выполнении моделирования технологии имплантации заднего послойного трансплантата в донорский глаз во всех случаях наблюдали: стабильность передней камеры, равномерность скручивания и плавность прохождения трансплантата через наконечник инжектора-глайда, удобность его использования. Исходя из результатов проведенного экспериментального исследования моделирования имплантации следует заключить, что предложенная модель инжектора-глайда для ЗПК способствует снижению числа интраоперационных рисков опустошения передней камеры, вставления радужки

в разрез, слияния краев трансплантата и, как следствие, избыточного повреждения донорского материала, а также упрощает технику имплантации. Конструктивные особенности модифицированного инжектора-глайда способствуют герметичному сопоставлению наконечника инструмента и разреза, в результате чего отсутствует перепад давления в передней камере и ее опорожнение, профилактруется пролапс радужки и смещение иридохрусталиковой диафрагмы кпереди, вследствие наличия поршня с заглушкой, создающего герметичность и предотвращающего отток жидкости из передней камеры. Форма канала наконечника инжектора с наличием закругленного выступа обеспечивает равномерное скручивание трансплантата (снижается риск складывания трансплантата в трубочку и слияния краев), тем самым создает оптимальные условия для его продвижения по каналу наконечника и последующей имплантации в переднюю камеру глаза.

Результаты клинической части

Данные МКОЗ и НКОЗ в основной и контрольной группах были сопоставимы на всех сроках наблюдения ($p > 0,05$, критерий Манна -Уитни), кроме данных НКОЗ до операции ($p = 0,017$, критерий Манна-Уитни), однако различие не имело клинической значимости (медиана НКОЗ в основной группе 0,03 (0,01; 0,05), в контрольной 0,05 (0,02; 0,10) и имело случайный характер, что позволило проводить дальнейшие исследования. Вместе с тем, выявлено статистически значимое увеличение МКОЗ и НКОЗ в обеих группах на всех сроках наблюдения по сравнению с данными до операции ($p < 0,001$, критерий Вилкоксона).

Данные ЦТР до операции были статистически значимо больше в основной группе 859 (750; 894) по сравнению с контрольной 726 (675; 787) ($p = 0,001$, критерий Манна-Уитни), однако на сроках 3, 6 и 12 месяцев данные между группами были сопоставимы и находились пределах нормальных значений, а также были статистически значимо меньше по сравнению с данными до операции ($p < 0,001$, критерий Вилкоксона).

Толщина трансплантата по данным ОКТ в центральной части роговицы в основной группе на сроках 3 месяца 91 (77; 93) и 6 месяцев 85 (65; 87) после операции была статистически значимо меньше, чем в контрольной 94 (89; 97) в

3 месяца и 89 (86; 94) в 6 месяцев ($p=0,024$ и $p=0,026$ соответственно, критерий Манна-Уитни), а через 12 месяцев после операции данные между граппами были сопоставимы ($p=0,181$, критерий Манна-Уитни). В обеих группах данные толщины трансплантата на сроках 6 и 12 месяцев были статистически значимо меньше по сравнению с данными на сроке 3 месяца после операции ($p<0,001$, критерий Вилкоксона).

Данные ПЭК донора до операции были сопоставимы между двумя группами и составили 2849 (2751; 2900) для основной группы, и 2900 (2793; 2974 для контрольной) ($p=0,096$, критерий Манна-Уитни) (таблица 21).

На сроках 3, 6 и 12 месяцев данные ПЭК в основной группе 1339 (1220; 1425) были статистически значимо больше, чем в контрольной группе 970 (890; 1097) ($p<0,001$, критерий Манна-Уитни).

Данные потери эндотелиальных клеток в основной группе были статистически значимо меньше, чем в контрольной группе на всех сроках наблюдения, и составили к году после наблюдения $53,6\pm 5,3\%$ в основной группе, и $65,6\pm 7,5\%$ в контрольной группе ($p<0,001$, t-критерий Стьюдента для независимых выборок).

ВЫВОДЫ

1. В результате экспериментального исследования инвертированных корнеосклеральных дисков в момент аппланации с головкой фемтосекундного лазера, выявлено, что нахождение ВЭ (1% ГПМЦ) в зоне интерфейса «эндотелий-головка лазера» не влияет на равномерность профиля аппланации донорской роговицы по данным оптической когерентной томографии.

2. Подсчет потери эндотелиальных клеток с оценкой их жизнеспособности в эксперименте с использованием свиных корнеосклеральных дисков показал, что плотность живых эндотелиальных клеток в основной группе с использованием вискоэластика была больше, чем в контрольной составив 3477 кл/мм² и 2854 кл/мм² соответственно ($p<0,001$, критерий Манна-Уитни). Данный факт свидетельствует об эффективной вископротекции эндотелия как в момент аппланации лазером, так и при его дальнейшей работе.

3. При анализе качества стромального реза по данным сканирующей электронной микроскопии трансплантата отмечали лишь незначительные

разволоknения стромы в обеих исследуемых группах. Нанесение 1% раствора гидроксипропилметилцеллюлозы на эндотелий донорской роговицы перед этапом аппланации не влияло на работу лазера и качество стромальной поверхности трансплантата.

4. Разработана оригинальная модель инжектора-глайда для задней послойной кератопластики, способствует поддержанию стабильного положительного давления в передней камере, равномерному складыванию трансплантата и создает оптимальные условия для продвижения его по каналу инжектора-глайда с последующим плавным расправлением в передней камере глаза в эксперименте.

5. Сравнительная оценка потери эндотелиальных клеток после прохождения трансплантата через предложенный инжектор-глайд показала плотность живых эндотелиальных клеток равную 2929 ± 38 кл/мм², что статистически значимо больше, чем в группе с использованием глайда Бузина – 2527 ± 34 кл/мм² ($p < 0,001$, t-критерий Стьюдента для независимых выборок). При исследовании относительной потери плотности ЭК с помощью ТС разница между группами составила $2,56 \pm 1,78\%$.

6. Анализ клинико-функциональных результатов лечения пациентов с эндотелиальными дистрофиями методом ФЛ-ЗПК показал, что оперативное лечение в обеих группах на всех сроках наблюдения дало статистически значимое увеличение МКОЗ по сравнению с исходными данными. В опытной группе МКОЗ до операции и на сроке наблюдения 12 месяцев составляет 0,04 (0,01;0,05) и 0,4 (0,30;0,50) соответственно. В контрольной группе МКОЗ до операции и на сроке наблюдения 12 месяцев составляет 0,08 (0,02;0,10) и 0,3 (0,30;0,40) соответственно. Толщина трансплантата в центральной части роговицы в основной группе на сроках 3 и 6 месяцев после операции была статистически значимо меньше, чем в контрольной ($p=0,024$ и $p=0,026$ критерий Манна-Уитни), плотность эндотелиальных клеток через 12 месяцев в опытной группе составила 1339 (1220;1425) кл/мм²; и была статистически значимо больше, чем в контрольной группе – 970 (890;1097) кл/мм², ($p < 0,001$, критерий Манна-Уитни), таким образом, потеря ПЭК в основной и контрольной группах составила $53,6 \pm 5,3\%$ и $65,6 \pm 7,5\%$ соответственно.

7.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для защиты эндотелиального слоя заднего послойного трансплантата на этапе выкраивания его с помощью ФСЛ, рекомендовано нанесение на эндотелий трансплантата слоя 1% ГПМЦ, который обеспечивает достаточную защиту ЭК и конгруэнтность поверхностей профиля роговицы и интерфейса ФСЛ в момент аппланации и не влияет на качество фемтолазерного реза.

2. Для обеспечения предсказуемости и безопасности процесса аппланации для эндотелия при выкраивания трансплантата, а также оптимизации силы контакта интерфейса ФСЛ и эндотелия, следует применять следующую методику: донорский корнеосклеральный диск фиксируют в специальном держателе – искусственной передней камере эндотелиальной стороной вверх, затем при непрерывной подаче сбалансированного солевого раствора заполняют ИПК под давлением 50 мм вод. ст., что оптимально для поддержания объема ИПК, разглаживания складок роговицы и распределения давления на эндотелий роговой оболочки при его контакте с интерфейсом лазера. После нанесения вискоэластика на поверхность эндотелиального слоя выдерживают время 30-60 секунд, необходимое для равномерного распределения его в виде слоя по всей поверхности эндотелия. Далее рукоятку лазера фиксируют к ИПК при помощи специального упора, затем вращением кольца с резьбой, плавно опускают вниз, тем самым аппланируя роговицу. При помощи ОКТ, интегрированной в ФСЛ, производят контроль контакта роговицы и головки лазера. Далее после работы ФСЛ вращением кольца в обратном направлении плавно разъединяют головку лазера и донорскую роговицу, затем удаляют рукоятку лазера с поверхности искусственной передней камеры.

3. Для выкраивания ультратонкого трансплантата для ЗПК при помощи ФСЛ оптимальными являются следующие параметры: глубина – 125 мкм, диаметр – 7,0-8,5 мм. После формирования горизонтального фемтореза, до эндотелиального слоя роговицы остается в среднем 34 мкм интактной стромы. Данная настройка, оптимальна с точки зрения безопасности коллатерального воздействия лазерной энергии на эндотелий трансплантата.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Ткаченко И.С.**, Малюгин Б.Э., Шилова Н.Ф. Ранние результаты фемтосекундной лазерной задней послойной кератопластики с применением вископротекции эндотелия при формировании роговичного трансплантата // Современные технологии в офтальмологии. – 2020. – №3. – С. 140-141.

2. **Ткаченко И.С.**, Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., Островский Д.С., Калининкова С.Ю. Экспериментальное изучение вископротекции эндотелия роговичного трансплантата для задней послойной кератопластики, сформированного при помощи фемтосекундного лазера» // Новые технологии в офтальмологии. – 2021. – С. 135-140.

3. **Ткаченко И.С.**, Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., Островский Д.С., Калининкова С.Ю. Экспериментальное обоснование применения вископротекции эндотелия роговичного трансплантата для задней послойной кератопластики, сформированного при помощи фемтосекундного лазера // Современные технологии в офтальмологии. – 2021. – №2. – С. 94-96.

4. Динь Т.Х.А., Калининков Ю.Ю., Тихонович М.В., Калининкова С.Ю., Нгуен С.Х., **Ткаченко И.С.** Развитие технологий эндотелиальной кератопластики (обзор) // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2022. – Т.18. – №1. – С. 12-18.

5. Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., **Ткаченко И.С.**, Островский Д.С., Калининкова С.Ю. Экспериментальное обоснование использования 1% раствора ГПМЦ для защиты эндотелия заднего послойного трансплантата роговицы при его выкраивании низкоэнергетическим фемтосекундным лазером по инвертированной методике» // Офтальмохирургия. – 2023. – №3. – С. 26-36.

Патенты РФ на изобретение по теме диссертации

1. Малюгин Б.Э., **Ткаченко И.С.**, Гелястанов А.М., Калининкова С.Ю. // Патент РФ № 2758028 от 25.10.2021 «Способ проведения задней послойной кератопластики с помощью фемтосекундного лазера»

2. Малюгин Б.Э., **Ткаченко И.С.**, Латыпов И.А., Орлов А.Ю., Калининкова С.Ю. // Патент РФ № 2803860 от 21.09.2023 «Инжектор для имплантации заднего послойного трансплантата роговицы»

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БТ** – болезнь трансплантата
- ВГД** – внутриглазное давление
- ВЭ** – вискоэластик
- ГПМЦ** – гидроксипропилметилцеллюлоза
- ДМ** – Десцеметова мембрана
- ДФ** – эндотелиальная дистрофия роговицы Фукса
- ЗАПК** – задняя автоматизированная послойная кератопластика
- ЗПК** – задняя послойная кератопластика
- ИОЛ** – интраокулярная линза
- ИПК** – искусственная передняя камера глаза
- КСД** – корнеосклеральный диск
- МКОЗ** – максимальной корригированной остроты зрения
- НКОЗ** – некорригированная острота зрения
- ОКТ** – оптическая когерентная томография
- ПБК** – псевдофакичная буллезная кератопатия
- ПОУГ** – первичная открытоугольная глаукома
- ПЭК** – плотность эндотелиальных клеток
- СКП** – сквозная кератопластика
- СЭМ** – сканирующая электронная микроскопия
- ТДМ** – трансплантация эндотелия с Десцеметовой мембраной
- ТС** – трепановый синий
- ФЛ-ЗПК** – задняя послойная фемтокератопластика
- ФСЛ** – фемтосекундный лазер
- ФЭК** – факоэмульсификация катаракты
- ЦТР** – центральная толщина роговицы
- ЭК** – эндотелиальные клетки

Биографические данные

Ткаченко Иван Сергеевич родился 9 декабря 1994 года в городе Таганроге Ростовской области. В 2019 году окончил ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России по специальности «Педиатрия». В 2019-2021 годах проходил ординатуру по специальности «Офтальмология» на базе ФГАУ «НМИЦ «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. С 2021 по 2024 год проходил аспирантуру по направлению «Глазные болезни» на базе отдела трансплантационной и оптико-реконструктивной хирургии переднего отрезка глазного яблока Головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Является автором 8 печатных работ, из них 5 – рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ. Автор 5 патентов РФ на изобретение, в том числе 2 патента по теме исследовательской работы. По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ, из них 2 в рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей Аттестационной Комиссией Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, в том числе 1 статья в журнале, входящем в международную базу данных «Scopus». Двукратный призер (2-е место) за лучший доклад на конференции молодых ученых в рамках всероссийской научной-практической конференции с международным участием «Федоровские чтения» (2020, 2021 гг.).