

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«МЕЖОТРАСЛЕВОЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС
«МИКРОХИРУРГИЯ ГЛАЗА» ИМЕНИ АКАДЕМИКА С.Н.ФЕДЕРОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
КАФЕДРА ГЛАЗНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

ИНСТИТУТ НЕПРЕРЫВНОГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

на правах рукописи

НЕФЕДОВА ОЛЬГА НИКОЛАЕВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ И
ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРА
В ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЛИМБАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ОДНОСТОРОННЕМ СИНДРОМЕ
ЛИМБАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ**

Научный доклад по направлению подготовки

31.06.01 Клиническая медицина по направленности (профиль)

14.01.07 Глазные болезни

14.01.24 Трансплантология и искусственные органы

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор
Малюгин Борис Эдуардович;

доктор медицинских наук, профессор
Борзенко Сергей Анатольевич

Рецензенты:

к.м.н. Головин Андрей Владимирович

к.м.н. Хубецова Мадина Хетаговна

Москва 2021

АКТУАЛЬНОСТЬ

По данным Всемирной организации здравоохранения, заболевания роговицы, приводящие к слепоте и слабовидению, составляют 5,1% и находятся на 4-ом месте в структуре инвалидности по зрению (Avadhanam V.S., 2014; World Health Organization, Priority eye diseases, Corneal opacities, 2017). В Российской Федерации около 21% от общего числа больных составляют помутнения и рубцы роговицы, приводящие к частичной или полной слепоте (Либман Е.С., Калеева Э.В., Рязанов Д.П. 2012). Доля других заболеваний составляет: кератоувеиты-27%, кератиты-37%, дистрофии роговицы - 6%, язвы роговицы - 9% (по данным мониторинга регионов РФ за 2012 г.). Важно отметить, что вышеуказанные заболевания в конечном итоге также приводят к развитию помутнений и рубцов роговицы.

Синдром лимбальной недостаточности является одной из причин слепоты и слабовидения. При гибели, дефектах популяции местных унипотентных прогениторов, называемых «лимбальные эпителиальные стволовые клетки» (Davanger M., Evensen A., 1971; Shermer A., 1986), либо разрушении места их локализации - «ниш», нарушается цикл обновления эпителия роговицы (Le Q., Xu J., Deng S., 2018). Это приводит к исчезновению естественного барьера между эпителием роговицы и конъюнктивы (Dua H.S., Saini J.S., Azuara-Blanco A., Gupta P., 2000), происходит замещение многослойного плоского неороговевающего эпителия роговицы на фиброваскулярную ткань конъюнктивального происхождения с наличием в своём составе бокаловидных клеток и кровеносных сосудов (Puangsrichareern V., Tseng S.C., 1995; Sacchetti M., Lambiase A., Cortes M., 2005). Изменение поверхности роговицы сопровождается снижением остроты зрения, слезотечением, светобоязнью, синдромом красного глаза, хроническим болевым синдромом (Le Q., Xu J., Deng S., 2018). Появление рецидивирующей эрозии роговицы на фоне СЛН повышает риск возникновения язвы и перфорации роговицы (Lim P., Fuchsluger T., Jurkunas U., 2009).

Согласно литературным данным, самым безопасным и эффективным вариантом хирургической реконструкции эпителия роговицы при одностороннем СЛН является «простая трансплантация лимбального эпителия» («simple limbal epithelial transplantation» (SLET)), предложенная Sangwan V.S. в 2012 году (Sangwan V.S., Basu S., MacNeil S., Balasubramanian D., 2012). Суть данной операции заключается в выделении поверхностного лимбального ауто трансплантата со «здорового» глаза протяженностью около 2 мм с дальнейшей его фрагментацией на 8-10 маленьких частей и фиксацией их фибриновым клеем на поверхности амниона (Amescua G., Atallah M., Nikroog N, 2014), закрепленного по всей площади роговицы пораженного глаза с предварительно проведенной поверхностной кератэктомией. После схватывания клея, на глаз устанавливается бандажная контактная линза. Полная стабильная реэпителизация роговицы составляет 80% у взрослых пациентов и 72% у детей за 12 месяцев наблюдения (Sangwan V.S., Basu S., MacNeil S., Balasubramanian D., 2012; Holland E.J., 2015; Basu S., Sureka S.P., Shanbhag S.S., 2016).

Все манипуляции при выкраивании и фрагментации трансплантата проводятся механически с использованием микрохирургических инструментов (раслаиватель, алмазный нож, пинцет роговичный типа колибри). Ряд вышеприведенных манипуляций не исключает повреждения клеточных структур, неравномерности толщины трансплантата (Bouchard C., 2010).

Внедрение в практику офтальмохирургии фемтосекундных технологий, обеспечивающих формирование равномерного по толщине трансплантата, является перспективным направлением. Данный способ позволяет провести ровное прицельное выкраивание трансплантата по заданным параметрам, ввиду наличия высокоточных систем визуализации- оптической когерентной томографии (ОКТ) и встроенного программного обеспечения.

Согласно проведенным исследованиям (Riau A.K., Liu Y.C., Lwin N.C., 2014), лазер на нДж-энергии (Femto LDV Z8) имеет большие преимущества по

сравнению с лазером на мДж-энергии (VisuMax) при подготовке роговичного трансплантата в аспекте вопроса о минимальном повреждении ткани при лазерном воздействии. Принцип работы фемтосекундного лазера FemtoLDV Z8, генерирующего импульсы с низкой энергией (диапазон нДж), заключается в формировании плазмы в плоскости разреза под действием лазерных импульсов. Предположительно, это позволяет производить разрез с меньшей ответной реакцией ткани на воздействие лазера и меньшим количеством апоптических клеток.

Таким образом, вышеперечисленные проблемы указывают на актуальность проведения сравнительного анализа результатов исследования двух методик (с использованием фемтосекундного лазера и с использованием микрохирургических инструментов) и определение реальных преимуществ и недостатков технологий заготовки трансплантата при выполнении трансплантации лимбальных стволовых клеток.

Цель исследования

Цель: изучить биологическую безопасность и эффективность применения фемтосекундного лазера при трансплантации лимбальных эпителиальных стволовых клеток.

Задачи НИР:

Для реализации поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать хирургическую технику пересадки зоны лимбальных стволовых клеток при синдроме лимбальной недостаточности с помощью фемтосекундной лазерной платформы Femto LDVZ8.
2. Разработать оптимальные, безопасные и эффективные энергетические параметры фемтосекундного лазера для выкраивания лимбального трансплантата.

3. Изучить биологическую безопасность воздействия низкоэнергетического фемтосекундного лазера Femto LDV Z8 на мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (ММСК) лимба в эксперименте *in vitro*.
4. Оценить переживаемость ММСК, полученных предложенным методом, в процессе культивирования.
5. Провести сравнительный анализ технологий выкраивания лимбального трансплантата с фемтосекундным сопровождением и традиционной методикой заготовки по технологии SLET.

Научная новизна

В результате проведенного исследования:

- 1) Впервые разработан метод трансплантации лимбальных стволовых клеток с использованием фемтосекундного лазера Femto LDV Z8 в эксперименте.
- 2) Определены оптимальные энергетические и технические параметры фемтосекундного лазера Femto LDV Z8 для выкраивания трансплантата лимбальных стволовых клеток в эксперименте.
- 3) На основании анатомо-морфологических исследований доказана безопасность и эффективность применения фемтосекундного лазера при пересадке лимбальных стволовых клеток.
- 4) Изучены особенности морфологии трансплантата, выполненного с использованием фемтосекундного лазера, его возможности к культивированию.
- 5) Показаны особенности (преимущества\недостатки) технологии простой лимбальной эпителиальной трансплантации лимбальных стволовых клеток с использованием фемтосекундного лазера по сравнению с традиционной SLET.

Практическая значимость

1. Установлено, что технология выкраивания и фрагментации лимбального трансплантата с помощью фемтосекундного лазера не влияет на дальнейшую способность лимбальных стволовых клеток к пролиферации.
2. Показано, что использование фемтосекундного лазера обеспечивает безопасное выкраивание лимбального трансплантата с полным захватом «ниши» лимбальных стволовых клеток.
3. Разработана технология проведения операции простой трансплантации лимбального эпителия с использованием фемтосекундного лазера на этапе выкраивания и фрагментации лимбального трансплантата.

Положения, выносимые на защиту

Разработанная технология простой трансплантации лимбального эпителия с использованием фемтосекундного лазера на этапе выкраивания и фрагментации лимбального трансплантата является безопасной и способствует снижению риска ятрогенного повреждения глазного яблока, обеспечивает сохранность ниши лимбальных стволовых клеток, позволяет получить полноценный клеточный состав лимбального трансплантата с возможностью к дальнейшей пролиферации. Это дает возможность получить стабильную культуру лимбальных эпителиальных стволовых клеток.

Публикации

По теме диссертации публикуется 1 печатная работа в журнале, рекомендованных ВАК РФ для публикации результатов диссертационного исследования, получен патент РФ на изобретение № 2741411 от 25.01.2021.

Структура и объём работы

Диссертационное исследование изложено на 120 страницах машинописного текста, иллюстрировано 15-ю рисунками и 5-ю таблицами.

Работа состоит из введения, обзора литературы, трёх глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 165 источников, из них 48 отечественных и 117 зарубежных.

Работы выполнялись на базе отдела трансплантационной и оптико-реконструктивной хирургии переднего отрезка глаза под руководством зам. генерального директора по научной работе, д.м.н., проф. Малюгина Б.Э. (зав. отделом- д.м.н. Измайлова С.Б.) и Операционного блока (зав. операционным блоком- к.м.н. Головин А.В.) ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. Экспериментальные исследования *in vitro* выполнены на базе Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем под руководством зав. Центром, д.м.н., проф. Борзенко С.А. (зав. глазным банком- к.м.н. Хубецова М.Х.) ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России при участии младшего научного сотрудника Герасимова М.Ю.

Гистологические исследования выполнены на базе лаборатории Патологической анатомии и гистологии глаза Головной организации учреждения заведующей лабораторией – к.м.н. Шацких А.В.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Для достижения поставленной цели работа была разделена на последовательные этапы, соответствующие задачам исследования.

Разработка хирургической техники пересадки лимбальных стволовых клеток с помощью низкоэнергетического фемтосекундного лазера Femto LDV Z8.

Экспериментальное исследование выполнено с использованием 2 свиных и 2 донорских кадаверных глаз.

Согласно классической технологии простой лимбальной эпителиальной трансплантации, после рассечения конъюнктивальными ножницами конъюнктивы в области верхнего сегмента глазного яблока над лимбальной зоной, при помощи алмазного ножа и расслаивателя на 12 ч производится выкраивание лимбального аутооттрансплантата размерами 2*2 мм. После этого аутооттрансплантат переносится в консервационную среду. Перед подготовкой к пересадке кусочков лимбального аутооттрансплантата производится его фрагментация на подложке с помощью микрохирургического лезвия (Рисунок 1).



Рисунок 1- схема простой трансплантации лимбального

Формирование трансплантатов осуществлялось в верхней и нижней зоне лимба каждого глаза с использованием низкоэнергетического пJ-фемтосекундного лазера Femto LDV Z8 (Ziemer Ophthalmic Systems AG, Швейцария). В ходе эксперимента использованы переменные уровни энергии фемтосекундного лазера с целью определения наиболее эффективных, обеспечивающих достижение целостных легко отделяемых фрагментов лимбального лоскута, сопоставимых с размерами мини-

трансплантатов при использовании микрохирургических инструментов. При этом время работы лазера и траектория его движения не менялись.

Для данной работы инженерами компании Ziemer разработана новая траектория работы фемтосекундного лазера Femto LDV Z8 не имеющая аналогов в мире. В начале эксперимента под контролем операционного микроскопа («Opton CFC-6», Carl Zeiss, Германия) производился разрез конъюнктивы на 12 ч у лимба роговицы. После апланации рукоятки фемтосекундного лазера на периферическую верхнюю зону лимба, производилось точное его позиционирование на 12 ч. С помощью встроенной в данный фемтосекундный лазер ОКТ, зона ниши лимбальных стволовых клеток верифицировалась, после чего начиналась работа лазера. Время работы лазера в среднем составляло 38-40 секунд. Глубина расположения горизонтального реза находилась на уровне 150 мкм. Фемтосекундный лазер моделирует лимбальный аутотрансплантат, имеющий форму прямоугольника, разделенного на фрагменты по вертикали, как при традиционной технологии простой трансплантации лимбального эпителия (Рисунок 2).

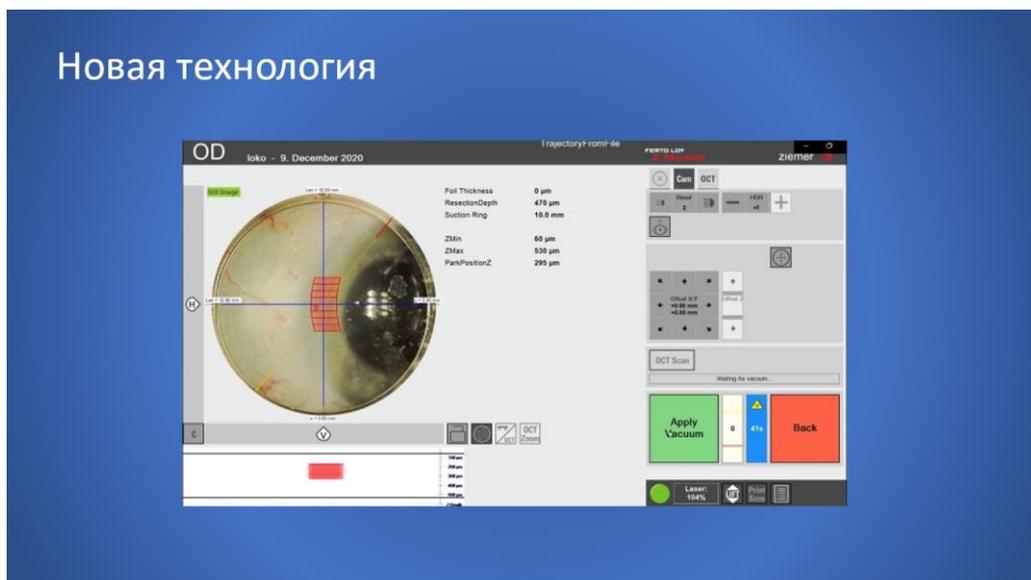


Рисунок 2- новая разработанная технология

Качественную оценку сформированного трансплантата и его мини-трансплантатов проводили в условиях операционной. После формирования лазером мини-трансплантатов учитывалась легкость их отделения от лимбального ложа, зависящая от наличия «тканевых» мостиков, а также целостность мини-трансплантатов. Оценка поверхности ложа лимбального трансплантата производили при помощи интраоперационной ОКТ (RESCAN 700 system, Zeiss, Германия). После удаления мини-трансплантатов корнеосклеральные диски исследовались для оценки глубины расположения горизонтального реза фемтосекундного лазера с помощью гистологического исследования.

В начале эксперимента использовались свиные глаза. Путем подбора необходимого уровня затрачиваемой лазером энергии выявлено, что сформированные мини-трансплантаты наиболее легко отделяются при минимальном уровне энергии в 100%. Но отделении мини-трансплантатов от лимбального ложа во всех случаях было невозможно выполнить в зоне границы роговицы и склеры, при этом со стороны роговицы и склеры мини-трансплантаты отделялись без усилий. Это объясняется анатомической особенностью свиного глаза.

При работе фемтосекундного лазера на кадаверных донорских глазах аналогичной ситуации не наблюдалось. При сравнении различных вариаций затрачиваемой энергии установлено, что формирование необходимых по качеству мини-трансплантатов происходит при минимальном уровне энергии в 100%. При 90% энергии наблюдается большое количество «тканевых мостиков» за счет чего приходится использовать дополнительные микрохирургические инструменты, такие как расслаиватель либо алмазный нож для отделения мини-трансплантатов.

Сравнительный анализ полученных данных гистологического исследования выявил, что глубина расположения горизонтального реза лазера соответствует 150 мкм, что позволяет полностью захватить горизонт лимбальных стволовых клеток.

Разработка оптимальных, безопасных и эффективных энергетических параметров фемтосекундного лазера для выкраивания лимбального трансплантата.

Экспериментальное исследование данного раздела выполнено с использованием 6-ти донорских кадаверных глаз. В верхней и нижней части лимба роговицы каждого глаза производилось формирование лимбального трансплантата и его фрагментация на 8 мини-трансплантатов с использованием низкоэнергетического фемтосекундного лазера Femto LDV Z8 с вариацией разных уровней энергии. Учитывая данные, полученные в предыдущем исследовании, начальный минимальный уровень энергии в настройках лазера определялся на 100% диапазоне. Далее производилось повышение уровня энергии на 10% для формирования каждого последующего трансплантата. Контроль качества трансплантатов оценивался интраоперационно, аналогично предыдущему исследованию.

Отмечено, что при уровне энергии 130% и 135% отделение части мини-трансплантатов от лимбального ложа в ряде случаев было затруднено из-за излишнего размягчения тканей. Исходя из этого, принято решение об использовании в последующих экспериментальных исследованиях использовать уровни энергии фемтосекундного лазера в 100, 110 и 120%, поскольку при данных параметрах формируемые мини-трансплантаты соответствовали заявленным критериям.

Изучение биологической безопасности воздействия низкоэнергетического фемтосекундного лазера Femto LDV Z8 на мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (ММСК) лимба в эксперименте *in vitro*.

Для оценки пролиферации лимбальных эпителиальных стволовых клеток было использовано 20 донорских кадаверных глаз. На каждом глазу было проведено выкраивание лимбального трансплантата и его фрагментация

на 4-е мини-трансплантата с применением низкоэнергетического фемтосекундного лазера Femto LDV Z8 в верхней и нижней части лимба роговицы справа. Для этого использовались различные уровни энергии лазера в 100, 110 и 120%, выбранных случайным образом. Слева лоскут выкраивался и фрагментировался аналогично в верхней и нижней части лимба с помощью микрохирургических инструментов.

С каждого глаза все выделенные мини-трансплантаты были помещены в культуральную среду (Epilife) со специфическими добавками, обеспечивающими рост эпителия роговицы. На 10-ти глазах проведено гистологическое исследование полученных образцов лимба в зоне выкраивания трансплантата обоими способами для оценки качества лимбального ложа. Оставшиеся образцы ткани на 5-ти глазах были подвергнуты иммуногистохимическому исследованию. На 5-ти глазах проводилась сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) ложа трансплантата (Рисунок 3).

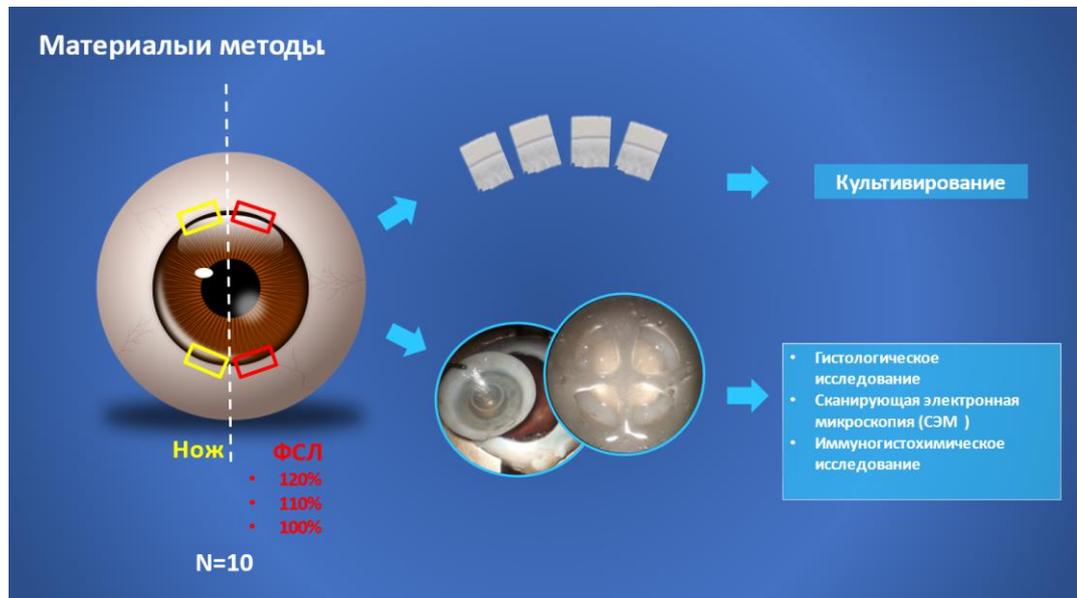


Рисунок 3- методы исследования образцов ткани

Таким образом все выделенные двумя разными способами мини-трансплантаты были размещены на слайд-планшеты. Каждый мини-трансплантат был помещен в отдельную лунку 48-луночного слайд планшета (Corning) с добавлением 100 ml среды Epilife. Таким образом полученные мини-трансплантаты, содержащие в своем составе лимбальные эпителиальные стволовые клетки были сформированы в две группы.

I группа (контрольная) – мини-трансплантаты, полученные путем выкраивания с использованием микрохирургических инструментов (160 мини-трансплантатов)

II группа (опытная)– мини-трансплантаты, полученные путем выкраивания с использованием фемтосекундного лазера (160 мини-трансплантатов). Из них 52- получены при 100% уровне энергии лазера, 52-при 110%, и 56-при 120%.

Культивирование производилось на протяжении 2-х недель. Через 1 и 2е недели проводили подсчет клеток (автоматический счетчик клеток «Luna II», Logos biosystems, Корея). При достижении конfluence (т.е. полного зарастания) клеточного слоя в каждой лунке 1-й (контрольной) и 2-й (опытной) групп полученные культуры лимбальных эпителиальных стволовых клеток рассаживали в дополнительные лунки слайд планшетов, получая культуру 1-го пассажа – P1. После получения достаточного количества лимбальных эпителиальных стволовых клеток P1, суспензии переносились на дополнительные слайд-планшеты. 2-й и 3-й пассаж из некоторых лунок пересеивали на чашки Corning для дальнейшего наблюдения. (Рисунок 4).



Рисунок 4-схема расположения мини-трансплантатов в слайд-планшете

Динамическое наблюдение за культурой ЛЭСК, находящейся в каждой лунке слайд-планшета, проводили ежедневно в течение 14 дней с помощью инвертированного светового фазово-контрастного микроскопа «IX81» с интегрированной цифровой фотокамерой «XC10» (Olympus, Япония). А также выполняли фоторегистрацию полученных клеточных культур каждой лунки слайд-планшета, давали качественную оценку наблюдаемым явлениям, оценивали адгезивные свойства клеточных трансплантатов и их способность к спредингу и фиксировали скорость пролиферации лимбальных стволовых клеток из мини-трансплантатов. Смену питательной среды проводили каждые 2-3 дня.

Оставшиеся корнеосклеральные диски, содержащие в своем составе ложе лимбального трансплантата, были фрагментированы на 4 части для дальнейшего гистологического исследования. Оценивалось качество поверхности лимбального ложа, его структурных тканевых изменений и его анатомо-топографическое положение.

Часть препаратов после фиксации в 10% растворе формалина оценивалась с помощью СЭМ с целью определения качества поверхности

лимбального ложа и морфологических изменений ткани (сканирующий электронный микроскоп «6000plus», Jeol, Япония).

Сравнительный анализ технологий выкраивания лимбального трансплантата с использованием фемтосекундного лазера и традиционной методикой выкраивания трансплантата по технологии SLET.

Сравнительный анализ двух контрольных групп производился с учетом данных гистологического, СЭМ, а также данных проведенного культивирования.

Статистическую обработку полученных в ходе эксперимента данных осуществляли на персональном компьютере с программным обеспечением Statistica 10. Для оценки полученных данных использовали методы параметрической описательной статистики с определением средней арифметической величины (M) и стандартного отклонения ($\pm\sigma$). Статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием t-критерия Стьюдента: в случаях сопоставления разных исследуемых групп – для независимых выборок; в случае оценки динамики исследуемых показателей в одной группе или оценки различий – для зависимых выборок. Различия сравниваемых показателей принимали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Через 1 неделю после выделения мини-трансплантатов и начала культивирования в 1-й контрольной группе, где выкраивание и фрагментация лимбального трансплантата производилось с применением микрохирургических инструментов, количество лунок слайд-планшета, в которых зафиксирован рост составил 28,1%. Во 2-й опытной группе, где формирование мини-трансплантатов осуществлялось фемтосекундным

лазером процент лунок с зафиксированным ростом также составлял 28,1%. На 10-й день наблюдения процентное количество лунок с положительным ростом в двух группах несколько отличалось и составило 40,6 %- в 1-й группе и 37,1 % - во 2-й группе. Адгезия лимбальных стволовых клеток и распространение вокруг них слоя межклеточного матрикса– важнейшие составляющие процессов приживания трансплантатов. Увеличение процента лунок с положительным ростом, вероятно, связано с более плотной адгезией мини-трансплантата, размещенного в лунке слайд планшета. К окончанию сроков культивирования на 14-й день выявлено, что достоверной разницы в пролиферации лимбальных эпителиальных стволовых клеток между двумя исследуемыми группами не наблюдалось ($p=0,617$) и составляло 43,8% -в 1-й контрольной группе и 53,1%-во 2-й опытной группе (Рисунок 5).



Рисунок 5- результаты культивирования клеток двух групп исследования

В сравнении различных уровней применяемой энергии лазера в 100, 110 и 120%, зафиксированный рост лимбальных стволовых клеток из мини-трансплантатов составил 41,7%, 62,5%, 58,3% соответственно ($p=0,592$). Отмечено, что фенотипические характеристики лимбальных эпителиальных

стволовых клеток в двух группах оставались стабильными на всех сроках культивирования (Рисунок б).



Рисунок б- результаты культивирования клеток после воздействия разных уровней энергии лазера

При проведении гистологического исследования в сравнении двух групп выявлено, что при выкраивании лимбального трансплантата микрохирургическими инструментами ровная поверхность лимбального ложа и необходимая глубина горизонтального реза на уровне 150 мкм наблюдалась лишь в 37,5% случаев. В 62,5% поверхность лимбального ложа была неравномерной, что предполагает неравномерную толщину лимбального трансплантата. При выкраивании лимбального трансплантата с использованием фемтосекундного лазера горизонтальный рез во всех случаях располагался на уровне 150 мкм. При сравнении различных уровней применяемой энергии наблюдались явления «оплавления» поверхности лимбального ложа с разной интенсивностью. Вертикальный разрез во всех случаях и при всех уровнях применяемой энергии был «оплавлен». Наблюдались различия в равномерности горизонтальной поверхности лимбального ложа и величине «оплавления» ткани. Наиболее выраженное изменение поверхности наблюдалось при 100% уровне энергии, оно

проявлялось большей «оплавленностью» ткани и неровностями контура ложа. Ложе лимбального трансплантата после воздействия 110 % энергии лазера было более равномерным, но также наблюдалось «оплавление» поверхности лимбального ложа. При 120 % уровне затраченной энергии горизонтальная поверхность во всех случаях была ровной, без изменения поверхности (Рисунок 7).



Рисунок 7- результаты гистологического исследования ложа лимбальных трансплантатов

При проведении СЭМ на увеличении 50х поверхность ложа лимбального трансплантата выглядела умеренно бугристо после воздействия фемтосекундного лазера, но отличалась четкими контурами боковых резов и равномерностью горизонтального реза. В образцах ткани после выкраивания лимбального трансплантата при помощи микрохирургических инструментов визуализировались лоскуты тканей, располагаемых более поверхностно, боковые и горизонтальный резы выглядели неровно, поверхность лимбального ложа была неравномерной в 37,5% случаев. На увеличении в 1000х визуализировалось более выраженное разряжение тканевых структур с образованием округлых конгломератов на образцах, полученных при использовании фемтосекундного лазера (Рисунок 8).

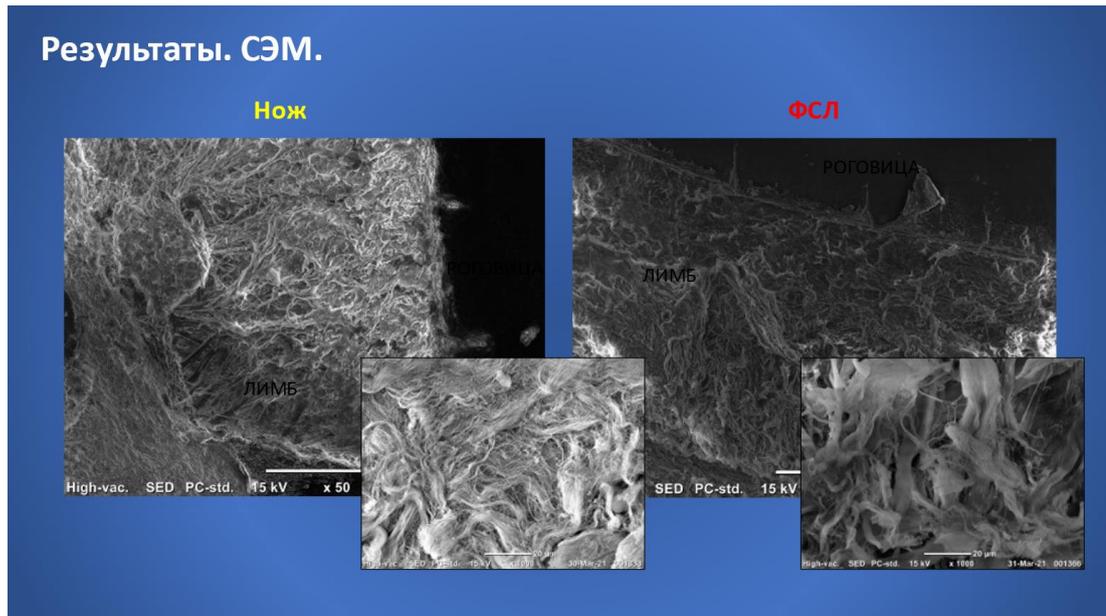


Рисунок 8- результаты сканирующей электронной микроскопии лимбального ложа

Таким образом, в ходе проведения исследований *in vitro*, было установлено, что применение фемтосекундного лазера является возможным в технологии трансплантации лимбальных эпителиальных стволовых клеток и значительно облегчает выкраивание и фрагментацию лимбального трансплантата. Результаты культивирования лимбальных эпителиальных стволовых клеток позволяют говорить о безопасности применения фемтосекундного лазера при их трансплантации и дальнейшей пролиферации до нескольких пассажей клеточных культур. Равномерность поверхности лимбального ложа и выполнение разреза точно по заданной глубине, подтвержденными данным гистологического исследования и данных СЭМ, делает технологию трансплантации лимбальных стволовых клеток с применением фемтосекундного лазера безопасной и эффективной.

ВЫВОДЫ

1. На основании проведенных исследований показано, что разработанная технология трансплантации лимбальных эпителиальных стволовых клеток с применением фемтосекундного лазера позволяет получать лимбальные

мини-трансплантаты определенного размера с забором всех необходимых структур лимбальной зоны.

2. Разработанная модифицированная техника трансплантации лимбальных эпителиальных стволовых клеток производится с меньшими затратами по времени, является малотравматичной и позволяет фрагментировать лимбальный лоскут одновременно с его выкраиванием без дополнительных манипуляций.
3. С помощью проведенного культивирования, микроскопии полученной культуры лимбальных эпителиальных стволовых клеток показано, что воздействие низкоэнергетического фемтосекундного лазера не влияет на их способность к пролиферации и позволяет получить культуру лимбальных эпителиальных стволовых клеток фенотипически не отличающуюся от первоначальной.
4. Разработанная хирургическая техника трансплантации лимбальных эпителиальных стволовых клеток с использованием фемтосекундного лазера сопровождается безопасными уровнями энергии (100%, 110%, 120%), но 120% уровень энергии определен, как наиболее эффективный.
5. Сравнительный анализ результатов лабораторных исследований между трансплантацией лимбальных эпителиальных стволовых клеток с использованием фемтосекундного лазера и трансплантацией лимбальных эпителиальных стволовых клеток с использованием микрохирургических инструментов продемонстрировал сопоставимые значения эффективности между группами, и отсутствие нежелательных изменений со стороны пролиферации лимбальных эпителиальных стволовых клеток в опытной группе, а также более высокую эффективность при получении полноценного по составу лимбального трансплантата по сравнению с традиционной технологией.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для успешного формирования качественного лимбального трансплантата перед апланацией рукоятки фемтосекундного лазера предварительно необходимо освободить лимбальную зону на 12 часах методом препарирования от прилегающих теноновой оболочки и конъюнктивы. При этом глаз нужно располагать так, чтобы оптическая ось была направлена вниз, и зона лимба в месте выкраивания расположилась параллельно рукоятке лазера и операционному столу. После апланации необходимо убедиться в полном докировании рукоятки к глазной поверхности. После этого путем визуализации лимбальной зоны методом встроенной ОКТ, убедиться в правильном позиционировании горизонтального разреза, он должен захватывать «нишу» лимбальных стволовых клеток целиком и в среднем составлять 150 мкм, но с учетом индивидуальных особенностей глаза. Убедившись в соблюдении всех условий, можно приступать к пуску работы фемтосекундного лазера.
2. В ходе выкраивания лимбального трансплантата с помощью фемтосекундного лазера, с целью уменьшения количества «тканевых мостиков» и обеспечения большей легкости отделения мини-трансплантатов от подлежащего ложа следует использовать уровень энергии в 110% и 120%.
3. После окончания работы фемтосекундного лазера при отделении мини-трансплантатов от лимбального ложа необходимо как можно меньше оказывать компрессионные воздействия микрохирургическими инструментами на них. Перед отделением необходимо убедиться в отсутствии «тканевых мостиков», для этого целесообразно с помощью фемтошпателя аккуратно пройти по границам сформированного лимбального трансплантата. Захват мини-трансплантата ирис-пинцетом либо пинцетом типа колибри рациональнее начинать на периферии мини-трансплантата со стороны склеры и двигаться в сторону центра роговицы.

При наличии «тканевых мостиков» в области горизонтального разреза при отделении мини-трансплантатов можно расслоить фемтошпателем.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ НАУЧНОГО ДОКЛАДА

Публикации в научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ

Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., Нефедова О.Н., Герасимов М.Ю. К вопросу о трансплантации лимбальных эпителиальных стволовых клеток при одностороннем синдроме лимбальной недостаточности//Вестник трансплантологии и искусственных органов (в печати)

Патенты РФ на изобретение по теме диссертации

Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., Герасимов М.Ю., Нефедова О.Н. Способ восстановления эпителиального слоя роговицы при одностороннем синдроме лимбальной недостаточности. Патент РФ на изобретение № № 2741411 от 25.01.2021.