

Динь Тхи Хоанг Ань

**КЛИНИКО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ
ПРЕЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ КЕРАТОПЛАСТИКИ С ДЕСЦЕМОРЕКСИСОМ В
ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ БУЛЛЕЗНОЙ КЕРАТОПАТИИ**

3.1.5. Офтальмология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена на кафедре глазных болезней Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико–стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России.

Научный руководитель:

Калинников Юрий Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры глазных болезней ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, врач-офтальмолог в ФГБУ «Клиническая больница» Управления делами Президента Российской Федерации, генеральный директор ООО «Клиника амбулаторной микрохирургии глаза».

Официальные оппоненты:

Измайлова Светлана Борисовна, доктор медицинских наук, заведующая отделом трансплантационной и оптико-реконструктивной хирургии переднего отрезка глазного яблока ФГАУ «МНТК «Микрохирургии глаза» им. С.Н. Федорова» Минздрава России;

Осипян Григорий Альбертович, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник отдела патологии оптических сред глаза ФГБНУ "НИИГБ им. М.М. Краснова".

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится 21 июня 2023 г. в 14:00 на заседании постоянно действующего диссертационного совета ПДС 0300.022 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

С диссертацией можно ознакомиться в читальном зале УНИБЦ (Научная библиотека) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6) и на сайте <https://www.rudn.ru/science/dissovet/dissertacionnye-sovety/pds-0300022>

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
ПДС 0300.022
кандидат медицинских наук, доцент

Макеева Мария Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследуемой темы

В настоящее время эндотелиальная недостаточность роговицы является одним из основных показаний к кератопластике. В 2021 г. согласно статистике Американской Ассоциации глазных банков, общее количество заготовленной донорской роговицы составляло 79 641 ед., из них на долю эндотелиальных дистрофий приходилось 35 532 ед. (2021 Eye banking Statistical report of Eye Bank Association of America).

Эндотелиальные дистрофии могут иметь врожденную и приобретенную этиологию. Самыми частыми являются эндотелиальная дистрофия роговицы Фукса, и псевдофакичная буллезная кератопатия (Feizi S., 2018; Claesson M., 2009). При данных заболеваниях в значительной степени страдает внутренний слой роговицы – эндотелий, представляющий собой монослой высоко дифференцированных гексагональных клеток, регулирующих водный обмен в роговице. Его дисфункция сопровождается отеком роговицы, помутнением стромы, образованием эпителиальных булл, в результате этого происходит значительное снижение зрительных функций, возникает хронический болевой синдром, и как следствие, снижается качество жизни пациента. Помимо монослоя эндотелиальных клеток, в патологический процесс вовлекается десцеметова мембрана (ДМ), представляющая собой базальную мембрану эндотелиального слоя толщиной 10-12 мкм и состоящая из коллагена IV и VIII типов, ламинина, фибронектина и протеогликанов (Schlötzer-Schrehardt U., 2011).

Общепринятым стандартом в лечении задних дистрофий роговицы является эндотелиальная кератопластика (Малюгин Б.Э., 2013; Измайлова С.Б., Паштаев А.Н., 2020; Оганесян О.Г., 2011). На сегодняшний день наиболее часто выполняемыми операциями являются автоматизированная задняя послойная кератопластика (ЗАПК) и трансплантация десцеметовой мембраны (ТДМ). В офтальмологическом мире ведется широкая дискуссия вокруг вопроса о том, какая процедура лучше: ЗАПК или ТДМ. F. Guerra и соавторы в 2011 г. опубликовали исследование, в котором представили послеоперационные результаты ТДМ и ЗАПК, выполненные на парных глазах одних и тех же пациентов. По данным сравнительного анализа, 85 % пациентов ощутили более значительное улучшение качества зрения на глазу, на котором была выполнена ТДМ (Guerra FP., 2011). Считается, это связано с тем, что слои стромы, вызывающие оптические аномалии, не трансплантируют в ходе процедуры ТДМ (Maier AK., 2014).

ЗАПК является более простой и устоявшейся хирургической процедурой, в то время как ТДМ – относительно новой техникой. Общеизвестно, что ТДМ является более сложной процедурой с технической точки зрения (Borroni D., 2021; Оганесян О.Г., 2018; Малюгин Б.Э., 2019). В технологии ТДМ пересаживается только эндотелиальный слой с десцеметовой мембраной, толщина трансплантата составляет приблизительно 15 мкм, поэтому возникает трудность при его заготовке. Сообщается, что от 4,2 до 8 % трансплантатов ТДМ не могут быть успешно подготовлены (Parekh M., 2018). Более того, послеоперационная отслойка трансплантата является более частым осложнением, связанным с ТДМ (от 33 до 81 %), чем с ЗАПК (от 7 до 20 %) (Tourtas T., 2012).

В 2013 г. был открыт новый, шестой слой роговицы – предесцеметовый слой (слой Дуа) (Dua HS, 2013). В связи с его открытием А. Agarwal предложил новую технологию эндотелиальной кератопластики – ПДЭК (Agarwal A, 2014). ПДЭК не требует подбора донора определенного возраста, техника операции проста, процент осложнений минимален, а функциональные результаты сопоставимы с ТДМ (Shanmugam S, 2023). Различные авторы стали проявлять интерес к этому слою роговицы и возможности его использования в клинической практике (Калинников Ю.Ю., Динь Т.Х.А., 2022; Аветисов С.Э., Осипян Г.А., 2022; Труфанов С.В., 2018).

Степень разработанности темы диссертации

Анализ литературы показал, что, несмотря на все потенциальные преимущества технологии ПДЭК, такие как высокие послеоперационные зрительные функции, сопоставимые с ТДМ, лучшая адгезия к строме роговицы реципиента за счет предесцеметового слоя чем

при ТДМ, а также возможность получения трансплантата для ПДЭК от молодых доноров, в настоящее время количество выполненных операций по технологии ПДЭК еще мало. Редкое использование ПДЭК связано с трудностью выкраивания трансплантата для ПДЭК, получаемого методом «big bubble», во время которого высок процент разрыва ткани и потери донорского материала. Встречаются следующие осложнения при формировании большого пузыря первого типа классическим методом: отсутствие пузыря (в результате прокола эндотелия или многократных вхождений иглы в строму), разрыв пузыря (из-за трудности дозирования силы надавливания поршня для введения воздуха), формирование большого пузыря второго типа (неправильная плоскость вхождения иглы в строму), что приводит к выбраковке ценного донорского материала.

Учитывая вышеизложенное, совершенствование технологии презэндотелиальной кератопластики с десцеметорексисом (предесцеметовая эндотелиальная кератопластика, ПДЭК), которое бы позволило внедрить данную операцию в широкую клиническую практику, является актуальным и требует дальнейшего изучения.

Цель исследования

Разработать оптимизированную технологию предесцеметовой эндотелиальной кератопластики (ПДЭК) для хирургического лечения пациентов с буллезной кератопатией.

Задачи исследования:

1. Разработать инструменты для эффективного и безопасного выкраивания трансплантата для предесцеметовой эндотелиальной кератопластики.
2. Оптимизировать хирургическую технику выкраивания трансплантата для предесцеметовой эндотелиальной кератопластики.
3. Провести сравнительный анализ различных техник выкраивания трансплантата для ПДЭК.
4. Разработать способ выкраивания и хранения трансплантата для предесцеметовой эндотелиальной кератопластики.
5. Оценить в эксперименте плотность, жизнеспособность и структуру эндотелиальных клеток роговиц в ходе заготовки и консервирования трансплантатов ПДЭК по оптимизированной технологии.
6. Усовершенствовать хирургическую технику предесцеметовой эндотелиальной кератопластики у пациентов с буллезной кератопатией.
7. Провести сравнительный анализ клинико-функциональных результатов хирургического лечения пациентов с буллезной кератопатией по оптимизированной технологии предесцеметовой эндотелиальной кератопластики (ПДЭК), трансплантации десцеметовой мембраны с эндотелием (ТДМ) и задней послойной кератопластики с выкраиванием трансплантата с помощью фемтосекундного лазера (ФЛ-ЗПК).
8. Оценить частоту и характер осложнений хирургического лечения пациентов с буллезной кератопатией с использованием различных технологий задней послойной кератопластики.

Научная новизна исследования

1. Впервые разработана и экспериментально обоснована техника выкраивания трансплантата для оптимизированной предесцеметовой эндотелиальной кератопластики, которая предотвращает интраоперационные риски потери донорского материала и позволяет получать трансплантат большого размера.
2. Предложена оригинальная техника консервации трансплантата для предесцеметовой эндотелиальной кератопластики.
3. Впервые в эксперименте проведена оценка плотности, жизнеспособности и структуры эндотелиальных клеток непосредственно после выкраивания трансплантата для

ПДЭК, а также структуры эндотелиальных клеток изучаемых трансплантатов ПДЭК после органотипического культивирования.

4. Впервые проведен сравнительный анализ клинико-функциональных результатов хирургического лечения пациентов с буллезной кератопатией методами оптимизированной ПДЭК, ТДМ, ФЛ-ЗПК. Оптимизированная ПДЭК показала высокую эффективность с минимальным процентом осложнений.

Теоретическая и практическая значимость

1. Разработана и внедрена в клиническую практику оптимизированная технология предесцементовой эндотелиальной кератопластики (ПДЭК) в хирургическом лечении пациентов с буллезной кератопатией.

2. Предложены инструменты для эффективного и безопасного получения трансплантата большого размера для ПДЭК.

3. Разработан и внедрен в работу глазного банка способ выкраивания и хранения трансплантата для предесцементовой эндотелиальной кератопластики.

4. Оптимизированная технология проведения ПДЭК позволяет достичь максимально возможной остроты зрения в послеоперационном периоде с минимальным процентом осложнений, использовать донорский материал любого возраста, легко манипулировать трансплантатом в передней камере.

Методология и методы исследования

Методологической основой данного диссертационного исследования явилось последовательное применение методов научного познания. Работа выполнялась по классическому типу построения научного исследования, основанного на принципах доказательной медицины. Работа выполнена в дизайне проспективного исследования с использованием клинических, инструментальных, аналитических и статистических методов.

Внедрение в практику результатов исследования

Результаты исследования внедрены в научно-клиническую и практическую деятельность кафедры глазных болезней ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, глазного банка «АЙЛАБ», Федерального Государственного Бюджетного Учреждения «Клиническая больница» Управления делами Президента Российской Федерации, центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургии глаза» им. С.Н. Федорова» Минздрава России, ООО «Клиника амбулаторной микрохирургии глаза».

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработанная в эксперименте и изученная в клинике оптимизированная технология предесцементовой эндотелиальной кератопластики (ПДЭК) для хирургического лечения пациентов с буллезной кератопатией, включающая в себя усовершенствованную хирургическую технику, новый способ выкраивания и консервации трансплантата позволяет улучшить клинико-функциональные результаты операции с минимальным процентом интра- и послеоперационных осложнений.

2. Разработана и внедрена в клиническую практику техника выкраивания трансплантата для оптимизированной ПДЭК, которая позволяет получить большой пузырь 1 типа в 95-100 % случаев диаметром 7,0 – 8,5 мм и значительно уменьшить риск выбраковки донорского материала.

3. Предложенная технология предварительного выкраивания и консервации трансплантата для ПДЭК может быть выполнена в условиях глазного банка и позволит устранить интраоперационный риск потери донорского материала, является основой для его более рационального использования, имеет потенциал многократного увеличения количества кератопластик и сокращения сроков ожидания операции.

Личный вклад автора

Личный вклад диссертанта заключается в отборе и подготовке пациентов для клинического исследования, участии диссертанта во всех операциях в качестве ассистента. Диссертантом проведено полное обследование пациентов, как в предоперационном периоде, так на различных сроках наблюдения в послеоперационном периоде. Диссертантом также проведены апробация полученных результатов, подготовка научных публикаций и докладов по теме диссертации. Диссертант выполнял тщательный анализ полученных данных и их статистическую обработку.

Степень достоверности результатов и апробация работы

Достоверность результатов диссертационной работы определяется достаточным количеством обследованных пациентов (84 пациента). Группы формировали в соответствии с критериями включения и невключения, использовали современные клинические и статистические методы.

Автор участвовал с устными докладами на следующих научно-практических конференциях:

- 1) Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Федоровские чтения» (Москва 2022).
- 2) I Дальневосточной Офтальмологический Саммит ДАВОС (Владивосток 2022)
- 3) XXII Всероссийский Конгресс с международным участием «Современные технологии катарактальной и рефракционной хирургии» (Москва, 2022)
- 4) Индийская конвенция по внутриглазным имплантатам и рефракционной хирургии IIRSI (Ченнай, 2022)
- 5) 38-й конгресс Азиатско-Тихоокеанской академии офтальмологии АРАО 2023 (Куала Лумпур, 2023).

Апробация проведена на заседании кафедры глазных болезней лечебного факультета ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, протокол № 8 от 13.02.2023.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 3 научных работ. Данные 3 работ опубликованы в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, входящих в перечень, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, и также входящие в Международные базы данных Web of Science Core/Scopus. По теме диссертационной работы получены 5 патентов РФ на изобретение: №2782785 от 02.11.2022, № 2787149 от 13.12.2021, № 2787148 от 13.12.2021, № 2787153 от 29.12.2022, № 2791988 от 15.03.2023.

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, глав материалы и методы, результаты исследования, заключение, выводы, практические рекомендации и списка литературы. Диссертация содержит 137 страниц, 23 таблицы, 22 рисунка. Список литературы включает 181 источник информации, из них 29 отечественных и 152 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Данная работа включала выполнение экспериментального и клинического этапов исследования.

I. Экспериментальное исследование включало:

1. Экспериментальное изучение воздействия различных способов выкраивания ПДЭК трансплантата на формирование большого пузыря первого типа.
2. Разработку способа выкраивания и хранения трансплантата для ПДЭК.

3. Гистологическое исследование препаратов донорских роговиц, выкроенных по различным технологиями ЗПК, с помощью световой микроскопии.

4. Оценку плотности, жизнеспособности и структуры эндотелиальных клеток роговиц в ходе заготовки и консервирования трансплантата ПДЭК по оптимизированной технологии.

1) Экспериментальное изучение воздействия различных способов выкраивания ПДЭК трансплантата на формирование большого пузыря первого типа.

Исследование было проведено на 30 донорских корнеосклеральных дисках. Критерий выбора донорской роговицы – ПЭК > 2200 кл/мм². Возраст доноров на момент смерти варьировал от 30 до 60 лет. Все донорские корнеосклеральные диски были разделены на три группы.

Первая группа состояла из 10 корнеосклеральных дисков, на которых применяли стандартную технику подготовки трансплантата для ПДЭК (Agarwal A, 2014).

Вторую группу составили также 10 корнеосклеральных дисков, на которых использовали оптимизированный способ № 1 подготовки трансплантата для ПДЭК с применением кольцевого фиксатора, специального основания, пружинящего шприца, консервирующего раствора.

Третью группу составили 10 дисков, на которых использовали оптимизированный способ № 2 подготовки трансплантата для ПДЭК, отличающийся от оптимизированного способа № 1 дополнительным применением искусственной передней камеры.

При получении успешного «большого пузыря» первого типа выкроенный трансплантат для ПДЭК консервировали по предложенной нами технологии для дальнейшего использования в клинической практике.

1.1 Классический способ выкраивания трансплантата для ПДЭК (группа I)

При этом способе корнеосклеральный лоскут (диск) укладывают на ровную поверхность эндотелием вверх. Иглу 30G, соединенную с 5 мл шприцем, заполненным воздухом, вводят со стороны склерального кольца в средние слои стромы (скошенный кончик иглы направлен к эндотелию). Воздух вводят в роговицу до тех пор, пока не сформируется большой пузырь 1-го типа, затем выполняют парацентез пузыря, вводят краситель трипановый синий, и по кругу пузыря с помощью ножниц высекают отслоенный трансплантат. Затем в стандартной технике проводят десцеметорексис, полученный трансплантат имплантируют в роговицу реципиента (Agarwal A, 2014).

1.2 Оптимизированный способ №1 выкраивания трансплантата для ПДЭК (группа II)

1.2.1 Разработка инструментов для оптимизированного способа №1

1.2.1.1 Шприц с пружинящим поршнем и иглой 30G

(Патент РФ № 2787149 от 13.12.2021 г.)

Для пневмодиссекции вместо стандартного 5 мл шприца с иглой 30G использовали шприц, имеющий пружинящий поршень (рис. 1). Данная пружина может легко вставляться в любой шприц и стерилизоваться при необходимости. При использовании иглы с пружинящим поршнем происходит более контролируемое введение воздуха при пневмодиссекции.

В статье, в которой описывается технология ПДЭК, указано на давление, при котором происходит разрыв пузыря, однако на практике хирург не измеряет давление при введении иглы в строму. Пружинящий шприц создает препятствие для быстрого введения воздуха, что позволяет избежать быстрого роста критического давления внутри пузыря, а также уменьшает риск его разрыва.



Рисунок 1 – Шприц с пружинящим поршнем и иглой 30G

1.2.1.2 Основание для выкраивания трансплантата для ПДЭК
(Патент РФ № 2782785, от 02/11/2022 г.)

Основание имеет цилиндрическую или прямоугольную форму, высоту 15 мм, диаметр 20 мм, выполнено из медицинского полимера или хирургической стали (рис.2,3). На верхней поверхности имеется шероховатое углубление диаметром 18 мм полусферической формы, радиус кривизны которого составляет 7,8 мм, для укладывания и фиксации корнеосклерального диска. В верхней части основания по краю бортика располагаются четыре выемки под прямым углом друг к другу. Выемки имеют глубину 4 мм и ширину 2 мм, одна из выемок служит для прохождения рукоятки фиксатора, одна из трех остальных – для введения иглы в трансплантат, при этом выбирают наиболее удобную из выемок.

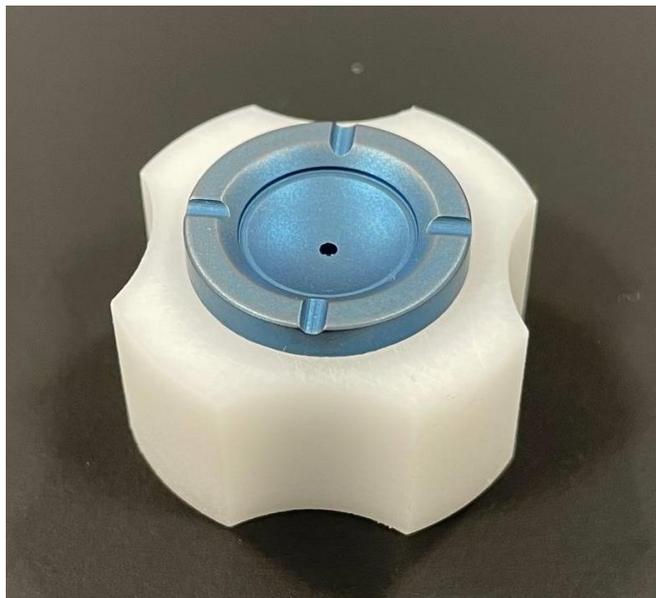


Рисунок 2 – Основание для выкраивания трансплантата для ПДЭК (изготовлено из металлического корпуса и полимера)



Рисунок 3 – Основание для выкраивания трансплантата для ПДЭК (изготовлено из 100% полимера)

1.2.1.3 Кольцевой фиксатор для выкраивания трансплантата для ПДЭК

(Патент РФ № 2782785, от 02.11.2022 г.)

Кольцевой фиксатор состоит из рукоятки и рабочей части. Рукоятка состоит из двух участков: первого, соединенного с кольцом под прямым углом, и второго, отогнутого от первого под углом 135° вверх (рис. 4). Рукоятка прикрепляется к кольцу шириной 1–2 мм, выполненному из хирургической стали, внутренний диаметр кольца составляет 9,0 мм, на нижней поверхности кольца сделана выемка полукруглой формы глубиной 1 мм и диаметром 0,5 мм для удобства введения иглы в трансплантат. Кольцо фиксатора предназначено для установки на углубление основания его нижней поверхностью на корнеосклеральный диск таким образом, чтобы выемка фиксатора находилась на одной оси с одной из выемок основания.

Таким образом, предотвращается смещение трансплантата во время пневмодиссекции, а также уменьшается выбраковка донорского материала, поскольку выемки обеспечивают точное введение иглы в трансплантат (слой Дуа) под прямым углом.

Использование кольцевого фиксатора с основанием не только предотвращает образование пузыря второго типа, но и обеспечивает стабильную фиксацию для попадания иглы в правильную плоскость. Данное устройство, в отличие от зажима Дуа, который держится на весу, имеет твердое основание, являющееся дополнительной опорой для безопасного проведения пневмодиссекции.



Рисунок 4 – Кольцевой фиксатор для выкраивания трансплантата для ПДЭК

1.2.2 Оптимизированная хирургическая техника №1 выкраивания трансплантата для ПДЭК.

В стерильных условиях донорский корнеосклеральный диск укладывают эндотелием вверх в углубление основания. Наносят пару капель раствора трипанового синего на эндотелий для улучшения визуализации глубины погружения иглы (рис. 5, а). Затем иглу 30G, соединенную с заполненным стерильным воздухом 5 мм шприцем, имеющим пружинящий поршень, вводят через выемку основания со стороны склеры в средние слои стромы. Срез иглы должен быть направлен к эндотелию. Затем фиксатор располагают сверху корнеосклерального

диска таким образом, чтобы кольцо фиксатора прижимало корнеосклеральный диск сверху и соответствовало центру трансплантата (рис. 5, б). При этом выемка фиксатора должна соответствовать месту вкола иглы и находиться на одной оси с одной из выемок основания. При надавливании на пружинящий поршень воздух вводят в роговицу поступательными движениями до тех пор, пока не сформируется большой пузырь первого типа (рис. 5, в). Благодаря фиксатору, основанию и пружинящему поршню пузырь будет равномерно отслаиваться от центра к периферии и ограничится диаметром кольца фиксатора, что предотвращает возможность получения большого пузыря второго типа. После получения пузыря для расширения его до необходимых размеров можно использовать среду для консервации. В 5 мм шприц без пружины с иглой 30G набирают консервирующий раствор и вкалывают его через строму внутрь отслоенного большого пузыря (рис. 5, г). Постепенно подавая консервационную среду, отслаивают его до необходимого размера. Выполняют парацентез пузыря и внутрь вводят краситель трипановый синий. Далее возможны два варианта действий: первый – большой пузырь высекают хирургическими ножницами по кругу, и образовавшийся трансплантат готов к введению в переднюю камеру глаза; второй – трансплантат консервируют по предложенной нами методике для дальнейшего использования (рис. 5)

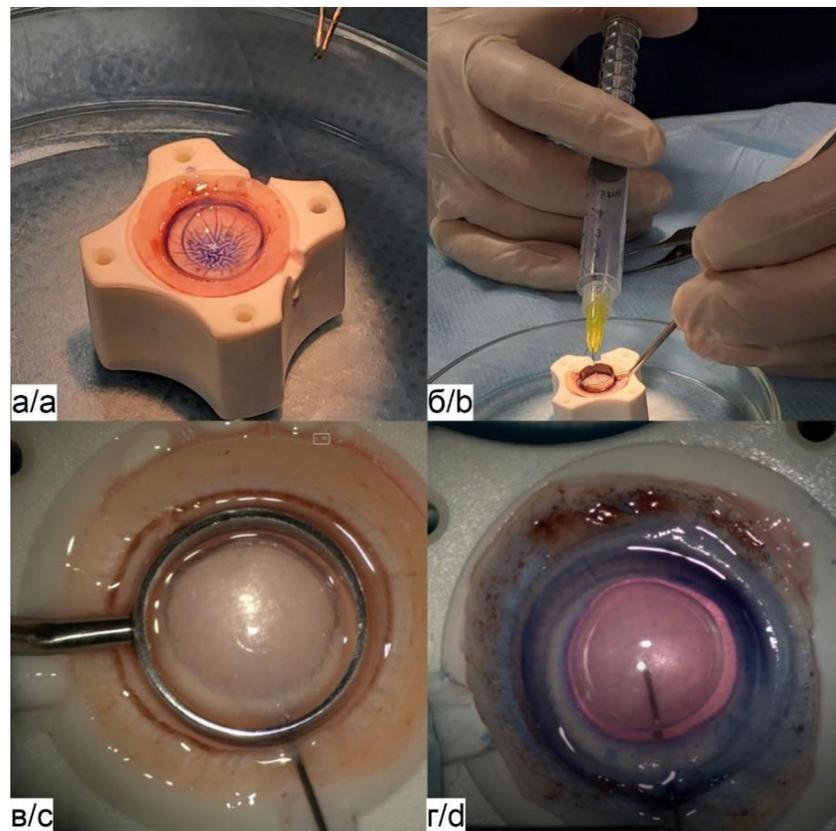


Рисунок 5 – Оптимизированная хирургическая техника №1 выкраивания трансплантата для ПДЭК

1.3 Оптимизированный способ №2 выкраивания трансплантата для ПДЭК

При введении воздуха шприцем в стандартной технике прездотелиальной кератопластики весь объем воздуха устремляется в пузырь, внутри которого резко возрастает давление, и в случае повышения давления выше критического уровня разрыв стенки пузыря является неизбежным. В предложенном нами изобретении подача жидкости через боковой порт внутрь корпуса ИПК будет симулировать переднюю камеру глаза, благодаря этому сформировавшийся пузырь внутри ИПК не рвется, так как происходит блокировка фенестров на периферии слоя Дуа, что создает дополнительную фиксацию для иглы во время введения воздуха.

1.3.1. Разработка инструментов для оптимизированного способа № 2

1.3.1.1. Искусственная передняя камера (ИПК) для ПДЭК.

(Патент РФ № 2791988, от 15.03.2023 г.)

ИПК состоит из корпуса и основания для фиксации трансплантата. Корпус с рукояткой выполнены из титанового сплава (рис.6). Рукоятка состоит из двух участков: первого, соединенного с корпусом под прямым углом, и второго, отогнутого от первого вверх под углом 135°. Корпус выполнен в виде полого цилиндра ступенчатой формы, расширяющегося кверху с образованием углубления внутри корпуса, и имеет внизу наружный диаметр 10 мм и внутренний диаметр 9 мм; начиная с высоты 7 мм наружный диаметр составляет 11 мм, внутренний – 10 мм; общая высота корпуса – 8,5 мм. В углубление устанавливают стеклянную пластину, закрывающую корпус и обеспечивающую визуализацию манипуляций внутри ИПК. Пластина (крышка) имеет диаметр 10 мм, толщину 2 мм. Поверх крышки устанавливают кольцо с наружным диаметром 10 мм, внутренним – 9 мм и толщиной 1 мм, которое придавливает/фиксирует стеклянную пластину. На нижней поверхности корпуса выполнена выемка полукруглой формы глубиной 0,5 мм и шириной 1,0 мм, служащая для введения иглы в трансплантат. К боковой поверхности корпуса крепится под прямым углом при помощи сварного соединения боковой порт, отстоящий от нижней поверхности корпуса на высоте 4,8 мм. Длина бокового порта – 4,5 мм. Боковой порт представляет собой трубку диаметром 2 мм и служит для подачи жидкости и расправления трансплантата. Основание для фиксации трансплантата выполнено в виде цилиндра из хирургической стали высотой 15 мм и диаметром 20 мм, на его верхней поверхности выполнено шероховатое углубление полукруглой формы диаметром 18 мм для укладки трансплантата эпителиальной стороной (корнеосклерального диска), в верхней части основания на одинаковом угловом расстоянии друг от друга по краю бортика расположены четыре выемки полукруглой формы глубиной 4 мм и шириной 2 мм, одна из которых предназначена для прохождения рукоятки корпуса, другие – для прохождения иглы в трансплантат по прямой оси через выемку на корпусе с одной из удобных сторон.

Остальные инструменты для оптимизированной техники №2 уже были описаны выше (раздел «Разработка инструментов для оптимизированного способа №1»).

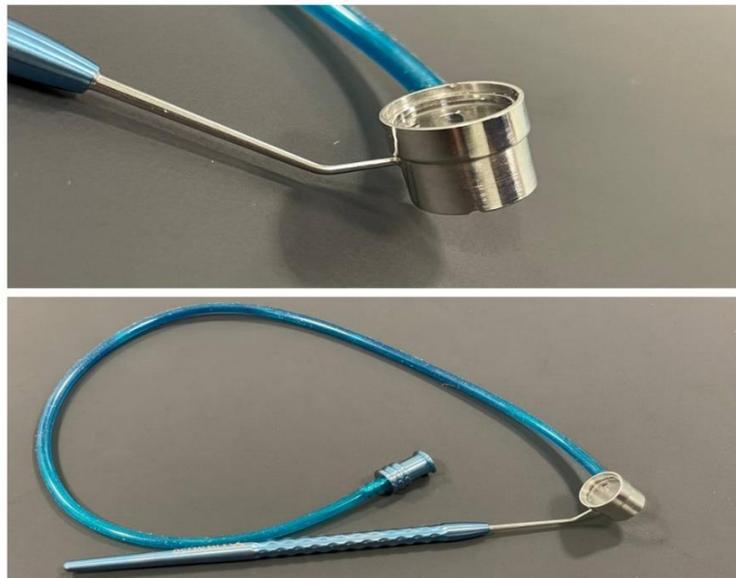


Рисунок 6 – Искусственная передняя камера для ПДЭК

1.3.2. Оптимизированная техника № 2 выкраивания трансплантата для ПДЭК.

В стерильных условиях донорский корнеосклеральный диск укладывают эндотелием вверх в углубление основания для фиксации трансплантата. Наносят пару капель раствора трипанового синего на эндотелий для улучшения визуализации глубины погружения иглы

(рис. 7, а). Затем иглу 30G, соединенную с заполненным стерильным воздухом 5 мм шприцем, имеющим пружинящий поршень, вводят через выемку основания со стороны склеры в средние слои стромы (рис. 7, б). Срез иглы должен быть направлен к эндотелию. Затем фиксатор располагают сверху, надавливают на пружинящий поршень, воздух вводят в средние слои роговицы до образования большого пузыря первого типа (рис. 7, в). Однако для предотвращения разрыва пузырь не раздувают до больших размеров. Затем снимают фиксатор и располагают рукоятку корпуса ИПК в одной из выемок основания таким образом, чтобы нижняя поверхность корпуса ИПК прижимала корнеосклеральный диск сверху и соответствовала центру трансплантата, затем совмещают нижнюю поверхность корпуса с верхней поверхностью основания таким образом, чтобы одна из оставшихся выемок основания находилась на одной оси с выемкой корпуса ИПК (рис. 7, г). К боковому порту корпуса ИПК присоединяют 5 мм шприц, наполненный сбалансированным физиологическим раствором BSS. Жидкость подают в ИПК до полного ее заполнения. За всеми манипуляциями можно наблюдать с помощью стеклянной пластины. Затем продолжают вводить воздух в «большой пузырь» для его безопасного расширения до необходимых размеров, после этого корпус ИПК отсоединяют от основания, при этом трансплантат остается фиксированным к нему (рис. 7, д). Для расширения пузыря до больших размеров также можно ввести консервирующий раствор внутрь пузыря (рис. 7, е). Затем выполняют парацентез пузыря, внутрь которого вводят специальный краситель (трипановый синий), а затем по кругу пузыря с помощью ножниц высекают отслоенный трансплантат (рис.7).

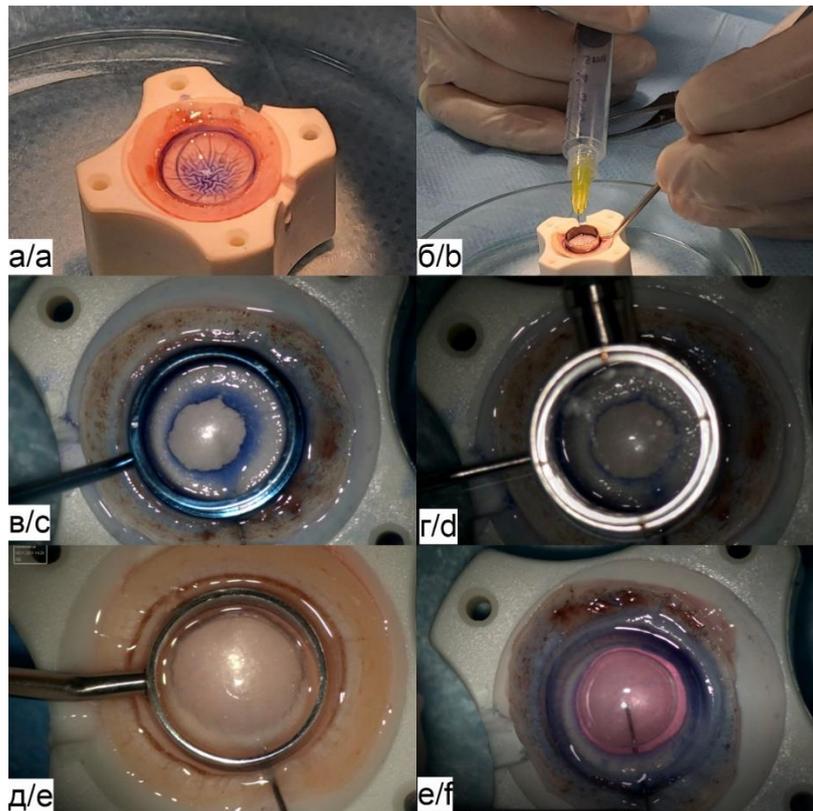


Рисунок 7 – Оптимизированная техника № 2 выкраивания трансплантата для ПДЭК

2) Разработка способа выкраивания и хранения трансплантата для ПДЭК.

(Патент РФ № 2022106305 от 29.12.2022 г.)

Корнеосклеральный диск с отслоенным большим пузырем первого типа укладывают эндотелием вверх в углубление основания. Пузырь окрашивают трипановым синим. На склеру

диска хирургическим маркером наносят три метки на равном расстоянии друг от друга. Рядом с первой меткой выполняют парацентез пузыря (рис. 8, а). Далее ножницами вырезают пузырь до следующей метки на склере (рис. 8, б). После второй метки снова делают парацентез и вырезают пузырь до третьей метки (рис. 8, в, г). После нее снова выполняют парацентез и вырезают пузырь до первой метки (рис. 8, д, е). Таким образом, трансплантат остается фиксированным к корнеосклеральному диску в трех точках, находящихся на одинаковом расстоянии друг от друга, что обеспечивает его частичную фиксацию и надежное хранение в консервационной среде (рис. 8, ё, ж). Данная техника консервации не позволяет трансплантату скручиваться и ударяться эндотелием о поверхность емкости для хранения, что снижает потерю эндотелиальных клеток. Фиксируемые участки с легкостью иссекаются с помощью ножниц перед имплантацией в переднюю камеру во время оперативного вмешательства (рис. 8, 9).

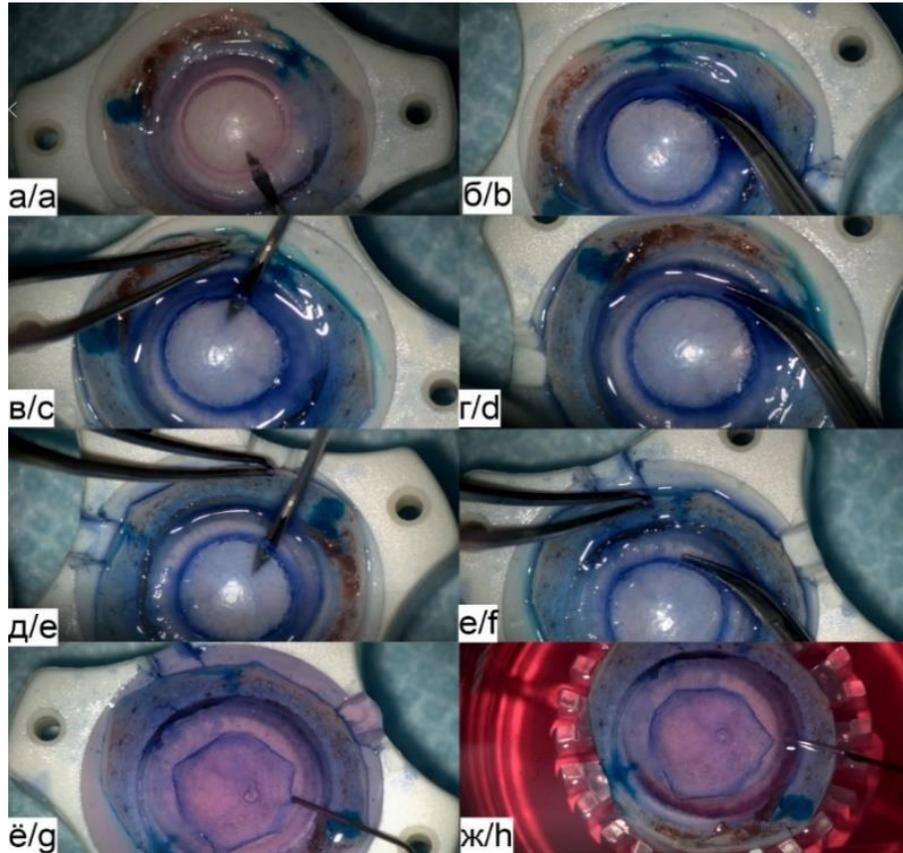


Рис. 8 – Техника выкраивания и хранения трансплантата для ПДЭК (объяснение в тексте)

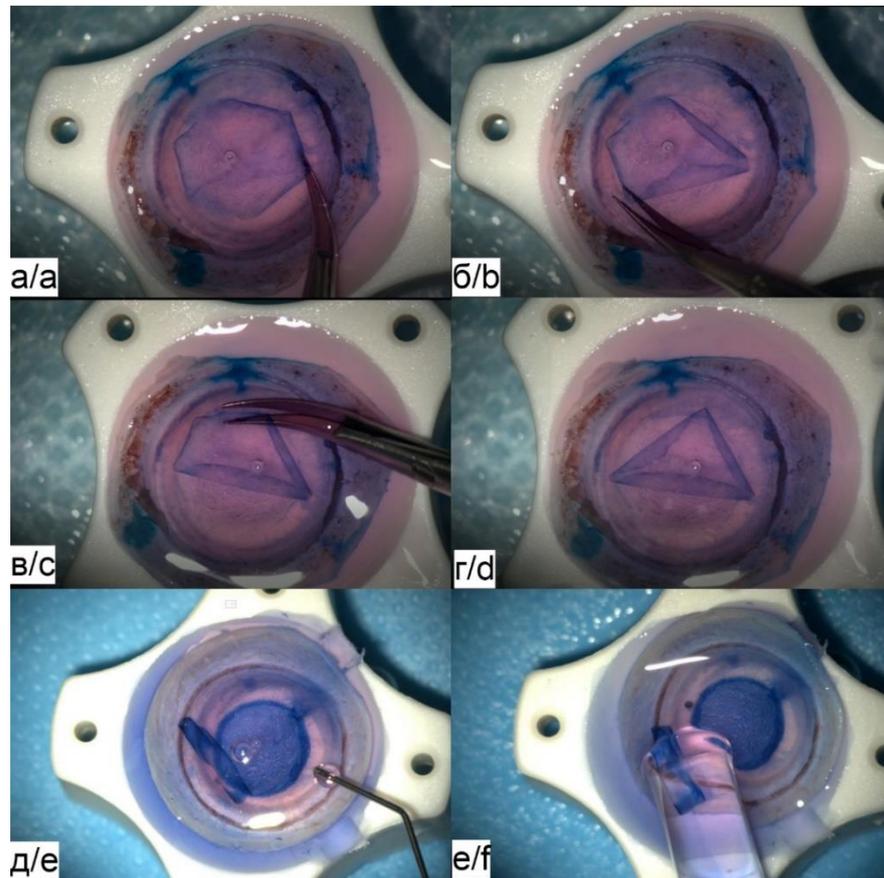


Рис. 9 – Трансплантат для ПДЭК после консервации перед имплантацией в переднюю камеру.

Примечание: а – с помощью ножниц иссекают первый фиксируемый участок; б – с помощью ножниц иссекают второй фиксируемый участок; в – с помощью ножниц иссекают третий фиксируемый участок; г – трансплантат свободен от корнеосклерального лоскута; д – с помощью BSS скручивают трансплантат в рулон, чтобы он смог легко войти в стеклянную канюлю Geuder; е – трансплантат помещают в стеклянную канюлю Geuder перед имплантацией в переднюю камеру во время оперативного вмешательства.

3) Гистологическое исследование препаратов донорских роговиц, выкроенных с помощью различных технологий ЗПК, с помощью световой микроскопии

Гистологическое исследование препаратов донорских роговиц, выкроенных с помощью различных технологий ЗПК, выполнялось с помощью световой микроскопии. Подготовка образцов (стандартная) – фиксация в 10 % растворе нейтрального формалина. Далее обезвоживание и обезжиривание в спиртах восходящей концентрации с последующей заливкой в формалин. Полученные парафиновые срезы 3-5 мкм, окрашенные гематоксилин-эозином, изучали под микроскопом Leica DM LB 2 при $\times 50$, $\times 100$ x, $\times 200$, $\times 400$ кратном увеличении с последующим фотографированием.

3.1 Гистологическое исследование донорской роговицы, выкроенной по технологии ПДЭК

Будущий трансплантат представлен десцеметовой мембраной со слоем Дуа, который состоит из волокон, уложенных в один ряд (рис. 10, В). В участках крепления к основной строме имеется часть поврежденных волокон. Единичные ядра эндотелия на трансплантате присутствуют. Волокна задних слоев стромы (или слоя Дуа) без признаков отека и с наличием единичных искусственных микрокавитаций (указано стрелкой) (рис. 10).

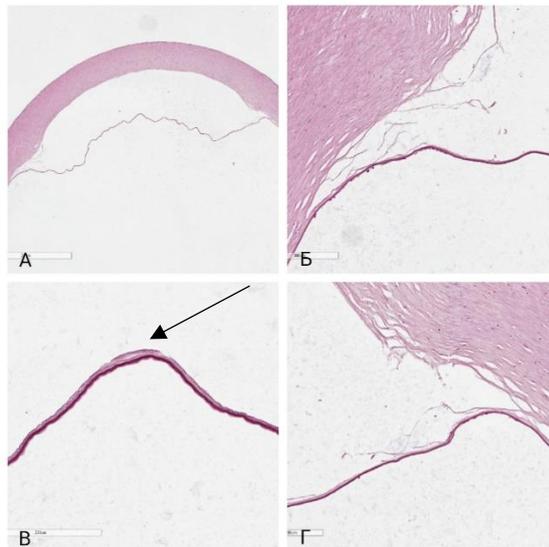


Рисунок 10 – Гистологический препарат донорской роговицы с моделированием отслойки Десцеметовой мембраны, слоем Дуа и эндотелия

3.7.2 Гистологическое исследование донорской роговицы, выкроенной по технологии ТДМ

Будущий трансплантат представлен практически только Десцеметовой мембраной (рис.11), лишь в участках крепления к основной строме имеется часть поврежденных волокон. Эндотелий на трансплантате присутствует (рис. 11, B – стрелки). Волокна задних слоев стромы с признаками умеренного отека.

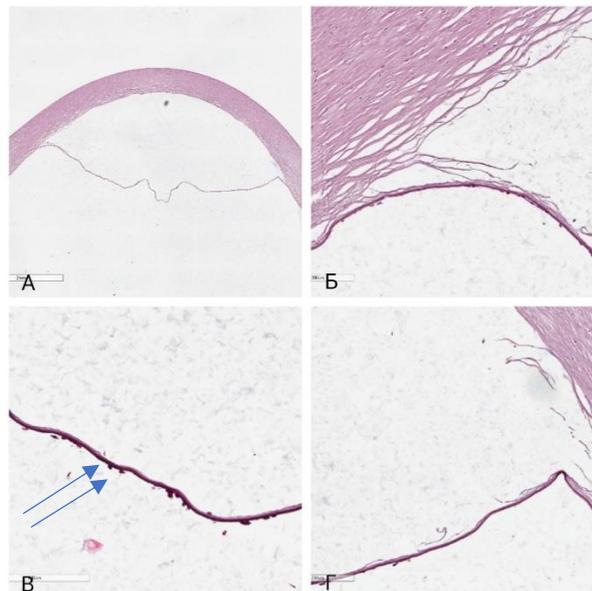


Рисунок 11 – Гистологический препарат донорской роговицы с моделированием отслойки Десцеметовой мембраны и эндотелия.

4) Оценка плотности, жизнеспособности и структуры эндотелиальных клеток роговиц в ходе заготовки и консервирования трансплантата ПДЭК по оптимизированной технологии

Исследование было проведено на базе Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургии глаза» им. С.Н. Федорова» Минздрава России. В ходе исследования были использованы непригодные для трансплантации донорские корнеосклеральные диски, полученные из Глазного тканевого банка ФГАУ

«НМИЦ «МНТК «Микрохирургии глаза» им. С.Н. Федорова». Основные характеристики использованного донорского материала описаны в таблице 1.

Экспериментальные исследования на тканях, выделенных из постмортальных человеческих глаз, проводились в соответствии с официально принятыми процедурами и специальным разрешением в рамках законодательства РФ.

Таблица 1 – Экспериментальное исследование состояния эндотелиальных клеток *in vivo* в зависимости от способа выкраивания и консервирования трансплантата для ЗПК

Количество роговиц	N=22
Соотношение мужчин и женщин	12/10
Средний возраст	45 +/- 4
Среднее время от момента смерти до момента консервации донорской роговицы	23 +/- 8 часа
Показатель трансплантабельности по С.А.Борзенку	3A=10 3B=8 1A=4
Время консервации	6±3 суток

На всех корнеосклеральных дисках был выполнен оптимизированный способ № 1 выкраивания трансплантата для ПДЭК, заключающийся в использовании кольцевого фиксатора, основания, иглы 30G с 5 мл шприцем с пружинящим поршнем и консервирующим раствором. После завершения выкраивания трансплантата для ПДЭК, полученный трансплантат оставляли фиксированным к корнеосклеральному диску с дальнейшим выкраиванием тонкого трансплантата методом одного прохода микрократома (Moria Evolution 3E). Данный шаг был продиктован оптическими возможностями конфокальной микроскопии.

Этапы работы

Дальнейшая оценка полученных трансплантатов включала в себя 3 последовательные этапа:

- 1) оценка плотности и жизнеспособности эндотелиальных клеток после проведения оптимизированной методики выкраивания трансплантата для ПДЭК № 1;
- 2) оценка структуры эндотелиальных клеток роговиц непосредственно после проведения оптимизированной методики выкраивания трансплантата для ПДЭК № 1;
- 3) оценка структуры эндотелиальных клеток изучаемых трансплантатов после органо-типического культивирования с использованием оригинальной методики консервирования трансплантата для ПДЭК.

4.1 Первый этап работы. Оценка жизнеспособности полученных трансплантатов (n = 8)

Оценку жизнеспособности полученных трансплантатов проводили с использованием флуоресцентного красителя «LiveandDead», который включает в себя 2 флуоресцентных красителя: в зеленый цвет (Ex. 494; Em. 515) окрашиваются живые клетки; в красный цвет (Ex. 528; Em. 617) – мертвые.

Для оценки жизнеспособности в ложе полученных ультратонких корнеосклеральных дисков с фиксированным трансплантатом вносили 100 мкл 1x концентрированного раствора «LiveandDead» (рис. 12) и инкубировали при комнатной температуре 10 минут в темноте. Далее 3-хкратно отмывали стерильным раствором фосфатного-солевого буфера. Оценку жизнеспособности проводили с использованием лазерно-сканирующего конфокального микроскопа Olympus FV 10i.

4.2 Второй этап работы. Проведение иммуноцитологического исследования полученных трансплантатов (n = 8)

Для детекции изменений экспрессии характерных функциональных белков эндотелиальных клеток трансплантатов (Na/K-АТФаза, ZO-1) проводили иммуноцитологическое исследование. Исследование выполняли на инвертированном лазерно-сканирующем конфокальном микроскопе Olympus FV 10i». В качестве контроля были изучены ультратонкие задние послойные трансплантаты, выкроенные на микрократоме методом одного реза. Для анализа полученных снимков применялось ПО «CellProfiler», позволяющее выделять клеточные компоненты (ядро, цитоплазму / клетку = ядро + цитоплазма) и рассчитывать интенсивность свечения каждой клетки.

4.3 Третий этап работы. Оценка структуры эндотелиальных клеток изучаемых трансплантатов после органотипического культивирования (n = 6)

Для оценки состояния эндотелиальных клеток в отдаленный период после консервирования трансплантата для ПДЭК проводили органотипическое культивирование корнеосклерального диска с фиксированным трансплантатом в 10 мл питательной среды DMEM/F12 с добавлением 2 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2мМ L-глутамин, 1 % раствора антибиотиков, 10 нг/мл эпидермального фактора роста. Культивирование проводили в культуральных матрасах 25 см², расположенных вертикально, с целью обеспечения необходимого уровня жидкости над роговицей, не более 2 см, для исключения недостатка кислорода в объеме культуральной среды. Культивирование выполняли при стандартных условиях: t+37 °С, 5 % CO₂, в течение 48 часов без смены культуральной среды. Образцы выводились через 24 часа и 48 часов.

4.4 Результаты

4.4.1 Первый этап

Плотность эндотелиальных клеток до выкраивания оценивали с использованием кератоанализатора KonanEKA 98 после выкраивания на основе полученных изображений «LiveandDead» с использованием программного обеспечения CellProfile. До выкраивания ПЭК составляла 2590±73 кл/мм², после выкраивания – 2261±200 кл/мм², что было статистически достоверно (p = 0.034), таким образом потеря клеток составила 13,2±0,5 %. Следует отметить, что в ходе препаровки трансплантата для ТДМ потеря эндотелиальных клеток составляет 11 %. Вместе с тем необходимо учитывать то обстоятельство, что оценка ПЭК до и после подготовки трансплантата осуществлялась различными способами, что возможно внесло свой вклад в полученные результаты.

При анализе жизнеспособности было выявлено, что количество живых клеток составило 89,5±7,3 %, мертвых – 10,5±3,2 %, в группе контроля 86±6,6 % и 14±7,4 %, соответственно. Полученные результаты позволили сделать заключение об отсутствии статистической разницы между группами. При этом необходимо отметить наличие выраженной кольцевидной зоны повреждения клеток, наблюдаемой в группе роговиц с ПДЭК (рис. 12, красная стрелка). Наличие данного повреждения обусловлено непосредственным воздействием на эндотелий роговицы хирургическим инструментом в ходе препарирования трансплантата методом ПДЭК. Использование сканирующей электронной микроскопии позволило выявить эндотелиальные клетки с повреждением клеточной мембраны – мертвые клетки (рис. 12, Б). Методом мануального подсчета было определено, что ПЭК изучаемых образцов составляет 2461±120 кл/мм², количество клеток, в которых имелось повреждение клеточной мембраны, составило 9±2,4 %, что было сопоставимо с результатами анализа жизнеспособности клеток методом «LiveandDead» (p = 0,0561). Вместе с тем имеющаяся разница в ПЭК обусловлена различиями в методах подсчета клеток и обуславливает необходимость дальнейших исследований.

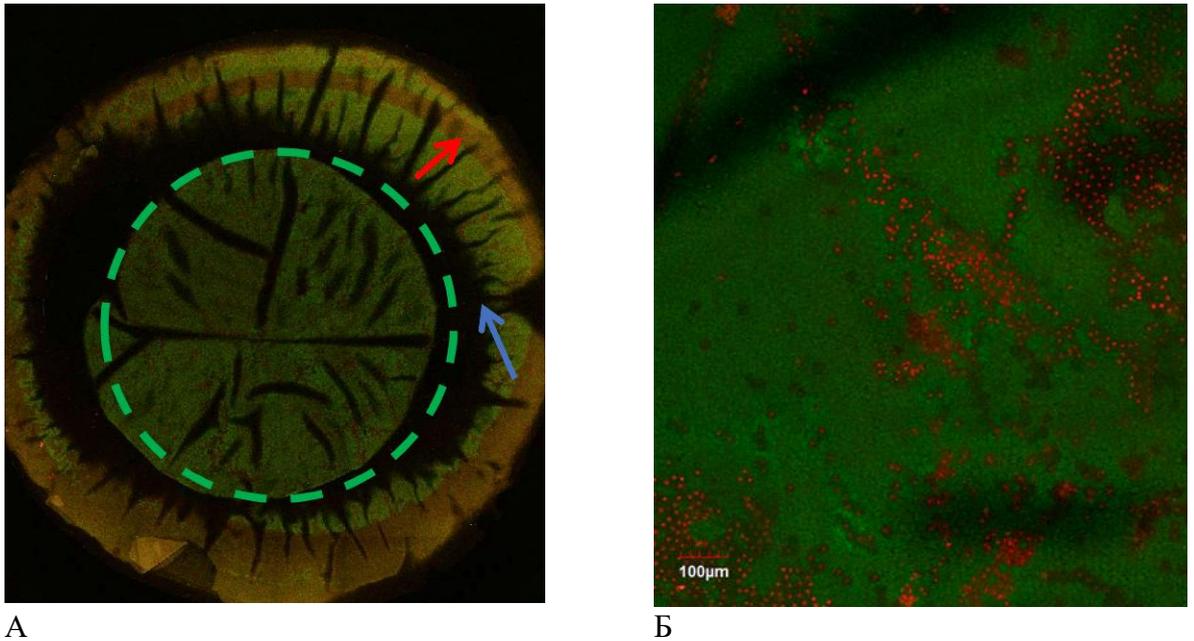
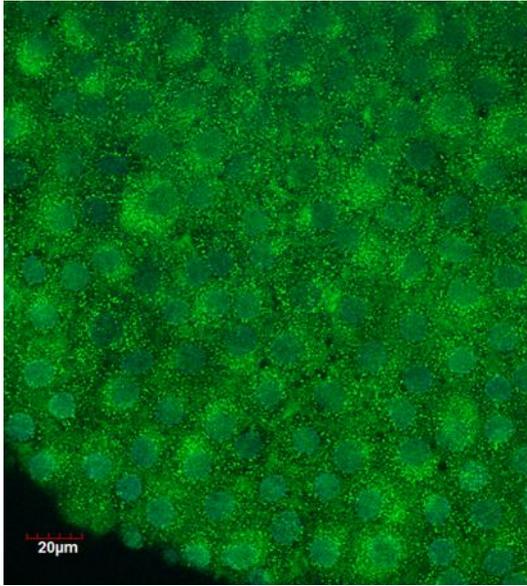


Рисунок 12 – Окрашивание трансплантата ПДЭК методом «LiveandDead»

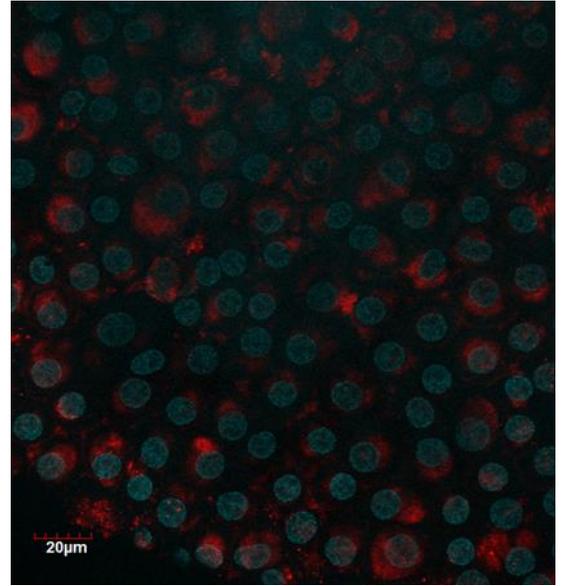
Примечание: А – увеличение 20×. Полученный трансплантат $d = 5,5-6$ мм обозначен пунктирной линией, синей стрелкой обозначена складка десцеметовой мембраны, формируемая в ходе операции; Б – увеличение 100×. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

4.4.2 Второй этап. Для анализа ультраструктуры функциональной активности эндотелиальных клеток оценивали экспрессию Na/K-АТФазы и белка плотных межклеточных контактов ZO-1. Натрий-калиевая аденозинтрифосфатаза (Na⁺/K⁺ -АТФаза) характеризует насосную (помпальную) функцию клеток заднего эпителия, которая является ключевой в поддержании гомеостаза роговицы; обеспечивает сохранность эпителиальной природы исследуемых клеток; является маркером плотных межклеточных контактов ZO-1.

При проведении иммуногистохимического исследования было выявлено значительное повреждение белков плотных контактов ZO-1. В норме при проведении иммуногистохимического исследования отмечается характерная ячеистая «сотовидная» экспрессия ZO-1 (рис. 13), однако при исследовании трансплантата ПДЭК была выявлена «пылевидная» флюоресценция, что возможно было обусловлено повреждением молекулы данного белка (рис. 13, А).



А

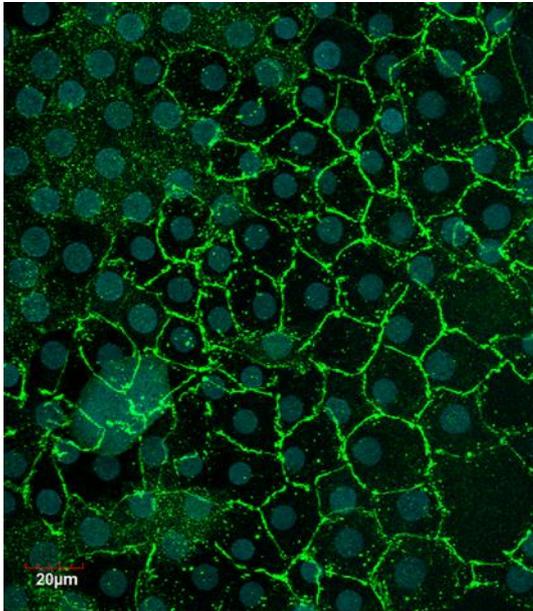


Б

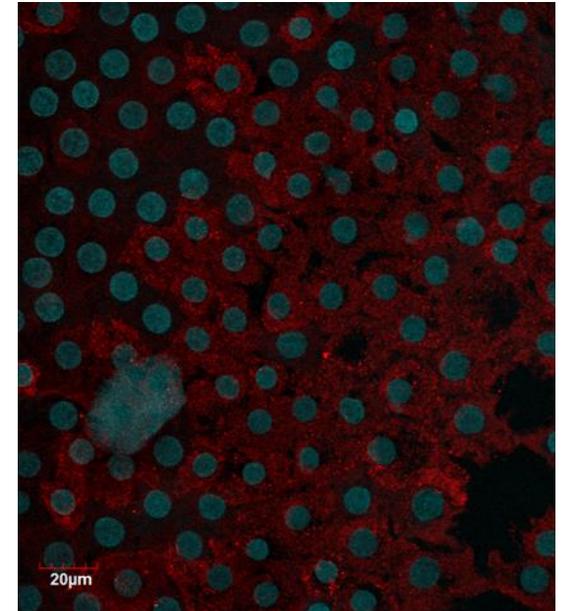
Примечание – А – экспрессия ZO-1 (AlexaFluor 488), Б – экспрессия Na⁺/K⁺ -АТФазы (AlexaFluor 594)

Рисунок 13 – Иммуногистохимический анализ клеток эндотелия роговицы трансплантата ПДЭК, увеличение 600×

Также отмечалось значительное снижение функциональной активности Na/K-АТФазы. Интенсивность экспрессии данного белка была снижена в 2,5 раза в сравнении с контролем и составила $0,0320 \pm 0,0156$ условных единиц и $0,0895 \pm 0,01$ условных единиц, соответственно (рис. 14, Б).



А



Б

Примечание – А - Экспрессия ZO-1 (AlexaFluor 488), Б - Экспрессия Na⁺/K⁺ -АТФазы (AlexaFluor 594).

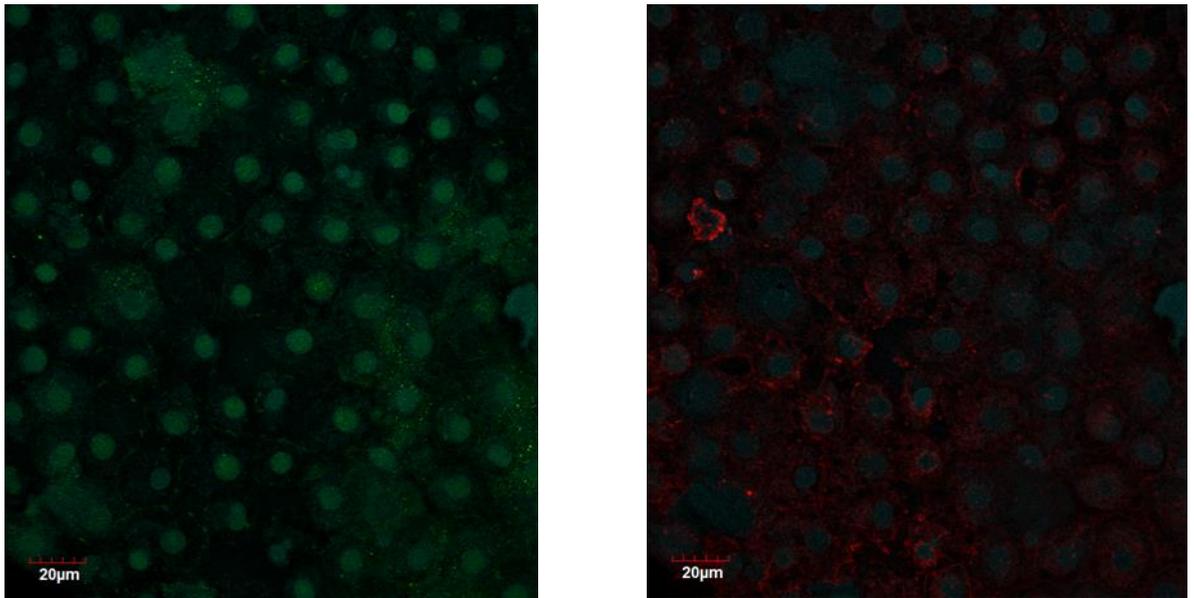
Рисунок 14 – Иммуногистохимический анализ клеток эндотелия роговицы в контроле, увеличение 600×

Наблюдаемые изменения, возможно, могли быть обусловлены как механическим воздействием воздушной волны на десцеметовую мембрану со слоем эндотелиальных клеток, и

вызванным ей некоторым «растяжением» десцеметовой мембраны, так и непосредственным воздействием самой воздушной среды на эндотелий.

4.4.3 Третий этап

Проведенное органотипическое культивирование выявило, что через 24 часа в изучаемых трансплантатах ПДЭК наблюдалось восстановление функциональной активности белка Na/K-АТФазы, интенсивность экспрессии повысилась до 0.0685 ± 0.012 условных единиц. Также отмечалось восстановление белка плотных межклеточных контактов ZO-1: имела место как «пылевидная» экспрессия, так и характерная «сотовидная» флюоресценция. Количество клеток с восстановленной картиной флюоресценции данного белка наблюдалось в 12 % клеток (рис.15).



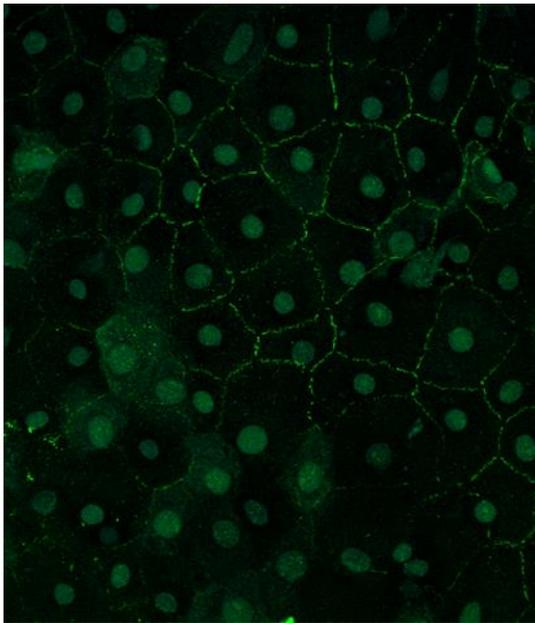
А

Б

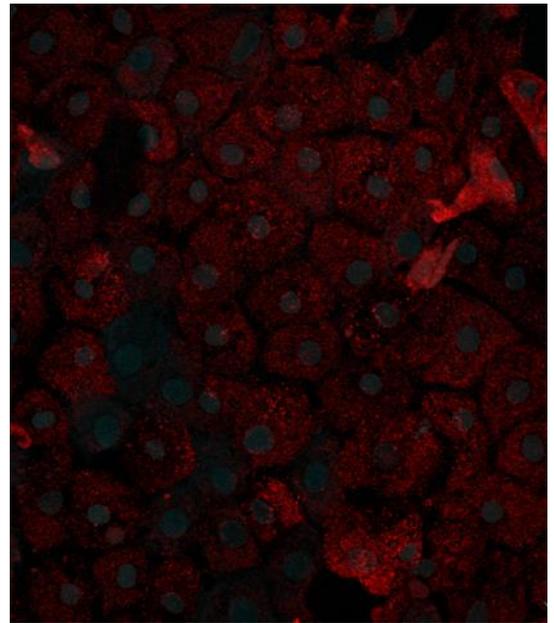
Примечание – А – экспрессия ZO-1 (AlexaFluor 488), Б – экспрессия Na⁺/K⁺ -АТФазы (AlexaFluor 594)

Рисунок 15 – Иммуногистохимический анализ клеток эндотелия роговицы трансплантата ПДЭК через 24 часа после препарирования, увеличение 600×

Через 48 часов культивирования имело место полное восстановление функциональной активности Na/K-АТФазы, интенсивность свечения составила $0,0987 \pm 0,023$ условных единиц и была сопоставима с данными контрольной группы. Также отмечалось полное восстановление белка плотных межклеточных контактов ZO-1 в 96 % клеток (рис.16).



А



Б

Примечание – А – экспрессия ZO-1 (AlexaFluor 488), Б – экспрессия Na⁺/K⁺ -АТФазы (AlexaFluor 594)

Рисунок 16 – Иммуногистохимический анализ клеток эндотелия роговицы трансплантата PDEK через 48 часов после препарирования, увеличение 600×

II. Клиническое исследование основывается на анализе клинико-функциональных исследований и хирургического лечения 84 пациентов с буллезной кератопатией (БК). Большинство пациентов, которые вошли в исследование, обратились в клинику с жалобами на снижение остроты зрения, периодическую боль, слезотечение, светобоязнь.

В зависимости от вида хирургического вмешательства пациенты были разделены на 3 группы.

Основная группа – пациенты с БК, которым выполнена оптимизированная ПДЭК.

Контрольная группа I – пациенты с БК, которым выполнена ТДМ.

Контрольная группа II – пациенты с БК, которым выполнена ФЛ-ЗПК.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1 Результаты экспериментальных исследований

4.1.1 Сравнительный анализ различных техник выкраивания трансплантата для ПДЭК

В контрольной группе большой пузырь первого типа удалось получить только в 5/10 (50 %) случаев. Разрыв большого пузыря произошел в четырех случаях, а в одном – образовался пузырь смешанного типа. Даже при работе опытного хирурга самым большим опасением остается именно возможный разрыв пузыря, так как если он лопается, то такой трансплантат уже непригоден к использованию.

В оптимизированной группе №1 большой пузырь первого типа получился в 9/10 (90 %) случаев, а в оптимизированной группе №2 – в 10/10 (100 %) случаев, что доказывает эффективность предложенной техники выкраивания трансплантата для ПДЭК. Лучший результат в оптимизированной группе №2 связан с тем, что была использована разработанная ИПК, которая симулирует переднюю камеру глаза, благодаря этому сформировавшийся пузырь внутри ИПК не рвется, одновременно происходит блокировка фенестров на периферии слоя Дуа и создается дополнительная фиксация для иглы во время введения воздуха.

При введении воздуха шприцем в стандартной технике ПДЭК весь объем воздуха устремляется в пузырь, внутри которого резко возрастает давление, и в случае его повышения выше критического уровня разрыв стенки пузыря является неизбежным.

Размер пузыря варьировал от 7,25 до 8 мм. Разница в успешном формировании большого пузыря первого типа между первой группой и двумя группами с использованием оптимизированной техники была очевидна. Во всех случаях образования большого пузыря первого типа трансплантаты были успешно консервированы по предложенной нами методике и использованы в клинической практике.

4.1.2 Результаты оценки плотности, жизнеспособности и структуры эндотелиальных клеток роговицы в ходе заготовки и консервирования трансплантата ПДЭК по оптимизированной технологии.

1. Потеря эндотелиальных клеток в ходе выполнения модифицированной методики ПДЭК составила 13 %, что является сопоставимым с потерей эндотелиальных клеток при выполнении ТДМ. Также необходимо принять во внимание тот факт, что подсчет плотности эндотелиальных клеток роговицы проводился с применением различных методик, что могло внести свой вклад в полученные данные.

2. Снижение функциональной активности Na^+/K^+ -АТФазы и белка плотных межклеточных контактов ZO-1 вероятно вызвано непосредственным стрессовым воздействием методики ПДЭК. Однако вызванные изменения носят временный характер, полное восстановление указанных белков происходит спустя 48 часов.

3. Предварительная консервация трансплантата ПДЭК до 48 часов приводит к полному восстановлению функциональной активности эндотелиальных клеток и может способствовать получению быстрого клинического эффекта.

4.2 Результаты клинических исследований

Показатели МКОЗ в послеоперационном периоде увеличились во всех исследуемых группах по сравнению с дооперационными значениями ($p < 0,05$) (табл.2). При проведении сравнительного анализа средних значений МКОЗ в сроки наблюдения 7 дней и 1, 3, 6 и 12 мес. лучшие показатели МКОЗ отмечались в основной и контрольной группе I, а худшие показатели МКОЗ во все сроки наблюдения были отмечены в контрольной группе II.

Таблица 2 – Результаты сравнительной оценки величины максимально скорректированной остроты зрения вдаль в исследуемых группах пациентов в течение 12 месяцев после операции ($M \pm m$, $n=84$)

Группы пациентов	Срок наблюдения/МКОЗ				
	1 нед.	1 мес.	3 мес.	6 мес.	12 мес.
Основная группа (n=25)	0,4±0,15	0,6±0,03	0,6±1,2	0,8±0,02	0,9±0,01
Контрольная группа I (n=27)	0,3 ±0,21	0,5±0,08	0,6±0,06	0,7±1,2	0,9±0,1
Контрольная группа II (n=32)	0,1±0,03	0,2±0,07	0,3±0,14	0,4±1,4	0,6±0,05

При проведении сравнительного анализа других показателей в сроки 12 мес. после операции не были выявлены статистически значимые различия между тремя группами ($p > 0,05$) (табл.3).

Таблица 3 - Значения других показателей в сроки 12 мес. после операции в группах исследования ($M \pm m$, $n=84$)

Исследуемые параметры	Основная группа ($n=25$)	Контрольная группа I ($n=27$)	Контрольная группа II ($n=32$)	p
ВГД мм.рт.ст	17,2±2,5	16,8±2,4	16,5±1,7	>0,05
К, дптр	43,5±1,5	43,7±2,0	43,2±1,3	>0,05
Астигматизм	-1,2±0,8	-1,25±0,5	-1,50±0,75	>0,05
ПЗО	23,2±1,9	23,6±1,4	24±0,5	>0,05

Стоит отметить, что количество осложнений в основной группе было существенно меньше, чем в контрольных группах I и II (табл.4). В основной группе наблюдался всего лишь 1 случай (4 %) дислокации трансплантата, потребовавший повторного введения воздуха, в то время как в контрольной группе I (14,8 %) у 4 пациентов было выявлено данное осложнение, а в контрольной группе II статистика была чуть схожа с контрольной группой I: у 1 (3,1 %) пациента обнаружено данное явление. Первичная эндотелиальная недостаточность, требующая проведения рекератопластики, имела место у 1 (3,1 %) пациента контрольной группы II. Причиной послужила необходимость дополнительных манипуляций по отделению трансплантата, сформированного ФЛ, от подлежащей стромы, из-за необходимости разделения оставшихся тканевых мостиков. Это повлекло за собой механическую травму эндотелиальных клеток трансплантата. Болезнь трансплантата была зарегистрирована в одном случае (3,1%) у пациента контрольной группы II. Данное состояние купировалось усиленным режимом кортикостероидной терапии.

Таблица 4 – Особенности течения послеоперационного периода после различных видов операций задней послойной кератопластики

Послеоперационные осложнения	Основная группа ($n=25$)	Контрольная группа I ($n=27$)	Контрольная группа II ($n=32$)
Дислокация трансплантата, требующая повторного введения воздуха	1(4 %)	4(18 %)	1 (3,1 %)
Болезнь трансплантата			2 (6,25 %)
Первичная недостаточность трансплантата			1 (3,1 %)

Были выявлены статистически значимые различия между значениями толщины трансплантата в центральной зоне в исследуемых группах ($p < 0,05$). Наибольшая толщина трансплантата в центральной зоне в послеоперационном периоде наблюдалась у пациентов контрольной группы II, в то время как наименьшая – у пациентов контрольной группы I. Толщина трансплантата в основной группе была чуть больше, чем в контрольной группе I, и значительно меньше, чем в контрольной группе II (табл. 5).

Таблица 5 – Результаты сравнительной оценки толщины трансплантата в центральной зоне по данным ОКТ у пациентов с БК, мкм ($M \pm m$, $n=84$)

	2 недели	1 мес.	3 мес.	6 мес.	12 мес.
Основная группа	30±5	28±4	27±4	25±3	25±2
Контрольная группа I	26±6	25±4	23±3	20±3	15±5
Контрольная группа II	98±19	83±19	80±15	74±15	72±16
P	$p < 0,05$				

Динамика ЦТР по данным ОКТ в трех группах исследования отражена в таблице 6. На сроках 2 нед., 1, 3, 6, 12 месяцев после операции отмечали уменьшение ЦТР во всех группах по сравнению с дооперационными значениями ($p < 0,05$). На сроке 12 мес. после операции наименьшая ЦТР отмечалась в контрольной группе I, в то время как наибольшая ЦТР – в контрольной группе II. ЦТР в основной группе была чуть больше, чем в контрольной группе I (табл. 6).

Таблица 6 – Результаты сравнительной оценки ЦТР, включая толщину трансплантата, по данным ОКТ у пациентов с БК, мкм ($M \pm m$, $n=84$)

	До операции	2 недели	1 мес.	3 мес.	6 мес.	12 мес.
Основная группа	701±15	657±20	597±36	542±53	537±32	512±28
Контрольная группа I	705±27	660±30	602±24	549±37	535±16	507±18
Контрольная группа II	702±47	674±19	630±15	590±20	575±22	567±16
P		$p < 0,05$				

В послеоперационном периоде у пациентов регистрировали постепенное снижение ПЭК во всех группах исследования (табл. 7). При проведении сравнительного анализа на сроках наблюдения 3, 6 и 12 месяцев были выявлены статистически значимые различия между тремя группами. Процент потери ПЭК после операции был меньше всего в контрольной группе I, больше всего – в контрольной группе II из-за воздействий фемтосекундного лазера во время выкраивания трансплантата. Процент потери ПЭК в основной группе и в контрольной группе I были практически сопоставимы относительно друг друга.

Таблица 7 – Сравнительный анализ снижения плотности эндотелиальных клеток в послеоперационном периоде

	ПЭК донорской роговицы	3 мес.	6 мес.	12 мес.
Основная группа (n = 25)	2747,6±255	2060±150	1977±127	1840±98
	% потери ПЭК	25±11 %	28±12 %	33±11 %
Контрольная группа I (n = 27)	2680±164	1956±446	1944±320	1870±504
	% потери ПЭК	27±7 %	29±5 %	31±13 %
Контрольная группа II (n = 32)	2705±65	1620±100	1428±562,9	961±105
	% потери ПЭК	41%±8	48%±10	65±6,8 %

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выводы

1. Презндотелиальная кератопластика с десцеметорексисом является новой и актуальной техникой задней послойной кератопластики ввиду ряда преимуществ: возможности использования материала от молодых доноров и легкого манипулирования трансплантатом в передней камере, высоких функциональных результатов, сопоставимых с ТДМ. Толщина получаемого трансплантата (25-30 мкм) является «золотой серединой» между ЗАПК (100-120 мкм) и ТДМ (10-15 мкм).
2. Экспериментальное изучение влияния различных способов выкраивания ПДЭК трансплантата на формирование большого пузыря первого типа показало высокую эффективность оптимизированного способа № 1 и № 2 (90 % и 100 % успеха, соответственно) по сравнению с классическим методом выкраивания (50 % успеха).
3. Преимуществами оптимизированной технологии ПДЭК являются: достижение максимально возможной остроты зрения в послеоперационном периоде; получение трансплантата большого размера; простота техники операции и удобство манипуляций.
4. В результате ЗПК с применением различных способов выкраивания трансплантата (ПДЭК, ТДМ, ФЛ-ЗПК) у оперированных пациентов в послеоперационном периоде констатировали положительную динамику клинико-функциональных показателей. Лучшие показатели НКОЗ и МКОЗ во все сроки наблюдения выявлены в основной (оптимизированная ПДЭК) и контрольной группе I (ТДМ). К 12 мес. наблюдения средняя МКОЗ в основной группе (ПДЭК) и контрольной группе I (ТДМ) составляла 0,9 и выше. В то же время в контрольной группе II (ФЛ-ЗПК) только средняя МКОЗ составляла приблизительно 0,6.
5. Сравнительный анализ послеоперационных осложнений операций ЗПК с применением различных способов выкраивания трансплантата (ПДЭК, ТДМ, ФЛ-ЗПК) показал, что наименьшее количество осложнений наблюдалось в основной группе (ПДЭК) – в 1 из 25 случаев (4 %) потребовалось повторное введение воздуха.
6. Оценка моментальной потери плотности эндотелиальных клеток методом витального окрашивания показывает, что потеря эндотелиальных клеток в ходе выполнения оптимизированной методики ПДЭК составила 13 %, что является сопоставимым с потерей эндотелиальных клеток при выполнении ТДМ.
7. Предварительная консервация трансплантата ПДЭК по оригинальной методике до 48 часов приводит к полному восстановлению функциональной активности эндотелиальных клеток, что способствует получению быстрого клинического эффекта и может быть легко внедрена в работу глазного банка и удобна для использования в клинической практике.
8. Динамическое наблюдение плотности эндотелиальных клеток в отдаленном периоде показало постепенное снижение ПЭК в течение всего срока наблюдения пациентов. Потеря ЭК в отдаленные сроки наблюдения в основной группе (оптимизированная ПДЭК) составила 33 ± 11 %, в то время как в контрольных группах I (ТДМ) и II (ФЛ-ЗПК) – 31 ± 13 % и $65 \pm 6,8$ %, соответственно. Большая потеря ЭК в группах ФЛ сопряжена с большей травмой клеток эндотелия во время подготовки донорского трансплантата.

Практические рекомендации

- 1) Для увеличения процента успешности выкраивания трансплантата следует использовать оптимизированную технику, которая предполагает применение кольцевого фиксатора, основания, иглы 30G с 5 мл шприцем с пружинящим поршнем и консервирующего раствора.
- 2) В ходе выкраивания трансплантата для ПДЭК с целью уменьшения травматизации эндотелиальных клеток, помимо использования предложенных инструментов, стоит медленно и нежно раздувать большой пузырь таким образом, чтобы его первоначальный размер не был слишком большим. Эндотелий страдает только на моменте первоначального расслаивания, а когда вводят дополнительный воздух или консервационную среду, страдает меньше.

- 3) Для лучшего отслаивания комплекса: Дуа-ДМ-Э более подходит молодая донорская роговица.
- 4) Для лучшей адгезии трансплантата к роговице реципиента необходимо использовать 20 % газо-воздушную смесь SF6.
- 5) Пациенту желательно еще 30-40 мин. находиться в операционной в лежачем положении для лучшей адаптации трансплантата. В первые сутки после операции рекомендуется лежать с высоким положением головы, чтобы избежать развития зрачкового блока.
- 6) Для определения правильной стороны трансплантата в передней камере, необходим осмотр края трансплантата при большом увеличении. Если резы от браншей ножниц по краю трансплантата не конгруэнтны резам на корнеосклеральном диске, следовательно, эндотелиальная сторона в правильном положении.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, включенных в международные базы цитирования WoS и Scopus, и в изданиях, рекомендованных Перечнями РУДН/ВАК

1. Калинин Ю.Ю., Динь Т., Золотаревский А.В., Калининкова С.Ю., Нгуен С.Х. Преэндотелиальная кератопластика с десцеметорексисом (PDEK), осложненная дислокацией ИОЛ в стекловидное тело. Клинический случай. Офтальмология. 2022;19(3):672.
2. Калинин Ю.Ю., Т.Х.А. Динь, Золотаревский А.В., Калининкова С.Ю. Новый хирургический подход к предесцеметовой эндотелиальной кератопластике (PDEK). Вестник офтальмологии. 2023;139(1):55-66.

Публикации в изданиях, рекомендованных Перечнями РУДН/ВАК

3. Динь Т.Х.А., Калинин Ю.Ю., Тихонович М.В., Калининкова С.Ю., Нгуен С.Х., Ткаченко И.С. РАЗВИТИЕ ТЕХНОЛОГИЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ КЕРАТОПЛАСТИКИ (ОБЗОР) // Саратовский научно-медицинский журнал. 2022.

Патенты

4. Калинин Ю.Ю., Калининкова С.Ю., Золотаревский А.В., Динь Т.Х.А., Сугробов В.А. Основание с кольцевым фиксатором для получения трансплантата для преэндотелиальной кератопластики с десцеметорексисом. Патент РФ на изобретение № 2782785, публикация патента 02.11.2022 г.
5. Калинин Ю.Ю., Калининкова С.Ю., Золотаревский А.В., Динь Т.Х.А. Способ выкраивания трансплантата для преэндотелиальной кератопластики с десцеметорексисом. Патент РФ на изобретение № 2787149, публикация патента 29.12.2022 г.
6. Калинин Ю.Ю., Калининкова С.Ю., Золотаревский А.В., Динь Т.Х.А. Способ проведения преэндотелиальной кератопластики с остаточной стромой при помощи фемтосекундного лазера. Патент РФ на изобретение № 2787148, публикация патента 29.12.2022 г.
7. Калинин Ю.Ю., Калининкова С.Ю., Золотаревский А.В., Динь Т.Х.А. Способ выкраивания и хранения донорского роговичного трансплантата для преэндотелиальной кератопластики. Патент РФ на изобретение № 2022106305, публикация патента 29.12.2022 г.
8. Калинин Ю.Ю., Калининкова С.Ю., Динь Т.Х.А., Сугроб В.А., Золотаревский А.В. Искусственная передняя камера для преэндотелиальной кератопластики с десцеметорексисом. Патент РФ на изобретение № 2791988, публикация патента 15.03.2023 г.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БК буллезная кератопатия
МКОЗ корригированная острота зрения
ОКТ оптическая когерентная томография
ПЭК плотность эндотелиальных клеток
ПДЭК (PDEK – англ.) преэндотелиальная кератопластика с десцеметорексисом или предесцеметовая эндотелиальная кератопластика
ТДМ (DMEK – англ.) трансплантация Десцеметовой мембраны
ФЛ-ЗПК задняя послойная кератопластика с использованием фемтосекундного лазера
ЦТР центральная толщина роговицы
ЭК эндотелиальные клетки
ДМ десцеметовая мембрана.
ФЛ фемтосекундный лазер
ВГД внутриглазное давление
ПЗО передне задняя ось глаза
К кератометрия глаза

РЕЗЮМЕ

Кандидатской диссертации Динь Тхи Хоанг Ань «Клинико-экспериментальное обоснование технологии преэндотелиальной кератопластики с десцеметорексисом в хирургическом лечении буллезной кератопатии»

В данном клиническом исследовании была разработана, экспериментально обоснована и внедрена в клиническую практику оптимизированная технология преэндотелиальной кератопластики с десцеметорексисом (ПДЭК) в хирургическом лечении буллезной кератопатии. Оптимизированная технология проведения ПДЭК позволяет достичь максимально возможной остроты зрения в послеоперационном периоде с минимальным процентом осложнений, использовать донорский материал любого возраста, легко манипулировать трансплантатом в передней камере. Предложены инструменты для эффективного и безопасного выкраивания трансплантата большего размера для ПДЭК. Предложенная техника консервации и хранения трансплантата может быть легко внедрена в работу глазного банка и позволяет восстанавливать состояние эндотелиального слоя после выкраивания трансплантата методом пневмодиссекции.

ABSTRACT

PhD thesis of Dinh Thi Hoang Anh "Clinical and experimental justification of the technology of Pre-Descemet's Endothelial Keratoplasty in the surgical treatment of bullous keratopathy"

In this clinical study, an optimized technology for Pre-Descemet's Endothelial Keratoplasty was developed, experimentally justified and introduced into the clinical practice for the surgical treatment of bullous keratopathy. The optimized technology of PDEK allows to achieve the highest possible best corrected visual acuity in the post-operative period with a minimum percentage of complications, obtain donor material of any age, easily manipulate the corneal graft in the anterior chamber. Several instruments have been developed to efficiently and safely prepare a larger size PDEK graft. The proposed technique for PDEK graft preservation and storage can be easily implemented in eye banks and allows to restore the state of endothelial layer of the corneal graft after PDEK graft preparation by pneumo-dissection method.