

Оганесян О.Г.¹, Яковлева С.С.¹, Баранчиков А.Е.², Иванов В.К.²

РЕЗУЛЬТАТЫ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ УЛЬТРАТОНКОГО ЭНДОКЕРАТОТРАНСПЛАНТАТА, СФОРМИРОВАННОГО ФЕМТОСЕКУНДНЫМ ЛАЗЕРОМ СО СТОРОНЫ ЭНДОТЕЛИЯ

¹ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, 105062, г. Москва;

²ФГБУН «Институт общей и неорганической химии им. Курнакова» Российской академии наук, 119991, г. Москва

♦ Задняя кератопластика в настоящее время является операцией первого выбора в лечении пациентов с патологией эндотелия.

Цель исследования: в условиях *ex vivo* методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) изучить качество стромальной поверхности трансплантата, сформированного фемтосекундным лазером (ФЛ) со стороны эндотелия (инвертно).

Материал и методы. Для изучения влияния параметров фемтодиссекции, а также влияния вискоэластика на качество стромальной поверхности проведены серии СЭМ поверхности стромы роговицы после фемтодиссекции. Использовано 6 пар глаз доноров, не пригодных для кератопластики. Для формирования трансплантата использовалась ФЛ-платформа LDV Z6 («Ziemer», Швейцария).

Заключение. Согласно полученным данным, присутствие вискоэластика ухудшает качество стромальной поверхности при фемтодиссекции со стороны эндотелия, в то время как его отсутствие негативно сказывается на плотности эндотелиальных клеток.

Ключевые слова: фемтосекундный лазер; эндотелиальная кератопластика; эндотелиальная дистрофия; сканирующая электронная микроскопия.

Для цитирования: Оганесян О.Г., Яковлева С.С., Баранчиков А.Е., Иванов В.К. Результаты сканирующей электронной микроскопии ультратонкого эндокератотрансплантата, сформированного фемтосекундным лазером со стороны эндотелия. *Российский медицинский журнал*. 2018; 24(1): 19—24. DOI <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2106-2018-24-1-19-24>

Для корреспонденции: Оганесян Оганес Георгиевич, доктор мед. наук, ведущий научный сотрудник отдела травматологии и реконструктивной хирургии ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, 105062, г. Москва, E-mail: oftalmolog@mail.ru

Oganesyan O.G.¹, Yakovleva S.S.¹, Baranchikov A.E.², Ivanov V.K.²

THE RESULTS OF SCANNING ELECTRONIC MICROSCOPY OF ULTRA-THIN ENDOKERATOTRANSPLANT FORMED BY FEMTOSECOND LASER ON PART OF ENDOTHELIUM

¹The Helmholtz Moscow research institute of eyes diseases, 105062, Moscow, Russian Federation;

²The N.S. Kurnakov institute of general and inorganic chemistry, 119991, Moscow, Russian Federation

♦ Nowadays, the posterior keratoplasty is an operation of original choice in treatment of patients with pathology of endothelium.

The purpose of study. To analyze, in *ex vivo* conditions and using scanning electronic microscopy technique, the quality of stromal surface of transplant formed by femtosecond laser on part of endothelium (invertedly).

Material and methods. The series of scanning electronic microscopy of surface of stroma of cornea after femtodissection were applied to investigate effect of parameters of femtodissection and also impact of viscoelastic on quality of stromal surface. Six pairs of eyes of donors unfitted to keratoplasty were used. To form a transplant the femtosecond laser platform LDV Z6 (Ziemer, Switzerland) was applied.

Conclusion. According obtained data, presence of viscoelastic deteriorates quality of stromal surface under femtodissection on part of endothelium while its absence effects negatively density of endothelium cells.

Keywords: femtosecond laser; endothelium keratoplasty; endothelium dystrophy; scanning electronic microscopy

For citation: Oganesyan O.G., Yakovleva S.S., Baranchikov A.E., Ivanov V.K. The results of scanning electronic microscopy of ultra-thin endokeratoplasty formed by femtosecond laser on part of endothelium. *Rossiiskii meditsinskii zhurnal (Medical Journal of the Russian Federation, Russian journal)*. 2018; 24(1): 19—24. (In Russ.)
DOI <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2106-2018-24-1-19-24>

For correspondence: Oganess G. Oganesyan, doctor of medical sciences, leading researcher of the department of traumatology and reconstructive surgery of the Helmholtz Moscow research institute of eyes diseases, 105062, Moscow, E-mail: oftalmolog@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 09.12.16

Accepted 28.03.17

Эндотелиальная кератопластика (ЭК) в модификации DSEK (Descemet's stripping endothelial keratoplasty) в настоящее время является операцией первого выбора в лечении пациентов, страдающих патологией эндотелия и нуждающихся в трансплантации роговицы. Операция обеспечивает быструю зрительную реабилитацию, небольшой послеоперационный астигматизм и значительно снижает количество интра- и послеоперационных осложнений [1, 2]. Предложено множество способов формиро-

вания эндокератотрансплантата для DSEK: мануальная методика, техники с использованием микрокератома, фемтосекундного или эксимерного лазера [3—6]. Однако все методики, используемые для подготовки донорских трансплантатов, обеспечивают разное качество стромальной поверхности, что может оказывать влияние на послеоперационные функциональные результаты ЭК [2, 7]. Гладкость поверхности трансплантата является одним из наиболее важных параметров при оценке качества ламел-

лярного среза роговицы. Считается, что гладкая поверхность способна обеспечить оптически качественный интерфейс с наименьшим рубцеванием и образованием хейза, лучшую контрастную чувствительность с меньшим количеством оптических аберраций и в целом с лучшей остротой зрения [8—12]. Для оценки качества поверхности в условиях *ex vivo* общепринято использовать метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Степень шероховатости/гладкости получаемых изображений СЭМ определяется субъективно, как правило, несколькими независимыми исследователями [13—15] либо с использованием программного обеспечения [7, 13]. М.А. Тергу и соавт. в своих исследованиях установили, что гладкость поверхности сформированного с помощью фемтосекундного лазера (ФЛ) Intralase трансплантата может быть сравнима с мануальной диссекцией [16]. Другие авторы высказывают предположение, что ФЛ создает более гладкую стромальную поверхность эндокератотрансплантата, чем при использовании микрokerатома [17]. Многочисленные исследования различных авторов были направлены на поиски методов улучшения качества стромальной поверхности кератотрансплантата и, следовательно, интерфейса путём подбора и оптимизации параметров ФЛ [18, 21, 22].

Цель исследования: изучить качество стромальной и эндотелиальной поверхности эндокератотрансплантата, сформированного с помощью фемтосекундного (ФС) лазера со стороны эндотелия (инвертно).

Материал и методы

Клинические исследования выполнены на базе отдела травматологии и реконструктивной хирургии ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России. Исследование методом СЭМ выполнено на базе ФГБУН «Институт общей и неорганической химии им. Курнакова» РАН.

Для формирования эндокератотрансплантата для задней кератопластики использовался ФЛ LDV Z6 («Ziemer», Швейцария). Для изучения влияния параметров лазерной фемтодиссекции, а также влияния вискоэластика на качество стромальной поверхности в ходе формирования трансплантата с эндотелиальной стороны и изучения эндотелиальной поверхности с помощью СЭМ проведены серии исследований поверхности стромы и эндотелия роговицы после фемтодиссекции. Для исследования использованы 6 пар глаз доноров, не пригодных для кератопластики. Анализ структуры образцов осуществляли на сканирующем электронном микроскопе Carl Zeiss NVision 40 с высоким разрешением, работающем при ускоряющем напряжении 1 кВ. Образцы не были покрыты проводящим слоем перед измерениями. Изображения были взяты с детектором Everhart—Thornley (SE2) в увеличениях 100—300.

После стандартного выкраивания корнеосклеральных дисков из всех исследуемых глаз, роговицы пар № 1 и 2 подвергнуты фемтодиссекции с эндотелиальной стороны с параметрами 1: глубина 100 мкм, скорость реза вертикальных границ составила 7,5 мм/с, с мощностью 150%. Диссекция по строме производилась с мощностью 90% и скоростью 7,5 мм/с, общее время диссекции составило 84 с. На эндотелий роговицы правых глаз перед фемтодиссекцией наносили когезивный вискоэластик Provisc («Alcon», США), на эндотелий левых глаз вискоэластик не наносился.

Роговицы из пар № 3 и 4 подвергнуты фемтодиссекции с эндотелиальной стороны с параметрами 2: глубина 100 мкм, скорость диссекции вертикальных границ составила 8,0 мм/с, с мощностью 110%, диссекция по строме производилась со скоростью 5,0 мм/с и мощностью 100%, время диссекции заняло 72 с. На эндотелий роговицы правых глаз перед фемтодиссекцией наносили когезивный вискоэластик Provisc («Alcon», США), в то время как на эндотелий левых глаз вискоэластик не наносился.

Роговицы из пар № 5 и 6 фемтодиссекции не подвергались. На эндотелий роговицы правых глаз наносили когезивный вискоэластик Provisc («Alcon», США) и далее осуществляли аппланацию фемторукотки продолжительностью 80 с без лазерного воздействия. Интактный эндотелий роговицы левых глаз служил группой сравнения для роговиц правых глаз пар № 5 и 6.

Для исследования отобраны остаточные корнеосклеральные диски пар № 1—4, а также цельные корнеосклеральные диски пар № 5 и 6. После фиксации в 2,5% растворе фосфатного буферного глутаральдегида образцы дегидратировали при 4°C последовательно в батарею водных растворов этанола возрастающей концентрации: 50, 75, 80, 90% и в абсолютном этаноле на заключительном этапе. На каждой стадии образцы дважды погружали на 5 мин в раствор этилового спирта. Для удаления спирта образцы переносили на 30 мин в гексаметилдисилазан (HMDS), после чего высушивали на воздухе. Подготовленные образцы монтировали на объектодержатель электронного микроскопа посредством токопроводящего клея.

Анализ структуры образцов осуществляли на сканирующем электронном микроскопе Carl Zeiss NVision 40 с высоким разрешением, работающем при ускоряющем напряжении 1 кВ. Образцы не были покрыты проводящим слоем перед измерениями. Изображения взяты с детектором Everhart—Thornley (SE2) в увеличениях 100—300.

Полученные изображения субъективно оценивали три независимых исследователя. Для градации качества стромальной поверхности нами предложена следующая шкала: 1 — очень гладкая, 2 — гладкая, 3 — шероховатая и 4 — очень грубая. Изображения были представлены исследователям в случайном порядке, без идентификации параметров фемтодиссекции.

Результаты

Изображение с самой грубой поверхностью и наиболее выраженным количеством гребней и складок получено с параметрами 1 и применением когезивного вискоэластика (рис. 1). Оценка по шкале равнялась 4 баллам. Изображение поверхности, полученное без использования вископротектора и с теми же параметрами ФЛ, оценено в 3 балла (рис. 2). Самая гладкая поверхность получена с параметрами 2, когда при фемторассечении вископротектор не использовался, этот снимок оценен по шкале 1 баллом (рис. 3). Изображение поверхности роговицы, полученной методом СЭМ с применением когезивного вискоэластика и параметрами 2, оценено в 2 балла (рис. 4). Снимок эндотелиальной поверхности без лазерного воздействия и протективного покрытия наглядно демонстрирует степень механического повреждения эндотелиальных клеток по сравнению с изображением интактного эндотелия, полученного методом СЭМ (рис. 5, 6).

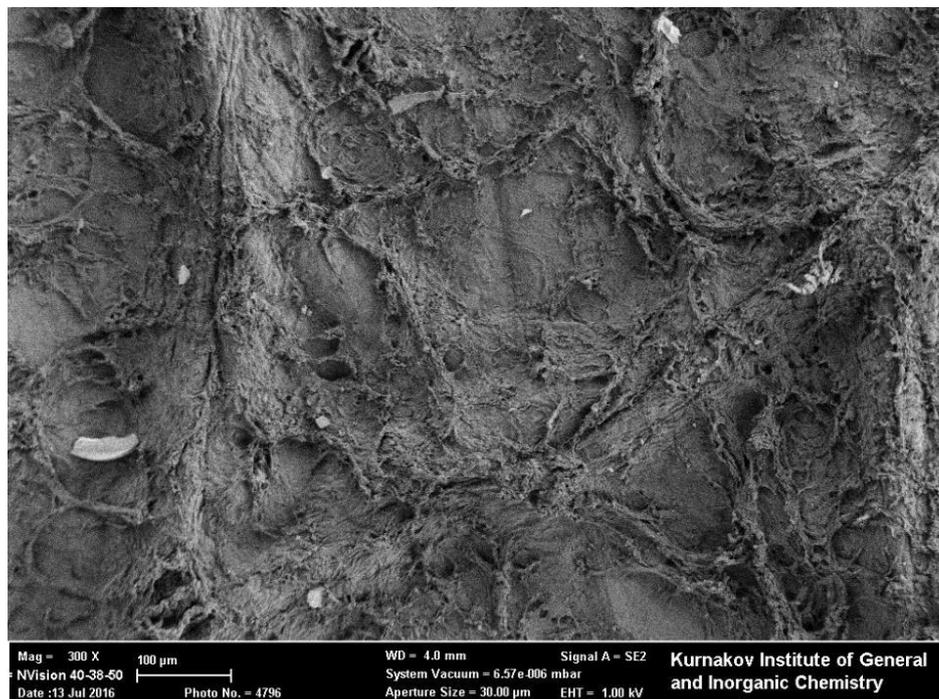


Рис. 1. Изображение СЭМ центральной части роговицы с увеличением 300.

Использовались параметры № 1; при формировании трансплантата применяли когезивный вискоэластик.

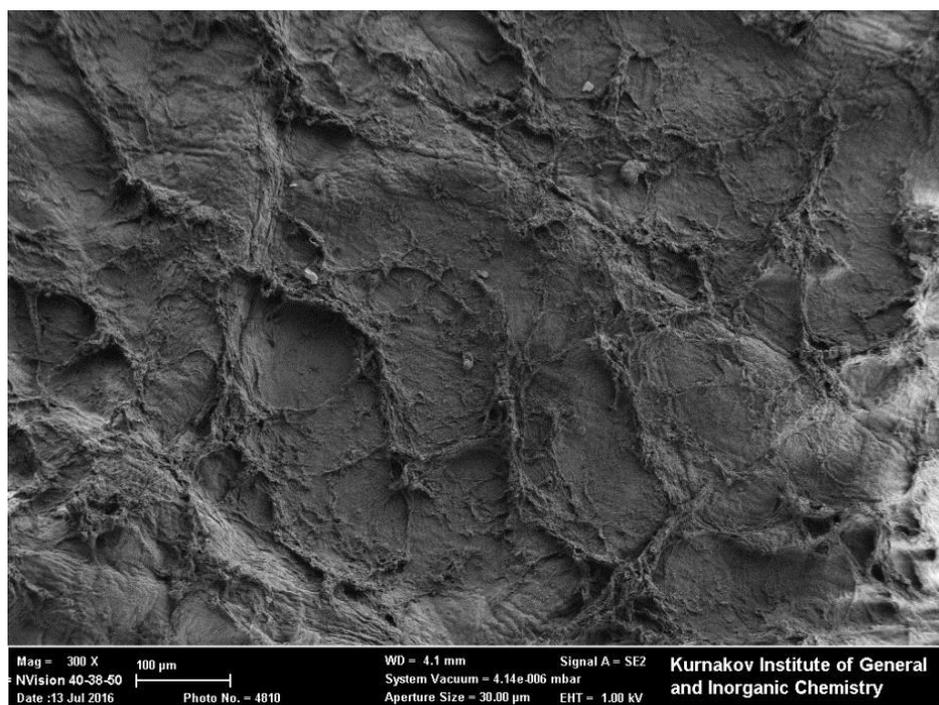


Рис. 2. Изображение СЭМ центральной части роговицы с увеличением 300.

Использовались параметры № 1; при формировании трансплантата вискоэластик не применялся.

Обсуждение

Впервые технологию фемтолазерной диссекции стромы роговицы *in vitro* использовали В. Seitz и соавт., которые продемонстрировали возможности фемтосекундного лазера Femtec (20/10 Perfect Vision, Германия) с частотой импульсов 12,5 кГц, уровнем энергии 10 мкДж и глубиной рассечения 500 мкм для формирования эндотелиального трансплантата диаметром 6—7 мм. По данным исследователей, данные СЭМ показали гладкую стромальную поверхность трансплантата, а коллагеновые волокна визуализировались без признаков термического повреждения [23]. М.А. Теггу и соавт. установили, что гладкость поверхности сформированного трансплантата с помощью ФС-лазера Intralase мо-

жет быть сравнима с таковой при мануальной диссекции [24]. Есть данные, свидетельствующие о том, что качество поверхности трансплантата при его фемтолазерном формировании зависит от глубины стромальной диссекции [19, 20]. Это объясняется тем, что передние слои роговицы имеют большее количество тканевых швов между волокнами, обеспечивая достаточную плотность ткани. Однако в более глубоких слоях эти отношения неполноценны, коллагеновые волокна имеют свободную, рыхлую конфигурацию, в связи с чем при фемтодиссекции происходит рассеивание и ослабление лазерной энергии, что может привести к образованию гребней, складок и хейза различной интенсивности [25—27]. С. Zhang и соавт. опытным путём определили оптималь-

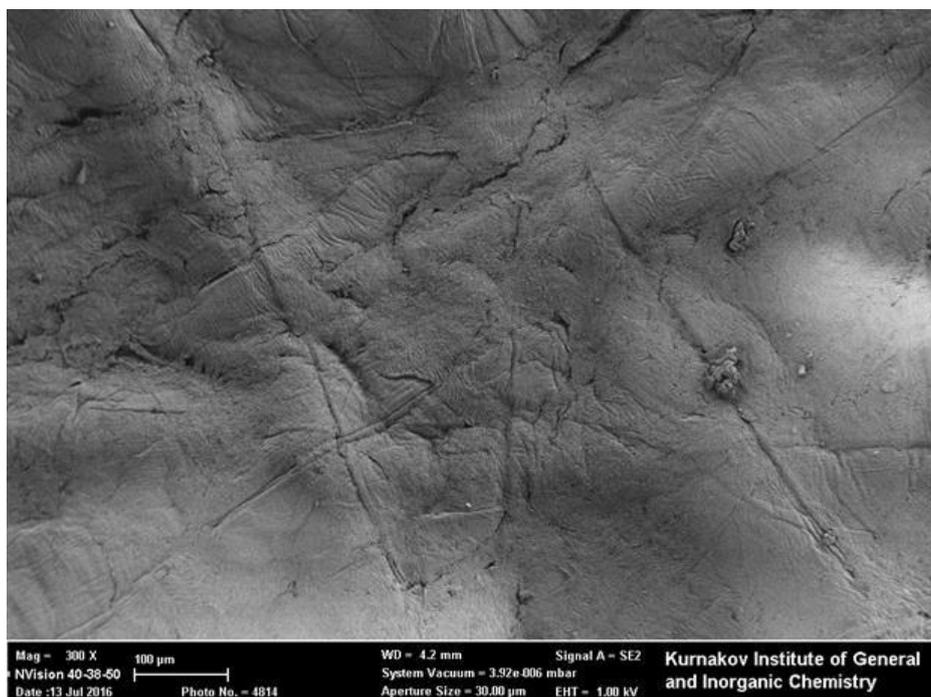


Рис. 3. Изображение СЭМ центральной части роговицы с увеличением 300.

Использовались параметры № 2; при формировании трансплантата вискоэластик не использовался.

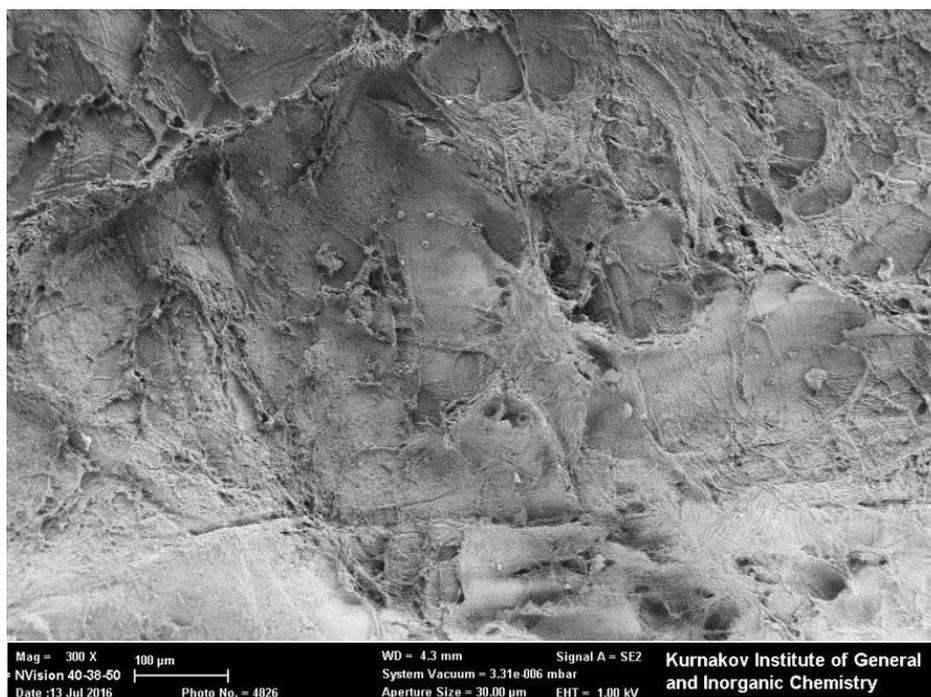


Рис. 4. Изображение СЭМ центральной части роговицы с увеличением 300.

Использовались параметры № 2; при формировании трансплантата использовали когезивный вискоэластик.

ную глубину фемтодиссекции роговицы на платформе лазера Intralase FS 60 кГц, на которой отмечается наиболее гладкая поверхность интерфейса с минимальным количеством гребней и складок, она составляет 31% от общей толщины роговицы, что соответствует в среднем 160—200 мкм [28].

Ранее нами была показана возможность использования установки LDVZ6 в клинике и представлены среднесрочные результаты операций [29]. В данной работе, по нашим сведениям, впервые представлены результаты СЭМ стромальной и эндотелиальной поверхности эндокератотрансплантата, сформированного инвертным способом установкой LDVZ6. С помощью СЭМ нами изучено влияние параметров ФЛ и присутствие виско-

протектора на качество поверхности трансплантата, сформированного с эндотелиальной стороны. В ходе работы установлено, что использование вискоэластика в момент процедуры фемтодиссекции негативно сказывается на качестве интерфейса. Согласно изображениям, полученным методом СЭМ, на поверхности трансплантата можно наблюдать множество складок, неровностей и гребней. Подобные образования в значительной степени могут влиять на функциональные результаты ЭК. Фемтодиссекция без применения каких-либо протективных покрытий позволяет получить очень гладкую стромальную поверхность, однако подобная процедура достаточно травматична для эндотелиального слоя роговицы. Однако в литературе встречается иное мнение,

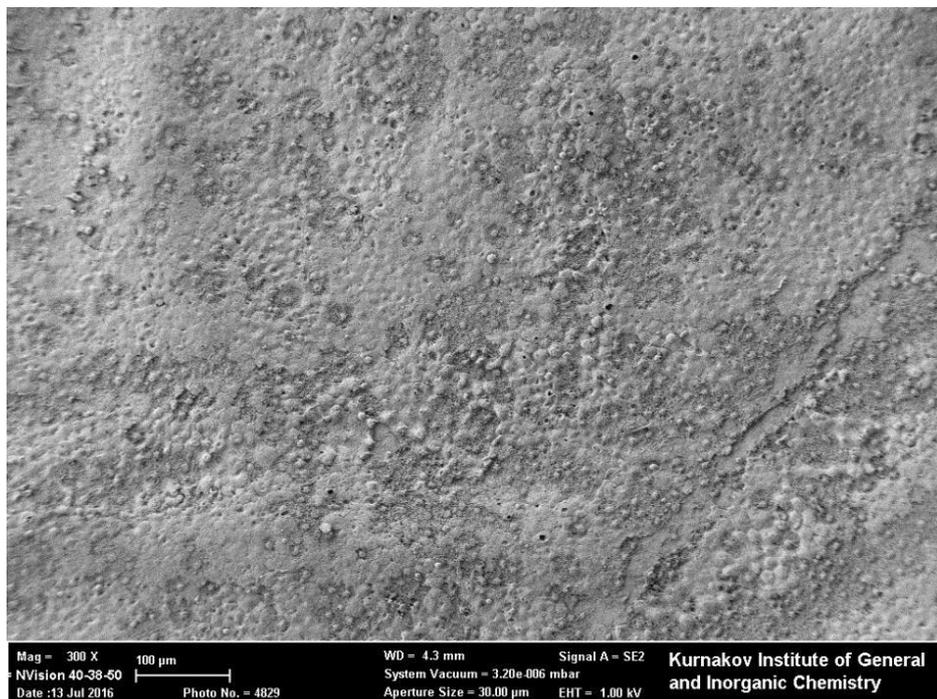


Рис. 5. Изображение СЭМ эндотелия роговицы после аппланации рукояткой ФЛ с эндотелиальной стороны без использования вискоэластика.

Время механического воздействия 80 с.

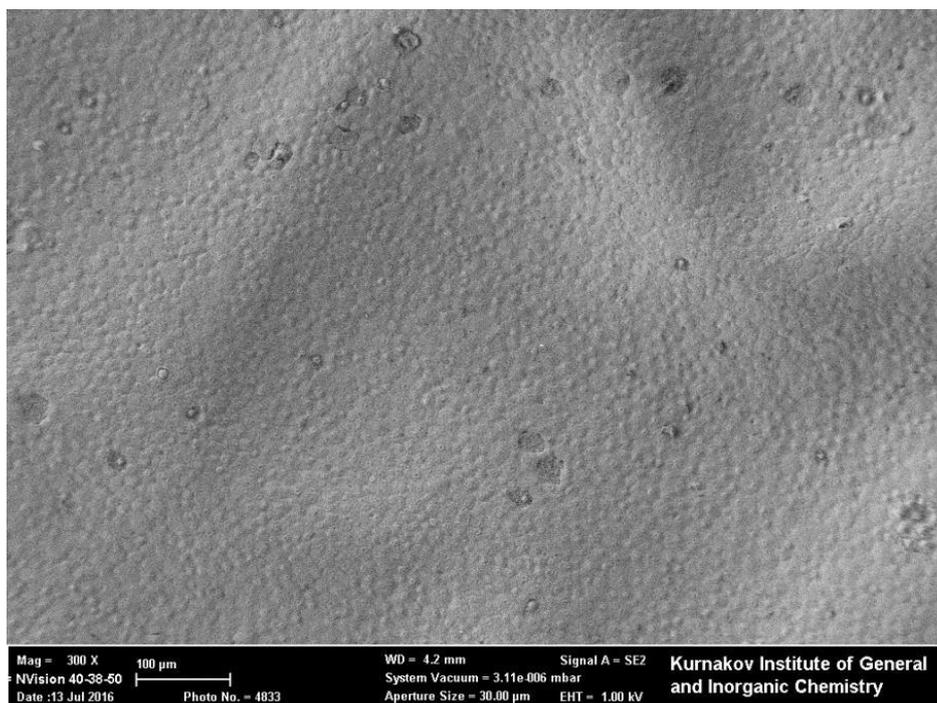


Рис. 6. Изображение СЭМ интактного эндотелия.

Увеличение 300.

согласно которому при выкраивании трансплантата фемтосекундным лазером с эндотелиальной стороны клинически значимой потери плотности эндотелиальных клеток не происходит и она составляет 6—14% [30]. В поисках методов улучшения качества интерфейса общее мнение сводится к тому, что низкая энергия лазера [18, 21] и применение растрового паттерна [22] производят наиболее гладкий и ровный интерфейс при фемторассечении роговицы на глубине от 200—500 мкм. Однако даже с оптимизацией лазерных параметров при фемторассечении роговицы в глубоких слоях стромальная поверхность трансплантата имеет гребни и шероховатости, которые могут быть причиной неудовлетворительных зрительных результатов.

Заключение

Присутствие вискоэластика ухудшает качество стромальной поверхности при ФЛ-формировании эндокератотрансплантата со стороны эндотелия, в то время как его отсутствие негативно сказывается на плотности эндотелиальных клеток.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—28, 30 см. REFERENCES)

29. Погорелова С.С., Оганесян О.Г., Ченцова Е.В. Среднесрочные биологические и функциональные результаты эндотелиальной

кератопластики (DSEK) с формированием трансплантата фемтосекундным лазером со стороны эндотелия. *Российский медицинский журнал*. 2015; 21(4): 9—12.

REFERENCES

- Nieuwendaal C.P., Lapid-Gortzak R., van der Meulen I.J., Melles G.J. Posterior lamellar keratoplasty using descemetorhexis and organ cultured donor corneal tissue (Melles technique). *Cornea*. 2006; 25(8): 933—6.
- Price M.O., Giebel A.W., Fairchild K.M., Price F.W. Descemet's membrane endothelial keratoplasty: prospective multicenter study of visual and refractive outcomes and endothelial survival. *Ophthalmology*. 2009; 116(12): 2361—8.
- Cheng Y.Y., Pels E., Nuijts R.M. Femtosecond laser assisted Descemet's stripping endothelial keratoplasty. *J. Cataract Refract. Surg.* 2007; 33(1): 152—5.
- Chen E.S., Terry M.A., Shamie N. Descemet stripping automated endothelial keratoplasty: six-month results in a prospective study of 100 eyes. *Cornea*. 2008; 27(5): 514—20.
- Melles G.R., Wijdh R.H., Nieuwendaal C.P. A technique to excise the descemet membrane from a recipient cornea (descemetorhexis). *Cornea*. 2004; 23(3): 286—8.
- Trinh L., Saubaméa B., Auclin F. A new technique of endothelial graft: the femtosecond and excimer lasers-assisted endothelial keratoplasty (FELEK). *Acta Ophthalmol.* 2013; 91(6): 497—9.
- Jones Y.J., Goins K.M., Sutphin J.E., Mullins R., Skeie J.M. Comparison of the femtosecond laser (IntraLase) versus manual microkeratome (Moria ALTK) in dissection of the donor in endothelial keratoplasty: initial study in eye bank eyes. *Cornea*. 2008; 27(1): 88—93.
- Güell J.L., Velasco F., Roberts C., Sisquella M.T., Mahmoud A. Corneal flap thickness and topography changes induced by flap creation during laser in situ keratomileusis. *J. Cataract Refract. Surg.* 2005; 31(1): 115—9.
- Huang D., Arif M. Spot size and quality of scanning laser correction of higher-order wavefront aberrations. *J. Cataract. Refract. Surg.* 2002; 28(3): 407—16.
- Lim T., Yang S., Kim M.J., Tchah H. Comparison of the IntraLase femtosecond laser and mechanical microkeratome for laser in situ keratomileusis. *Am. J. Ophthalmol.* 2006; 141(5): 833—9.
- Tran D.B., Sarayba M.A., Bor Z., Garufis C., Duh Y.-J., Soltes C.R. Randomized prospective clinical study comparing induced aberrations with IntraLase and Hansatome flap creation in fellow eyes; potential impact on wavefront guided laser in situ keratomileusis. *J. Cataract Refract. Surg.* 2005; 31(1): 97—105.
- Vinciguerra P., Azzolini M., Airaghi P., Radice P., De Molfetta V. Effect of decreasing surface and interface irregularities after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis on optical and functional outcomes. *J. Refract. Surg.* 1998; 14(2 Suppl.): 199—203.
- Sarayba M.A., Ignacio T.S., Binder P.S., Tran D.B. Comparative study of stromal bed quality by using mechanical, IntraLase femtosecond laser 15- and 30-kHz microkeratomes. *Cornea*. 2007; 26(4): 446—51.
- Sarayba M.A., Maguen E., Salz J., Rabinowitz Y., Ignacio T.S. Femtosecond laser keratome creation of partial thickness donor corneal buttons for lamellar keratoplasty. *J. Refract. Surg.* 2007; 23(1): 58—65.
- Nuzzo V., Aptel F., Savoldelli M., Plamann K., Peyrot D., Deloison F., et al. Histologic and ultrastructural characterization of normal femtosecond laser trephination. *Cornea*. 2009; 28(8): 908—13.
- Terry M.A., Ousley P.J., Will B. A practical femtosecond laser procedure for DLEK endothelial transplantation; cadaver eye histology and topography. *Cornea*. 2005; 24(4): 453—9.
- Kymionis G.D., Kontadakis G.A., Naoumidi I., Kankariya V.P., Panagopoulou S., Manousaki A. Comparative study of stromal bed of LASIK flaps created with femtosecond lasers (IntraLase FS150, WaveLight FS200) and mechanical microkeratome. *Br. J. Ophthalmol.* 2014; 98(1): 133—7.
- Ziebarth N.M., Dias J., Hürmeric V. Quality of corneal lamellar cuts quantified using atomic force microscopy. *J. Cataract Refract. Surg.* 2013; 39(5): 110—7.
- Soong H.K., Mian S., Abbasi O., Juhasz T. Femtosecond laser-assisted posterior lamellar keratoplasty: initial studies of surgical technique in eye bank eyes. *Ophthalmology*. 2005; 112(1): 44—9.
- Zhang C., Bald M., Tang M. Interface quality of different corneal lamellar-cut depths for femtosecond laser-assisted lamellar anterior keratoplasty. *J. Cataract Refract. Surg.* 2015; 41(4): 827—35.
- Lombardo M., De Santo M.P., Lombardo G. Surface quality of femtosecond dissected posterior human corneal stroma investigated with atomic force microscopy. *Cornea*. 2012; 31(12): 1369—75.
- Sarayba M.A., Maguen E., Salz J. Femtosecond laser keratome creation of partial thickness donor corneal buttons for lamellar keratoplasty. *J. Refract. Surg.* 2007; 23(1): 58—65.
- Seitz B., Langenbacher A., Hofmann-Rummelt C. Non mechanical posterior lamellar keratoplasty using the femtosecond laser (femto-PLAK) for corneal endothelial decompensation. *Am. J. Ophthalmol.* 2003; 136(4): 769—72.
- Terry M.A., Ousley P.J., Will B. A practical femtosecond laser procedure for DLEK endothelial transplantation; cadaver eye histology and topography. *Cornea*. 2005; 24(4): 453—9.
- Bergmanson J.P.G., Horne J., Doughty M.J. Assessment of the number of lamellae in the central region of the normal human corneal stroma at the resolution of the transmission electron microscope. *Eye Contact Lens*. 2005; 31(6): 281—7.
- Aptel F., Olivier N., Deniset-Besseau A. Multimodal nonlinear imaging of the human cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010; 51(5): 2459—65.
- Soong H.K., Mian S., Abbasi O., Juhasz T. Femtosecond laser assisted posterior lamellar keratoplasty. Initial studies of surgical technique in eye bank eyes. *Ophthalmology*. 2005; 112(1): 44—9.
- Zhang C., Bald M., Tang M. Interface quality of different corneal lamellar-cut depths for femtosecond laser-assisted lamellar anterior keratoplasty. *J. Cataract Refract. Surg.* 2015; 41(4): 827—35.
- Pogorelova S.S., Oganessian O.G., Chentsova E.V. Medium-term biological and functional results of endothelial keratoplasty (DSEK) with the formation of a graft by a femtosecond laser from the endothelium. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal*. 2015; 21(4): 9—12. (in Russian)
- Sikder S., Snyder R.W. Femtosecond laser preparation of donor tissue from the endothelial side. *Cornea*. 2006; 25(4): 416—22.