

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

**ДИНЬ ТХИ ХОАНГ АНЬ**

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

3.1.5 Офтальмология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
**Калинников Юрий Юрьевич**  
доктор медицинских наук, профессор

Москва – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....</b>	<b>4</b>
<b>Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>13</b>
1.1. Анатомия роговицы .....	13
1.2. Буллезная кератопатия .....	21
1.2.1. Вторичная кератопатия .....	21
1.2.2. Первичная кератопатия.....	22
1.3. Хирургические способы лечения буллезной кератопатии.....	26
1.3.1. Сквозная кератопластика (СКП).....	27
1.3.2. Задняя послойная кератопластика.....	29
1.3.2.1 Задняя автоматизированная послойная кератопластика (ЗАПК) .....	32
1.3.2.2 Трансплантация десцеметовой мембраны с эндотелием (ТДМ) .....	36
1.3.2.3 Предесцеметовая эндотелиальная кератопластика, (ПДЭК, преэндотелиальная кератопластика с десцеметорексисом) .....	42
<b>Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.....</b>	<b>45</b>
2.1. Дизайн исследования .....	45
2.2. Материал и методы клинических исследований .....	46
2.3. Методы клинико-функциональных исследований .....	48
2.4. Результаты клинико-функциональных исследований у пациентов с буллезной кератопатией в предоперационном периоде .....	51
2.5. Характеристика донорского материала .....	53
<b>Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....</b>	<b>54</b>
3.1. Материал и методы экспериментального исследования.....	54
3.2 Классический способ выкраивания трансплантата для ПДЭК .....	55
3.3. Оптимизированный способ №1 выкраивания трансплантата для ПДЭК ...	
3.3.1. Разработка инструментов для оптимизированного способа №1 .....	56
3.3.1.1. Шприц с пружинящим поршнем и иглой 30G.....	57
3.3.1.2 Основание для выкраивания трансплантата для ПДЭК.....	58
3.3.1.3 Кольцевой фиксатор для выкраивания трансплантата для ПДЭК.....	60

3.4. Оптимизированный способ №2 для заготовки трансплантата для ПДЭК .....	63
3.4.1. Разработка инструментов для оптимизированного способа №1 .....	64
3.4.1.1 Искусственная передняя камера (ИПК) для ПДЭК .....	64
3.4.2. Оптимизированная техника № 2 выкраивания трансплантата для ПДЭК.....	66
3.5. Разработка способа выкраивания и хранения трансплантата для ПДЭК	68
3.6. Сравнительный анализа различных техник выкраивания трансплантата для ПДЭК.....	71
3.7. Гистологическое исследование препаратов донорской роговицы, выкроенных различными технологиями ЗПК с помощью световой микроскопии .....	73
3.8 Оценка плотности, жизнеспособности и структуры эндотелиальных клеток роговиц в ходе заготовки и консервирования трансплантата ПДЭК по оптимизированной технологию .....	76
<b>Глава 4. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ .....</b>	<b>90</b>
4.1. Хирургическая техника предесцементовой эндотелиальной кератопластики (ПДЭК), выполненной по оптимизированной технологии..	90
4.2 Хирургическая техника операции трансплантации десцементовой мембраны с эндотелием (ТДМ).....	95
4.3. Хирургическая техника задней послойной кератопластики с выкраиванием трансплантата с помощью фемтосекундного лазера (ФЛ-ЗПК) .....	96
4.4. Сравнительный анализ клинико-функциональных показателей пациентов в послеоперационном периоде .....	97
4.5. Послеоперационные осложнения и течение послеоперационного периода	101
4.6. Сравнительный анализ результатов оптической когерентной томографии роговиц .....	103
4.7. Сравнительный анализ снижения плотности эндотелиальных клеток в послеоперационном периоде .....	105
<b>ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....</b>	<b>106</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>113</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>	<b>115</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>116</b>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

<b>БК</b>	Буллезная кератопатия
<b>ВГД</b>	внутриглазное давление
<b>ВМД</b>	возрастная макулярная дистрофия
<b>ДМ</b>	Десцеметова мембрана
<b>ЗАПК</b>	задняя автоматизированная послойная кератопластика (DSAEK – англ.)
<b>ЗЛК</b>	задняя ламеллярная кератопластика (PLK – англ.)
<b>ЗПК</b>	задняя послойная кератопластика (DSEK – англ.)
<b>ИОЛ</b>	интраокулярная линза
<b>ИПК</b>	искусственная передняя камера
<b>МКОЗ</b>	корректированная острота зрения
<b>НКОЗ</b>	некорректированная острота зрения
<b>ОКТ</b>	оптическая когерентная томография
<b>ПДЭК</b>	преэндотелиальная кератопластика с десцеметорексисом или предесцеметовая эндотелиальная кератопластика. (PDEK – англ.)
<b>ПЭК</b>	плотность эндотелиальных клеток
<b>СКП</b>	сквозная кератопластика
<b>ТДМ</b>	трансплантация Десцеметовой мембраны (DMEK – англ.)
<b>ФЛ</b>	фемтосекундный лазер
<b>ФЛ-ЗПК</b>	задняя послойная кератопластика с использованием фемтосекундного лазера
<b>ЦТР</b>	центральная толщина роговицы
<b>ЭД</b>	эндотелиальная дистрофия
<b>ЭК</b>	эндотелиальные клетки
<b>ЗПДР</b>	задняя полиморфная дистрофия роговицы

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность и степень разработанности темы исследования**

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. [1].

Эндотелиальные дистрофии могут иметь врожденную и приобретенную этиологию. Самыми частыми являются эндотелиальная дистрофия роговицы Фукса, и псевдофакичная буллезная кератопатия [2, 3]. При данных заболеваниях значительно страдает внутренний слой роговицы – эндотелий, представляющий собой монослой высококодифференцированных 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 [4].

Общепринятым стандартом в лечении задних дистрофий роговицы является эндотелиальная кератопластика. На сегодняшний день наиболее часто выполняемыми операциями являются автоматизированная задняя послойная кератопластика (ЗАПК) и трансплантация десцеметовой мембраны (ТДМ) [1]. В офтальмологическом мире ведется широкая дискуссия вокруг вопроса о том, какая

процедура лучше: ЗАПК или ТДМ. F. Guetta и соавторы в 2011 г. опубликовали исследование, в котором описывались послеоперационные результаты ТДМ и ЗАПК, выполненных на парных глазах одних и тех же пациентов [5]. По данным сравнительного анализа 85% пациентов ощутили более значительное улучшение качества зрения на глазу, на котором была выполнена ТДМ [5]. Считается, это связано с тем, что слои стромы, вызывающие оптические аномалии, не трансплантируются в ходе процедуры ТДМ [6].

ЗАПК является более простой и устоявшейся хирургической процедурой, в то время как ТДМ – относительно новая техника. Общеизвестно, что ТДМ является более сложной процедурой с технической точки зрения [7,8]. 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 [9]. Более того, послеоперационная отслойка трансплантата является более частым осложнением, связанным с ТДМ (от 33 до 81 %), чем с ЗАПК (от 7 до 20 %) [5,10].

В 2014 г. был открыт новый, шестой слой роговицы – предесцеметовый слой (слой Дуа) [11]. В связи с его открытием А. Agarwal предложил новую технологию эндотелиальной кератопластики – ПДЭК [12]. ПДЭК не требует подбора донора определенного возраста [13], техника операции проста, процент осложнений минимален, а функциональные результаты сопоставимы с ТДМ [14]. Различные авторы стали проявлять интерес к этому слою роговицы и возможности его использования в клинической практике [15–17].

### **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 [18].

Учитывая вышеизложенное, совершенствование технологии преэндотелиальной 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 предесцементовой эндотелиальной кератопластики.
3. Провести сравнительный анализ различных техник выкраивания трансплантата для ПДЭК.
4. Разработать способ выкраивания и хранения трансплантата для предесцементовой 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 предесцементовой эндотелиальной кератопластики у пациентов с буллезной кератопатией.
7. Провести сравнительный анализ клинико-функциональных результатов хирургического лечения пациентов с буллезной кератопатией по оптимизированной технологии предесцементовой эндотелиальной кератопластики (ПДЭК), трансплантации десцементовой 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 предесцементовой эндотелиальной



- кератопластики, которая предотвращает интраоперационные риски потери донорского материала и позволяет получать трансплантат большого размера.
2. Предложена оригинальная техника консервации трансплантата для предесцементовой 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 диссертации**

Диссертационная работа изложена на 137 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, глав материалы и методы, результаты экспериментальных и клинических исследований, заключение, выводы, практических рекомендаций и списка использованной литературы. Работа проиллюстрирована 22 рисунками и содержит 23 таблиц. Список литературы включает 181 источник информации, из них 29 отечественных и 152 зарубежных.

## **Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1 Анатомия роговицы**

Роговица представляет собой прозрачную аваскулярную ткань, которая выступает в качестве основного инфекционного и структурного барьера глаза. Вместе с покрывающей слезной пленкой она также обеспечивает необходимое преломление солнечных лучей, являясь главной преломляющей средой в оптической системе глаза. Её прозрачность является результатом многих факторов, включая структурную анатомию и физиологию всех клеточных слоев, входящих в состав роговицы. Роговица состоит из шести слоев: трех клеточных (эпителий, строма и эндотелий) и трех промежуточных бесклеточных слоев (Боуменова оболочка, слой Дуа и Десцеметовой оболочки).

### **Эпителий роговицы**

Неороговивающий эпителий роговицы состоит из 5-6 слоев, и толщина его колеблется в норме от 40 мкм до 50 мкм. Эпителиальные клетки роговицы имеют среднюю продолжительность жизни от 7 до 10 дней и регулярно подвергаются упорядоченной инволюции, апоптозу и десквамации. Наиболее поверхностные эпителиальные клетки роговицы образуют в среднем от 2-х до 3-х слоев плоских

многоугольных клеток. Эти клетки имеют обширные апикальные микроворсинки, которые, в свою очередь, покрыты тонким, плотно прилегающим, заряженным слоем гликокаликса [19]. Благодаря такой структуре увеличивается площадь контактной поверхности и сила сцепления с муциновым слоем слезной пленки. Между покровными и базальными клетками имеется 2-3 слоя полигональных клеток, скрепляющих всю структуру эпителия. Самый глубокий клеточный слой эпителия роговицы – базальный слой, который состоит из одного клеточного слоя призматических клеток высотой около 20 мкм. Помимо стволовых клеток и переходных амплифицирующих клеток, базальные клетки являются единственными эпителиальными клетками роговицы, способными к митозу [20]. Они являются источником всех вышележащих клеток эпителия роговицы. Данные клетки крепятся к подлежащей базальной мембране с помощью гемидесмосом, что препятствует отделению эпителия от нижележащих слоев роговицы. Эпителиальные стволовые клетки, которые служат основным источником нового эпителия роговицы, локализованы в зоне лимба. По мере того, как клетки мигрируют в центральную роговицу, они дифференцируются в переходные амплифицируемые клетки (клетки, способные к множественному, но ограниченному клеточному делению) и базальные клетки [21]. Толщина эпителиальной базальной мембраны примерно 0,05 мкм, она содержит коллаген IV типа и ламинин, секретиремый базальными клетками эпителия. При её повреждении процесс заживления может занять до 6 недель. В течение этого времени связь между базальной мембраной и вышележащим эпителием крайне слабая, что приводит к образованию эрозий.

### **Боуменова оболочка**

Боуменова оболочка (или Боуменова мембрана) расположена непосредственно перед стромой и является не настоящей мембраной, а скорее,

бесклеточным конденсатом самой передней части стромы. Этот гладкий слой имеет толщину около 15 мкм и помогает роговице сохранять свою форму. Когда данный слой повреждается, то он не регенерирует, и на месте повреждения может образоваться рубец [19].

### **Строма роговицы**

Строма обеспечивает основную часть структурного каркаса роговицы и составляет примерно от 80 до 85 % ее толщины. На периферии строма толще, чем в центре роговицы. Строма отличается от других коллагеновых структур своей прозрачностью, которая является результатом точной организации стромальных волокон и внеклеточного матрикса [22]. Коллагеновые волокна собраны в параллельные пучки, называемые фибриллами, и эти фибриллы упакованы в параллельно упорядоченные слои или пластины. Строма человеческого глаза содержит от 200 до 250 пластин, каждый слой которых расположен под прямым углом к волокнам в соседних пластинах. Значительная часть коллагеновых фибрилл роговицы меняет свою ориентацию возле лимба и сливается с лимбальным коллагеном, который располагается по окружности [23]. Благодаря такой высокой организации сети фибрилл уменьшается рассеивание света, а роговица приобретает прозрачность и механическую прочность. Дополнительной особенностью стромы является то, что ультраструктура внутри организации пластины изменяется в зависимости от глубины ее залегания в строме. Более глубокие слои организованы более строго, чем поверхностные [24], и это различие объясняет бóльшую легкость хирургического рассечения роговицы в более глубоких слоях. Коллагеновые фибриллы состоят из гетеродимеров коллагена I и V типа I, что позволяет достигнуть их уникального и узкого диаметра в 25-30 нм. Фибриллы окружены специализированными протеогликанами, состоящими из кератансульфатных или хондроитинсульфатных/дерматансульфатных боковых

цепей, которые помогают регулировать гидратационные и структурные свойства стромы [25].

Кератоциты являются основными клетками стромы и участвуют в поддержании внеклеточного матрикса. Они способны синтезировать молекулы коллагена и гликозаминогликаны, а также выделять матричные металлопротеазы (ММП), которые имеют решающее значение для поддержания стромального гомеостаза. Большинство из этих кератоцитов находится в передней строме и содержит «кристаллины» роговицы, составляющие от 25 до 30 % растворимого белка в клетках. Вероятно, именно благодаря кристаллинам уменьшается обратное рассеяние света от кератоцитов и поддерживается прозрачность роговицы [26].

### **Предесцеметовый слой стромы (Слой Дуа)**

В 2013 году профессор H.S. Dua с соавт. опубликовали статью, в которой сообщили об обнаружении у человека ранее неизвестного слоя роговицы толщиной около 10-15 микрометров, располагающегося между стромой и десцеметовой оболочкой роговицы [11]. Он назвал этот слой «слоем Дуа». Данный слой состоит из 5-8 тонких пластин плотно упакованных пучков волокон, проходящих в продольном, поперечном и косом направлениях. Диаметр волокон, составляющих слой Дуа, меньше, чем у волокон вышележащей стромы. Пучки волокон в данном слое располагаются более регулярно, плотно и строго параллельно друг другу в отличие от волокон стромы, между которыми есть пространства, обеспечивающие прохождение воздуха при разделении слоев. От предесцеметового слоя к вышележащей строме идут длинные волокна, с помощью которых они крепятся друг к другу. Слой Дуа не содержит кератоцитов. Волокна предесцеметового слоя положительно окрашиваются на антитела к коллагену I, IV и VI типа. P.N. Lewis с соавт. в 2016 году показал, что в состав слоя Дуа входят эластические волокна [27], которые определяются уже на стадии эмбрионального



развития глаза. Эластические волокна роговицы идут от лимба до лимба. Они начинаются от задних слоев лимба и склеры в зоне 40-50 микрон, ограниченной Шлеммовым каналом и трабекулярной сетью, которая сама по себе богата эластичными волокнами [28], и продолжаются в центральной роговице. Здесь они располагаются перед десцеметовой оболочкой, концентрируясь в зоне первых четырех пластин, выше эластические волокна располагаются между пластинами и занимают почти всю толщу стромы, кроме её самых верхних слоев. Еще раз отметим, что наибольшая концентрация эластических волокон, представленных в роговице, располагается в  $\sim 8$  мкм от десцеметовой мембраны [27].

Трабекулярная сеть продолжается в роговицу, располагаясь между десцеметовой мембраной и задней стромой и занимая 250 мкм периферии роговицы [27]. H.S. Dua с соавт. (2014) показал, что волокна преддесцеметового слоя вплетаются в трабекулярную сеть на периферии роговицы [29]. По-видимому, трабекулярная сеть спереди тесно связана с эластичными волокнами роговицы, которые помогают поддерживать тонус, фиксируя трабекулярную сеть к периферической роговице и лимбу [27].

Разные авторы стали проявлять интерес к этому слою роговицы и возможности его использования в клинической практике. Существует мнение, что не существует отдельно выделенного слоя Дуа перед десцеметовой оболочкой, а представленные в нем пластины являются пластинами задней стромы роговицы [15, 30, 31].

### **Десцеметовая оболочка (десцеметовая мембрана)**

Начиная с 8-й недели эмбрионального развития, эндотелиальные клетки непрерывно секретируют десцеметовую мембрану. Передние 3 мкм десцеметовой

мембраны, сформированные ещё до рождения, имеют четкую полосчатую структуру, хорошо определяемую при электронной микроскопии. Слои десцеметовой оболочки, которые формируются после рождения, представляют аморфную текстуру. С возрастом десцеметовая оболочка может достигать 10 мкм в толщину [31]. Десцеметовая мембрана соединяется со стромой роговицы узкой переходной зоной аморфного внеклеточного матрикса, называемого межфазным матриксом [32]. Было обнаружено, что межфазный матрикс содержит различные белки внеклеточного матрикса с адгезивными свойствами, такие как фибронектин, витронектин, амилоид P, остеоонектин/SPARC, фибриллин-1, фибулин-1, фибулин-2, фибулин-3 и кератоэпителин [31]. Этот матрикс относительно легко отделяется от вышележащих слоев роговицы, что может привести к непреднамеренному отрыву десцеметовой мембраны во время операции по удалению катаракты [33]. Мембрана состоит из коллагена IV, VIII, XII и XVIII типов и неколлагеновых компонентов, включая фибронектин, витронектин, ламинин, нидоген, перлекан, а также протеогликаны [34,35]. Предполагается, что помимо обеспечения структурной целостности роговицы, оболочка играет роль в нескольких важных физиологических процессах, включая гидратацию роговицы, дифференцировку и пролиферацию эндотелиальных клеток и поддержание кривизны роговицы. Было показано, что она обладает такими же механическими свойствами, что и капсула хрусталика, и противостоит как боковому, так и осевому напряжению и деформации [37]. Десцеметовая оболочка крепится к вышележащим коллагеновым пластинам за счёт (1) непрерывного аморфного межфазового матрикса, который смешивается как с передней полосатой зоной десцеметовой мембраны, так и с коллагеновыми волокнами слоя Дуа, (2) расположенных случайным образом коллагеновых волокон, идущих от стромы под острым или прямым углом и проникающих в мембрану на глубину до 0,5 мкм (3) протеогликановых филаментов, соединяющих коллагеновые волокна с межфазным матриксом [31].

## Эндотелий

Эндотелиальный слой роговицы поддерживает прозрачность роговицы, обеспечивая ее относительно обезвоженное состояние. Неповрежденный человеческий эндотелий представляет собой монослой шестигранных клеток, который напоминает пчелиные соты.

В эмбриогенезе задний слой роговицы представляет собой монослой из упорядоченно расположенных кубовидных клеток [38]. Со временем эти клетки уплощаются и начинают плотно прилегать друг к другу. Непосредственно над этим слоем находится прерывистый гомогенный бесклеточный слой, который со временем становится десцеметовой мембраной. При рождении эндотелиальный монослой имеет толщину приблизительно 10 мкм и состоит из слоя клеток одинаковой толщины, покрывающих всю заднюю поверхность роговицы и постепенно переходящих в клетки трабекулярной сети [19]. С течением времени клетки продолжают уплощаться, и в зрелом возрасте их толщина становится приблизительно равна 4 мкм. Латеральные стороны эндотелиальных клеток имеют выраженные боковые выпячивания, которые значительно увеличивают площадь межклеточного соприкосновения. Именно на латерально расположенных клеточных мембранах наблюдается высокая концентрация  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазных насосов [38]. Базальная эндотелиальная поверхность содержит многочисленные гемидесмосомы, которые способствуют адгезии клеток к десцеметовой мембране.

Эндотелиальные клетки не обладают митотической активностью *in vivo* [39], поэтому их плотность и топография продолжают изменяться на протяжении всей жизни. Со второй по восьмую декаду жизни плотность клеток снижается с 3000 - 4000 клеток/мм<sup>2</sup> до примерно 2600 клеток/мм<sup>2</sup>, а процентное содержание гексагональных клеток снижается примерно с 75 до 60 %. В нормальной роговице плотность центральных эндотелиальных клеток уменьшается в среднем на 0,6 % в год [40]. Оставшиеся живые клетки «растягиваются» и захватывают пространство

дегенерированных эндотелиальных клеток, при этом клетки увеличиваются в размерах (полимегатизм) и теряют свою гексагональную форму (плеоморфизм).

Как уже упоминалось, строма поддерживается в относительно дегидротированном состоянии (содержание воды примерно равно 78 %) благодаря активности эндотелиальных клеток. Это обезвоживание обеспечивается процессом пассивного движения воды по градиенту концентрации от относительно гипоосмотичной стромы к относительно гиперосмотичной водянистой влаге. Это пассивное движение жидкости не требует затраты энергии, но обеспечивается за счет энергоемкого процесса переноса ионов для генерации осмотического градиента. Двумя наиболее важными системами транспортировки ионов являются  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза и внутриклеточный путь карбоангидразы [41]. Активность этих путей обеспечивает поток ионов, а в месте с ними и воды, в направлении от стромы роговицы к водянистой влаге передней камеры глаза [38]. Если плотность эндотелиальных клеток уменьшается до 500 клеток/ $\text{мм}^2$ , то насосная функция слоя ухудшается, и роговица начинает отекает [39]. Увеличение размера клеток и их плеоморфизм также положительно коррелируют с уменьшением способности эндотелиальных клеток дегидротировать роговицу [19].

### **Кровоснабжение роговицы**

Хотя в норме человеческая роговица является бессосудистой тканью, она зависит от компонентов крови, чтобы оставаться здоровой. Роговица получает питание путем осмоса из краевой сосудистой петливой сети, а также из ветвей лицевой и глазной артерии через водянистую влагу передней камеры и слезную пленку [19].

### **Иннервация роговицы**

Роговица – одна из наиболее обильно иннервируемых и чувствительных тканей организма. Чувствительность роговицы обеспечивается системой длинных

циллиарных нервов, которые идут от глазничной ветви тройничного нерва. Нервы проникают в строму в виде радиально расположенных толстых стволов, постепенно поднимаясь вверх, нервы истончаются и образуют несколько стромальных сплетений, далее они перфорируют Боуменову мембрану, формируя обширное сплетение под базальным эпителиальным слоем [43]. В центральной части роговицы нервных окончаний значительно больше, чем на ее периферии [43]. Роговица также содержит трофические и вегетативные нервные волокна.

## **1.2 Буллезная кератопатия**

Необратимое нарушение функций эндотелиальных клеток приводит к развитию хронического отека роговицы. Вначале развивается стромальный отек, к которому постепенно присоединяется межклеточный отек эпителия роговицы. Эпителиальный отек сопровождается формированием микрокист и затем пузырей — булл. Самопроизвольное вскрытие булл характеризуется появлением болевого синдрома разной степени выраженности — от ощущения инородного тела до нестерпимой боли, а также выраженной светобоязни и слезотечения. Острота зрения у пациентов с буллезной кератопатией уменьшается прямо пропорционально развитию центрального отека роговицы [44].

Причиной развития буллезной кератопатии могут быть первичные наследственные поражения эндотелия роговицы или вторичные, развивающиеся после различных оперативных вмешательств, проникающих ранений глазного яблока и воспалительных процессов роговой оболочки [45].

### **1.2.1 Вторичная кератопатия**

Основной причиной буллезной кератопатии (БК) является потеря эндотелиальных клеток во время проведения офтальмологических операций, особенно часто это наблюдается при хирургии катаракты. Буллезная кератопатия

возникает в среднем у 1-2 % пациентов после факоемульсификации, а это примерно, от двух до четырех миллионов пациентов во всем мире [46].

Другими причинами развития буллезной кератопатии могут быть: опухоли передней камеры, врожденные аномалии, например, микрокорнея, глаукома, герпетический кератит или операции, которые могут привести к потере эндотелиальных клеток, такие как трабекулэктомия, имплантация внутрикамерных линз, радиальная кератотомия [46].

### 1.2.2 Первичная кератопатия

Согласно последней классификации, принятой в 2015 году, к группе первичных генетически детерминированных эндотелиальных дистрофий относятся: эндотелиальная дистрофия роговицы Фукса, эндотелиальная дистрофия, связанная с X-хромосомой, врожденная наследственная эндотелиальная дистрофия и задняя полиморфная дистрофия [47].

#### **А. Дистрофия Фукса или семейная *cornea guttata***

Эндотелиальная дистрофия Фукса наследуется по аутосомно-доминантному типу со пенетрантностью 100 %. Её характеризует асимметричный, двусторонний, медленно прогрессирующий отек роговицы. Первопричиной этого отека является медленно прогрессирующее формирование каплевидных образований (гутт) между эндотелием роговицы и десцеметовой мембраной. Гутты становятся более многочисленными по мере прогрессирования заболевания [48].

Дистрофия Фукса может проявляться в разном возрасте: до 40 лет (ранняя форма) и после 40 лет (поздняя форма). Ранняя манифестация болезни связана с мутациями в гене COL8A2. При этом происходит значительное утолщение десцеметовой мембраны с 10 до 30 мкм и более [49]. Так, полосатая зона десцеметовой оболочки, которая существует с рождения, увеличивается в три раза.

Между полосатым и неполоватым слоем десцеметовой мембраны при ранней форме дистрофии Фукса обнаруживается дополнительный слой. Его толщина составляет всего 2 мкм, и состоит он из коллагена VIII типа. Также у пациентов с ранней формой заболевания имеется еще один дополнительный слой в десцеметовой мембране – задний полосатый слой, который граничит с эндотелием. Он составляет примерно 40 % от общей толщины мембраны и тоже богат коллагеном VIII типа [50]. Поздняя форма манифестации дистрофии Фукса наблюдается при мутациях в генах FCD1 [51], FCD2 [52], FCD3 [53] и FCD4 [54]. Развитие этой формы еще связывают с мутациями в генах TCF8 и SLC4A11, но полученных данных пока недостаточно, чтобы говорить об их роли в развитии заболевания [55]. Изменения анатомии, наблюдаемые в десцеметовой оболочке у пациентов, лежат в промежутке между нормальной и анатомией пациентов с ранней формой манифестации. Общая толщина мембраны увеличивается в диапазоне 14–46 мкм [56]. При том, что передние слои десцеметовой мембраны выглядят относительно неповрежденными, коллаген VIII типа скапливается в нижней части мембраны в патологических полосатом и фибриллярном слое [57].

Потеря эндотелиальной функции роговицы при дистрофии Фукса может быть вторичной по отношению к изменениям в десцеметовой мембране. Безусловно, плотность эндотелиальных клеток роговицы у пациентов достигает в среднем 1202 клеток/мм<sup>2</sup> [58]. При этом плеоморфизм эндотелиальных клеток увеличивается. Снижение плотности эндотелиальных клеток может быть связано с уменьшением их способности противостоять окислительному стрессу и повышенной активностью процессов апоптоза [59–61]. Поскольку по мере прогрессирования заболевания в эндотелиальном слое образуются сливные гутты в центральной зоне роговицы, клетки больше не могут сохранять роговицу в дегидратированном состоянии и прозрачной. К развитию отека роговицы при дистрофии Фукса на поздних стадиях заболевания могут приводить не только

структурные изменения в слоях роговицы, но и работа определенных генов. Так, было обнаружено, что происходит разрушение аквапоринов AQP1 [62], изменяется экспрессия генов, связанных с насосной функцией эндотелия [63].

### **Б. Задняя полиморфная дистрофия роговицы (ЗПДР)**

Генетическое заболевание, встречающееся 1/100 000 человек, передается аутосомно-доминантным путем [64]. Данная дистрофия генетически гетерогенна, характеризуется вариабельной экспрессией. Её развитие обуславливают мутации в следующих генах: OVOL2, COL8A2, ZEB1 и GRHL2 [65]. Данные мутации приводят к тому, что эндотелиальные клетки приобретают эпителиоподобные свойства: располагаются в несколько слоев [66], на них появляются апикальные микроворсинки и межклеточные десмосомы [67], они обладают митотической активностью и способны к миграции через десцеметовую мембрану и иногда через трабекулярную сеть и переднюю поверхность радужки. Миграция клеток в область угла передней камеры может привести к развитию вторичной глаукомы [68]. Утолщение десцеметовой мембраны происходит вторично по отношению к повышенной активности эндотелиальных клеток, эти утолщения нерегулярные. Кривизна задней поверхности роговицы значительно увеличивается у носителей данных мутаций, что приводит к развитию нерегулярного астигматизма [69]. Заболевание появляется сразу после рождения, но как правило, диагностируется к 3-5 декаде жизни. Пациенты, у которых диагноз является случайным или установленным после 50 лет, обычно демонстрируют бессимптомное, стабильное течение заболевания с хорошим прогнозом. Прогноз для молодых пациентов с выраженными симптомами зависит от семейного анамнеза. Изменения эндотелия разнообразны: везикулярные, лентовидные и картообразные, и могут быть выражены ассиметрично на обоих глазах [70]. В тяжелых случаях задней



полиморфной дистрофии возрастает риск потери зрения. Пораженный эндотелий теряет свои насосные функции, что приводит к очаговому или диффузному отеку роговицы и образованию булл. В этих случаях требуется хирургическое лечение [71, 72].

## **В. Врождённая наследственная эндотелиальная дистрофия роговицы (ВНЭДР)**

В недавнем прошлом врожденную наследственную эндотелиальную дистрофию разделяли на два типа: аутосомно-доминантный, прогрессирующий (ВНЭДР-1) и аутосомно-рецессивный непрогрессирующий (ВНЭДР-2). ВНЭДР-1 встречается крайне редко, зарегистрирована в пяти семейных родословных. После того, как клиническая, гистопатологическая и электронная микроскопия показали большую согласованность с ЗПДР, провели генетический анализ и определили, что ВНЭДР-1 является аллельным вариантом задней полиморфной дистрофии и представляет собой выраженную форму данного заболевания [73].

Больше ВНЭДР не разделяют на два типа, и в настоящее время ВНЭДР-2 считается просто ВНЭДР. Развивается из-за мутации в гене *SLC4A11*, характеризуется помутнением роговицы в перинатальном периоде. Отек может привести к увеличению толщины роговицы в 2–3 раза [74].

В норме ген *SLC4A11* в эндотелии роговицы кодирует бикарбонатный транспортер-связанный белок-1 (BTR1), который действует как ко-транспортер бората натрия для обеспечения тока избытка воды из стромы. При ВНЭДР BTR-1 не функционирует [35].

Гистопатологически отмечается голубоватое диффузное помутнение роговицы вследствие отека всех слоев роговицы. Новорожденные обычно не слепые, хотя их зрение очень изменено, и иногда наблюдается нистагм. ВНЭДР

может быть связан с поздней кохлеарной нейросенсорной потерей слуха (начинающейся в подростковом возрасте) [75].

Использование для лечения различных методик кератопластики обычно дает хороший результат [71,76,77].

### **Г. X-сцепленная эндотелиальная дистрофия роговицы**

С этой патологией была изучена и описана только одна семья из 65 человек [78]. Клиническая картина схожа с ВНЭДР, но передается X-сцепленно и поражает только мужчин. Прозрачность роговицы варьирует от легкой мутности до значимых белесых помутнений.

### **1.3 Хирургические способы лечения буллезной кератопатии**

Трансплантация роговицы или кератопластика является наиболее часто выполняемой, а также наиболее успешной аллогенной трансплантацией в мире. В 1813 году Nimly впервые в своей работе упомянул концепцию трансплантации роговицы, но непосредственно первую трансплантацию осуществил A. V. Nippei в 1886 году, заменив больные слои роговицы человека всей роговицей кролика [79]. E. Zirm осуществил первую успешную трансплантацию роговицы в 1905 году, осознав важность внутривидового аллотрансплантата [80]. С тех пор научились выполнять не только замену всей толщи роговицы, но и отдельных пораженных её слоёв. Это стало возможным благодаря более глубокому пониманию анатомии роговицы, развитию хирургических методов, изобретению новых офтальмологических инструментов и микроскопов [81].

### **1.3.1. Сквозная кератопластика (СКП)**

Сквозная кератопластика в течение многих лет была единственным хирургическим способом лечения различных эндотелиальных патологий роговицы, но в настоящее время заменена эндотелиальной кератопластикой [45,82]. Тем не менее, СКП остается методом выбора во многих случаях осложненного или тяжелого течения заболевания и довольно успешно восстанавливает зрение у многих пациентов [83].

#### **А. Хирургическая техника**

СКП включает замену всех слоев роговицы хозяина на всю толщину роговицы донора. Донорская ткань вырезается хирургом при помощи трепана, что приводит к неизбежной потере эндотелиальных клеток по краю разреза. При трепанации донорской ткани диаметром 8,0 мм теряется 6–9 % донорских эндотелиальных клеток [83]. При помощи высекателя выделяется центральная область роговицы реципиента, диаметр которой должен быть на 0,25 мм меньше, чем донорский материал. Далее роговица донора пришивается к оставшемуся ободку от роговицы хозяина узловыми или обвивным швом. Хирургические манипуляции с донорской тканью минимальны по сравнению с методами послойной кератопластики.

#### **Б. Результаты лечения и осложнения**

Для достижения хороших показателей по восстановлению зрения необходимо тщательное сопоставление краев донорского материала с ложем реципиента, равномерное натяжение швов, хотя в итоге все равно может потребоваться высокая сфероцилиндрическая коррекция, жесткая контактная линза или различные хирургические операции для лечения высокого или

нерегулярного астигматизма, вызванного неправильной формой передней поверхности трансплантата [84-88]. В ретроспективном исследовании A. Reimer с соавт. на 413-и пациентах через восемь лет после лечения показал, что использование СКП при буллезной кератопатии улучшает остроту зрения до 0,6 при этом средние значения топографического астигматизма = 3,9 диоптрий. Важно отметить, что полученная через восемь лет острота зрения имела положительную корреляционную зависимость от предоперационной остроты зрения [83].

Для СКП характерна биомеханическая нестабильность послеоперационной раны и низкая прочность получаемого рубца. При этом швы, накладываемые во время операции, могут инфицироваться и быть несостоятельными.

Риски выхода стекловидного тела в переднюю камеру, повышенная кровоточивость и вероятность развития экспульсивного кровотечения, связанные с проведением операции по методу «открытое небо», могут быть уменьшены путем снижения внутриглазного давления перед удалением роговицы реципиента. Соответствующая анестезия также снижает риск возникновения данных осложнений.

После СКП в 10-40 % случаев развивается глаукома [89]. Высокое внутриглазное давление в раннем послеоперационном периоде может быть обусловлено тем, что в передней камере остается вискоэластик. В позднем послеоперационном периоде часто наблюдается коллапс трабекулярной сети, что отчасти можно объяснить нарушением целостности эластичных волокон роговицы, поддерживающих её структур [27]. СКП при буллезной кератопатии относится к кератопластике с низким уровнем вероятности отторжения трансплантата. При этом по литературным данным болезнь трансплантата развивается в 4-20 % случаев [90]. M. Kuchle с соавт. провели исследование на 397 пациентах со средним периодом наблюдения 18 месяцев, в котором показали, что отторжение трансплантата наблюдалось в 22 случаях, при этом большинство

эпизодов отторжения происходило между 11 и 18 месяцем после СКП. Процент успешно выполненной кератопластики без признаков болезни трансплантата составил 95 % через 12 месяцев, 89 % через 18 месяцев и 86,5 % через 24 месяца после операции [91]. Длительное применение стероидов уменьшает вероятность развития болезни трансплантата [92]. В исследовании, включающем 406 глаз, послеоперационное лечение началось с инстилляций 1 % раствора преднизолона ацетата пять раз в день, следующие шесть месяцев частота закапывания капель постепенно уменьшалась. После этого пациенты были рандомно разделены на две группы: кратковременное (прекратили местное лечение стероидами) или долгосрочное лечение (продолжали прием стероидов один раз в день в течение 12 месяцев). Во время наблюдения в 29 случаях (7,1 %) развилась болезнь трансплантата. Частота встречаемости отторжения трансплантата была значительно выше в группе с кратковременным лечением (19 глаз из 202; 9,1 %) по сравнению с группой долгосрочного лечения (10 глаз из 204, 4,9 %). Это указывает на то, что длительное местное применение кортикостероидов в низких дозах значительно снижает риск отторжения трансплантата [93]. Также использование дексаметазона стимулирует работу  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы эндотелиальных клеток, что способствует более быстрому уменьшению отека роговицы после кератопластики [94].

### **1.3.2 Задняя послойная кератопластика**

Этот тип операций используется для замены эндотелия и лечения состояний, при которых поражен только эндотелий, а остальная часть роговицы не затронута, например, для лечения различных буллезных кератопатий.

Изначально хирурги попытались заменить заднюю часть роговицы через передний доступ, то есть вначале формировали клапан из передних слоев роговицы, затем его поднимали и производили трепанацию задних слоев роговицы

[95], но эта методика не получила широкого распространения. В 1956 году С.W. Tillet впервые использовал задний доступ к эндотелию реципиента – лимбальный доступ шириной 12 мм, далее отсепаровывал задние слои роговицы с помощью расслаивателя, донорский материал фиксировался к сформированному ложу при помощи швов. Второй уровень швов накладывали в зоне лимба, фиксируя тем самым поверхностный лоскут роговицы реципиента [96]. Результат по зрению и приживаемость трансплантата были низкими, что объяснялось использованием мануальной техники расслаивания роговицы и применением швов. G.R. Melles с соавт. в 1998 году предложил использовать вместо швов тампонаду воздухом для фиксации донорского трансплантата в глазу реципиента. При этом использовали 8 мм лимбальный доступ, расслаивали роговицу реципиента на  $\frac{1}{2}$  ее толщины с помощью алмазного ножа, донорский трансплантат фиксировали путем введения пузыря воздуха в переднюю камеру, на лимбальный разрез накладывали швы [97]. В 2002 году G.R. Melles с соавт. стал вводить сложенный в соотношении 60/40 донорский трансплантат через 5 мм склеральный тоннельный разрез [98]. Ту же методику использовали М.А. Terry и Р. J. Ousley и назвали ее глубокой послойной эндотелиальной кератопластикой [99]. В 2004 г. G.R Melles и соавт. дополнительно модифицировали свою технику, начав использовать десцеметорексис на роговице реципиента. Данная операция получила название: Задняя послойная кератопластика (ЗПК) [100]. Данная методика значительно уменьшила риск травматизации радужной оболочки и структур передней камеры, а также позволяла сохранять целостность стромы реципиента, что обеспечивало получение более гладкого интерфейса и улучшало клинический результат операции. В 2006 году ЗПК стал автоматизированной эндотелиальной кератопластикой (ЗАПК), когда М. Gorovoy использовал микрокератом для выкраивания донорского трансплантата [101]. Это облегчило процесс обучения, а интерфейс стал еще более гладким. Тогда же G.R Melles и соавт. предложили очередной революционный подход в задней

послойной кератопластике [102] – технику замены больного эндотелия здоровым путем пересадки десцемето-эндотелиального комплекса (Трансплантация десцеметовой мембраны, ТДМ) уже без донорской стромы. Данная техника крайне трудна в исполнении, но дает превосходные результаты по восстановлению зрения.

После открытия слоя Дуа А. Agarwal с соавт. в 2014 году предложил использовать методику пересадки десцеметовой мембраны и эндотелия вместе с предесцеметовым слоем (Преэндотелиальная кератопластика с десцеметорексисом или предесцеметовая эндотелиальная кератопластика — ПДЭК) [12]. Данный комплекс тканей легче расправляется и фиксируется в передней камере. Две процедуры задней послойной кератопластики, а именно ЗАПК и ТДМ, стали стандартными методами лечения буллезной кератопатии. ПДЭК, являясь новой и малоизученной методикой, в настоящее время не имеет такого широкого распространения.

В России разработке, усовершенствованию и оптимизации способов и техники задней послойной кератопластики на основе современных технологий, обеспечивающих более высокий лечебно-оптический эффект, посвящены работы Б.Э. Малюгина, О.Г. Оганесяна, С.В. Труфанова, Ю.Ю. Калининкова, Паштаева А.Н, Измайловой С.Б. [103-107].

Эндотелиальная кератопластика выполняется минимально инвазивным способом, избегая ситуации «открытое небо», более того, для сопоставления хирургических разрезов используются всего несколько швов или вообще обходятся без них [108]. Важные преимущества задней послойной кератопластики перед сквозной включают: более быстрое восстановление зрения, снижение риска кровоизлияний и инфекций, послеоперационный астигматизм менее выражен, меньшая денервация роговицы, более стабильный результат, меньше частота прорастания сосудов и отторжения трансплантата [109,110].

### 1.3.2.1 Задняя автоматизированная послойная кератопластика (ЗАПК)

Донорский трансплантат для ЗАПК может быть подготовлен для пересадки непосредственно во время проведения операции или же может быть заготовлен заранее в глазном банке [111]. При помощи микрокератома удаляется эпителий и передняя строма роговицы толщиной 300, 350 или 400 мкм. Трансплантаты, полученные с помощью микрокератома, и особенно ультратонкие трансплантаты, дают более предсказуемую толщину трансплантата, а также более быструю зрительную реабилитацию [112].

Из корнеосклерального диска с помощью трепана 8, 8,5 или 9 мм выкраивают готовый трансплантат [113], вводят в переднюю камеру через роговичный 5 мм разрез при помощи пинцета, глайда или инжектора [114]. Трансплантат фиксируют к роговице реципиента при помощи пузыря 20 % газа SF<sub>6</sub>. Разрез и дополнительные парацентезы гидротизируют или на них накладывают узловые швы.

Наиболее частым осложнением после операции ЗАПК является частичная отслойка трансплантата. Однако частота встречаемости осложнений обратно пропорциональна опытности хирурга. В связи с тем, что небольшие области отслойки трансплантата прилегают сами собой, повторное введение газа требуется только для лечения выраженной или полной отслойки трансплантата [114]. Такие осложнения, как первичная или вторичная недостаточность трансплантата, его отторжение, зрачковый блок, повышенное внутриглазное давление и синдром Урретс-Завалия, врастание эпителия, отслойка сетчатки, кистозный макулярный отёк и кровоизлияния, встречаются редко [115]. Выживаемость трансплантата после ЗАПК, по-видимому, такая же хорошая, как и после СКП [116]. Окончательный рефракционный результат после СКП становится понятен только после снятия всех роговичных швов, но после ЗАПК происходит гораздо более быстрая зрительная реабилитация пациентов. При этом необходимо учитывать, что



готовый трансплантат для ЗАПК представляет собой линтикулу вогнутой формы с различной толщиной в центре и по периферии, поэтому присутствует послеоперационный гиперметропический сдвиг около 1,13 диоптрий [117] при ЗАПК и около  $0.78 \pm 0.59$  диоптрий при ультратонком-ЗАПК [112]. J.Y. Li с соавт. в 2012 году обнаружили, что процент пациентов, у которых максимально корригируемая острота зрения (МКОЗ) составляла 0,8, был равен 36,1 % через 6 месяцев и 70,4 % через 3 года после операции ЗАПК. Процент же пациентов с корригируемой остротой зрения равной 1,0 был достигнут в 11,1 % через 6 месяцев и 47,2 % через 3 года [118]. K. Wacker с соавт. в 2016 году опубликовали данные о том, что зрение у пациентов после ЗПК постепенно улучшалось в течение пяти лет, так, корригируемая острота зрения равная 0,8 через год после операции была у 26 % пациентов, а через 5 лет – у 56 % пациентов [119]. Эти исследования говорят о том, что улучшение зрения не имеет плато и предполагает непрерывный процесс ремоделирования ткани роговицы даже через пять лет после ЗАПК. Однако стоит отметить, что достижение максимальной корригированной остроты зрения равной 1,0 происходит после ЗАПК нечасто. Одной из возможных причин этого является избыточная толщина донорской ткани [120]. Строма, входящая в состав пересаживаемой линтикулы, искажает интерфейс границы донор-реципиент, что увеличивает количество аберраций высокого порядка на 25 % и ухудшает зрение пациентов [121]. Одним из существенных недостатков ЗАПК по сравнению с СКП является относительно большая потеря эндотелиальных клеток в ходе подготовки трансплантата и выполнения операции. Потеря эндотелиальных клеток после ЗАПК составляет около 32 % в первый год после операции и примерно 7–9 % каждый последующий год, что за 5 лет в общем приводит к потере приблизительно 47–55 % эндотелиальных клеток [119.]

Для подготовки трансплантата для ЗАПК также пробуют использовать

фемтосекундный лазер, такой вид кератопластики получило название ФЛ-ЗПК [122]. Использование фемтосекундного лазера позволяет получить более равномерный по своей толщине трансплантат по сравнению с техникой ЗАПК. [123]. Однако в сравнении с микрокератомом лазер не дает преимуществ по гладкости получаемого среза, скорее наоборот. Для ФЛ-ЗПК трансплантата характерна шероховатость из-за глубокой абляции ткани, приводящей к денатурации коллагена стромы. Это в свою очередь, приводит к рассеиванию света на границе раздела [124.]. Также было показано, что после ФЛ-ЗПК развивается нерегулярный астигматизм задней поверхности роговицы, связанный с образованием складок трансплантата [125,126]. После ФЛ-ЗПК часто развивается хейз [127,128]. Все вышеперечисленное приводит к тому, что зрительные функции после ФЛ-ЗПК хуже по сравнению с ЗАПК. ФЛ-ЗПК по-прежнему нуждается в дальнейшем техническом усовершенствовании, прежде чем он получит широкое применение.

Иммунный ответ на пересаженные эндотелиальные клетки гораздо меньше выражен, чем при пересадке всей роговицы. Исследования показали, что в течение первых 2 лет после кератопластики риск отторжения трансплантата составляет 5–17 % для СКП у пациентов с низким уровнем риска отторжения и 8–14 % у пациентов после ЗАПК. Таким образом, риск развития иммунного отторжения трансплантата после ЗАПК, вероятно, более низкий, чем после СКП. Этому может быть несколько объяснений. Во-первых, введение аллоантигенов в переднюю камеру вызывает системное ингибирование адаптивных иммунных ответов против этих антигенов, и их представление антигенпрезентирующим клеткам реципиента, которые в основном находятся в передней части стромы, также уменьшается. Точно так же при ЗАПК пересаживается значительно меньше антигенпрезентирующих клеток донора, которые, как было показано,

способствуют развитию реакции отторжения трансплантата. Кроме того, трансплантируемая донорская ткань может быть менее иммуногенной, поскольку эпителий и большая часть донорской стромы не пересаживается. Другим важным фактором является отсутствие или минимальное количество роговичных швов, которые могут ослабнуть при СКП и вызвать воспаление с развитием вторичного иммунного ответа [90].

Иммунный ответ после ЗАПК клинически менее выражен, чем после СКП. В исследовании, проведенном М.О. Price и его коллегами в 2009 году на 598 пациентах, было показано, что в 35 % случаев иммунные реакции отторжения протекают бессимптомно и диагностируются только во время планового осмотра [129]. Признаки развития иммунной реакции на донорский трансплантат при ЗАПК также отличаются от таковых при СКП. Так, чаще всего они проявляются в виде изолированных преципитатов, которые могут быть очаговыми или диффузными (60-70 %). Другими признаками отторжения трансплантата являются отек роговицы (10-25 %) и наличие клеток во влаге передней камеры (25 %). Классические эндотелиальные линии отторжения (линии Хоудауста) встречаются редко [130]. Риск отторжения трансплантата после ЗАПК выше у афроамериканцев, в случаях ранее существовавшей глаукомы и у пациентов со стероидзависимой офтальмогипертензией [129]. В нескольких исследованиях сообщалось о времени между операцией и отторжением трансплантата. В исследовании Е.И. Wu с соавт. 2012 года, описывающем 353 случая ЗАПК, было показано, что болезнь трансплантата развивается в среднем через  $13 \pm 10$  месяцев после операции [130]. J.Y. Li с соавт. (2012) в своем исследовании, выполненном на 615 глазах, наблюдали развитие отторжения трансплантата в 45 случаях через 12-18 месяцев после кератопластики [131]. Похожее исследование выполнила L. Sepsakos с коллегами (2016), в котором они проанализировали отдаленные результаты ЗАПК у 400 пациентов с дистрофией Фукса и выяснили, что чаще всего

отторжение донорского материала наблюдается через 19-30 месяцев после операции. При этом ими было замечено, что вероятность отторжения трансплантата увеличивается при раннем отказе от местного применения стероидов и если толщина трансплантата превышает 145 мкм [132].

Следует отметить, что, судя по статистическим отчетам американской ассоциации глазных банков (EBAА U.S.), хотя общее количество выполненной задней послойной кератопластики постоянно увеличивается, это происходит в основном из-за резкого увеличения частоты выполнения операции ТДМ, количество выполненных операций ЗАПК за последние годы уменьшилось.

### **1.3.2.2 Трансплантация десцеметовой мембраны с эндотелием (ТДМ)**

ТДМ включает селективную трансплантацию эндотелия роговицы и десцеметовой мембраны. Основными преимуществами ТДМ по сравнению с предыдущим типом задней послойной кератопластики являются очень низкая вероятность развития отторжения трансплантата, более быстрое восстановление зрительных функций и тот факт, что для проведения операции требуется значительно меньше технического оборудования. Тем не менее, ТДМ считается вмешательством более высокого уровня сложности и технически тяжелее в исполнении, чем ЗАПК [8,102].

Существует несколько способов подготовки трансплантата для выполнения ТДМ, здесь описывается самый распространенный [134]. Трипановым синим окрашивается эндотелий роговицы, далее отсепаровывается по кругу край десцеметовой мембраны и постепенно тянущими движениями приподнимается к центру с помощью двух пинцетов для завязывания, центральную область роговицы около 3×3 мм остается нетронутой. С помощью трепана из корнеосклерального лоскута вырезается трансплантат необходимого диаметра. Наконец, трансплантат полностью отслаивается, при этом он скручивается либо очень плотно, приобретая

форму сигары, либо (в форме сигар), либо в виде двойного рулона или свободными складками, но всегда эндотелием наружу. При этом, чем моложе донор, тем плотнее скручивается трансплантат, что увеличивает в дальнейшем время его расправления в передней камере реципиента [135]. В связи с этим в качестве доноров для ТДМ предпочитают выбирать роговицы людей старше 50 лет [136], к тому же у них значительно легче отходит десцеметовая оболочка от стромы, что уменьшает вероятность повреждения трансплантата во время его препаровки. Следующим шагом является перенос трансплантата в глаз с помощью устройства, которое минимально повреждает эндотелий. Для этого используют несколько типов устройств - от инжекторов для имплантации ИОЛ до стеклянных пипеток и трубок, изготовленных специально для этой цели. Самая распространенная техника для имплантации расправления трансплантата ТДМ – это техника «no-touch» [137].

Оставшуюся после отделения десцеметовой оболочки вместе с эндотелием ткань донорской роговицы в последствие можно использовать для глубокой передней послойной кератопластики (ГППКП) у второго реципиента. В этом процессе, называемом трансплантация сплит-роговицы, один трансплантат может использоваться для двух операций ТДМ и ГППКП у двух разных реципиентов соответственно, что способствует снижению общего дефицита донорского материала [138]. В нескольких исследованиях было продемонстрировано, что трансплантация разделенной на слои роговицы может быть включена в качестве безопасной процедуры в клиническую практику [138,139].

ТДМ в отличие от ЗАПК входила в широкую хирургическую практику достаточно долго. В основном это связано с необходимостью применять высокой сложности манипуляции в ходе обращения с очень тонким трансплантатом, в связи с чем кривая обучения хирургами достаточно крутая [140,141]. Частота развития

первичной эндотелиальной недостаточности (6%-8%) и потери донорской ткани при ТДМ выше, чем у ЗПК [134].

Осложнения ТДМ включают отслойку трансплантата, кровоизлияние, вторичную глаукому, синдром Урретс-Завалия, первичную и вторичную недостаточность трансплантата, кальцификацию интраокулярных линз (ИОЛ) и макулярный отек [142,143]. Отслойка трансплантата является наиболее распространенным осложнением после ТДМ и случается чаще, чем после ЗАПК. Так частота встречаемости отслойки трансплантата после ЗАПК равна 14-ть на 1000-чу операций, а после ТДМ – 79-ть на 1000-чу операций [144]. Количество случаев повторного введения воздуха в переднюю камеру значительно уменьшилось после замены воздуха на 20% газ SF<sub>6</sub> [145,146] и теперь составляет менее 3% [147]. Небольшие отслойки трансплантата часто прилегают самопроизвольно. Более крупные отслойки, особенно если они имеют свернутые края, часто необходимо прикладывать путем повторного введения воздуха/газа [147]. Тем не менее, до сих пор нет стандартизированных критериев необходимости и сроков повторной тампонады. Повышение внутриглазного давления после ТДМ в раннем послеоперационном периоде обычно обусловлено зрачковым блоком. Возникновение зрачкового блока можно предотвратить с помощью базальной иридотомии или иридэктомии, раннего выведения газа из передней камеры или неполной эндотампонады во время процедуры. Кальцификация ИОЛ является редким осложнением, его частота встречаемости составляет примерно 2% [143]. Патомеханизм кальцификации ИОЛ до сих пор полностью не изучен. Кистозный макулярный отек возникает после ТДМ с частотой около 10% и поэтому является распространенным осложнением [148]. После введения усиленного режима инстилляций кортикостероидов в послеоперационном лечении кистозный макулярный отек фактически перестал встречаться как осложнение ТДМ [149]. До настоящего времени нет сообщений о

применении нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) для предотвращения развития кистозного макулярного отека после ДМЕК. Можно предположить, что НПВП могут быть также эффективны, как в случае с хирургией катаракты. Тем не менее, необходимы клинические испытания, чтобы предоставить доказательства их эффективности в использовании.

При решении выполнить одномоментно ТДМ в сочетании с операцией по удалению катаракты, необходимо учитывать гиперметропический сдвиг при выборе ИОЛ. Рефракционные изменения, скорее всего, вызваны уменьшением отека роговицы после замены пораженных слоев. Этот гиперметропический сдвиг обычно составляет около 0,31 дптр. В среднем гиперметропический сдвиг после ТДМ меньше, чем после ЗАПК [150]. S. Schrittenlocher с соавт. (2018 год) в работе на 1340 глазах продемонстрировали, что максимально корригируемая острота зрения в среднем увеличивается с 0,3 до операции до 0,7 и 0,8 через 6-ть и 12-ть месяцев после ТДМ соответственно [143]. Из опубликованных в 2016 году данных L. Нам с соавт., наблюдавшими за 250 глазами после ТДМ в течение 4-7-ми лет, следует, что через 6-ть месяцев после операции МКОЗ 0,8 и выше было в 73% глаз и 1,0 - в 44% глаз, а через 4 года зрение 0,8 и выше диагностировали в 83% случаев, а 1,0 - в 54% [151]. При этом после ТДМ в отличие от других вышеописанных типов кератопластики не характерно появления аберраций высокого порядка [152]. Потеря эндотелиальных клеток в послеоперационном периоде схожа между ТДМ и ЗАПК [153]. Потеря эндотелиальных клеток после ТДМ составляет примерно 38% через 12-ть месяцев [143]. L. Нам с соавт. сообщают о потере 33,9% эндотелиальных клеток через 6 месяцев, 37,6% - через 1 год и 52,6% - через 4 года после ТДМ [151], тогда как D.A. Price с соавт. говорят о потере 48% эндотелиальных клеток за 5 лет [153]. Стабильность остроты зрения достигается обычно через шесть месяцев после ТДМ, что быстрее, чем после ЗАПК [154], при этом острота зрения после ТДМ в среднем лучше, чем ЗАПК [144].

ТДМ является перспективным способом лечения вторичной эндотелиальной недостаточности трансплантата после СКП. S. Schrittenlocher с соавт. (2020 год) ретроспективно проанализировали данные 52-х случаев замены задних слоев роговичного трансплантата и получили следующие данные: толщина роговицы уменьшилась с  $770 \pm 213$  мкм до  $536 \pm 61$  мкм через 12-ть месяцев после ТДМ за счет уменьшения отёка; с уменьшением отёка острота зрения с  $1.07 \pm 0.33$  (logMAR) улучшилась до  $0.72 \pm 0.39$  (n = 33),  $0.56 \pm 0.36$  (n = 32),  $0.38 \pm 0.28$  (n = 23),  $0.37 \pm 0.21$  (n = 21) и  $0.32 \pm 0.18$  по шкале logMAR через 3-и, 6-ть, 12-ть, 24-е и 36-ть месяцев после операции соответственно; роговичный астигматизм после ТДМ не изменился. В 7-ми случаях из 52-х развилась иммунная реакция отторжения трансплантата, что потребовало повторной кератопластики [155].

Риск развития болезни трансплантата после ТДМ крайне незначителен. Так A. Anshu с соавт. (2012 год) сообщили об 1-м эпизоде отторжения трансплантата из 140-ка случаев наблюдения после ТДМ [156], в другом исследовании, проведенном L. Baydoun с коллегами (2016 год), отторжение трансплантата наблюдалось у 17-ти из 750-ти глаз [157]. В самом крупном на сегодняшний день отчете говорится о 12-ти случаях отторжения трансплантата в когорте из 905-ти глаз после ТДМ, при этом в 1-й год после операции вероятность развития отторжения равна 0,9%, а через 4 года – всего 2,3% [158]. Клиническая картина отторжения трансплантата после ТДМ может быть почти незаметной. Иммунные реакции отторжения могут проявляться в виде классической линии Хоудауста, но чаще всего встречаются в виде диффузных эндотелиальных преципитатов [158]. Преципитаты обычно ограничены рамками трансплантата, но иногда могут встречаться на периферических участках роговицы, которые не содержат десцеметовой оболочки после проведенного десцеметорексиса, но и не покрыты трансплантатом [159]. Дополнительными клиническими признаками острого отторжения трансплантата могут быть взвесь в передней камере и отек роговицы.



Интересные данные получила С. Monnereau и её коллеги в 2014 году, ретроспективно анализируя данные 500-ти случаев ТДМ в 7-ми из которых развилось отторжение трансплантата. Они показали, что характерные морфологические изменения эндотелиальных клеток наблюдались уже за несколько месяцев до того, как реакция отторжения стала клинически очевидной. В отличие от контрольной группы глаз, у которой после ТДМ не развилось болезни трансплантата, в которой наблюдали гомогенную отражательную способность эндотелиальных клеток, их довольно правильную форму без видимой структуры клеточных ядер и равномерное распределение; в глазах с развивающимся отторжением алло- трансплантата выявили нерегулярность формы эндотелиальных клеток, их размеров и распределения по поверхности, также у них увеличилась отражательная способность, и появились ярко выраженные клеточные ядра. Это исследование показывает, что отторжение алло- трансплантата может быть не острым явлением, а скорее медленным развивающейся иммунной реакцией, и что мониторинг донорского эндотелия может использоваться для прогнозирования развития отторжения трансплантата [160].

Пациенты с отторжением роговичного трансплантата после ТДМ часто могут не предъявлять никаких жалоб, особенно при отсутствии отека роговицы, несмотря на наличие эндотелиальных преципитатов [158]. Кроме того, пациенты могут жаловаться на дискомфорт в глазах, покраснение и снижение остроты зрения. Поскольку большинство случаев отторжения трансплантата протекает бессимптомно, необходимо регулярное наблюдение за пациентами после ТДМ. При своевременном начале стероидной терапии острота зрения и толщина роговицы в центре остаются стабильными в большинстве случаев, однако, плотность эндотелиальных клеток значительно снижается. При этом, значения плотности эндотелиальных клеток через 3 месяца и 1 год после эпизодов

отторжения трансплантата сопоставимы и дальнейшего их снижения не наблюдается [158].

Таким образом, основной проблемой использования ТДМ, вызывающая беспокойство, помимо крутой кривой обучения хирурга, является то, что возраст донора должен быть более 50 лет для облегчения препаровки трансплантата [136]. Теоретически, с увеличением возраста донора снижается жизнеспособность эндотелиальных клеток трансплантата в глазу хозяина и уменьшается плотность эндотелиальных клеток. Вероятно, с возрастом меняется структура десцеметового слоя, уменьшая его адгезию к вышележащим слоям роговицы, поэтому у пожилых людей может происходить спонтанная отслойка десцеметовой мембраны во время удаления катаракты [161–163]. Это может служить одной из причин увеличения частоты отслойки трансплантата после ТДМ. Поэтому все большей популярностью начинает пользоваться техника предесцеметовой эндотелиальной кератопластики, которая позволяет пересаживать ткани молодых доноров.

### **1.3.2.3 Предесцеметовая эндотелиальная кератопластика**

#### **(ПДЭК, Преэндотелиальная кератопластика с десцеметорексисом)**

В статье, в которой впервые описывалось наличие предесцеметового слоя, также описывается возможность его использование единым блоком вместе с десцеметовой мембраной и эндотелиальными клетками [11]. Основываясь на описанном H.S. Dua методе, в качестве альтернативы ЗПК и ТДМ была разработана методика трансплантации ткани пациентам [12], получившая название ПДЭК. Главное преимущество трансплантата ПДЭК перед ТДМ состоит в том, что он гораздо меньше подвержен скручиванию [164], что значительно упрощает работу хирурга. Дополнительным преимуществом ПДЭК является то, что, в отличие от ТДМ, трансплантат можно получать от очень молодых доноров и даже детей до года, у которых выше плотность эндотелиальных клеток [13]. В отличие от

трансплантатов используемых при ЗАПК, толщина которых за счет задних слоев стромы составляет приблизительно 100–150 мкм, трансплантат для ПДЭК значительно тоньше. Его толщина складывается из толщины десцеметовой мембраны с эндотелиальными клетками –  $10,97 \pm 2,36$  мкм и толщины слоя Дуа 10–13,6 мкм [11]. При этом в имеющихся слоях волокон не обнаруживаются клетки, что, скорее всего, уменьшает вероятность развития реакции отторжения.

Техника подготовки донорской ткани для ПДЭК заключается в следующем: 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 вводится в роговицу до тех пор, пока не сформируется большой пузырь 1-го типа [12]. Воздух, введенный в строму, радиальным потоком достигает лимба, от лимба он начинает двигаться по окружности по часовой стрелке или против часовой стрелки, образуя кольцо отсепарованной ткани параллельно лимбу. Затем воздух меняет свое движение на центростремительное, заполняет оставшуюся строму и собирается в виде крошечных пузырьков между предесцеметовым слоем и задними слоями стромы, которые затем сливаются, образуя большой пузырь типа 1 [165]. Когда диаметр пузыря достигает приблизительно 7–8 мм, подачу воздуха прекращают, и игла извлекается. Для облегчения формирования пузыря 1-ого типа можно использовать специальный ПДЭК-зажим, который предотвращает выход воздуха через трабекулярную сеть и практически исключает возможность формирования большого пузыря 2-ого типа [166]. Далее трансплантат отрезается либо при помощи ножниц, либо используют трепан. Введение трансплантата в переднюю камеру осуществляют с помощью стеклянной канюли. Вместо воздуха для сепаровки слоев может быть использован вискоэластик или культуральная среда.

Потеря эндотелиальных клеток при подготовке донорской ткани для ПДЭК немного меньше, чем для ТДМ [167]. Поскольку диаметр трансплантата ПДЭК

меньше, чем трансплантата ТДМ, то трансплантируется меньше эндотелиальных клеток. Тем не менее, постулируется, что меньшее количество манипуляций, необходимых при разворачивании трансплантата, могут это компенсировать.

Поскольку ПДЭК является относительно новой техникой кератопластики, то еще нет анализа отдаленных результатов лечения. До сих пор остаются не изученными такие аспекты, как: послеоперационная острота зрения (сопоставима ли она с таковой после ТДМ, какой вклад в рассеяние света вносит предесцементовый слой), уменьшает ли предесцементовый слой вероятность отслойки трансплантата, какова частота развития реакции отторжения, влияет ли возраст донора на качество трансплантата и получаемые результаты после кератопластики. Для получения ответов на эти и другие вопросы, необходимо проведение дополнительных исследований и более глубокое изучение вопроса.

## Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

### 2.1 Дизайн исследования

Представленное исследование основано на экспериментальной разработке и в дальнейшем клинико-функциональном обосновании эффективности оптимизированной технологии ПДЭК на основе сравнительного анализа результатов лечения пациентов с диагнозом БК различными хирургическими методами. Дизайн проводимого исследования указан в таблице 1.

**Таблица 1** – Дизайн исследования

1. Экспериментальные исследования	
Экспериментальное изучение воздействия различных способов выкраивания ПДЭК трансплантата на формирование большого пузыря первого типа. N = 30	Группа I – 10 склерокорнеальных дисков, на которых выполняли стандартную технику выкраивания трансплантата для ПДЭК. N = 10
	Группа II – 10 склерокорнеальных дисков, на которых использовали оптимизированный способ № 1 подготовки трансплантата для ПДЭК. N = 10
	Группа III – 10 склерокорнеальных дисков, на которых использовали оптимизированный способ № 2 подготовки трансплантата для ПДЭК. N = 10
2. Клинико-функциональное исследование	
Анализ клинико-функциональных результатов лечения пациентов после выполнения ЗПК с применением различных технологий заготовки трансплантатов (N = 84)	Основная группа – пациенты с БК, которым выполнена оптимизированная ПДЭК (N = 25).
	Контрольная группа I – пациенты с БК, которым выполнена ТДМ (N = 27)
	Контрольная группа II – пациенты с БК, которым выполнена ФЛ-ЗПК (N = 32)

## 2.2. Материал и методы клинических исследований

Настоящее исследование основывается на анализе клинико-функциональных исследований и хирургического лечения 84 пациентов с буллезной кератопатией, большинство из которых обратились в клинику с жалобами на снижение остроты зрения, слезотечение, светобоязнь, периодическую боль. Пациенты с БК были разделены на 3 группы в зависимости от вида хирургического вмешательства.

- 1) Основная группа – выполнена оптимизированная ПДЭК;
- 2) Контрольная группа I – выполнена ТДМ;
- 3) Контрольная группа II – выполнена ФЛ-ЗПК.

Пациентам выполняли комплекс диагностических обследований в дооперационном периоде и на сроках 1, 3, 6, 12 мес. после операции.

Критерии включения пациентов были следующими:

- наличие информированного согласия пациента на участие в исследовании;
- наличие ЭД роговицы развитой и далеко зашедшей стадии<sup>1</sup>;
- согласие на хирургическое лечение и обследование в соответствии с предложенным протоколом и графиком.

Критерии исключения пациентов из исследования:

- некомплаентность пациентов;
- отказ пациента от дальнейшего участия в исследовании;
- наличие выраженных фиброзных изменений в роговице;
- тяжелое общее соматическое состояние пациента: некомпенсированный сахарный диабет, ревматоидный артрит, псориаз, саркоидоз, психические заболевания и др.;

---

<sup>1</sup> По Волкову В. В. и Дронову М. М. (1978).

– наличие сопутствующей патологии (некомпенсированная глаукома, частичная или полная атрофия зрительного нерва, поражение сетчатки, увеит).

### 2.2.1 Характеристика пациентов основной группы

Основную группу составили 25 глаз 25 пациентов, которым проводили оптимизированную технику выкраивания трансплантата для ПДЭК № 1. В таблице 2 представлено их распределение по возрасту и полу.

**Таблица 2** – Характеристика пациентов основной группы по половому и возрастному составу

Параметры отбора. Характеристика пациентов	Показатели
Пациенты (глаза)	25 (25)
Возраст, лет $M \pm m$	69 $\pm$ 11
Пол, муж/жен	11( 44%)/14(56%)

### 2.2.2 Характеристика пациентов контрольной группы I

Контрольную группу I составили 27 глаз 27 пациентов, которым была проведена ТДМ. В таблице 3 представлено их распределение по возрасту и полу.

**Таблица 3** – Характеристика пациентов контрольной группы I по половому и возрастному составу.

Параметры отбора. Характеристика пациентов	Показатели
Пациенты (глаза)	27 (27)
Возраст, лет $M \pm m$	70 $\pm$ 12
Пол, муж/жен	15(55,5%)/12(44,5%)

### 2.2.3 Характеристика пациентов контрольной группы II.

Контрольную группу II составили 32 глаза 32 пациентов, которым была проведена ФЛ-ЗПК. В таблице 4 представлено их распределение по возрасту и полу.

**Таблица 4** – Характеристика пациентов контрольной группы II по половому и возрастному составу.

Параметры отбора. Характеристика пациентов	Показатели
Пациенты (глаза)	32(32)
Возраст, лет $M \pm m$	68 $\pm$ 12
Пол, муж/жен	16(50%)/16(50%)

Из представленных данных следует, что сформированные группы пациентов однородны и почти идентичны друг другу, что позволяет в ходе исследования делать обоснованные выводы по получаемым результатам.

### 2.3 Методы клинико-функциональных исследований

Всем пациентам проводили комплексное клинико-функциональное обследование, в котором использовались следующие методы исследования (аспекты приведены в таблице 5).



Таблица 5 – Аспекты комплексного клинико-функционального исследования

Метод	Аспекты применения метода исследования
Визометрия	Выполняли без коррекции и с максимальной очковой коррекцией с помощью фороптора Huvitz CDR-3100 (Южная Корея) и проектора оптометров Topcon ACP-5 (Япония). Выполняли в дооперационном периоде и на всех сроках наблюдения до 12 месяцев после операции
Авторефрактометрия	Выполняли в естественных условиях на аппарате RC5000 «Tomey» (Япония) с погрешностью $\pm 0,25$ дптр
Тонометрия	Выполняли на пневмотонометре Reichert (США)
Периметрия	Выполняли на периметре Octopus 900 (Швейцария). Процесс осмотра на нем автоматизирован и позволяет оценить полное поле зрения через периметрию статического и кинетического типа
Биомикроскопия переднего отрезка глаза	Выполняли с помощью щелевой лампы Dixon S 350, Mediworks (Китай). Первично проводили оценку придаточного аппарата глаза (век, ресниц), состояния тарзальной и бульбарной конъюнктивы, а также переднего и заднего отрезка глаз. Во время осмотра роговицы отмечали наличие признаков эндотелиальной дистрофии роговицы, таких как симптом «битого металла» в виде неравномерности ДМ с отливом бронзового цвета, наличие патологических гутт и складок ДМ. Определяли степень и локализацию отека стромы и эпителия роговицы, наличие булл. Подвергали оценке глубину и равномерность передней камеры глаза, наличие ретрокорнеальной мембраны, спаяк, синехий. Оценивали состояние радужной оболочки, размера и формы зрачка, наличие коллоидом. Если имелась ИОЛ, оценивали ее положение внутри глаза, место и степень ее фиксации
Офтальмоскопия	Выполняли при наличии достаточной прозрачности сред переднего отрезка глаза при помощи асферической линзы с оптической силой 78 дптр «MaxField» (Ocular, США). Осмотру подвергали макулярную зону, диск зрительного нерва, его цвет, границы, величину экскавации, а также ход и калибр сосудов сетчатки
Ультразвуковое А- и В-сканирование	Выполняли на приборе «EZ-Scan A/B-550+» (Sonomed, США). Измеряли глубину передней камеры, толщину хрусталика, передне-задний размер глазного яблока, также исключали наличие внутриглазных новообразований, отслойки сетчатки и гемофтальма
Кератотопография	Осуществляли при помощи автоматизированного кератотопографа Zeiss «Atlas 9000» (Германия)
Оптическая когерентная томографию	Осуществляли с применением двух приборов: Optovue (США) и Visante OCT (Carl Zeiss, Германия). Параметры прибора Optovue: длина волны сканирующего луча – $840 \pm 10$ нм, частота сканирования – 26000 А-сканов в секунду, оптическое разрешение – 5 мкм. 60 Параметры прибора Visante OCT: длина волны сканирующего луча – 1300 нм, частота сканирования – 256 А-сканов в поперечном срезе, время получения одного снимка – 0,125 сек, оптическое разрешение – $10 \times 3$ мм. Метод ОКТ является безопасным для пациента и выполняется бесконтактно, что является очень важной характеристикой в раннем послеоперационном периоде. Исследование проводили на всех сроках наблюдения за пациентом. Оценке подвергали следующие параметры: адаптация трансплантата к задней строме реципиента, равномерность трансплантата, общая толщина роговицы реципиента вместе с трансплантатом, толщина трансплантата в центральной зоне и на периферии
Подсчет плотности, размера эндотелиальных клеток и оценка динамики их количества	Проводили методом конфокальной микроскопии с помощью прибора Confoscan 4 (Nidek, Япония) со такими параметрами: линза для исследования – $40\times$ , NA 0,75, рабочая дистанция – 1,98 мм, исследуемая зона роговицы – $460 \times 345$ мкм, размеры получаемого изображения – $768 \times 576$ pixel, латеральное разрешение – 0,6 мкм/pixel, скорость сканирования – 25 снимков в сек. При исследовании 51 использовали функцию автоматического и мануального подсчета плотности эндотелиальных клеток. Обследование проводили после однократной инстилляцией местного анестетика через иммерсионный гель (карбогель 0,2%)

- тонометрия,
- офтальмометрия,
- визометрия без коррекции и с максимальной очковой коррекцией,
- биомикроскопия переднего отрезка глаза,
- фотографирование глаз пациентов,
- кератотопография,
- оптическая когерентная томография переднего и заднего отрезка глаза,
- пахиметрия,
- эндотелиальная микроскопия,
- эхоофтальмография в В-режиме,
- лабильность и электрическая чувствительность зрительного нерва.

### **Статистические методы исследований**

Данные всех клинико-функциональных исследований заносили в сводные Excel-таблицы.

Для оценки нормальности распределения имеющихся переменных применяли критерий Стьюдента.

В качестве описательной статистики использовали среднее со стандартным отклонением ( $M \pm SD$ ).

Во время оценки полученных результатов статистически значимыми считали результаты при значениях  $p \leq 0,05$ .

Для проведения и визуализации статистической обработки полученных данных использовали пакет GraphPad Prism 7.

## 2.4 Результаты клинико-функциональных исследований у пациентов с буллезной кератопатией в предоперационном периоде

Однородность распределения групп по клинико-функциональным параметрам проверяли на основе сравнительного анализа параметров глаза в дооперационном периоде.

### 2.4.1 Сравнительная оценка величины некорригированной и максимально корригированной остроты зрения вдаль в исследуемых группах пациентов до операции

Анализ средней остроты зрения без коррекции и с максимальной коррекцией не выявил статистически достоверную разницу в исследуемых группах до операции (Таблица 6).

**Таблица 6** – НКОЗ и МКОЗ в исследуемых группах пациентов до операции

Исследуемые параметры	Основная группа (n=25)	Контрольная группа I (n=27)	Контрольная группа II (n=32)	p
НКОЗ	0,04±0,05	0,04±0,02	0,04±0,06	>0,05
МКОЗ	0,05±0,04	0,05±0,01	0,05±0,03	>0,05

\*Между группами не выявлено статистически значимых различий ( $p > 0,05$ ), критерий Стьюдента

### 2.4.2 Сравнительная оценка других показателей в исследуемых группах пациентов до операции

Не было выявлено статистически значимых различий ( $p > 0,05$ ) между группами при сравнении других параметров (Таблица 7).

**Таблица 7** – Значения других показателей до 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
ЦТР, мкм	730 $\pm$ 51	720 $\pm$ 75	725 $\pm$ 49,1	>0,05
ВГД мм.рт.ст	17,2 $\pm$ 2,5	16,8 $\pm$ 2,4	16,8 $\pm$ 2,6	>0,05
К, дптр	43,5 $\pm$ 1,5	43,7 $\pm$ 2,0	44,0 $\pm$ 0,9	>0,05
Астигматизм	-1,2 $\pm$ 0,8	-1,25 $\pm$ 0,5	-0,75 $\pm$ 0,25	>0,05
ПЗО	23,2 $\pm$ 1,9	23,6 $\pm$ 1,4	23,4 $\pm$ 1,8	>0,05

#### 2.4.3. Наличие сопутствующей патологии в исследуемых группах пациентов

Различные виды сопутствующей патологии были выявлены у исследуемых пациентов на момент дооперационного обследования (Таблица 8).

**Таблица 8** – Сопутствующая патология в трех группах исследования

Сопутствующая патология	Основная Группа ( $n=25$ )	Контрольная группа I ( $n=27$ )	Контрольная группа II ( $n=32$ )
Глаукома, компенсированная медикаментозно или оперативно	2	1	1
Слабость цинновых связок, частичная дислокация ИОЛ	1	1	1
Миопия средней и высокой степени	2	2	3

## 2.5 Характеристика донорского материала

В ходе выполнения работы использовали донорские корнеосклеральные диски, которые были заготовлены в Глазном банке «АЙЛАБ». В таблице 9 представлены возраст и сроки хранения донорских трансплантатов, исходные средние значения плотности эндотелиальных клеток (ПЭК).

**Таблица 9** – Исходные значения ПЭК и сроки хранения донорских трансплантатов в исследуемых группах

Исследуемые параметры	Основная группа (n=25)	Контрольная группа I (n=27)	Контрольная группа II (n=32)
ПЭК исходное, кл/мм <sup>2</sup> (M±σ)	2747±65	2680±85	2705±72,5
Сроки хранения, дней (M±σ)	3,0±0,75	2,9±0,67	3,0±0,7
Возраст донора на момент смерти	20-50	50-65	20-65

Сравнительный анализ исходных значений ПЭК не выявил статистически значимых различий между тремя группами, однако большее количество ПЭК отмечалось в основной группе, так как для нее использовались молодые донорские роговицы.

В итоге, сравнительное исследование функциональных характеристик донорских трансплантатов в группах пациентов и клинично-функциональных параметров глаз показало их однородность и применимость для сравнительного статистического анализа динамики восстановления в различные послеоперационные сроки клиничнофункциональных показателей оперированных глаз.

## **Глава III. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Классический способ выкраивания трансплантата имеет ряд недостатков. Во-первых, существует высокая вероятность разрыва пузыря, в результате этого может образоваться трансплантат меньше необходимого размера. Во-вторых, отсутствует стабильная фиксация донорской ткани при введении иглы для пневмодиссекции, в результате этого может произойти перфорация эндотелия и гибель клеток. В-третьих, трудности дозирования силы надавливания поршня для введения воздуха могут привести к выбраковке донорского материала [18].

Следовательно, данный способ не позволяет осуществлять контроль и правильность распространения воздуха в нужном слое и тем самым, не дает хирургу полной уверенности в успешном получении большого пузыря первого типа при выполнении данной хирургической манипуляции.

Цель исследования – разработать новые хирургические методы получения и консервации трансплантата для ПДЭК для снижения процента выбраковки донорского материала.

### **3.1 Материал и методы экспериментального исследования**

Исследование было проведено на 30 донорских корнеосклеральных дисках. Критерий выбора донорской роговицы – ПЭК > 2200 кл/мм<sup>2</sup>. Возраст доноров на момент смерти варьировал от 30 до 60 лет. Все донорские корнеосклеральные диски были разделены на три группы (Таблица 10).

Первая группа состояла из 10 корнеосклеральных дисков, на которых применяли стандартную технику подготовки трансплантата для ПДЭК [12].

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 [106].

Третью группу составили 10 дисков, на которых использовали оптимизированный способ № 2 подготовки трансплантата для ПДЭК, который отличается от оптимизированного способа № 1 дополнительным применением искусственной передней камеры. [106].

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

**Таблица 10** – Дизайн экспериментального исследования

1. Экспериментальные исследования	
Экспериментальное изучение воздействия различных способов выкраивания трансплантата для ПДЕК на формирование большого пузыря первого типа. N = 30	Группа I – 10 склерокорнеальных дисков, на которых выполнена стандартная техника выкраивания трансплантата для ПДЭК. N = 10
	Группа II – 10 склерокорнеальных дисков, на которых использовали оптимизированный способ № 1 подготовки трансплантата для ПДЭК. N = 10
	Группа III – 10 склерокорнеальных дисков, на которых использовали оптимизированный способ № 2 подготовки трансплантата для ПДЭК

### **3.2 Классический способ выкраивания трансплантата для ПДЭК**

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) [12]. 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 [12]. Затем в стандартной технике проводят десцеметорексис, полученный трансплантат имплантируют в роговицу реципиента [12].

### **3.3 Оптимизированный способ №1 выкраивания трансплантата для ПДЭК**

#### **3.3.1 Разработка инструментов для оптимизированного способа №1**

##### **3.3.1.1. Шприц с пружинящим поршнем и иглой 30G**

(Патент RU 2787149 от 13.12.2021)

Для пневмодиссекции вместо стандартного 5 мм 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 [168].

В статье, в которой описывается технология ПДЭК, указано на давление, при котором происходит разрыв пузыря [12], однако на практике хирург не измеряет давление при введении иглы в струму. 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

### **3.3.1.2 Основание для выкраивания трансплантата для ПДЭК**

### **3.3.1.3 Кольцевой фиксатор для выкраивания трансплантата для ПДЭК**

Для большей стабильности во время пневмодиссекции профессор Дуа создал зажим для ПДЭК, который изготовлен из стали и имеет пружинную рукоятку с двумя дополнительными кольцами с внутренним диаметром 9 мм. Для удержания зажима в закрытом состоянии имеется центральный стопорный винт, кольца имеют ширину 1 мм, внутренняя поверхность содержит пескоструйную обработку для обеспечения лучшего захвата. Под углом 45 градусов от места крепления рукоятки в толще нижнего кольца находится боковой паз размером  $0,7 \times 1,7$  мм. На верхнем кольце под таким же углом к рукоятке расположена насечка. В зажатом состоянии насечка на верхнем кольце смыкается с пазом на нижнем кольце, образуя отверстие

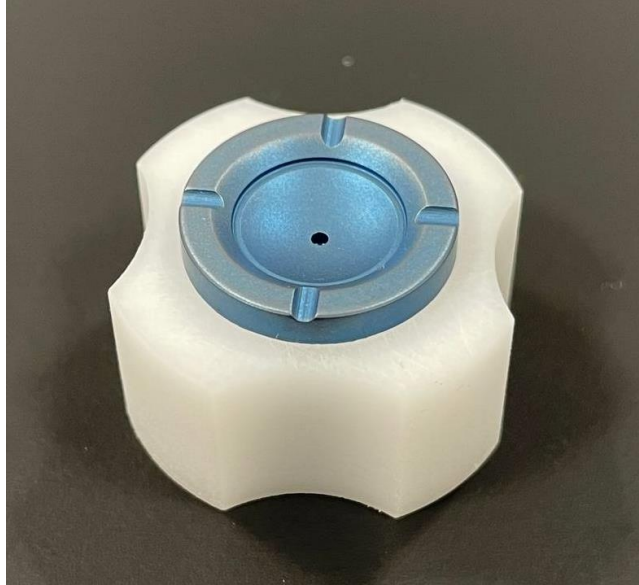
размером 0,9 мм. Место засечки обозначено гравировкой на верхнем кольце. В полностью открытом положении кольца находятся на расстоянии 10 мм друг от друга [166].

Недостатком данного фиксатора, во-первых, является нестабильное положение донорского материала в пространстве в связи с тем, что он не имеет опоры на твердую поверхность и находится навесу у хирурга, что затрудняет правильное введение иглы для проведения пневмодиссекции. Во-вторых, существуют трудности изменения места и угла входа иглы, так как роговица находится в зажатом состоянии между двумя кольцами с фиксированным боковым портом. Была поставлена задача создания фиксатора и его основания для получения трансплантата, предназначенного для ПДЭК.

### **3.3.1.2 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.



**Рис. 2** – Основание для выкраивания трансплантата для ПДЭК (выполнено из металлического корпуса и полимера)



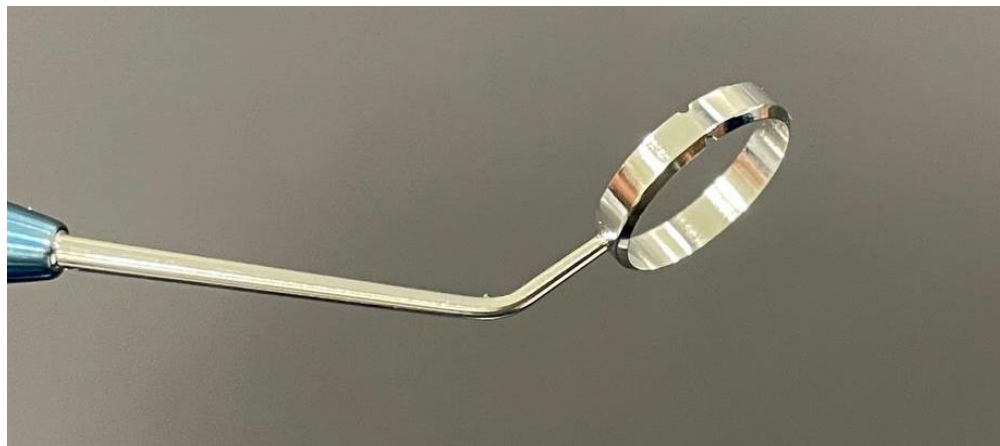
**Рис. 3** – Основание для выкраивания трансплантата для ПДЭК (выполнено из 100% полимера)

### **3.3.1.3 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  $135^\circ$  вверх (рис. 4, 5). 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 [166], который держится на весу, имеет твердое основание, являющееся дополнительной опорой для безопасного проведения пневмодиссекции [169].



**Рисунок 4** – Кольцевой Фиксатор для для выкраивания трансплантата для ПДЭК

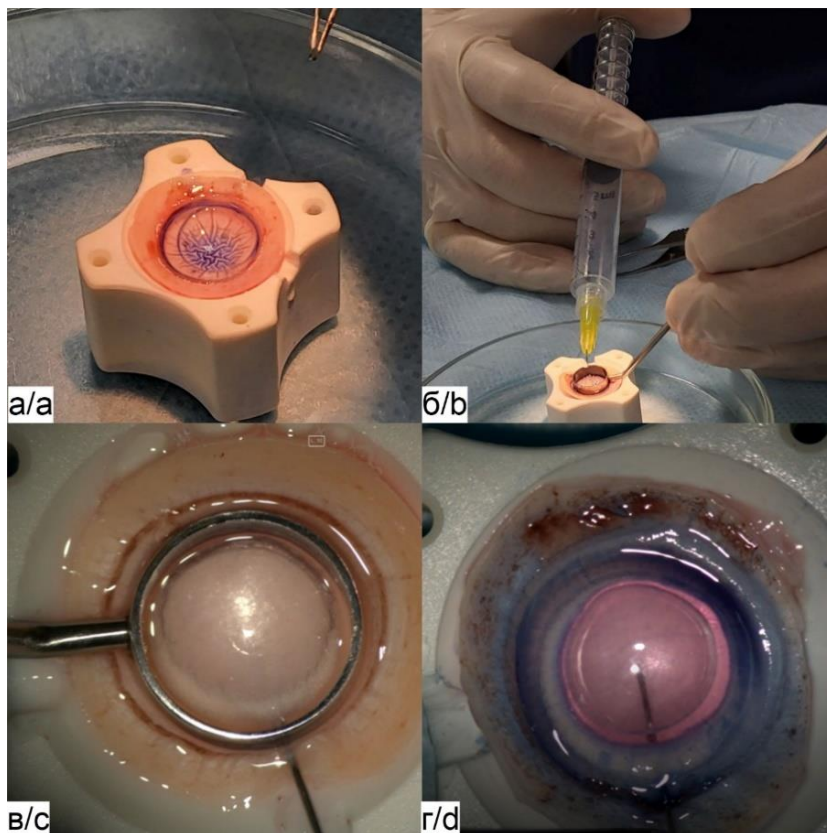


**Рисунок 5** – Кольцевой фиксатор для ПДЭК (полный вид).

### **3.3.2 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. 6, 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. 6, 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. 6, 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. 6, г). Постепенно подавая консервационную среду, отслаивают его до необходимого размера. Далее 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 консервируется по предложенной нами методике для дальнейшего использования (рис. 6) [106].



**Рисунок 6** – Оптимизированная хирургическая техника №1 выкраивания трансплантата для ПДЭК

### **3.4 Оптимизированный способ №2 выкраивания трансплантата для ПДЭК**

При введении воздуха шприцем в стандартной технике преэпителиальной 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 [106].

### **3.4.1. Разработка инструментов для оптимизированного способа № 2**

#### **3.4.1.1. Искусственная передняя камера (ИПК) для ПДЭК**

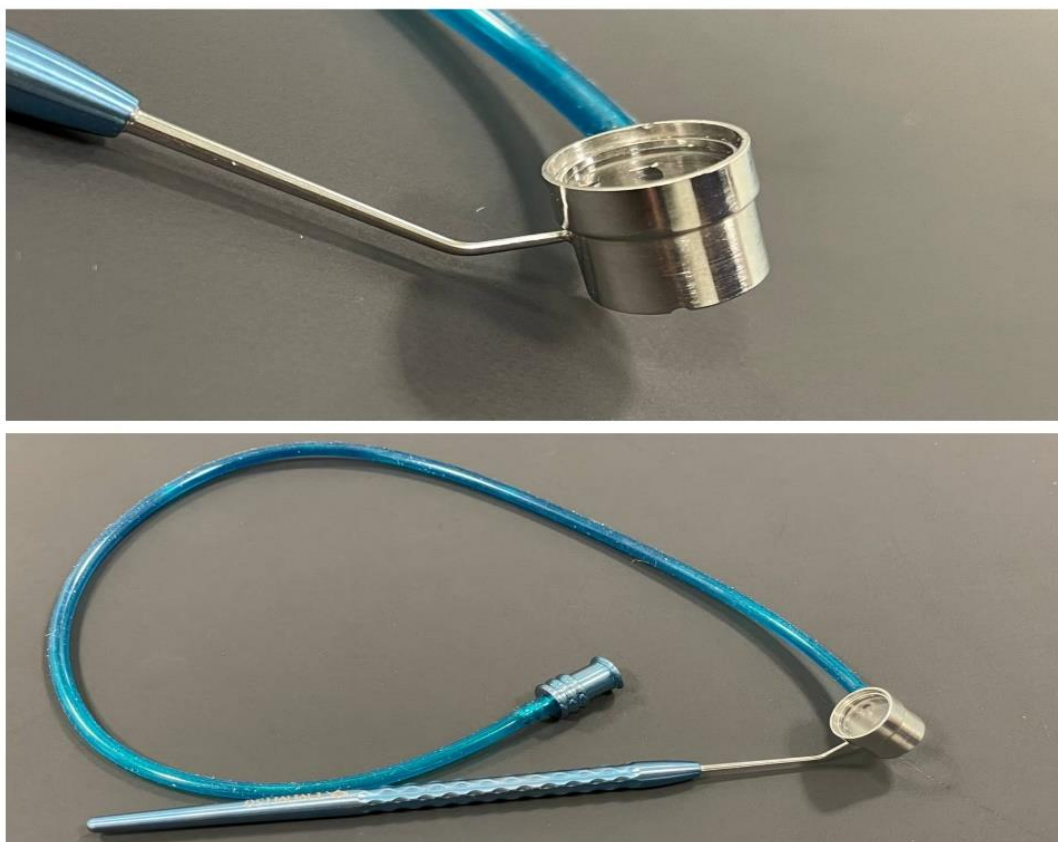
(Патент РФ № 2791988, от 15.03.2023 г.)

ИПК состоит из корпуса и основания для фиксации трансплантата (рис. 7). Корпус с рукояткой выполнены из титанового сплава. Рукоятка состоит из двух участков: первого, соединенного с корпусом под прямым углом, и второго, отогнутого от первого вверх под углом  $135^\circ$ . 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 укладывания 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 [170].

Остальные инструменты для оптимизированной техники №2 уже были описаны выше (раздел «Технический дизайн инструментов для оптимизированной техники №1»).

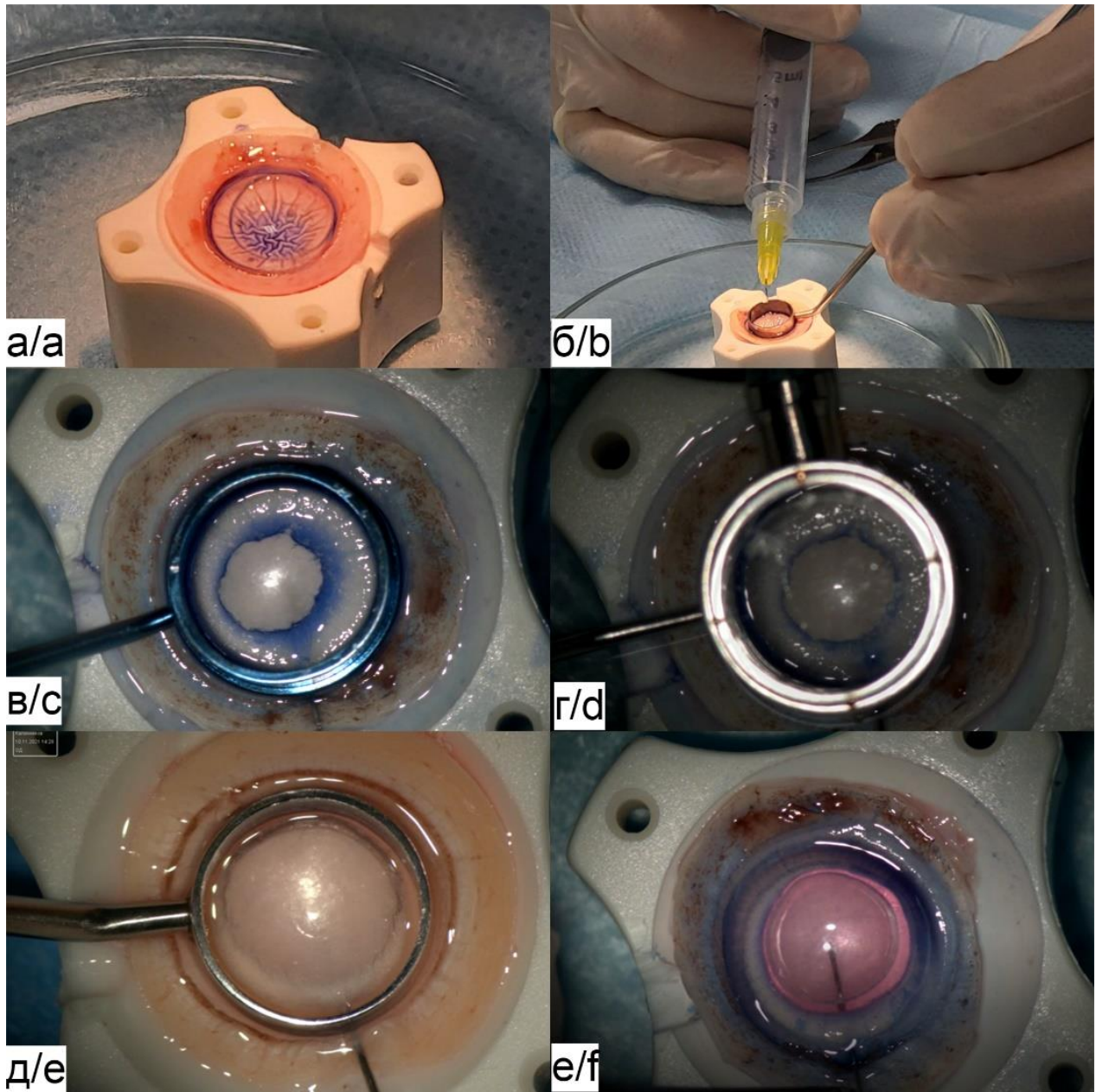


**Рисунок 7** – Искусственная передняя камера для ПДЭК.

### 3.4.2. 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. 8, 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. 8, 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. 8, 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. 8, 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. 8, д). Для расширения пузыря до больших размеров также можно ввести консервирующий раствор внутрь пузыря (рис. 8, е). Затем выполняют парацентез пузыря, внутрь которого вводят

специальный краситель (трипановый синий), а затем по кругу пузыря с помощью ножниц высекают отслоенный трансплантат (рис.8) [106].

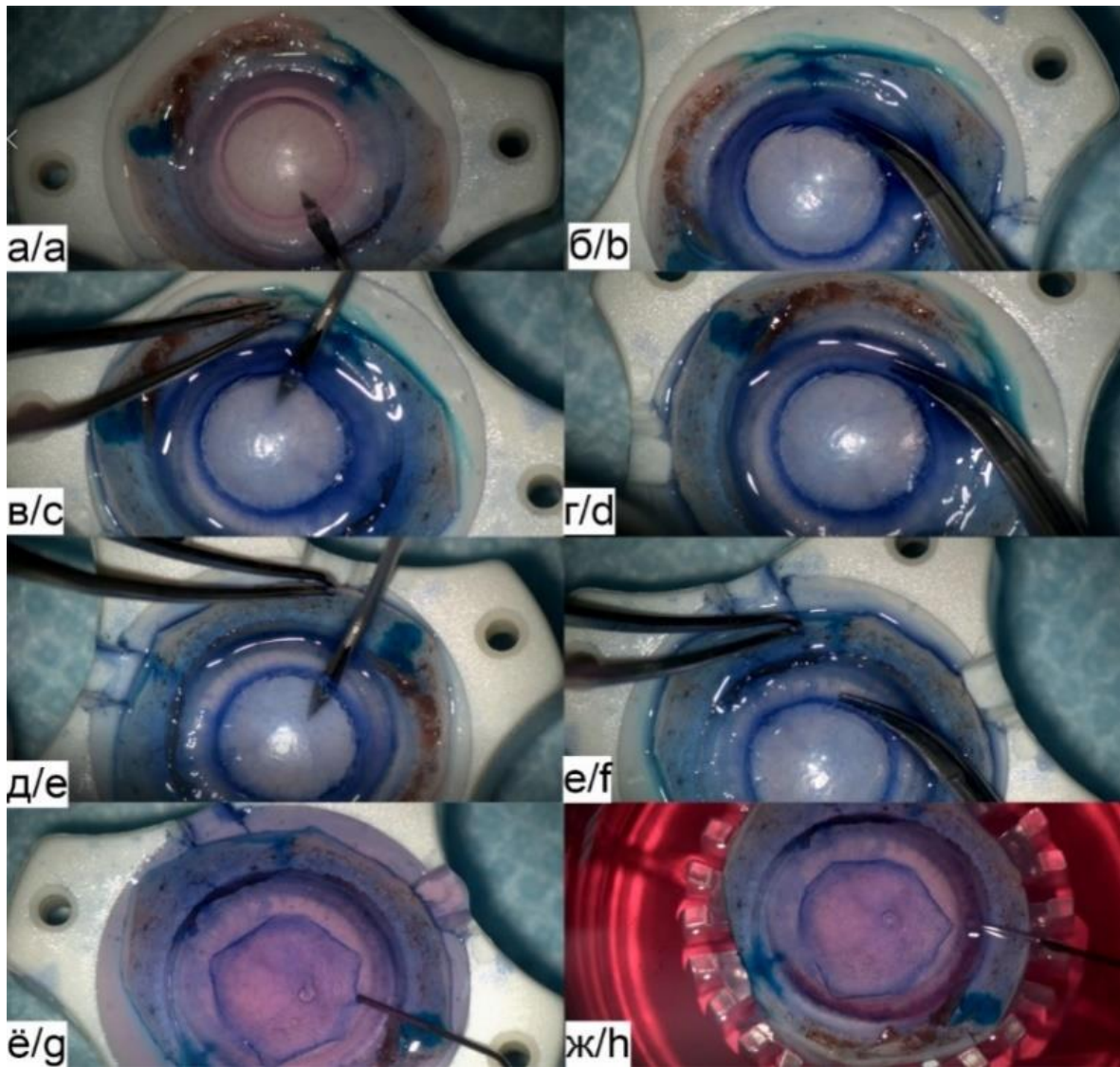


**Рисунок 8 - Оптимизированная техника № 2 выкраивания трансплантата для ПДЭК.**

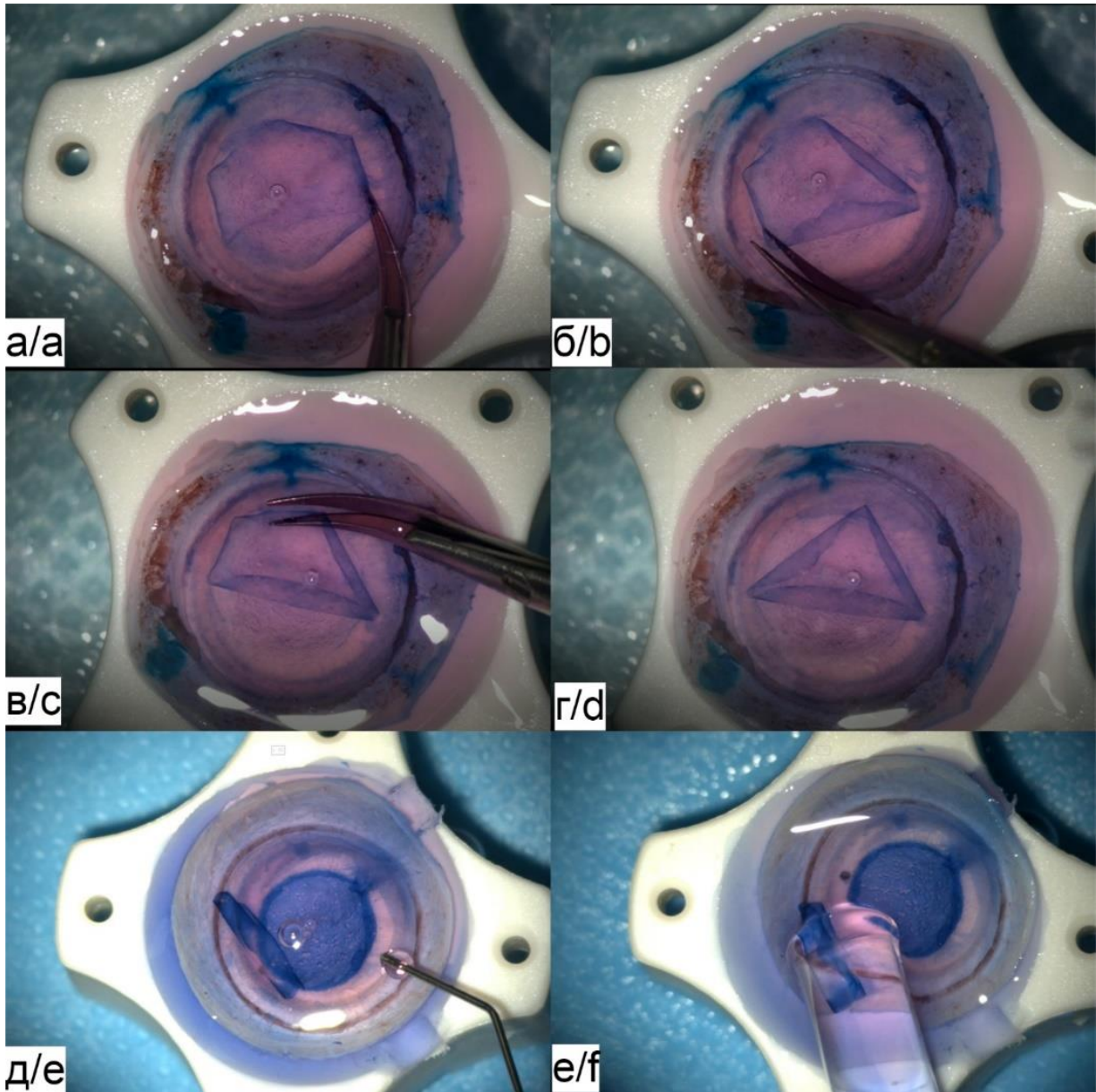
### 3.5 Разработка способа выкраивания и хранения трансплантата для ПДЭК

(Патент РФ на изобретение № 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 склере диска хирургическим маркером наносят три метки на равном расстоянии друг от друга. Рядом с первой меткой выполняют парацентез пузыря (рис. 9, а). Далее ножницами вырезают пузырь до следующей метки на склере (рис. 9, б). После второй метки снова делают парацентез и вырезают пузырь до третьей метки (рис. 9, в, г). После нее снова выполняют парацентез и вырезают пузырь до первой метки (рис. 9, 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. 9, ё, ж). Данная техника консервации не позволяет трансплантату скручиваться и ударяться эндотелием о поверхности 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. 9, 10) [171].



**Рисунок 9** – Техника выкраивания и хранения трансплантата для ПДЭК  
(объяснение в тексте)

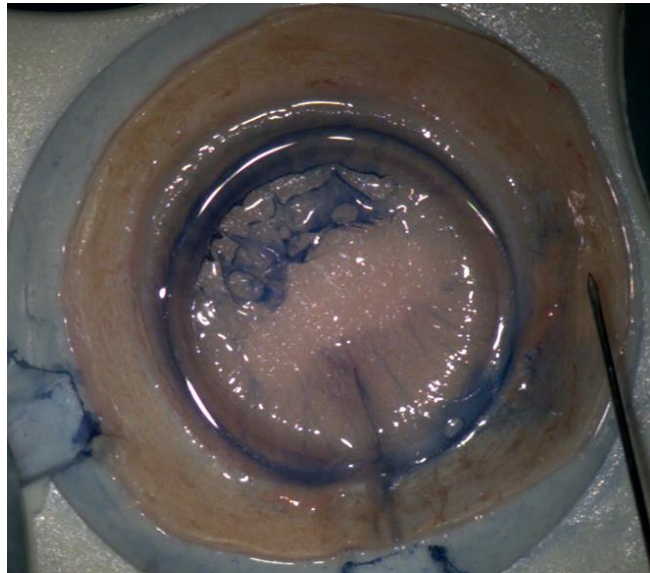


**Рисунок 10** - Трансплантат для ПДЭК после консервации перед имплантацией в переднюю камеру.

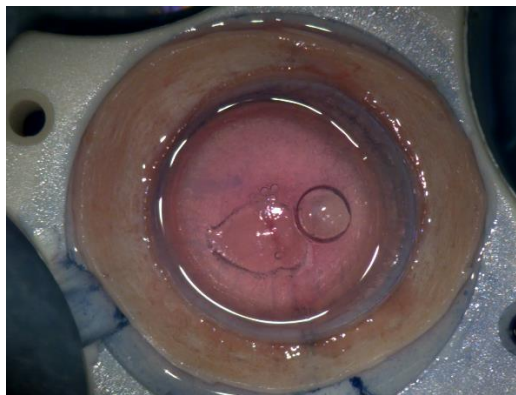
Примечание: а – с помощью ножниц иссекают первый фиксируемый участок; б – с помощью ножниц иссекают второй фиксируемый участок; в – с помощью ножниц иссекают третий фиксируемый участок; г – трансплантат свободен от корнеосклерального лоскута; д – с помощью BSS скручивают трансплантат в рулон, чтобы он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

### 3.6 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 (рис. 11), а в одном – образовался пузырь смешанного типа (рис.12). Даже при работе опытного хирурга самым большим опасением остается именно возможный разрыв пузыря, так как если он лопаются, то такой трансплантат уже непригоден к использованию.



**Рисунок 11 - Разрыв пузыря**



**Рисунок 12 - Пузырь смешанного типа**

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.



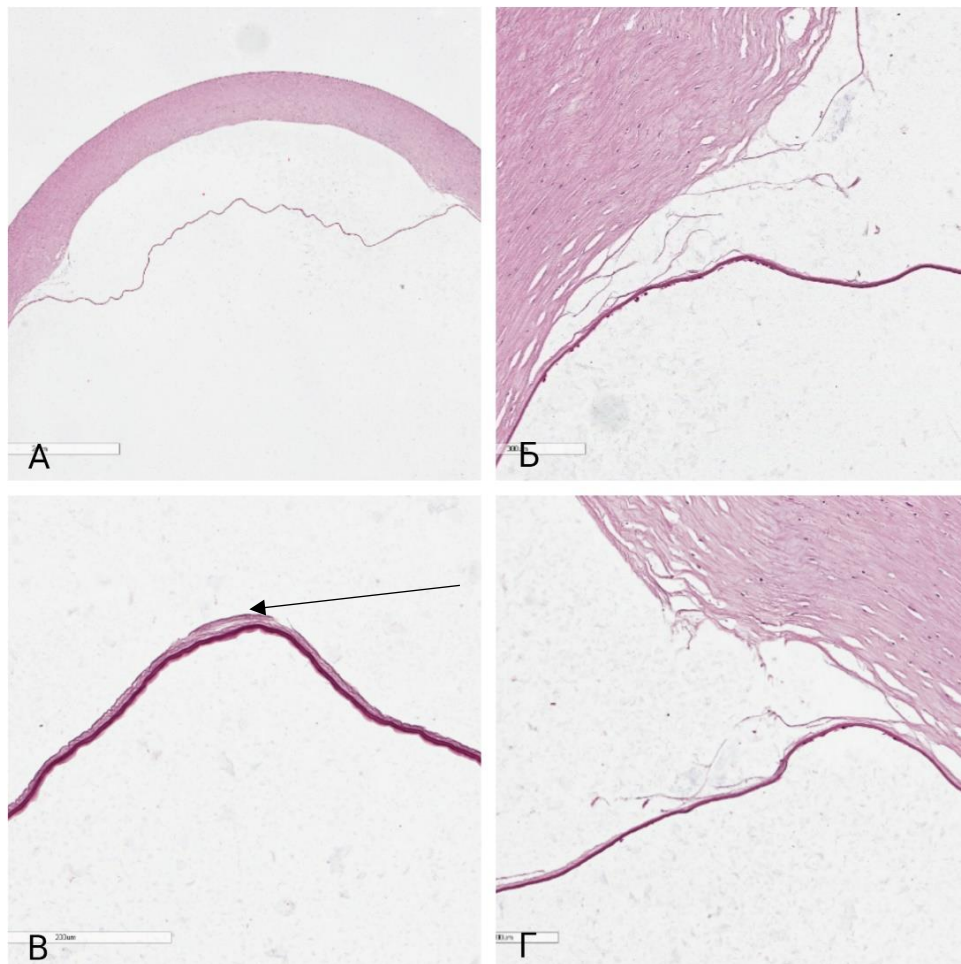
### **3.7. Гистологическое исследование препаратов донорских роговиц, выкроенных различными технологиями ЗПК с помощью световой микроскопии**

Гистологическое исследование препаратов донорских роговиц, выкроенных различными технологиями ЗПК с помощью световой микроскопии 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  $\times 50$ ,  $\times 100x$ ,  $\times 200$ ,  $\times 400$  кратном увеличении с последующим фотографированием.

### 3.7.1 Гистологические исследования донорской роговицы, выкроенной по технологии ПДЭК

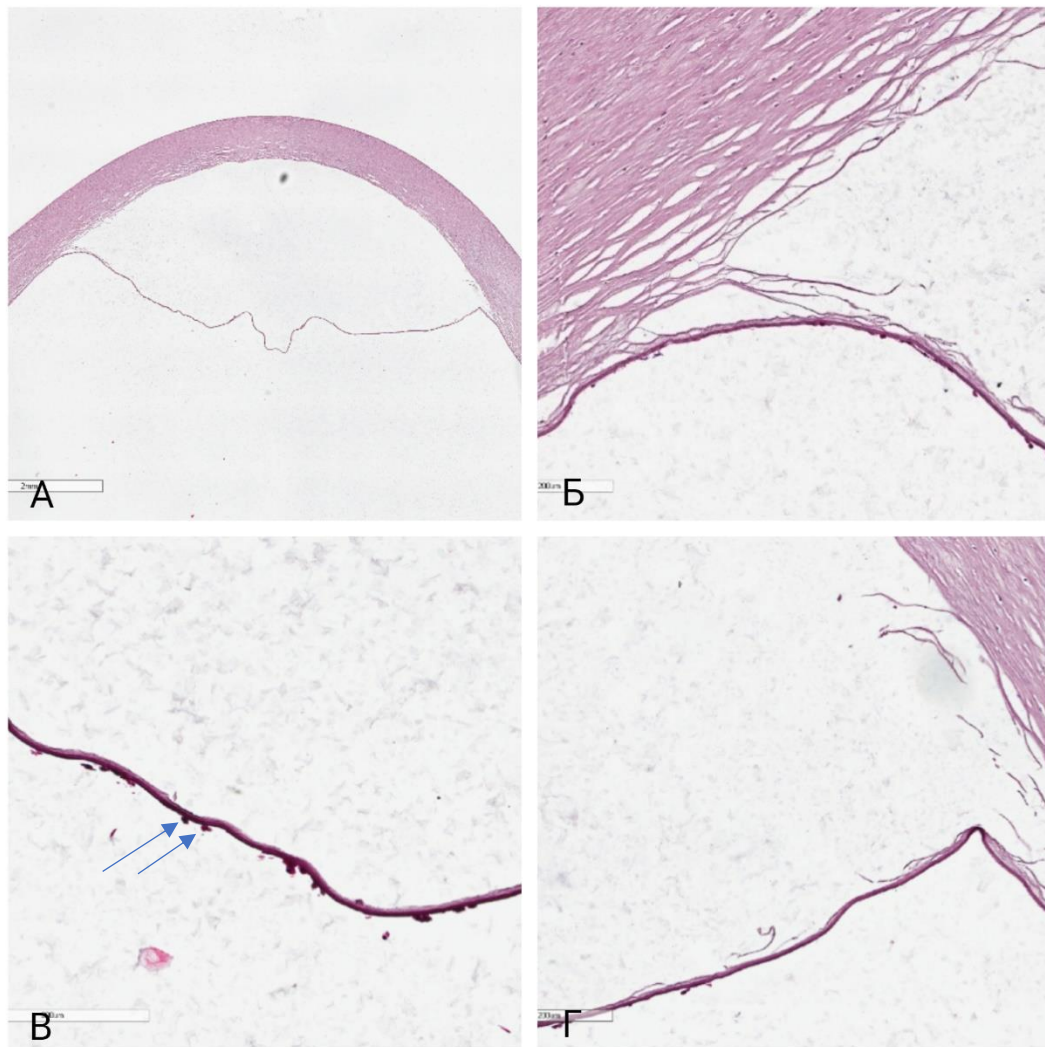
Будущий трансплантат представлен десцеметовой мембраной со слоем Дуа, который состоит из волокон, уложенных в один ряд (рис.13, В). В участках крепления к основной строме имеется часть поврежденных волокон. Единичные ядра эндотелия на трансплантате присутствуют. Волокна задних слоев стромы (или слоя Дуа) без признаков отека и с наличием единичных искусственных микрокавитаций (рис.13).



**Рисунок 13** – 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, лишь в участках крепления к основной строме имеется часть поврежденных волокон. Эндотелий на трансплантате присутствует (рис. 14, В – стрелки). Волокна задних слоев стромы с признаками умеренного отека (рис. 14).



**Рисунок 14** - Гистологический препарат донорской роговицы с моделированием отслойки Десцеметовой мембраны и эндотелия.

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

#### А. Материалы и методы

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». В таблице 11 даны основные характеристики использованного донорского материала.

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

**Таблица 11** – 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 [1]	3А = 10. 3В = 8. 1А = 4
Время консервации	6±3 суток

На всех корнеосклеральных дисках была выполнена оптимизированная методика выкраивания трансплантата для ПДЭК № 1, заключающаяся в использовании кольцевого фиксатора, основания, иглы 30G с 5 мл шприцем с пружинящим поршнем и консервирующим раствором.

После выполнения оптимизированного способа выкраивания трансплантата для ПДЭК № 1, 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.

### **Б. Этапы работы**

Дальнейшая оценка полученных трансплантатов включала в себя 3 последовательных 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 органотипического культивирования с использованием оригинальной методики консервирования трансплантата для ПДЭК.

### **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 1х концентрированного раствора «LiveandDead» и инкубировали при комнатной температуре 10 минут в темноте. Далее 3-х кратно отмывали стерильным раствором фосфатного-солевого буфера.

Оценку жизнеспособности проводили с использованием лазерно-сканирующего конфокального микроскопа Olympus FV 10i.

При оценке жизнеспособности в качестве контроля были использованы ультратонкие задние послойные трансплантаты, выкроенные на микрократоме методом одного реза.

После оценки жизнеспособности трансплантат полностью отделяли от роговицы и фиксировали в 10 %-м растворе формалина в течение 24 часов.

Далее проводили пробоподготовку для сканирующей электронной микроскопии.

Оптимальную дегидратацию обеспечивали раствор ацетона в восходящих концентрациях: 10, 20, 30, 50, 70, 90, 100 × 3 % по 30 минут в каждой с последующей вакуумной сушкой в критической точке.

Когда заканчивалась сушка, образцы монтировали на алюминиевом столике с помощью карбонового клея, напыляли золотом с толщиной слоя 5 нм для обеспечения электронно-проходящего слоя на поверхности образца; помещали в камеру сканирующего электронного микроскопа и исследовали в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 15 кВ.

### **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.

Протокол проведения иммуноцитологического анализа включал в себя 5 этапов (Таблица 12).

**Таблица 12** – Иммуноцитологическое исследование [172]

<i>№</i>	<i>Этап</i>	<i>Описание этапа</i>
1	Фиксация материала	Фиксацию трансплантата проводили в 10%-м растворе формалина (pH-7.4) в течение 24 часов при комнатной температуре. Фиксатор отмывали 3 раза по 5 мин холодным раствором (+4 °С) фосфатно-солевого буфера (pH-7.4).
2	Пермобилизация клеток	Пермобилизацию эндотелиальных клеток проводили 0,25% раствором Triton-X100 в фосфатно-солевом буфере в течение 10 минут. Далее клетки отмывали 3 раза по 5 минут раствором фосфатно-солевого буфера (pH-7.4). Для уменьшения неспецифического связывания антител производили обработку образцов раствором фосфатно-солевого буфера с добавлением 1% бычьего сывороточного альбумина и 0,1% Tween 20. После чего, образцы инкубировали с первичными антителами, разведенными в фосфатно-солевом буфере с добавлением 1% бычьего сывороточного альбумина и 0,1% Tween 20, в течение 1 часа при комнатной температуре. Концентрация антител представлена в Таблице 12. По истечению времени тщательно отмывали образцы раствором фосфатно-солевого буфера (pH- 7.4) 3 раза по 5 мин при комнатной температуре
3	Окраска первичными антителами	Для детекции первичных антител использовали вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромными красителями, разведенными в фосфатно-солевом буфере (pH-7.4) с добавлением 1%-го бычьего сывороточного альбумина и 0,1% Tween 20, инкубировали в течение 1 часа, концентрация антител представлена в Таблице 13.
4	Окраска вторично-меченными антителами	Вторичные антитела отмывали 3 раза по 5 мин раствором фосфатно-солевого буфера (pH-7.4)
5	Контрастирование клеточного ядра	Контрастирование ядер проводили бис-бензими́дом (Hoechst 33258) 0,1 мг/мл в растворе фосфатно-солевого буфера (pH-7.4), по истечению времени краситель также удалялся раствором фосфатно-солевого буфера (pH-7.4) 3 раза по 5 мин. Полученные образцы переносились в чашку Петри с центральным углублением в растворе фосфатно-солевого буфера и хранили при t+4 °С не более 2 дней с момента окраски до момента анализа

**Таблица 13** – Используемые первичные антитела

<i>Наименование антител</i>	<i>Разведение</i>	<i>Источник</i>
ZO- 1	1:100	Кролик
Na/КАТФаза	1:100	Мышь

**Таблица 14** – Используемые вторичные антитела

<i>Наименование вторичных антител</i>	<i>Разведение</i>	<i>Флуорохром</i>
Козьи против Мыши (Goatanti-Mouse)	1:250	AlexaFluor 594 (Ex590; Em617)
Козьи против Кролика (Goatanti-Rabit)	1:250	AlexaFluor 488 (Ex495; Em519)

Исследование производили 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.

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

Для оценки состояния эндотелиальных клеток в отдаленные периоды 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, 2 mM L-глутамин, 1 % раствора антибиотиков, 10 нг/мл эпидермального фактора роста. Культивирование проводили в культуральных матрасах 25 см<sup>2</sup>,



расположенных вертикально, с целью обеспечения необходимого уровня жидкости над роговицей, не более 2 см для исключения недостатка кислорода в объеме культуральной среды. Культивирование проводили при стандартных условиях:  $t+37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , в течение 48 часов, без смены культуральной среды. Образцы выводились через 24 и 48 часов.

## **Статистика**

Для оценки полученных данных использовали методы параметрической и непараметрической описательной статистики с определением средней арифметической величины ( $M$ ) и стандартного отклонения ( $\pm\sigma$ ).

Статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием  $t$ -критерия для зависимых выборок. Различия сравниваемых показателей принимали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью ПО Prisma 8.0.

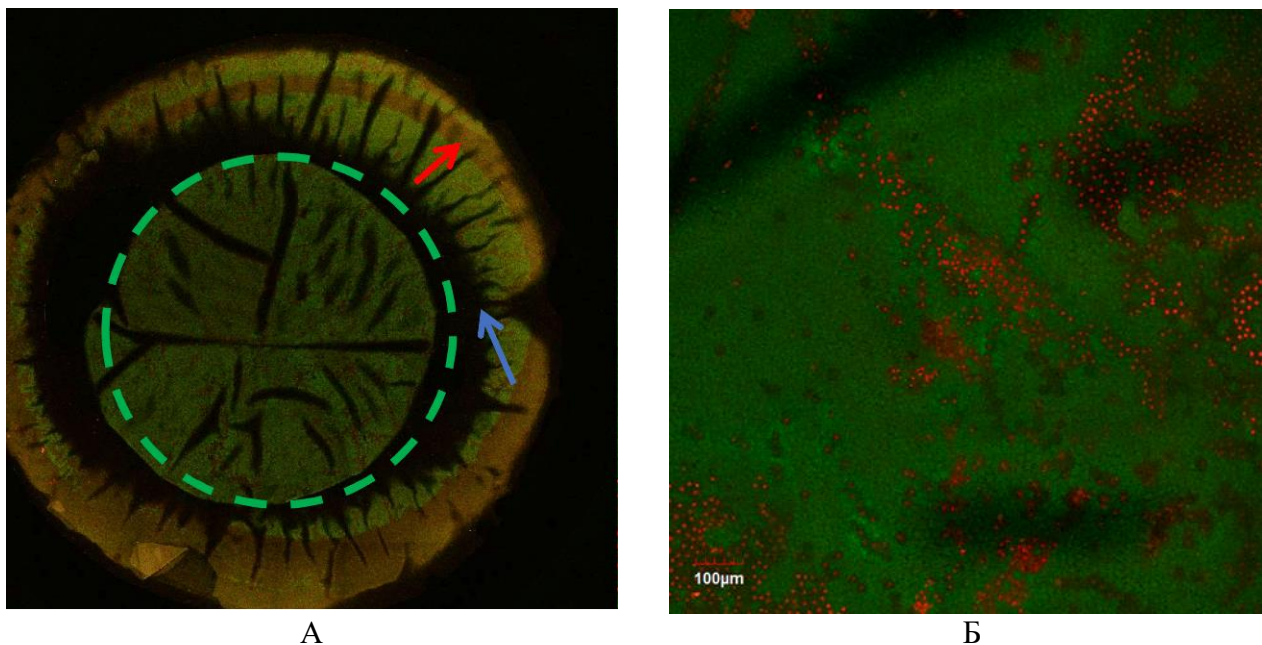
## **В. Результаты**

### **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  $2590\pm 73$  кл/мм<sup>2</sup>, после выкраивания  $2261\pm 200$  кл/мм<sup>2</sup>, снижение было статистически достоверно ( $p = 0.034$ ), таким образом потеря клеток составила  $13,2\pm 0,5$  %. Следует отметить, что в ходе препаровки трансплантата для ТДМ потеря эндотелиальных клеток составляет 11 % [173]. 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.

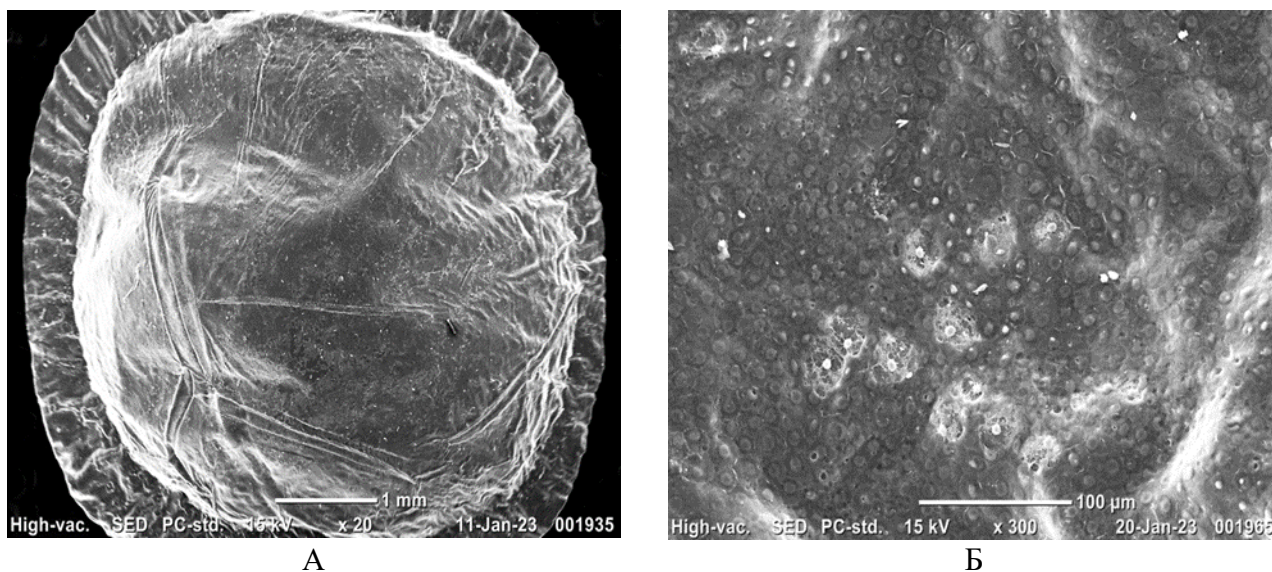
При анализе жизнеспособности было выявлено, что количество живых клеток составило  $89,5 \pm 7,3$  %, мертвых –  $10,5 \pm 3,2$  %, в группе контроля  $86 \pm 6,6$  % и  $14 \pm 7,4$  %, соответственно. Полученные результаты позволили сделать заключение об отсутствии статистической разницы между группами. При этом необходимо отметить наличие выраженной кольцевидной зоны повреждения клеток, наблюдаемой в группе роговиц с ПДЭК (Рисунок 15, красная стрелка). Наличие данного повреждения обусловлено непосредственным воздействием на эндотелий роговицы хирургическим инструментарием в ходе препарирования трансплантата методом ПДЭК. Использование сканирующей электронной микроскопии позволило выявить эндотелиальные клетки с повреждением клеточной мембраны – мертвые клетки (Рисунок 15, Б). Методом мануального подсчета было выявлено, что ПЭК изучаемых образцов составляет  $2461 \pm 120$  кл/мм<sup>2</sup>, количество клеток в которых имелось повреждение клеточной мембраны составило  $9 \pm 2,4$  %, 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.



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

**Рисунок 15** – Окрашивание трансплантата ПДЭЖ методом «LiveandDead»

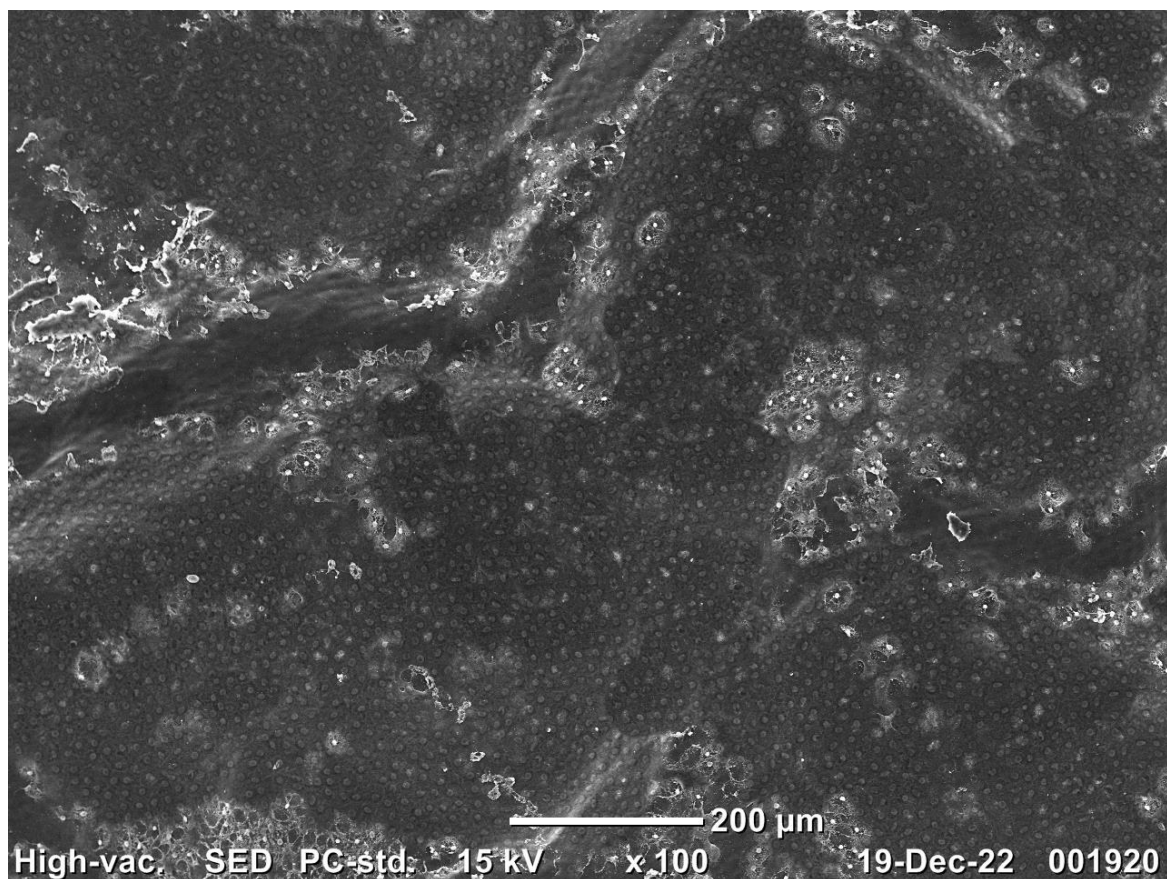
Также в ходе анализа трансплантатов было выявлено, что в некоторых образцах есть места «голой» десцементовой мембраны (Рисунок 16).



Примечание: **А** – увеличение 17×, **Б** – увеличение 300×, видны единичные клетки с ярко выраженным ядром и отсутствием сформированной клеточной мембраны

**Рисунок 16**– Сканирующая электронная микроскопия трансплантата ПДЭЖ

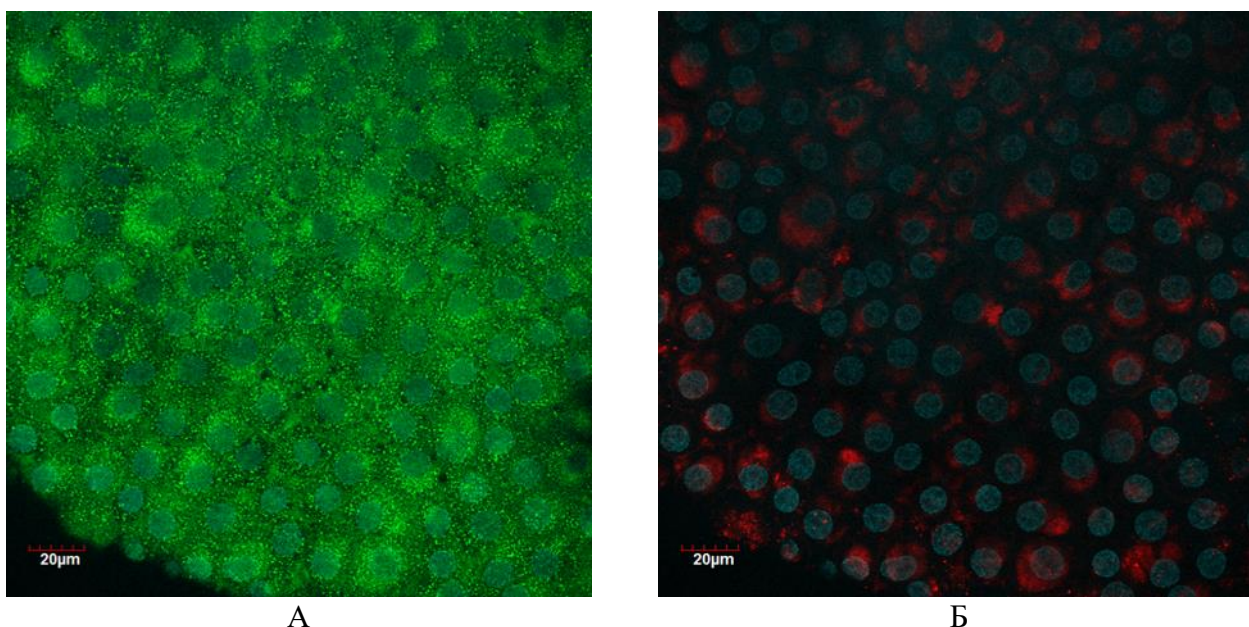
Данное повреждение может быть сформировано в момент консервации корнеосклерального диска, а также в момент проведения препарирования трансплантата, общее отсутствие клеток составило  $5,6 \pm 2,3$  % на  $\text{мм}^2$ . Для анализа ультраструктуры функциональной активности эндотелиальных клеток оценивали экспрессию Na/K-АТФазы и белка плотных межклеточных контактов ZO-1. Натрий-калиевая аденозинтрифосфатаза ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  -АТФаза) характеризует насосную (помпальную) функцию клеток заднего эпителия, которая является ключевой в поддержании гомеостаза роговицы; сохранность эпителиальной природы исследуемых клеток; является маркером плотных межклеточных контактов ZO-1.



**Рисунок 17** – Сканирующая электронная микроскопия трансплантата ПДЭК увеличение  $100\times$ , Отмечается локальная зона «голой» десметовой мембраны. S фотографии составляет  $1,2 \text{ мм}^2$

## Второй этап

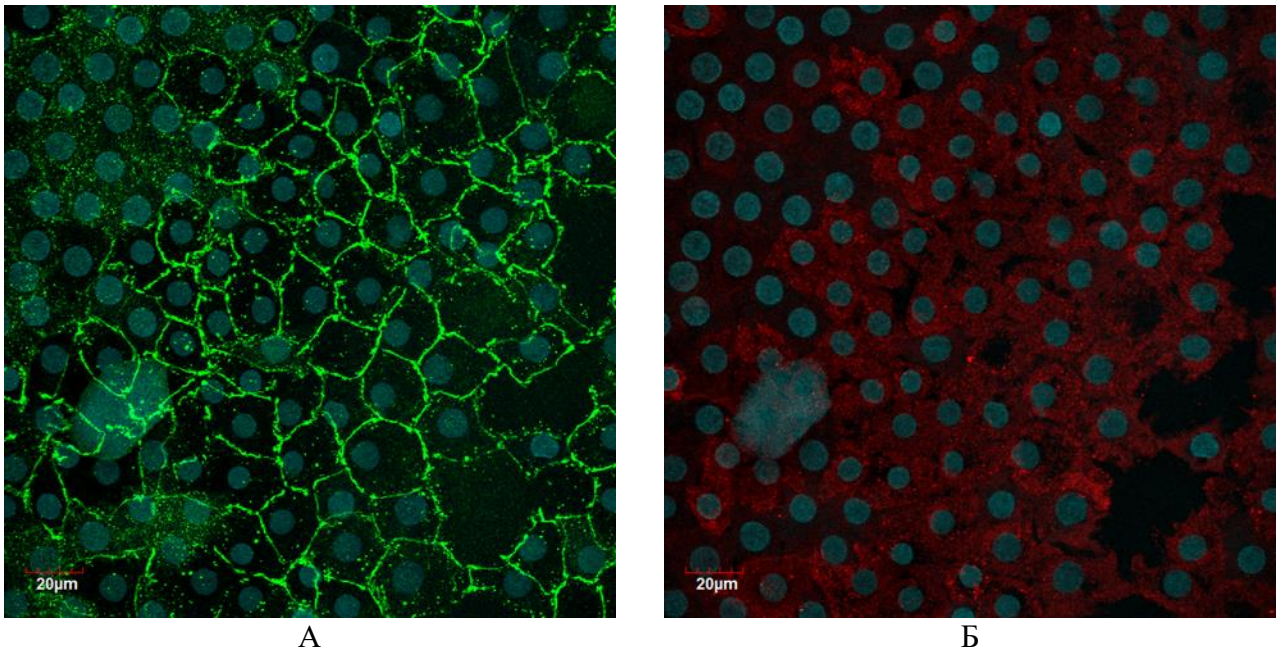
При проведении иммуногистохимического исследования было выявлено значительное повреждение белков плотных контактов ZO-1. В норме при проведении иммуногистохимического исследования отмечается характерная ячеистая «сотовидная» экспрессия ZO-1 (Рисунок 18), однако при исследовании трансплантата PDEK была выявлена «пылевидная» флюоресценция, что возможно обусловлено повреждением молекулы данного белка (Рисунок 18, А).



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

**Рисунок 18** – Иммуногистохимический анализ клеток эндотелия роговицы трансплантата PDEK, увеличение 600×.

Также отмечалось значительное снижение функциональной активности Na/K-АТФазы. Интенсивность экспрессии данного белка была снижена 2,5 раза в сравнении с контролем и составила  $0,0320 \pm 0,0156$  и  $0,0895 \pm 0,01$  условных единиц, соответственно (Рисунок 19, Б).



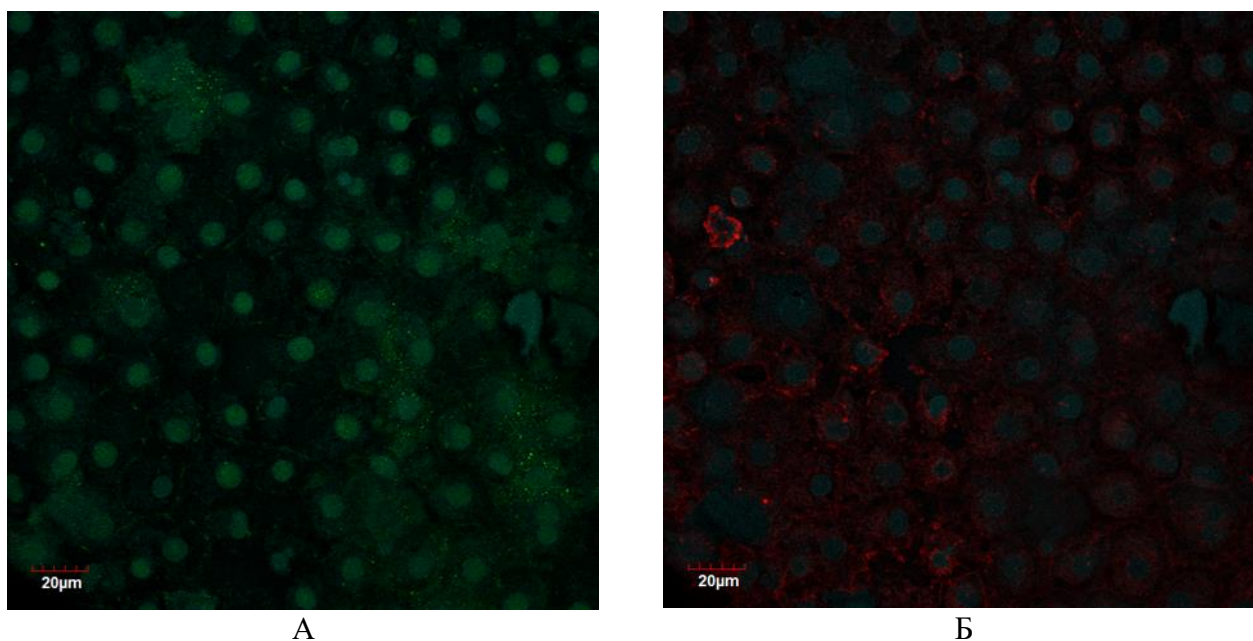
Примечание – А - Экспрессия ZO-1 (AlexaFluor 488), Б - Экспрессия Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -АТФазы (AlexaFluor 594).

**Рисунок 19** – 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.

### Третий этап

Проведенное органотипическое культивирование выявило, что через 24 часа в изучаемых трансплантатах ПДЭК наблюдалось восстановление функциональной активности белка Na/K-АТ Фазы, интенсивность экспрессии повысилась до  $0.0685 \pm 0.012$  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 (Рисунок 20).

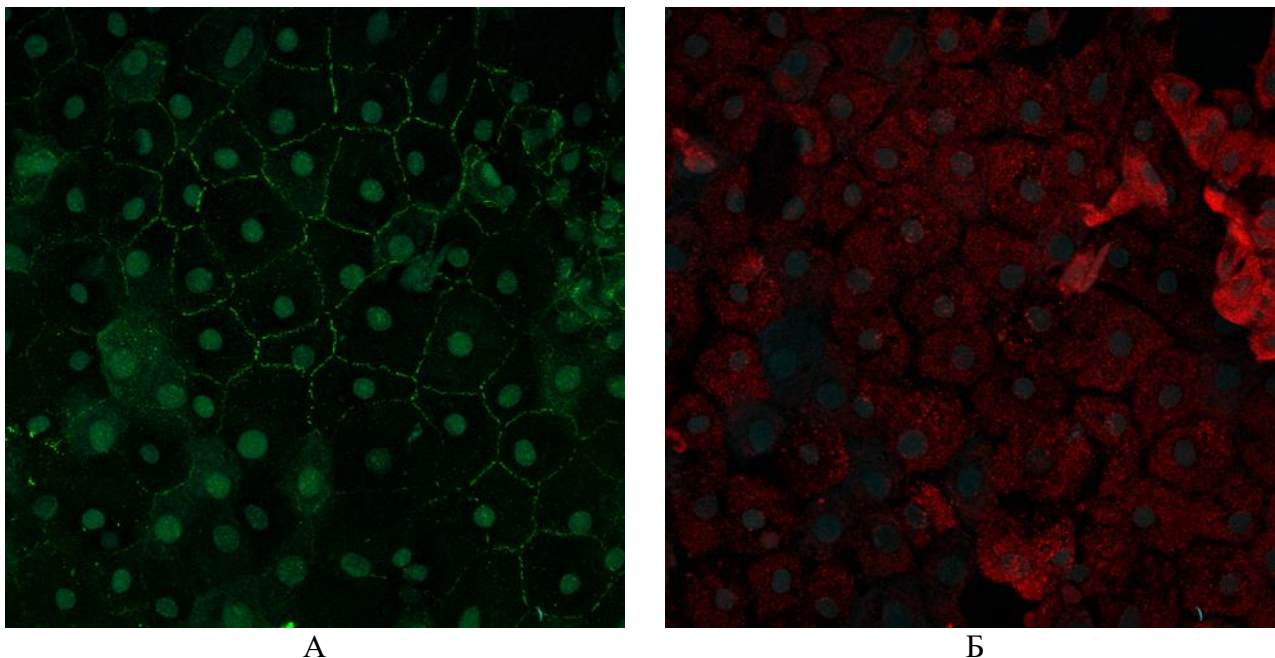


*Примечание* – А – экспрессия ZO-1 (AlexaFluor 488), Б – экспрессия Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -АТФазы (AlexaFluor 594)

**Рисунок 20** – Иммуногистохимический анализ клеток эндотелия роговицы трансплантата ПДЕК через 24 часа после препарирования, увеличение 600×

Через 48 часов культивирования наблюдалось 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 (Рисунок 21).



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

**Рисунок 21** – Иммуногистохимический анализ клеток эндотелия роговицы трансплантата PDEK через 48 часов после препарирования, увеличение 600×

### **Выводы**

1. Потеря эндотелиальных клеток в ходе выполнения модифицированной методики ПДЭК составила 13 %, что является сопоставимым с потерей эндотелиальных клеток при выполнении ТДМ [173]. 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<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-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.

## **Глава 4. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.**

В данной главе представлены особенности техники оперативного вмешательства, послеоперационного периода, интра- и послеоперационных осложнений, особенности восстановления функциональных и анатомических свойств роговицы, сроки зрительной реабилитации. Проведен сравнительный анализ результатов хирургического лечения пациентов всех трех групп на сроках 2 нед., 1, 3, 6, 12 месяцев.

### **4.1 Хирургическая техника предесцементовой эндотелиальной кератопластики (ПДЭК), выполненной по оптимизированной технологии**

Начинать операцию предпочтительнее с этапа заготовки трансплантата для ПДЭК, подробно изложенного в предыдущих разделах работы. После выкраивания трансплантата будет известен его точный диаметр, как правило, 7-8,5 мм, что определит диаметр десцементорексиса. Вырезать трансплантат удобнее изогнутыми ножницами Vannas и только в одном направлении по часовой или против часовой стрелки. При большом увеличении по краю трансплантата будут видны резы от браншей ножниц в определенном направлении, по которым после трансплантации легко определить эндотелиальную сторону. Желательно сохранить корнеосклеральный диск без трансплантата для сравнения до конца операции. После выкраивания трансплантат необходимо разместить в стеклянном прелоаде или инжекторе. С нашей точки зрения, удобнее использовать стеклянный прелоад фирмы Ганс-Гейдер (Германия). К узкой части прелоада через силиконовую трубку присоединяют 1 мм шприц и всю систему заполняют физраствором. Плавающий в физиологическом растворе трансплантат помещают в прелоад при помощи шприца через широкую часть. На силиконовую трубку накладывают зажим рядом с узкой частью. Если в широкой части есть воздух, прелоад необходимо заполнить

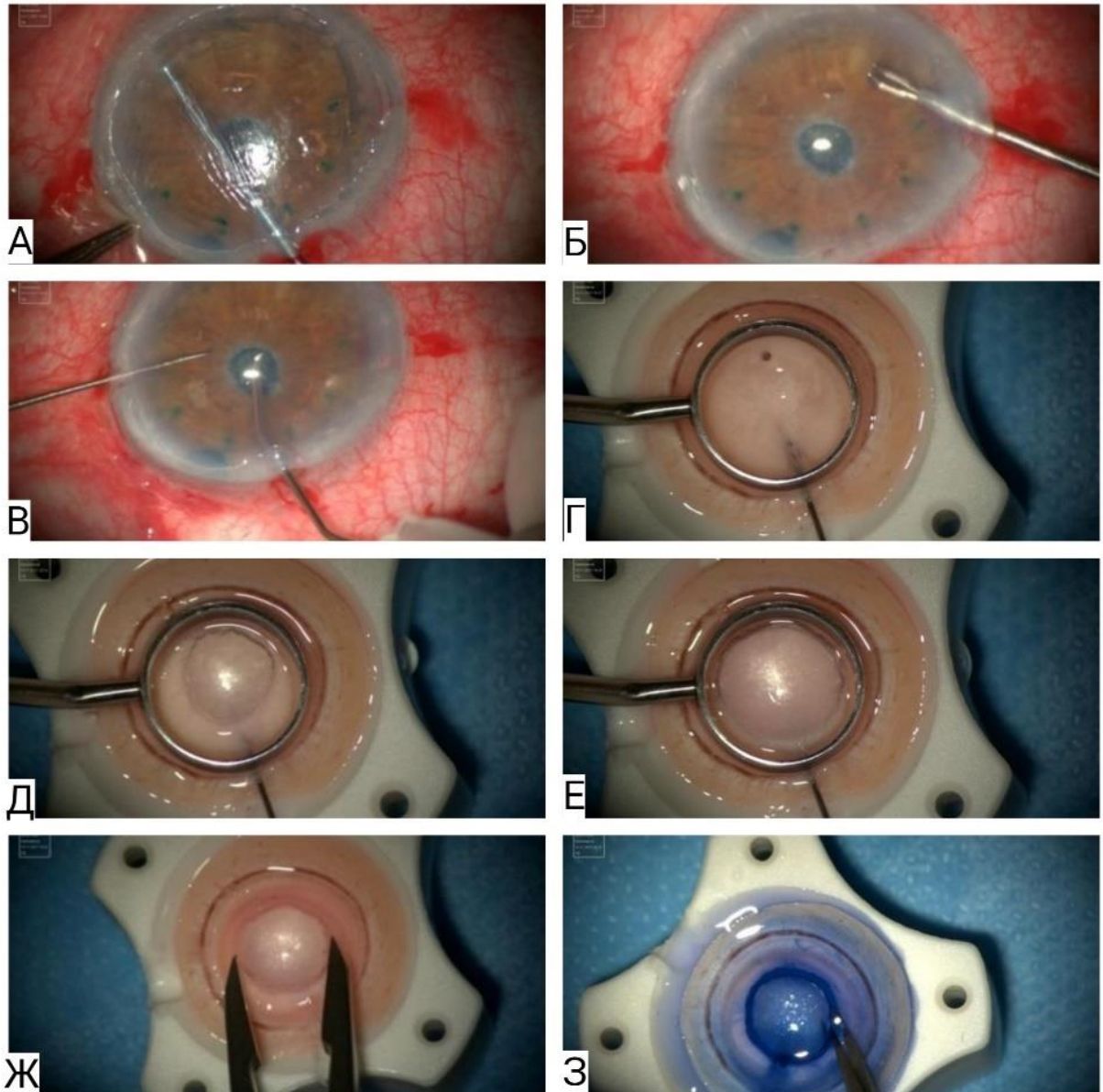
до краев изотоническим раствором. После этого заполненный изотоническим раствором 1 мм шприц вставляют в широкую часть прелоада. В таком виде трансплантат откладывают до следующего этапа операции.

В случае, если используется консервированный трансплантат, отличие лишь в том, что перед помещением его в прелоад требуется отсечь участки фиксации трансплантата к корнеосклеральному диску с помощью ножниц [106].

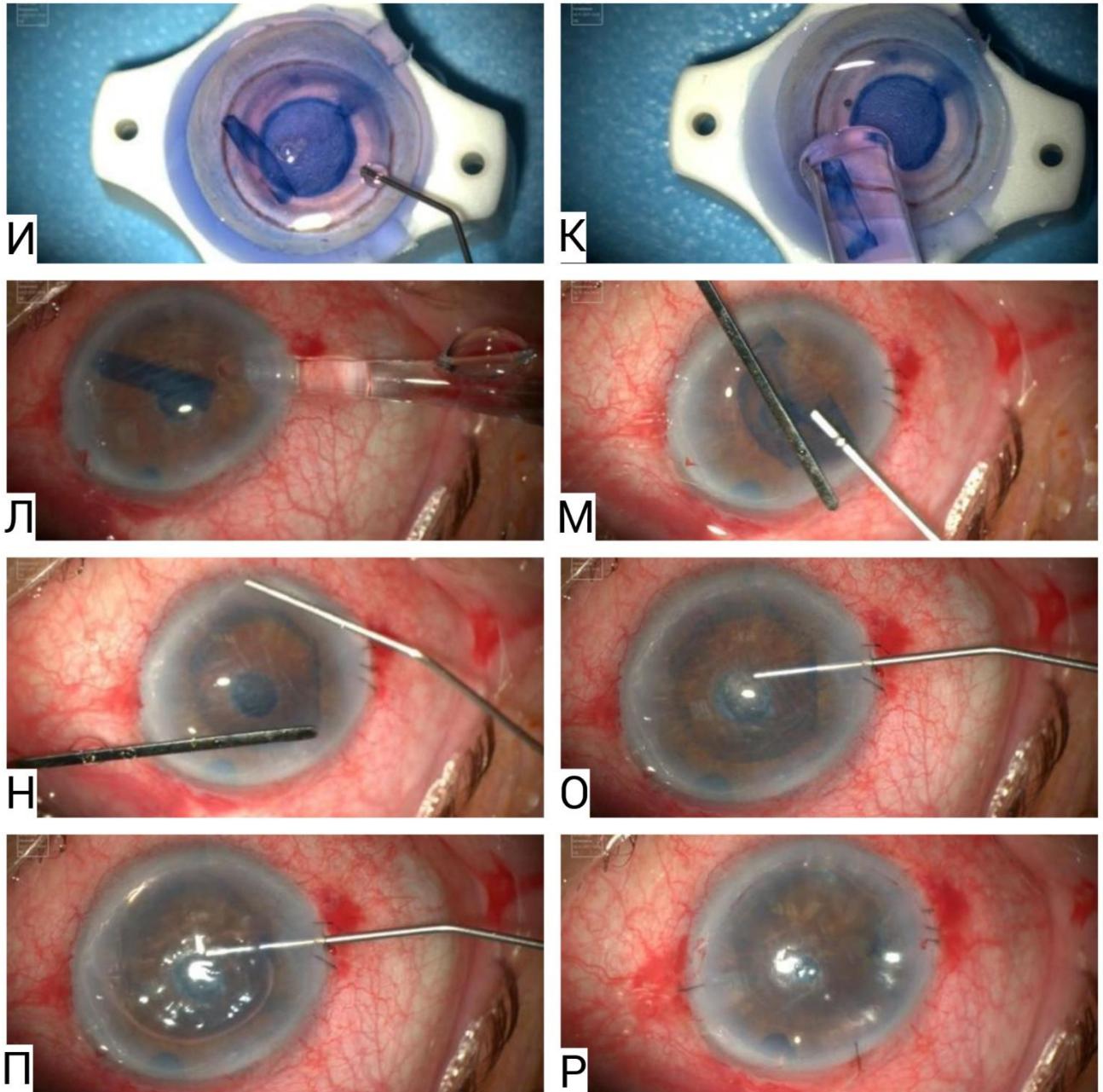
### **Хирургические манипуляции на глазу реципиента**

Операция на глазу реципиента выполняется под местной инфильтрационной анестезией. В верхненаружном или верхневнутреннем конъюнктивальном своде в субтенноново пространство вводят 2 мл 0,5 % раствора бупивакаина гидрохлорида. С помощью скребца удаляют роговичный эпителий на площади 9-10 мм для лучшей визуализации. При помощи хирургического маркера наносят точечную разметку диаметром 7,5-8 мм. Производят 2 парацентеза 21G на 9 и 15 часах. Для удобства манипуляций в ПК возможно нанесение дополнительных парацентезов на 12 и 18 часах. В переднюю камеру вводят миотик для достижения максимального сужения зрачка. Переднюю камеру полностью заполняют когезивным вискоэластиком (Провиск, Хеалон-GV, Когевиск и т.п). С помощью шпателя Синского и обратного цангового пинцета выполняют десцеметорексис в пределах разметки. Используя загнутую иглу 30G со стороны пигментного листка и крючок для разворота ИОЛ с передней стороны радужки, формируют базальную иридотомию в нижних отделах радужной оболочки. Если прозрачность роговицы позволяет, то ИАГ-лазерная базальная иридэктомия может быть выполнена предоперационно. Затем вискоэластик тщательно удаляют с помощью ирригационно-аспирационной системы. Один из парацентезов расширяют до 2,2–2,5 мм. На большом увеличении под микроскопом изучают характер свертывания и положение трансплантата в прелоаде, что учитывается при введении тонкой

части прелоада в парацентез. Нажатием шприца трансплантат направляют в переднюю камеру глаза. На основной разрез и парацентезы накладывают узловые погружные швы нейлон 10/0. Используя прижимающие и толкающие воздействия 2 тонких шпателей через роговицу, трансплантат расправляют и располагают в нужном месте. Техническим приемом, помогающим влиять на трансплантат, является аккуратное заполнение и опорожнение ПК изотоническим раствором. Важным этапом операции является 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. Для фиксации трансплантата используют 20 % газоздушную смесь (SF<sub>6</sub> – стерильный воздух). Тонкую канюлю на шприце проводят через парацентез по радужке под трансплантат в область зрачка, после этого переднюю камеру заполняют газоздушной смесью до легкого гипертонуса (Рисунок 22). Субконъюнктивально вводят раствор дексаметазона, а конъюнктивальную полость и роговицу орошают раствором антибиотика. На роговицу накладывают контактную линзу. 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 [106].



**Рисунок 22** - Операция – прездотелиальная кератопластика с десцеметорексисом. (ПДЭК) по оптимизированной технологии.



**Рисунок 22** – Продолжение операции – преэпителиальная кератопластика с десцеметорексисом. (ПДЭК) по оптимизированной технологии.

## 4.2 Хирургическая техника операции трансплантации десцеметовой мембраны с эндотелием (ТДМ)

Основные этапы трансплантации десцеметовой мембраны (ДМ) приведены в Таблице 15.

**Таблица 15** – Техника трансплантации ДМ [8]

<i>Этап</i>	<i>Последовательность действий</i>
Подготовка донорского трансплантата	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Корнеосклеральное кольцо захватывают держателем. ДМ совместно с трабекулярной сетью соскабливают на протяжении 360° при помощи ножа «хоккейная клюшка».</li> <li>2. Производят полное отделение ДМ с прилежащей трабекулярной сетью от подлежащей стромы. Благодаря ригидности и относительно большему молекулярному весу трабекулярной сети не происходит закручивания ДМ.</li> <li>3. Окрашивают ткань раствором трипанового синего.</li> <li>4. Окрашенную ткань перемещают на мягкую контактную линзу, где производят трепанацию с помощью трепана 9,5 мм.</li> <li>5. Сформированный «десцеметовый ролл» с эндотелиальным слоем, расположенным снаружи, помещают в органическую питательную среду</li> </ol>
Имплантация трансплантата	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Заранее препарированный трансплантат переносят в стеклянную чашку, где промывают сбалансированным водно-солевым раствором при помощи стеклянной пипетки.</li> <li>2. Окрашивают ткань 0,06%-м раствором трипанового синего на протяжении от 3 до 5 мин. Окрашивание производят до тех пор, пока ткань трансплантата не окрасится в голубой цвет, что необходимо для лучшей ее визуализации в передней камере во время операции</li> <li>3. Трансплантат аспирируют в стеклянный инжектор Geuder и имплантируют в переднюю камеру.</li> <li>4. После определения правильного положения трансплантата его раскрывают и центрируют путем легких ударов канюлей по наружной поверхности роговицы.</li> <li>5. Для полного прилегания ткани вводят газоздушную смесь в переднюю камеру и герметизируют все разрезы</li> </ol>

### 4.3. Хирургическая техника проведения ФЛ-ЗПК

Основные этапы проведения ФЛ-ЗПК приведены в Таблице 16.

**Таблица 16** – Техника проведения ФЛ-ЗПК [174, 175]

<i>Этап</i>	<i>Последовательность действий</i>
Предоперационная подготовка	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Проводили субтеноновую анестезию (Лидокаин 2% – 1,0). Все манипуляции выполняли по стандартной методике.</li> <li>2. Анестезию дополняли закапыванием в конъюнктивальную полость анестетика (Алкаин 0,5%) 3 раза с интервалом 5 минут.</li> <li>3. Выкраивание трансплантата осуществляли с помощью ФЛ Visumax 500 (Zeiss, США) по классической методике. Рез донорской ткани осуществляли со стороны эндотелия на глубину 120 мкм.</li> <li>4. Остаточные тканевые мостики в послойном срезе (между трансплантатом и глубже лежащей стромой) разделяли тупым шпателем.</li> <li>5. Готовый трансплантат укладывали в глайд Бузина в виде дубликатуры, предварительно нанеся полоску вискоэластика 1% гиалуроната натрия на эндотелий по центру</li> </ol>
Кератопластика	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. На глазу реципиента копьевидным ножом выполняли 2 парацентеза на 1 и 3 часах, шириной 0,9 мм.</li> <li>2. В меридиане 9 часов производили склерокорнеальный тоннельный разрез, шириной 4,5 мм.</li> <li>3. Через парацентез камеру заполняли когезивным вискоэластиком.</li> <li>4. С помощью обратного крючка Синского производили круговой десцеметорексис диаметром 9 мм, с последующим удалением ДМ из передней камеры реципиента.</li> <li>5. На 6-7 часах выполняли колобому радужки при помощи 25G загнутой иглы и микрокрючка для разворота.</li> <li>6. После вымывания раствора вискоэластика в парацентез на 1 часе вводили ирригационную трубку. Введение трансплантата в переднюю камеру осуществляется через главный разрез на 9 часах, путем захвата края донорской ткани интраокулярным пинцетом, введенным через парацентез на 3 часах.</li> <li>7. Для лучшей герметизации главный разрез и 2 парацентеза ушивали нитками 10-0 Nylon.</li> <li>8. Под конъюнктиву вводили 0,5 ml раствора антибиотика (гентамицин) и кортикостероида (дексаметазон). Воздух оставляли в передней камере реципиента до полного рассасывания</li> </ol>



#### **4.4 Сравнительный анализ клинико-функциональных показателей пациентов в послеоперационном периоде**

Оценка эффективности хирургического лечения основывалась на анализе показателей НКОЗ/МКОЗ, центральной толщины роговицы и толщины трансплантата по данным оптической когерентной томографии переднего отрезка глаза, ПЭК по данным эндотелиальной микроскопии. Для анализа использовали результаты вышеуказанных показателей в динамике на сроках 2 нед., 1, 3, 6, 12 месяцев после оперативного лечения.

#### 4.4.1 Результаты сравнительной оценки величины некорригированной остроты зрения вдаль в исследуемых группах пациентов

В послеоперационном периоде выявлено увеличение показателей НКОЗ во всех группах наблюдения по сравнению с дооперационными значениями ( $p < 0,05$ ) (Таблица 17). При этом показатели НКОЗ были одинаково высоки в основной и контрольной группе I, а худшие показатели НКОЗ во все сроки наблюдения были отмечены в контрольной группе I.

**Таблица 17** – Результаты сравнительной оценки величины некорригированной остроты зрения вдаль в исследуемых группах пациентов в течение 12 месяцев после операции ( $M \pm m$ )

Группы пациентов	Срок наблюдения				
	1 нед.	1 мес.	3 мес.	6 мес.	12 мес.
Основная группа (n=25)	0,2±0,03	0,4±0,09	0,5±0,04	0,7±0,02	0,8±0,05
Контрольная группа I (n=27)	0,1 ±0,6	0,3±0,13	0,5±1,1	0,6±1,4	0,8±0,02
Контрольная группа II (n=32)	0,05±0,04	0,1±0,03	0,2±0,13	0,3±0,07	0,4±0,1

#### 4.4.2 Результаты сравнительной оценки величины максимально корригированной остроты зрения вдаль в исследуемых группах пациентов

Показатели МКОЗ в послеоперационном периоде увеличились во всех исследуемых группах по сравнению с дооперационными значениями ( $p < 0,001$ ). При этом показатели МКОЗ были одинаково высоки в основной группе и контрольной группе I, а худшие показатели НКОЗ во все сроки наблюдения были отмечены в контрольной группе II. Между основной и контрольной группой I статистически значимых различий на всех сроках наблюдения не было выявлено ( $p > 0,05$ ). Статистически значимые различия были выявлены между основной и контрольной группой II, а также между контрольными группами I и II ( $p < 0,05$ ) (Таблица 18).

**Таблица 18** – Результаты сравнительной оценки величины максимально корригированной остроты зрения вдаль в исследуемых группах пациентов в течение 12 месяцев после операции ( $M \pm m$ ).

Группы пациентов	Срок наблюдения				
	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

#### 4.4.3. Результаты сравнительной оценки других функциональных показателей в исследуемых группах пациентов

При проведении сравнительного анализа других показателей в срок 12 мес. после операции не было выявлено статистически значимых различий между тремя группами ( $p > 0,05$ ) (Таблица 19).

**Таблица 19** - Значения других показателей в сроки 12 мес. после операции в группах исследования ( $M \pm m$ ,  $n=84$ )

Исследуемые параметры	Основная группа (n=25)	Контрольная I группа (n=27)	Контрольная II группа (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

#### 4.5 Послеоперационные осложнения

Целью данного раздела явилось описание течения послеоперационного периода и сравнительный анализ послеоперационных осложнений у пациентов исследуемых групп.

В раннем послеоперационном периоде в течение первых суток после оперативного лечения у всех пациентов отмечалась легкая инъекция конъюнктивальной оболочки, роговица пациентов всех трех групп исследования была слегка отечной на второй день после операции, трансплантат характеризовался наличием единичных складок десцеметовой оболочки. В первые сутки после операции эпителизации ни у одного из пациентов не отмечалось. Первые признаки эпителизации появились на 2-3 сутки после операции. Процесс эпителизации завершался в течение 7 дней после оперативного вмешательства. При выявлении буллезных изменений или определении замедленной эпителизации пациентам назначали ношение мягких контактных линз.

Все пациенты получали стандартные назначения, включающие инстилляцию антибиотика, стероидного препарата, кератопротектора и гелей, а также парабульбарные инъекции стероидных препаратов.

Стоит отметить, что количество осложнений в основной группе было существенно меньше, чем в контрольных I и II группах. 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 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 II группы. 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 (Таблица 20). Данное состояние купировалось усиленным режимом кортикостероидной терапии.

**Таблица 20** – Особенности течения послеоперационного периода после различных видов задней послойной кератопластики.

Послеоперационные осложнения	Основная группа (n=25)	Контрольная I группа (n=27)	Контрольная II группа (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%)

#### 4.6 Сравнительный анализ результатов оптической когерентной томографии роговицы

Раздел посвящен описанию результатов сравнительного анализа данных оптической когерентной томографии роговицы, а также их динамике у пациентов исследуемых групп. Раздел посвящен описанию результатов сравнительного анализа данных оптической когерентной томографии роговицы, а также их динамике у пациентов исследуемых групп.

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 (Таблица 21).

**Таблица 21** – Результаты сравнительной оценки толщины трансплантата в центральной зоне по данным ОКТ у пациентов с БК, мкм ( $M \pm m$ )

	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	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$

Динамика ЦТР по данным ОКТ в трех группах исследования отражена в таблице 22. 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.

**Таблица 22** – Результаты сравнительной оценки ЦТР, включая толщину трансплантата, по данным ОКТ у пациентов с БК, мкм ( $M \pm m$ )

	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	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05



#### 4.7 Сравнительный анализ снижения плотности эндотелиальных клеток в послеоперационном периоде

Целью исследования была прижизненная оценка потери ЭК в различные сроки после трансплантации. Для этого было необходимо провести эндотелиальную биомикроскопию и выполнить сравнительный анализ ПЭК в динамике в трех группах на разных сроках после операции.

В послеоперационном периоде у пациентов регистрировали постепенное снижение ПЭК во всех группах исследования (таб. 23). 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 23** – Сравнительный анализ снижения плотности эндотелиальных клеток в послеоперационном периоде.

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

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ПДЭК является новой и актуальной техникой задней послойной кератопластики ввиду ряда преимуществ: возможности использования материала от молодых доноров и легкого манипулирования трансплантатом в передней камере, минимального процента осложнений, высоких функциональных результатов, сопоставимых с таковыми ТДМ [14]. Толщина получаемого трансплантата (25–30 мкм) [12] является «золотой серединой» между ЗАПК (100–120 мкм) [101] и ТДМ (10–15 мкм) [102].

Несмотря на успешные отчеты некоторых хирургов о данной технологии [14, 176], статистика [1] говорит о недостаточной стабильности техники по подготовке и консервации трансплантата ПДЭК, что и является камнем преткновения для масштабного применения данной методики на практике.

Стандартный способ выкраивания ПДЭК сопряжен с многими рисками [177]. Во-первых, высока вероятность разрыва пузыря из-за трудности дозирования силы надавливания поршня для введения воздуха, что может привести к выбраковке донорского материала или получению трансплантата меньше необходимого размера. Во-вторых, отсутствует стабильная фиксация донорской ткани при введении иглы, в результате чего может произойти перфорация десцеметовой мембраны и гибель эндотеалиальных клеток. Так, P. Bedard и соавт. выявили 16,8% (22/131) случаев потери донорского материала в связи с перфорацией эндотелия с десцеметовой мембраны во время пневмодиссекции [18]. В-третьих, есть риск образования пузыря второго типа и смешанного типа, так как воздух всегда устремляется на периферию и отслаивает десцеметову мембрану от слоя Дуа, а не слой Дуа от стромы. В статье хирурга M. Tsatsos и соавт. доля случаев успешного получения «большого пузыря» первого типа среди 40 донорских роговиц составляла 85% (34/40), показатель получения «большого пузыря» второго типа

составлял 10%, а пузырь смешанного типа был зафиксирован в 5% случаев [178]. Следует отметить, что авторы использовали для отслаивания трансплантата методики пневмодиссекции и гидродиссекции. При пневмодиссекции вырастает шанс получения «большого пузыря» первого типа, в то время как гидродиссекция дает непредсказуемые результаты в виде «большого пузыря» второго и смешанного типа. Также, по данным исследования N. Pereira и соавт., среди 32 донорских роговиц при классической технике отслаивания трансплантата для PDEK «большой пузырь» первого типа получался только в 53,1% случаев, «большой пузырь» второго типа – в 34,4% случаев, «большой пузырь» смешанного типа – в 12,5 % случаев [179].

Таким образом, стандартный подход к заготовке трансплантата для ПДЭК не дает хирургу полной уверенности при выполнении данной манипуляции. Большинство работ по совершенствованию технологии PDEK направлено только на предотвращение образования «большого пузыря» второго типа. H. Dua разработал специальный зажим для PDEK, который закрывает фенестрации на периферии предесцементового слоя и предотвращает утечку воздуха. Данный зажим также помогает хирургу хорошо отцентрировать корнеосклеральный диск [166]. Другим вариантом облегчения получения «большого пузыря» первого типа является техника M. Soper: автор с помощью тупого инструмента убирает десцементову мембрану на периферии роговицы непосредственно внутри линии Швальбе [180]. N. Sharma предлагает использовать интраоперационный ОКТ, для облегчения визуализации и понимания глубины иглы в трансплантате при пневмодиссекции. [181]

Тем не менее перечисленные техники не решают вопрос с разрывом пузыря при пневмодиссекции в связи с неконтролируемым подъемом давления внутри пузыря.

В связи с актуальностью данной проблемы была сформулирована цель настоящего исследования - разработать, экспериментально обосновать и внедрить в клиническую практику оптимизированную технологию презндотелиальной кератопластики (ПДЭК) для хирургического лечения пациентов с буллезной кератопатией. Для достижения поставленной цели работа была разделена на несколько последовательных этапов, которые соответствовали поставленным задачам: оптимизировать технику выкраивания трансплантата для (ПДЭК), разработать подходящие инструменты для оптимизированной технологии, оценить в эксперименте какой способ выкраивания обладает наибольшей эффективностью, в ходе эксперимента определить состояние эндотелиальных клеток при различных способах выкраивания трансплантата с помощью витальных красителей, с помощью световой микроскопии гистологически определить и отличать строение трансплантата для ПДЭК и ТДМ, в клинике оценить ранние и поздние клинико-функциональные результаты хирургического лечения БК методами оптимизированный ПДЭК, ТДМ, ФЛ-ЗПК, оценить осложнения и степень потери ПЭК в послеоперационном периоде ЗПК при различных способах выкраивания трансплантата.

Данная работа включала выполнение клинического и экспериментального этапов исследования.

В ходе исследования выявили, что оптимизированные техники (№ 1 и № 2) выкраивания трансплантата для ПДЭК позволяют получить большой пузырь 1 типа в 95-100% случаев диаметром 7,0 – 8,5 мм и значительно уменьшить риск выбраковки донорского материала, в то время как классический способ выкраивания позволяет получить большой пузырь 1 типа только в 50% случаев.

Также в ходе экспериментального этапа исследования проводили оценку качества эндотелиальных клеток при помощи окрашивания витальными

красителями и электронной микроскопии. Заметили такую особенность, что в области, где первоначально раздувался большой пузырь, там страдает эндотелий, как результат резкого подъема давления внутри пузыря. А в момент расширения объема образованного пузыря дополнительным введением воздуха, эндотелий уже меньше страдает. Данная находка соответствует данным литературы описанным ранее. Вместе с тем, сравнительный анализ показателей живых и мертвых клеток и подсчет количества эндотелиальных клеток на электронной микроскопии показал намного меньшую травматизацию эндотелиальных клеток при оптимизированной технике выкраивания и консервации, так как использование пружинящего шприца, стабильное положение трансплантата и точная позиция вкола иглы в трансплантат при помощи кольцевого фиксатора с основанием, плавное расширение трансплантата консервационной средой уменьшает травматизацию за счет медленного нарастания давления внутри него. В ходе исследования установили, что потеря эндотелиальных клеток в ходе выполнения оптимизированной методики ПДЭК составила 13%, что является сопоставимым с потерей эндотелиальных клеток при выполнении ТДМ. Снижение функциональной активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -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. Предварительная консервация трансплантата ПДЭК до 48 часов приводит к полному восстановлению функциональной активности эндотелиальных клеток и может способствовать получению быстрого клинического эффекта.

Также выполнили гистологическое исследование роговиц, выкроенные технологиями ПДЭК и ТДМ. Данное исследование позволило нам морфологически различать и понимать строение 2х видов трансплантата.

Клинический этап исследования базировался на анализе клинико-функциональных результатов 84 пациентов после трех видов операции ЗПК, выполненной по поводу буллезной кератопатии.

Все пациенты были разделены на 3 группы, сформированные в зависимости выбранной хирургической тактики.

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.

Пациентам выполняли комплекс диагностических обследований в дооперационном периоде, а также на сроках 1, 3, 6, 12 мес. после проведенного лечения. Исследуемые группы пациентов были однородны и сравнимы по предоперационным характеристикам. Отличительной особенностью пациентов основной группы являлась использование молодой донорской роговицы (20-50 лет), которая характеризуется большим количеством эндотелиальных клеток, чем остальные две группы.

Послеоперационный период пациентов характеризовался адекватным течением. Пациенты основной группы характеризовались наименьшим количеством осложнений – 1 случай дислокации трансплантата (1/25 или 4%), в то время как пациенты контрольной группы I характеризовались большим количеством дислокации трансплантата (4/27 или 18%), требующая повторного введения воздуха. А пациенты контрольной группы II чаще встречались с болезнью трансплантата (2/32 или 6,25%) и эндотелиальной недостаточностью (1/32 или 3,1%).

Стоит отметить, что в ходе данного исследования не было выявлено ни одного случая развития зрачкового блока в послеоперационном периоде, что связано с профилактическим выполнением иридэктомии во время операции до этапа трансплантации донорского материала.

В ходе исследования у всех пациентов отмечалось увеличение показателей НКОЗ и МКОЗ по сравнению с дооперационными значениями, Средняя максимально скорректированная острота зрения в основной группой, контрольной группой I, контрольной группой II в сроки наблюдения 12 мес. составляли  $0,9 \pm 0,01$ ,  $0,9 \pm 0,1$ ,  $0,6 \pm 0,05$  соответственно.

Плотность эндотелиальных клеток трансплантата и динамика её потери в послеоперационном периоде являются существенно важными с позиций обеспечения долгосрочной прозрачности пересаженной ткани. Травма клеток может происходить на разных этапах операции, но особенно при выкраивании трансплантата и в момент его имплантации в переднюю камеру глаза, расправления и фиксации пузырем воздуха или газа. В ходе данного исследования при оценке относительной потери эндотелиальных клеток при выкраивании трансплантата методиками оптимизированной ПДЭК, ТДМ, ФЛ-ЗПК большая потеря ЭК в сроки наблюдения 12 месяцев была выявлена в группах с использованием ФЛ (контрольная группа II) и составила:  $65\% \pm 6,8\%$ . В то время как в группе оптимизированной ПДЭК и ТДМ относительная потеря ЭК была  $33 \pm 11\%$  и  $31 \pm 13\%$  соответственно.

Среди возможных причин утраты монослоя клеток эндотелия при выкраивании ПДЭК трансплантата является сам факт первоначального раздувание пузыря и прохождения иглы внутри трансплантата. Однако все эти моменты нивелируются в оптимизированной технологии, предложенной нами.

Исследование ограничивает малая выборка пациентов в связи с жесткими критериями отбора. Были исключены из исследования пациенты с наличием такой сопутствующей патологии как амблиопия высокой степени, рубцовая форма ВМД, отслойка сетчатки, пациенты с фиксацией ИОЛ в передней камере и зрачковой фиксацией ИОЛ. А также пациенты с отсутствием полноты дооперационных данных клинико-функциональных исследований, с выраженными дистрофическими изменениями стромы роговицы и пациенты с тяжелым общесоматическим состоянием, не позволяющим проводить лечение.

Таким образом, в заключении хочется сказать, что в предложенной нами оптимизированной технологии ПДЭК минимизируются практически все трудности, с которыми сталкиваются хирурги: разрыв ткани при пневмодиссекции и гидродиссекции, образование пузыря второго и смешанного типа, получение трансплантата заданного размера; доработаны детали хирургической техники. Предложенная технология консервации и хранения трансплантата может быть легко внедрена в работу глазного банка и удобна для использования в клинической практике.



## ВЫВОДЫ

1. Презэндотелиальная кератопластика с десцеметорексисом/Предесцеметовая эндотелиальная кератопластика 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 группе (ПДЭК) и контрольной группе I (ТДМ). К 12 мес. наблюдения средняя МКОЗ в основной группе (PDEK) и контрольной группе I (ТДМ) составляла 0,9 и выше в группе. В то

время как 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  $33 \pm 11$  %, в то время как в контрольных группах I (ТДМ) и II (ФЛ-ЗПК)  $31 \pm 13$  % 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 использование кольцевого фиксатора, основания, иглы 30G с 5 мл шприцем с пружинящим поршнем, консервирующий раствор.
- 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 лучше подходит молодая донорская роговица.
- 4) Для лучшей адгезии трансплантата к роговице реципиента необходимо использовать 20 % газо-воздушную смесь SF<sub>6</sub>.
- 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. 2021 Eye banking Statistical report of Eye Bank Association of America. Available \_\_\_\_\_ at [https://restoresight.org/wpcontent/uploads/2022/03/2021\\_StatisticalGuide\\_numbered\\_FINAL.pdf](https://restoresight.org/wpcontent/uploads/2022/03/2021_StatisticalGuide_numbered_FINAL.pdf)
2. Feizi S. Corneal endothelial cell dysfunction: etiologies and management. *Ther Adv Ophthalmol.* – 2018 Dec 7; – Vol. 10 – 2515841418815802. <https://doi.org/10.1177/2515841418815802>
3. Claesson M, Armitage WJ, Stenevi U. Corneal oedema after cataract surgery: predisposing factors and corneal graft outcome. // *Acta Ophthalmol.* – 2009. – Vol. 87, №2 – P. 154-159. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2008.01180.x>
4. Schlötzer-Schrehardt U., Bachmann BO, Laaser K, Cursiefen Characterization of the Cleavage Plane in Descemet’s Membrane Endothelial Keratoplasty // *Ophthalmology.* – 2011. – Vol. 118. – P. 1950–1957. <https://doi.org/10.1016/j.ophtla.2011.03.025>
5. Guerra FP, Anshu A, Price MO, Price FW. Endothelial keratoplasty: fellow eyes comparison of Descemet stripping automated endothelial keratoplasty and Descemet membrane endothelial keratoplasty. // *Cornea.* – 2011 Dec; – Vol. 30, №12 – P. 1382-1386 <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e31821ddd25>
6. Maier AK, Gundlach E, Gonnermann J Retrospective contralateral study comparing Descemet membrane endothelial keratoplasty with Descemet stripping automated endothelial keratoplasty. // *Eye (Lond).* – 2015 Mar; – Vol. 29, №3. – P. 327-32. <https://doi.org/10.1038/eye.2014.280>
7. Borroni D, Tips, Tricks, and Guides in Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Learning Curve. / Rocha de Lossada C, Parekh M, Gadhvi K [et al.] // *J Ophthalmol.* – 2021 Aug 17. – 2021. – P. 1819454. <https://doi.org/10.1155/2021/1819454>

8. Малюгин Б.Э., Шилова Н.Ф., Анисимова Н.С., Антонова О.П. Трансплантация эндотелия и Десцеметовой мембраны // Вестник офтальмологии. – 2019. – Том.135, № 1. – С. 98-103. <https://doi.org/10.17116/oftalma201913501198>
9. Parekh M, Leon P, Ruzza A, Borroni D, Ferrari S, Ponzin D, Romano V. Graft detachment and rebubbling rate in Descemet membrane endothelial keratoplasty. // *Surv Ophthalmol.* – 2018 Mar-Apr; – Vol. 63, № 2. – P. 245-250. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2017.07.003>
10. Guindolet, D., Disegni, H., Martin, G. C., Azar, G., Hardy, S., Cochereau, I., & Gabison, E. E. (2022). Predictive factors of graft detachment and rebubbling after descemet membrane endothelial keratoplasty. *International ophthalmology*, 10.1007/s10792-022-02547-4. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s10792-022-02547-4>
11. Dua H.S., Faraj LA, Said DG, Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer) // *Ophthalmology.* – 2013. – Vol. 120, № 9. – P. 1778–1785. <https://doi.org/10.1016/j.ophttha.2013.01.018>
12. Agarwal A, Pre-Descemet's endothelial keratoplasty (PDEK). / HS Dua, P Narang, DA Kumar [et al.] // *Br J Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 98, № 9. – P. 1181-1185. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2013-304639>
13. Agarwal A, Pre-Descemet Endothelial Keratoplasty With Infant Donor Corneas: A Prospective Analysis. / A. Agarwal, P. Narang, DA Kumar, S. Jacob // *Cornea.* – 2015. – Vol. 34, №8. – P. 859-65. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000000486>
14. Shanmugam C, Agarwal R, Asif MI, et al. Comparison of Pre-Descemet Endothelial Keratoplasty and Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty in

Endothelial Decompensation // Cornea. – 2023. – Vol. 42, №3. – P. 292-297.  
doi:10.1097/ICO.0000000000003042

15. Аветисов С.Э., Осипян Г.А., Абукеримова А.К. К вопросу о выделении предесцеметового слоя в структуре роговицы. // Вестник офтальмологии. – 2022 – Том.138, №3. – С. 145–148.  
<https://doi.org/10.17116/oftalma2022138031145>
16. Труфанов С.В. Сравнительная оценка современных способов подготовки донорского материала для эндотелиальной кератопластики. / Е.П. Саловарова, Г.А. Осипян, А.А. Федоров, Ведмеденко И.И. // Вестник офтальмологии. – 2018. – Том 134, №5. – С. 202-207.  
<https://doi.org/10.17116/oftalma2018134051202>
17. Калинин Ю.Ю. Клинический случай. Преэндотелиальная кератопластика с десцеметорексисом (PDEK), осложненная дислокацией ИОЛ в стекловидное тело. / Т.Х.А. Динь, А.В. Золотаревский, С.Ю. Калининкова, С.Х. Нгуен // Офтальмология. – 2022. – Том 19, №3. – С. 672–680.  
<https://doi.org/10.18008/1816-5095-2022-3-672-680>
18. Bedard P, Hou JH. Characterization of Endothelial Cell Loss in Pre-Descemet Endothelial Keratoplasty Graft Preparation. // Cornea. – 2021. – Vol. 40, №3. – P. 364-369. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000002536>
19. DelMonte D.W., Kim T. Anatomy and physiology of the cornea // J. Cart. Refract. Surg. ASCRS and ESCRS. – 2011. – Vol. 37. – P. 588–598.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2010.12.037>
20. Wiley L., SundarRaj N, Sun TT Regional heterogeneity in human corneal and limbal epithelia: An immunohistochemical evaluation // Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. – 1991. – Vol. 32, № 3. – P. 594–602.

21. Li W. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus // *Cell Res.* – 2007. – Vol. 17, № 1. – P. 26–36. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310137>
22. Boote C, Dennis S, Newton RH Collagen fibrils appear more closely packed in the prepupillary cornea: Optical and biomechanical implications // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* // – 2003. – Vol. 44, № 7. – P. 2941–2948. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-0131>
23. Meek K.M., Boote C. The organization of collagen in the corneal stroma // *Exp. Eye Res.* – 2004. – Vol. 78, № 3. – P. 503–512. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2003.07.003>
24. Bron A. The architecture of the corneal stroma // *Br J Ophthalmol.* – 2001. – Vol. 85. – P. 379–383. <https://doi.org/10.1136/bjo.85.4.379>
25. Cheng X., Pinsky P.M. Mechanisms of self-organization for the collagen fibril lattice in the human cornea // *J. R. Soc. Interface.* – 2013. Vol. 10, № 87. – P. 20130512. <https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0512>
26. Jester J. V. Moller-Pedersen T, Huang J The cellular basis of corneal transparency: Evidence for ‘corneal crystallins’ // *J. Cell Sci.* – 1999. – Vol. 112, № 5. – P. 613–622. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.5.613>
27. Lewis P.N. White TL, Young RD Three-dimensional arrangement of elastic fibers in the human corneal stroma // *Exp. Eye Res.* – 2016. – Vol. 146. – P. 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.12.006>
28. Hann C.R., Fautsch M.P. The Elastin Fiber System between and Adjacent to Collector Channels in the Human Juxtacanalicular Tissue // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2011. – Vol. 52, № 1. – P. 45–50. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5620>
29. Dua H.S., Faraj LA, Branch MJ, The collagen matrix of the human trabecular meshwork is an extension of the novel pre-Descemet’s layer (Dua’s layer). // *Br J Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 98, № 5. – P. 691–697.

- <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2013-304593>
30. Jester J. V, Faraj LA, Said DG Lessons in Corneal Structure and Mechanics to Guide the Corneal Surgeon // *Ophthalmology*. – 2013. – Vol. 120, № 9. – P. 1715–1717. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2013.07.004>
31. Schlötzer-Schrehardt U., Bachmann BO, Tourtas T Ultrastructure of the posterior corneal stroma // *Ophthalmology*. – 2015. – Vol. 122, № 4. – P. 693–699. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2014.09.037>
32. Levy S.G., McCartney A.C.E., Moss J. The distribution of fibronectin and P component in Descemet's membrane: an immunoelectron microscopic study // *Curr Eye Res*. – 1995. – Vol. 14, № 9. – P. 865–870. <https://doi.org/10.3109/02713689508995810>
33. Al-mezaie H.S. Descemet's membrane detachment after cataract extraction surgery // *Int Ophthalmol*. – 2010. – Vol. 30, № 4. – P. 391–396. <https://doi.org/10.1007/s10792-010-9367-y>
34. Sawada H., Konomi H., Hirosawa K. Characterization of the collagen in the hexagonal lattice of Descemet's membrane: its relation to type VIII collagen // *J Cell Biol*. – 1990. – Vol. 110, № 1. – P. 219–227. <https://doi.org/10.1083/jcb.110.1.219>
35. Kabosova A, Azar DT, Bannikov GA Compositional Differences between Infant and Adult Human Corneal Basement Membranes // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. – 2007. – Vol. 48, № 11. – P. 4989–4999. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-0654>
36. Danielsen C.C. Tensile mechanical and creep properties of Descemet's membrane and lens capsule // *Exp. Eye Res*. – 2004. – Vol. 79, № 3. – P. 343–350. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2004.05.014>
37. Beebe D.C., Coats J.M. The lens organizes the anterior segment: Specification of neural crest cell differentiation in the avian eye // *Dev. Biol*. – 2000. – Vol. 220,



- № 2. – P. 424–431. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9638>
38. Tuft S.J., Coster D.J. The corneal endothelium // *Eye (Lond)*. – 1990. – Vol. 4, № 3. – P. 389–424.
39. Joyce N.C. Proliferative capacity of corneal endothelial cells // *Exp. Eye Res.* – 2012. – Vol. 95, № 1. – P. 16–23.
40. Bourne W.M., Nelson L.I.L., Hodge D.O. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* Elsevier Inc., – 1997. – Vol. 38, № 3. – P. 779–782.
41. Bonanno J.A. Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump // *Exp. Eye Res.* – 2012. – Vol. 95, № 1. – P. 2–7.
42. Oliveira-Soto L., Efron N. Morphology of corneal nerves using confocal microscopy // *Cornea*. – 2001. – Vol. 20, № 4. – P. 374–384.
43. Румянцева О.А., Спивак И.А. Изменение морфологической структуры роговицы человека с возрастом // *РМЖ Клиническая Офтальмология*. // 2004. – Vol. 4. P. – 158–160.
44. Труфанов С.В. Хирургическое лечение буллезной кератопатии: современные подходы и тенденции // *Офтальмология*. – 2018. – Vol. 15, № 3. – P. 242–247.
45. Рикс И.А. Новая клинико-морфологическая классификация эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы // *Офтальмологические ведомости*. – 2017. – Vol. 10, № 3. – P. 46–52.
46. Pricopie S. Pseudophakic bullous keratopathy. // *Rom J Ophthalmol.* – 2017. – Vol. 61, № 2. – P. 90–94.
47. Weiss J.S. IC3D classification of corneal dystrophies-edition 2 // *Cornea*. – 2015. – Vol. 34, № 2. – P. 117–159.
48. Baratz K.H. et al. E2-2 protein and Fuchs's corneal dystrophy // *N. Engl. J. Med.* – 2010. – Vol. 363, № 11. – P. 1016–1024.

49. Zhang C. Immunohistochemistry and electron microscopy of early-onset Fuchs corneal dystrophy in three cases with the same L450W COL8A2 mutation // *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* – 2006. – Vol. 104. – P. 85–95.
50. Gottsch J.D. et al. Fuchs corneal dystrophy: Aberrant collagen distribution in an L450W Mutant of the COL8A2 gene // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2005. – Vol. 46, № 12. – P. 4504–4511.
51. Sundin O.H. Linkage of late-onset fuchs corneal dystrophy to a novel locus at 13pTel-13q12.13 // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2006. – Vol. 47, № 1. – P. 140–145.
52. Sundin O.H. A common locus for late-onset Fuchs corneal dystrophy maps to 18q21.2-q21.32 // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2006. – Vol. 47, № 9. – P. 3919–3926.
53. Riazuddin S.A. Linkage of a mild late-onset phenotype of fuchs corneal dystrophy to a novel locus at 5q33.1-q35.2 // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2009. – Vol. 50, № 12. – P. 5667–5671.
54. Riazuddin S.A. Missense Mutations in TCF8 Cause Late-Onset Fuchs Corneal Dystrophy and Interact with FCD4 on Chromosome 9p // *Am. J. Hum. Genet. The American Society of Human Genetics.* – 2010. – Vol. 86, № 1. – P. 45–53.
55. Eghrari A.O., Gottsch J.D. Fuchs' corneal dystrophy // *Expert Rev. Ophthalmol.* – 2010. – Vol. 5, № 2. – P. 147–159.
56. Borderie V.M. Corneal endothelial cell apoptosis in patients with Fuchs' dystrophy // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2000. – Vol. 41, № 9. – P. 2501–2505.
57. Bourne W.M., Johnson D., Campbell R.J. The ultrastructure of Descemet's membrane. III. Fuchs' dystrophy // *Arch Ophthalmol.* – 1982. – Vol. 100, № 12. – P. 1952–1955.
58. Mustonen R. In vivo confocal microscopy of Fuchs' endothelial dystrophy //

- Cornea. – 1998. – Vol. 17, № 5. – P. 493–503.
59. Jurkunas U. et al. Decreased expression of peroxiredoxins in Fuchs' endothelial dystrophy // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2008. – Vol. 49, № 7. – P. 2956–2963.
60. Szentmáry N., Szende B., Süveges I. Epithelial cell, keratocyte, and endothelial cell apoptosis in Fuchs' dystrophy and in pseudophakic bullous keratopathy // *Eur. J. Ophthalmol.* – 2005. – Vol. 15, № 1. – P. 17–22.
61. Szentmáry N., Szende B., Süveges I. P53, CD95, cathepsin and survivin pathways in Fuchs' dystrophy and pseudophakic bullous keratopathy corneas // *Histol. Histopathol.* – 2008. – Vol. 23, № 8. – P. 911–916.
62. Kenney M.C. et al. Altered expression of aquaporins in bullous keratopathy and Fuchs' dystrophy corneas // *J. Histochem. Cytochem.* – 2004. – Vol. 52, № 10. – P. 1341–1350.
63. Gottsch J.D. Serial analysis of gene expression in the corneal endothelium of Fuchs' dystrophy // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2003. – Vol. 44, № 2. – P. 594–599.
64. Bourges J.L. Corneal dystrophies // *J. Fr. Ophtalmol. Elsevier Masson SAS*, – 2017. – Vol. 40, № 6. – P. e177–e192.
65. Aldave A.J., Han J., Frausto R.F. Genetics of the corneal endothelial dystrophies: An evidence-based review // *Clin. Genet.* – 2013. – Vol. 84, № 2. – P. 109–119.
66. Jirsova K. Immunohistochemical characterization of cytokeratins in the abnormal corneal endothelium of posterior polymorphous corneal dystrophy patients // *Exp. Eye Res.* – 2007. – Vol. 84, № 4. – P. 680–686.
67. Boruchoff S.A., Kuwabara T. Electron microscopy of posterior polymorphous degeneration // *Am. J. Ophthalmol. Elsevier Inc.*, – 1971. – Vol. 72, № 5. – P. 879–887.
68. Rodrigues M.M. Glaucoma due to Endothelialization of the Anterior Chamber Angle: A Comparison of Posterior Polymorphous Dystrophy of the Cornea and

- Chandler's Syndrome // *Arch. Ophthalmol.* – 1980. – Vol. 98, № 4. – P. 688–696.
69. Ahn Y.J. Clinical features in children with posterior polymorphous corneal dystrophy // *Optom. Vis. Sci.* – 2017. – Vol. 94, № 4. – P. 476–481.
70. Bozkurt B., Irkec M., Mocan M.C. In vivo confocal microscopic findings in posterior polymorphous corneal dystrophy // *Cornea.* – 2013. – Vol. 32, № 9. – P. 1237–1242.
71. Hermina Strungaru M. Endothelial keratoplasty for posterior polymorphous corneal dystrophy in a 4-month-old infant // *Am. J. Ophthalmol. Case Reports.* – 2017. – Vol. 7. – P. 23–26.
72. Sorkin N. et al. Descemet membrane endothelial keratoplasty in iridocorneal endothelial syndrome and posterior polymorphous corneal dystrophy // *Can. J. Ophthalmol. Elsevier Inc.,* – 2019. – Vol. 54, № 2. – P. 190–195.
73. Davidson A.E. Autosomal-Dominant Corneal Endothelial Dystrophies CHED1 and PPCD1 Are Allelic Disorders Caused by Non-coding Mutations in the Promoter of OVOL2 // *Am. J. Hum. Genet.* – 2016. – Vol. 98, № 1. – P. 75–89.
74. Patel S.P., Parker M.D. SLC4A11 and the Pathophysiology of Congenital Hereditary Endothelial Dystrophy // *Biomed Res Int. Hindawi Publishing Corporation,* – 2015. – Vol. 2015. – P. 1–7.
75. Desir J., Abramowicz M. Congenital hereditary endothelial dystrophy with progressive sensorineural deafness (Harboyan syndrome) // *Orphanet J Rare Dis.* – 2008. – Vol. 3 – P. 28.
76. Emilia M. Primary Pediatric Keratoplasty: Etiology, Graft Survival, And Visual Outcome // *Am. J. Ophthalmol. Elsevier Inc.,* – 2020. – Vol. 212. – P. 162–168.
77. Yang F. Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty in Pediatric Patients with Congenital Hereditary Endothelial Dystrophy // *Am. J. Ophthalmol. Elsevier Inc.,* – 2020. – Vol. 209. – P. 132–140.
78. Schmid E. A New, X-linked Endothelial Corneal Dystrophy // *Am J Ophthalmol.*

- 2006. – Vol. 141, № 3. – P. 478–487.
79. Singh R. et al. Corneal transplantation in the modern era // *Indian J Med Res.* – 2019. – Vol. 150. – P. 7–22.
80. Zirm E. Eine erfolgreiche totale Keratoplastik (A successful total keratoplasty). // *Refract Corneal Surg.* – 1989. – Vol. 5, № 4. – P. 258–261.
81. Gain P. et al. Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking // *JAMA Ophthalmol.* – 2016. – Vol. 134, № 2. – P. 167–173.
82. Patel S. V. Graft survival and endothelial outcomes in the new era of endothelial keratoplasty // *Exp. Eye Res.* – 2012. – Vol. 95, № 1. – P. 40–47.
83. Reimer A., Langenbacher A., Cursiefen C. Long-term outcome after penetrating keratoplasty for bullous keratopathy - influence of preoperative visual acuity on final outcome // *Klin Monbl Augenheilkd.* – 2012. – Vol. 229, № 2. – P. 149–157.
84. Измайлова С.Б., Малюгин Б.Э., Новиков С.В. Способ проведения кератопластики с одномоментной имплантацией интрастромального кольца для профилактики послеоперационного астигматизма. Патент РФ № 2674889 от 13.12.2018.
85. Калинин Ю.Ю., Леонтьева Г. Д., Селифанов Ю. В., Беззаботнов А.И., Задорожный С. В. Способ проведения кератопластики (Варианты). Патент РФ №2589633 от 10.07.2016.
86. Мороз З.И., Калинин Ю.Ю., Легких С.Л., Ушакова А.А. Хирургическое лечение астигматизма после сквозной кератопластики (предварительные результаты). *Новое в офтальмологии.* – 2013 – Vol. № 2 – P. 28-30
87. Малюгин Б.Э., Токмакова А.Н., Каримова А.Н. (2017). Отдаленные результаты лазерной коррекции астигматизма после сквозной кератопластики у пациентов с кератоконусом. *Практическая медицина.* – 2017 – Vol. 2 № 9 (110) – P. 128-132.

- 88.Измайлова С.Б., Зимина М.В., Завьялов А.С., Новиков С.В., Шацких А.В., Тонаева Х.Д., Шормаз И.Н., Комарова О.Ю. Интраоперационная профилактика посткератопластического астигматизма на отечественной установке "Фемто Визум" в эксперименте ex vivo // ПМ. – 2018. №4. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/intraoperatsionnaya-profilaktika-postkeratoplasticheskogo-astigmatizma-na-otechestvennoy-ustanovke-femto-vizum-v-eksperimente-ex> (дата обращения: 12.04.22)
- 89.Al-Mahmood A.M., Al-Swailem S.A., Edward D.P. Glaucoma and Corneal Transplant Procedures // J Ophthalmol. – 2012. – Vol. 2012. P – 576394.
- 90.Hos D. Immune reactions after modern lamellar (DALK, DSAEK, DMEK) versus conventional penetrating corneal transplantation // Prog. Retin. Eye Res. Elsevier, – 2019. – Vol. 73. – P. 100768.
- 91.Küchle M. Risk factors for corneal allograft rejection: Intermediate results of a prospective normal-risk keratoplasty study // Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. – 2002. – Vol. 240, № 7. – P. 580–584.
- 92.Ross A.H. Long-term Topical Steroid Treatment after Penetrating Keratoplasty in Patients with Pseudophakic Bullous Keratopathy // Ophthalmology. Elsevier Inc., – 2009. – Vol. 116, № 12. – P. 2369–2372.
93. Nguyen N.X. et al. Long-term Topical Steroid Treatment Improves Graft Survival Following Normal-risk Penetrating Keratoplasty // Am. J. Ophthalmol. – 2007. – Vol. 144, № 2. – P. 318–319
- 94.Hatou S. The effects of dexamethasone on the Na,K-ATPase activity and pump function of corneal endothelial cells // Curr. Eye Res. – 2009. – Vol. 34, № 5. – P. 347–354.
- 95.Barraquer J. Special methods in corneal surgery / ed. King J., McTigue J. Washington, DC: Rutterworths, 1965. 586–604 p.
- 96.Tillett C.W. Posterior lamellar keratoplasty // Am. J. Ophthalmol. Elsevier Inc., –

1956. – Vol. 41, № 3. – P. 530–533.
97. Melles G. A surgical technique for posterior lamellar keratoplasty // *Cornea*. – 1998. – Vol. 17, № 6. – P. 618–626.
98. Melles G.R.J., Lander F., Nieuwendaal C. Sutureless, posterior lamellar keratoplasty: A case report of a modified technique // *Cornea*. – 2002. – Vol. 21, № 3. – P. 325–327.
99. Terry M.A., Ousley P.J. Deep lamellar endothelial keratoplasty in the first United States patients // *Cornea*. – 2001. – Vol. 20, № 3. – P. 239–243.
100. Melles G.R.J., Wijdh R.H.J., Nieuwendaal C.P. A Technique to Excise the Descemet Membrane from a Recipient Cornea (Descemetorhexis) // *Cornea*. – 2004. – Vol. 23, № 3. – P. 286–288.
101. Gorovoy M.S. Descemet-Stripping Automated Endothelial Keratoplasty // *Cornea*. – 2006. – Vol. 25, № 8. – P. 886–889.
102. Melles G. Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK) // *Cornea*. – 2006. – Vol. 25, № 8. – P. 987–990.
103. Малюгин Б.Э., Мороз З.И., Борзенко С.А., Дроздов И.В., Айба Э.Э., Паштаев А.Н. Первый опыт и клинические результаты задней автоматизированной послойной кератопластики (ЗАПК) с использованием предварительно выкроенных консервированных ультратонких роговичных трансплантатов. *Офтальмохирургия*. – 2013 – № 12 – P. 16 DOI: 10.25276/0235-4160-2013-3-12-16.
104. Оганесян О.Г., Нероев В.В., Гундорова Р.А., Сметанина М.А., Данилова Д.Ю. Микроинвазивная десцеметопластика. Анализ предварительных результатов первых 20 случаев. *Офтальмология*. – 2010 – Vol. 7 № 2 – P. 20–25
105. Труфанов С.В. Результаты автоматизированной эндотелиальной кератопластики с удалением десцеметовой мембраны (DSAEK) при

- буллезной кератопатии. Офтальмология. – 2012 – Vol. 9 №1 – P. 33–36  
DOI:10.18008/1816-5095-2012-1-32-36
106. Калинин Ю.Ю., Динь Т.Х.А., Золотаревский А.В., Калининкова С.Ю. Новый хирургический подход к предесцементовой эндотелиальной кератопластике (PDEK). Вестник офтальмологии. – 2023 Vol. 139 №1 – P. 55–66. <https://doi.org/10.17116/oftalma202313901155>
107. Паштаев А.Н., Малюгин Б.Э., Измайлова С.Б., Паштаев Н.П., Кузьмичев К.Н., Алиева С.С., Катмаков К.И. Инвертированная задняя послойная фемтокератопластика: качество поверхности среза роговицы и предварительные клинические результаты. Офтальмология. – 2020 – Vol. 17 № 2 – P. 216-222. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2020-2-216-222>
108. Аветисов С.Э., Мамиконян В.Р., Труфанов С.В., Осипян Г.А. Селективный принцип современных подходов в кератопластике. Вестник офтальмологии. 2013 – Vol. 129 № 5 – P. 97-103.
109. Малюгин Б.Э., Мороз З.И., Дроздов И.В., Айба Э.Э., Паштаев А.Н. Эндотелиальная кератопластика (обзор литературы). Офтальмохирургия. – 2013. – № 1. – С. 66-72.
110. Паштаев Николай Петрович, Поздеева Надежда Александровна, Паштаев Алексей Николаевич, Шипунов Александр Александрович Задняя послойная кератопластика (обзор литературы) // Вестник российских университетов. Математика. – 2016. – №4. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/zadnyaya-posloynnaya-keratoplastika-obzor-literatury>
111. Price M.O. Randomized, Prospective Comparison of Precut vs Surgeon-Dissected Grafts for Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty // Am J Ophthalmol. – 2008. – Vol. 146, № 1. – P. 36–41.
112. Busin M. Ultrathin descemet's stripping automated endothelial



- keratoplasty with the microkeratome double-pass technique: two-year outcomes // *Ophthalmology*. Elsevier Inc., – 2013. – Vol. 120, № 6. – P. 1186–1194
113. Cursiefen C., Kruse F., Gruppe E.D. [Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty (DSAEK)] // *Ophthalmologie*. – 2009. – Vol. 106, № 10. – P. 939–954.
114. Price M.O. EK (DLEK, DSEK, DMEK): New Frontier in Cornea Surgery. // *Annu Rev Vis Sci*. – 2017. – Vol. 3. – P. 69–90.
115. Suh L. Complications of Descemet's stripping with automated endothelial keratoplasty: survey of 118 eyes at One Institute // *Ophthalmology*. – 2008. – Vol. 115, № 9. – P. 1517–1524.
116. Ang M. Five-Year Graft Survival Comparing Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty and Penetrating Keratoplasty // *Ophthalmology*. American Academy of Ophthalmology, – 2016. – Vol. 123, № 8. – P. 1646–1652
117. Covert D.J., Koenig S.B. New triple procedure: Descemet's stripping and automated endothelial keratoplasty combined with phacoemulsification and intraocular lens implantation. // *Ophthalmology*. – 2007. – Vol. 114, № 7. – P. 1272–1277.
118. Li J.Y. Three-year visual acuity outcomes after Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty // *Ophthalmology*. – 2012. – Vol. 119, № 6. – P. 1126–1129
119. Wacker K. Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty for Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy: Five-Year Results of a Prospective Study // *Ophthalmology*. Elsevier Inc, – 2016. – Vol. 123, № 1. – P. 154–160.
120. Dapena I., Ham L., Melles G.R.J. Endothelial keratoplasty: DSEK/DSAEK or DMEK-the thinner the better? // *Curr Opin Ophthalmol*. – 2009. – Vol. 20, № 4. – P. 299–307.

121. Yamaguchi T. et al. The Contribution of the Posterior Surface to the Corneal Aberrations in Eyes after Keratoplasty // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2011. – Vol. 52, № 9. – P. 6222–6229.
122. Паштаев А.Н., Малюгин Б.Э., Паштаев Н.П., Поздеева Н.А., Измайлова С.Б., Шипунов А.А. Первый опыт задней послойной кератопластики, выполненной с помощью российского фемтосекундного лазера «Визум». *Современные технологии в офтальмологии.* – 2016 – Vol. 5 – P. 167- 169
123. Малюгин Б.Э., Шилова Н.Ф., Антонова О.П., Анисимова Н.С., Шормаз И.Н. Сравнительный анализ клинико-функциональных результатов задней послойной кератопластики с использованием фемтосекундного лазера и микрокератома // *Офтальмохирургия.* – 2019 – № 1. – С. 20-26.
124. Rossi M. Protective Effects of Deswelling on Stromal Collagen Denaturation After a Corneal Femtosecond Laser Cut // *Cornea.* – 2013. – Vol. 54, № 6. – P. 4148–4157.
125. Tomida D. Effects of corneal irregular astigmatism on visual acuity after conventional and femtosecond laser-assisted Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty // *Jpn. J. Ophthalmol.* Springer Japan, – 2015. – Vol. 59, № 4. – P. 216–222.
126. Vetter J.M. Irregularity of the Posterior Corneal Surface After Curved Interface Femtosecond Laser-Assisted Versus Microkeratome-Assisted Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty // *Cornea.* – 2013. – Vol. 32, № 2 – P. 118–124.
127. Hjortdal J. Inverse Cutting of Posterior Lamellar Corneal Grafts by a Femtosecond Laser // *Open Ophthalmol J.* – 2012. – Vol. 6. – P. 19–22.
128. Яковлева С.С. Инвертное фемтолазерное формирование трансплантата для задней кератопластики. Москва, 2017. 56 с.
129. Price M.O. Graft rejection episodes after Descemet stripping with

- endothelial keratoplasty: part two: the statistical analysis of probability and risk factors // *Br J Ophthalmol.* – 2009. – Vol. 93, № 3. – P. 391–395.
130. Wu E.I. Graft Rejection Following Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty: Features, Risk Factors, and Outcomes // *Am J Ophthalmol.* – 2012. – Vol. 153, № 5. – P. 949–958.
131. Li J. Graft rejection after Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty: graft survival and endothelial cell loss // *Ophthalmology.* – 2012. – Vol. 119, № 1. – P. 90–94.
132. Sepsakos L. Rate of Rejection After Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty in Fuchs Dystrophy: Three-Year Follow-up // *Cornea.* – 2016. – Vol. 35, № 12. – P. 1537–1541.
133. Price M.O. Descemet's membrane endothelial keratoplasty: prospective multicenter study of visual and refractive outcomes and endothelial survival // *Ophthalmology.* Elsevier Inc., – 2009. – Vol. 116, № 12. – P. 2361–2368.
134. Price M.O. Descemet's membrane endothelial keratoplasty: prospective multicenter study of visual and refractive outcomes and endothelial survival // *Ophthalmology.* Elsevier Inc., – 2009. – Vol. 116, № 12. – P. 2361–2368.
135. Bennett A. et al. Impact of Donor Age on Corneal Endothelium-Descemet Membrane Layer Scroll Formation. // *Eye Contact Lens.* – 2016. – Vol. 41, № 4. – P. 236–239.
136. Heinzelmann S. . Influence of Donor Characteristics on Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty // *Cornea.* – 2014. – Vol. 33, № 6. – P. 644–648.
137. Dapena I. Standardized 'no-touch' technique for descemet membrane endothelial keratoplasty // *Arch Ophthalmol.* – 2011. – Vol. 129, № 1. – P. 88–94.
138. Heindl L.M. et al. Split Cornea Transplantation for 2 Recipients – Review of the First 100 Consecutive Patients // *Am J Ophthalmol.* Elsevier Inc., – 2011. –

- Vol. 152, № 4. – P. 523–532.
139. Schaub F., Cursiefen C., Heindl L. Retrospective Appraisal of Split-Cornea Transplantation: An Audit of 1141 Donor Corneas // *JAMA Ophthalmol.* – 2015. – Vol. 133, № 9. – P. 1086–1087.
140. Terry M.A. Endothelial keratoplasty: why aren't we all doing Descemet membrane endothelial keratoplasty? // *Cornea.* – 2012. – Vol. 31, № 5. – P. 469–471.
141. Dapena I. Learning Curve in Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty: First Series of 135 Consecutive Cases // *Ophthalmology.* Elsevier Inc., – 2011. – Vol. 118, № 11. – P. 2147–2154.
142. Gorovoy M.S. DMEK Complications // *Cornea.* – 2014. – Vol. 33, № 1. – P. 101–104.
143. Schrittenlocher S. Evolution of Consecutive Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Outcomes Throughout a 5-Year Period Performed by Two Experienced Surgeons // *Am. J. Ophthalmol.* Elsevier Inc., – 2018. – Vol. 190. – P. 171–178.
144. Stuart A.J. Descemet's membrane endothelial keratoplasty (DMEK) versus Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty (DSAEK) for corneal endothelial failure // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2018. – Vol. 25, № 6. – P. CD012097.
145. Güell J.L. Comparison of Sulfur Hexafluoride 20% versus Air Tamponade in Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. // *Ophthalmology.* Elsevier Inc, – 2015. – Vol. 122, № 9. – P. 1757–1764.
146. Schaub F. One-year outcome after Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK) comparing sulfur hexafluoride (SF6) 20% versus 100% air for anterior chamber tamponade // *Br J Ophthalmol.* – 2017. – Vol. 101, № 7. – P. 902–908.

147. Bucher F. Spontaneous long-term course of persistent peripheral graft detachments after Descemet's membrane endothelial keratoplasty // *Br J Ophthalmol.* – 2015. – Vol. 99, № 6. – P. 768–772.
148. Heinzelmann S. Cystoid macular oedema following Descemet membrane endothelial keratoplasty // *Br J Ophthalmol.* – 2015. – Vol. 99, № 1. – P. 98–102.
149. Hoerster R. Intensified Topical Steroids as Prophylaxis for Macular Edema After Posterior Lamellar Keratoplasty Combined With Cataract Surgery // *Am. J. Ophthalmol.* Elsevier Inc., – 2016. – Vol. 163. – P. 174-179. e2.
150. Deng S.X. . Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty: Safety and Outcomes: A Report by the American Academy of Ophthalmology // *Ophthalmology.* American Academy of Ophthalmology, – 2018. – Vol. 125, № 2. – P. 295–310.
151. Ham L. Mid-term Results of Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty: 4 to 7 Years Clinical Outcome // *Am. J. Ophthalmol.* Elsevier Ltd, – 2016. – Vol. 171. – P. 113–121.
152. Rudolph M. Corneal higher-order aberrations after Descemet's membrane endothelial keratoplasty // *Ophthalmology.* Elsevier Inc., – 2012. – Vol. 119, № 3. – P. 528–535.
153. Price D.A. Five-Year Graft Survival of Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty (EK) versus Descemet Stripping EK and the Effect of Donor Sex Matching // *Ophthalmology.* American Academy of Ophthalmology, – 2018. – Vol. 125, № 10. – P. 1508–1514.
154. Singh A. et al. Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Outcomes of Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Versus Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty/Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty // *Cornea.* – 2017. – Vol. 36, № 11. – P. 1437–1443.
155. Schrittenlocher S. et al. Long-term outcome of descemet membrane

- endothelial keratoplasty (DMEK) following failed penetrating keratoplasty (PK) // *Acta Ophthalmol.* 2020.
156. Anshu A., Price M.O., Price F.W.J. Risk of Corneal Transplant Rejection Significantly Reduced with Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty // *Ophthalmology.* Elsevier Inc., – 2012. – Vol. 119, № 3. – P. 536–540.
157. Baydoun L. 360-Degree Scheimpflug Imaging to Predict Allograft Rejection After Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty // *Cornea.* – 2016. – Vol. 35, № 11. – P. 1385–1390.
158. Hos D. Incidence and Clinical Course of Immune Reactions after Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty: Retrospective Analysis of 1000 Consecutive Eyes // *Ophthalmology.* American Academy of Ophthalmology, – 2017. – Vol. 124, № 4. – P. 512–518.
159. Hos D. Evidence of donor corneal endothelial cell migration from immune reactions occurring after descemet membrane endothelial keratoplasty // *Cornea.* – 2014. – Vol. 33, № 4. – P. 331–334.
160. Monnereau C. et al. Endothelial Cell Changes as an Indicator for Upcoming Allograft Rejection Following Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty // *Am. J. Ophthalmol.* Elsevier Inc., – 2014. – Vol. 158, № 3. – P. 485–495.
161. Pan J.C.H., Eong K.G.A. Spontaneous resolution of corneal oedema after inadvertent 'descemetorhexis' during cataract surgery // *Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2006. – Vol. 34, № 9. – P. 896–897.
162. Choo S.Y., Zahidin A.Z.M., Then K.Y. Spontaneous Corneal Clearance Despite Graft Detachment in Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty // *Am. J. Ophthalmol.* Elsevier Inc., – 2010. – Vol. 149, № 3. – P. 531.
163. Watson S.L., Abiad G., Coroneo M.T. Spontaneous resolution of corneal oedema following Descemet's detachment // *Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2006. – Vol. 34, № 8. – P. 797–799.

164. Dua H.S. et al. Scrolling characteristics of Pre-Descemet's Endothelial Keratoplasty (PDEK) tissue: An ex-vivo study // Am. J. Ophthalmol. Elsevier Ltd, – 2016. – Vol. 166. – P. 84–90.
165. Dua H.S. et al. Dynamics of big bubble formation in deep anterior lamellar keratoplasty by the big bubble technique: in vitro studies // Acta Ophthalmol. – 2018. – Vol. 96, № 1. –P. 69–76.
166. Dua H.S., Said D.G. Pre-Descemets endothelial keratoplasty: the PDEK clamp for successful PDEK // Eye. Nature Publishing Group, – 2017. – Vol. 31, № 7. – P. 1106–1110
167. Altaan S.L. Endothelial cell loss following tissue harvesting by pneumodissection for endothelial keratoplasty: an ex vivo study // Br J Ophthalmol. – 2015. – Vol. 99, № 5. – P. 710–713.
168. Калинин Ю.Ю., Калининкова С.Ю., Золотаревский А.В., Динь Т.Х.А. Способ выкраивания трансплантата для презндетелиальной кератопластики с десцеметорексисом. Патент РФ на изобретение № 2787149, от 29.12.2022 г.
169. Калинин Ю.Ю., Калининкова С.Ю., Золотаревский А.В., Динь Т.Х.А., Сугробов В.А. Основание с кольцевым фиксатором для получения трансплантата для презндетелиальной кератопластики с десцеметорексисом. Патент РФ на изобретение № 2782785, от 02.11.2022 г.
170. Калинин Ю.Ю., Калининкова С.Ю., Калинин Ю.Ю., Калининкова С.Ю., Сугробов В.А., Золотаревский А.В. Искусственная передняя камера для презндетелиальной кератопластики с десцеметорексисом. РФ на изобретение Патент № 2791988 от 15.03.2023 г.
171. Калинин Ю.Ю., Калининкова С.Ю., Золотаревский А.В., Динь Т.Х.А. Способ выкраивания и хранения донорского роговичного

трансплантата для презндотелиальной кератопластики. Патент РФ на изобретение № 2022106305, от 29.12.2022 г.

172. Борзенко С.А. Медико-технологические и методологические основы эффективной деятельности глазных тканевых банков России в обеспечении операций по сквозной трансплантации роговицы: дисс. докт. мед наук: 14.01.07 / Сергей Анатольевич Борзенко. – М., 2008. – 308 с.
173. Safi T, Seitz B, Berg K, Schulz K, Langenbacher A, Daas L. Reproducibility of Non-Invasive Endothelial Cell Loss Assessment of the Pre-Stripped DMEK Roll After Preparation and Storage // *Am J Ophthalmol.* – 2021. – 221 – Vol. 17 – P. 26. doi: 10.1016/j.ajo.2020.08.001.
174. Паштаев, А. Н. Реабилитация пациентов с дистрофией роговицы Фукса и буллезной кератопатией на основе задней послойной кератопластики с применением различных лазерных систем: дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.07 / Паштаев, Алексей Николаевич. – Москва, 2021.
175. Шилова, Н. Ф. Сравнительный анализ результатов задней послойной кератопластики с использованием фемтосекундного лазера и микрокератома : дис. ... канд. мед.: 14.01.07 / Шилова Наталья Федоровна. – Москва, 2019.
176. Huang T, Jiang L, Zhan J, Ouyang C. [Pre-descemet membrane endothelial keratoplasty for treatment of patients with corneal endothelial decompensation]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* – 2018 Feb 11; – Vol. 54 № 2 – P. 105-110. Chinese.
177. Kumar DA, Agarwal A. Intraoperative Complications of Pre-Descemet's Endothelial 337 Keratoplasty. In: Agarwal A, ed. *Pre-Descemet's Endothelial Keratoplasty.* JP Medical 338 Ltd., 2018:153.15
178. Tsatsos M, Mironidou M, Jacob S, Ziakas N. Factors influencing corneal predescemetic endothelial keratoplasty (PDEK) graft creation: It's all in a bubble. *Hell J Nucl Med.* – 2019 Sep-Dec; – Vol. 22 Suppl 2 – P. 42-46.



179. Pereira NC, Forseto ADS, Maluf RCP, Dua HS. Pre-Descemet's endothelial keratoplasty: a simple, Descemet's membrane scoring technique for successful graft preparation. *Br J Ophthalmol.* – 2022 Jun; Vol. 106 № 6 – P. 786-789. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2020-317613>
180. Saint-Jean A, Soper M, Den Beste K, Iverson S, Price MO, Price FW. Technique for Ensuring Type I Bubble Formation for Pre-Descemet Endothelial Keratoplasty Preparation. *Cornea.* – 2019 Oct; Vol. 38 № 10 – P. 1336-1338. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000002051>
181. Sharma N, Devi C, Agarwal R, Bafna RK, Agarwal A. i-PDEK: Microscope-integrated OCT-assisted pre-Descemet endothelial keratoplasty. *J Cataract Refract Surg.* – 2021 – Vol. 47 № 12 – P. e44-e48. doi:10.1097/j.jcrs.0000000000000603