

DOI: <https://doi.org/10.25276/0235-4160-2019-4-7-15>
УДК 617.713

Изучение процессов репопуляции роговицы кролика эндотелиальными клетками при экспериментальном моделировании частичной трансплантации эндотелия и десцеметовой мембраны

Б.Э. Малюгин¹, А.В. Терещенко³, О.П. Антонова¹, А.М. Гелястанов¹, Е.А. Васильева²,
И.В. Трифаненкова³, А.М. Кодунов³, С.К. Демьянченко³

¹ ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России, Москва;

² Институт фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России;

³ ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России, Калужский филиал

РЕФЕРАТ

Цель. Изучить особенности операции и послеоперационного состояния глаз кроликов после частичной трансплантации эндотелия и десцеметовой мембраны (ТЭДМ) с акцентом на определение вектора миграции трансплантированных эндотелиальных клеток роговицы.

Материал и методы. Исследование проводили на 10 кроликах-самках (10 глаз) породы шиншилла. Для выкраивания донорских трансплантатов десцеметовой мембраны использовали корнеосклеральные диски энуклеированных глаз кроликов-самцов. Пересаживали ½ часть 8,0 мм диска выкраенной ДМ. С целью определения половой принадлежности эндотелиальных клеток и определения вектора миграции клеток использовали цитологические (окраска азу-эозин и раствором акрихина) и молекулярно-генетические (полимеразная цепная реакция) методы.

Результаты. Ранний послеоперационный период характеризовался диффузным отеком роговицы и смешанной инъекцией глазного яблока. Два кролика в ходе эксперимента скончались от естественных причин (в период от 7 до 30-х суток). Через месяц после ТЭДМ у 3-х кроликов (3 глаза) была достигнута полная резорбция отека роговицы. Центральная зона роговицы была прозрачна, её окружало четко сформированная зона белесоватого помутнения. Во всех перечисленных 3-х случаях периферия роговицы, прилегающая к лимбу (шириной 1,0-1,5 мм), также сохраняла прозрачность. В одном случае состояние центральной зоны роговицы было расценено как полупрозрачное, у 4-х других кроликов (4 глаза) сформировалось централь-

ное помутнение роговицы, соответствующее с зоной десцеметорексиса. Молекулярно-генетический анализ проведен на 3-х глазах с прозрачным приживлением трансплантатов. Он показал, что амплификация с помощью праймеров SRYfor и SRYrev к gSRY, локализованному на Y-хромосоме в регионе, определяющем половую принадлежность, не давала положительных откликов ни для одной из исследуемых зон роговицы (центр, периферия).

Заключение. В результате исследования впервые в мире продемонстрирована техническая возможность выполнения ТЭДМ на глазах кроликов, что обеспечивало восстановление прозрачности центральной зоны роговицы в 37,5% (3 из 8) случаев. Особенностью регенераторного ответа роговиц экспериментальных животных следует считать формирование помутнения стромы, окружающей прозрачную центральную зону роговицы. Невозможность идентифицировать эндотелиальные клетки донора (кролика-самца) на средней периферии роговицы реципиента (кролика-самки) позволяет сделать обоснованное предположение об отсутствии их миграции в зону ятрогенного дефекта. При прозрачном приживлении трансплантата, состоящего из ½ части ДМ и расположенного на её поверхности эндотелиального монослоя, миграция эндотелиальных клеток происходила в направлении от периферии роговицы к её центру.

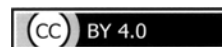
Ключевые слова: роговица, трансплантация, эндотелий роговицы, десцеметова мембрана, полимеразная цепная реакция, кролики, трансплантация эндотелия и десцеметовой мембраны, ТЭДМ. ■

Авторы не имеют финансовых или имущественных интересов в упомянутых материале и методах.

Офтальмохирургия. 2019;4: 7–15.

Для корреспонденции:

Антонова Ольга Павловна, канд. мед. наук, мл. науч. сотрудник.
ORCID ID: 0000-0003-0050-7883
E-mail: antonova.mntk@gmail.com



ABSTRACT

Clinical results and corneal endothelial cells migration assessment after Hemi-DMEK in rabbit eyes

B.E. Malyugin¹, A.V. Tereshchenko³, O.P. Antonova¹, A.M. Gelyastanov¹, E.A. Vasilyeva², I.V. Trifanenkova³, A.M. Kodunov³, S.K. Demyanchenko³

¹ S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow;

² Institute of Fundamental Medicine of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Privolzhsky Research Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation;

³ Kaluga Branch of S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Kaluga

Purpose. To assess clinical results of partial Descemet's membrane endothelial keratoplasty (hemi-DMEK) performed on the rabbit eyes with the focus on migration vector of transplanted corneal endothelial cells.

Material and methods. The study was performed on 10 female Chinchilla rabbits (10 eyes). Corneo-scleral discs of enucleated eyes of male rabbits were used for preparing donor transplants of the Descemet's membrane. Half of the dissected 8,0 mm Descemet's membrane disc was transplanted. In order to determine the sex of the endothelial cells and to determine the cell migration vector, cytological (staining with azure-eosin and akrikhin solution) and molecular genetic (polymerase chain reaction) methods were used.

Results. Early postoperative period was characterized by diffuse corneal oedema and admixed injection of the eye. Two rabbits died from natural causes during the experiment (from 7 to 30 days). 1 month after the procedure in 3 rabbits (3 eyes), complete resorption of corneal oedema was achieved. In these eyes central cornea regained transparency and was surrounded by a circular whitish cloudy area. In all of these 3 corneas, periphery (1,0-1,5 mm in width adjacent to the limbus) was also transparent. In one rabbit, the cornea was having the same pattern of circular cloudiness, but the central zone was graded as semi-transparent. In 4 rabbits (4 eyes) intensive, thick central opacity of the cornea was formed, corresponding to the zone of descemetorhexis.

Molecular genetic analysis was performed on 3 eyes with transparent grafts. Analysis showed that amplification using primers SRYfor and SRYrev to gSRY, localized on the Y-chromosome in the region determining sex, did not give positive responses for any of the studied areas of the cornea (centre, periphery).

Conclusion. For the first time, technical feasibility of performing hemi-DMEK in on the rabbit eyes was demonstrated. Full transparency of the central cornea was achieved in 37,5% (3 out of 8 eyes). Regenerative response of the cornea to the surgical procedure included the formation of circular opacity of the stroma surrounding the transparent central zone. We were not being able to identify endothelial cells of the donor (male rabbit) on the middle periphery of the recipient's cornea (female rabbit) which allows us to make a reasonable assumption about the absence of their migration to the iatrogenically defected zone. Transparent status of a transplanted half of the Descemet's membrane with endothelial monolayer was due to endothelial cell migration from the periphery to the centre of the cornea.

Key words: cornea, transplantation, corneal endothelium, Descemet's membrane, polymerase chain reaction, rabbits, Descemet's Membrane Endothelial Transplantation, DMEK. ■

No author has a financial or proprietary interest in any material or method mentioned

Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery. 2019;4: 7-15.

АКТУАЛЬНОСТЬ

В последнее десятилетие развитие эндотелиальной кератопластики шло по пути использования трансплантатов, обеспечивающих наиболее высокие зрительные функции уже на ранних сроках послеоперационного периода. Известно, что это напрямую связано с объемом пересаживаемой ткани и её толщиной [1]. Данный факт можно наглядно оценить, проследив появление таких технологий, как задняя послойная кератопластика ЗПК или DLEK (deep lamellar endothelial keratoplasty – англ.), задняя автома-

тизированная послойная кератопластика ЗАПК или DSAEK (Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty – англ.), усовершенствованной до автоматизированной ЗАПК с использованием ультратонких (ultrathin-DSAEK) и даже супертонких трансплантатов (nano-DSAEK) с толщиной стромы порядка 40-50 микрон [2, 3]. Вершиной модификации трансплантата для эндотелиальной кератопластики можно считать разработку техники трансплантации десцеметовой мембраны с монослоем эндотелиальных клеток – ТЭДМ или DMEK (Descemet's membrane endothelial keratoplasty – англ.) [11]. Одним из направлений

дальнейшего развития данной технологии является миниатюризация параметров пересаживаемой ткани и использование трансплантатов, составляющих от половины до четверти по площади стандартного трансплантата десцеметовой мембраны (ДМ). Данные тканесберегающие методики подразумевают возможность использования одной ДМ донорской роговицы для двух и более реципиентов путем деления эндотелиального трансплантата на несколько частей [8].

Известно, что при патологии эндотелиального слоя роговицы не всегда целесообразно проводить его замену, трансплантируя донорские клет-

ки. В частности, при первичной эндотелиальной дистрофии роговицы Фукса одним из актуальных направлений стала разработка и совершенствование операции изолированного десцеметорексиса (ИДР). Данная методика основана на способности собственных клеток эндотелия роговицы к миграции и заполнению ятрогенного дефекта [5, 7, 12]. Успех подобных операций во многом зависит от того, насколько быстро и эффективно произойдет трансфер клеток на «оголенные» участки стромы роговицы реципиента.

Несмотря на то что технология ТЭДМ уверенно вошла в клиническую практику, до настоящего момента нет достоверных исследований, дающих ответ на основной вопрос. А именно – чьи эндотелиальные клетки, донора или самого реципиента, заполняют участки стромы, лишенные десцеметовой мембраны? Изучение фундаментальной базы данных тканесберегающих методик эндотелиальной кератопластики позволит обеспечить повышение результативности вышеуказанных оперативных вмешательств и откроет новые направления по их совершенствованию. Следует также подчеркнуть, что в доступной нам литературе нет сообщений о выполнении операция ТЭДМ у экспериментальных животных, в частности, у кроликов.

ЦЕЛЬ

Изучение особенностей операции и послеоперационного состояния глаз кроликов после трансплантации эндотелия и десцеметовой мембраны (ТЭДМ) с акцентом на определение вектора миграции трансплантированных эндотелиальных клеток роговицы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Операции проводили на 10 кроликах-самках (10 глаз) породы шиншилла. Для выкраивания донорских трансплантатов десцеметовой мем-

браны со слоем эндотелиальных клеток использовали корнеосклеральные диски энуклеированных глаз кроликов-самцов. Для определения половой принадлежности эндотелиальных клеток и определения вектора миграции клеток использовали цитологические (окраска азури-эозином и раствором акрихина) и молекулярно-генетические (полимеразная цепная реакция) методы.

Исследование проводили в соответствии с общепринятыми принципами гуманного обращения, определяющимися международными правилами по работе с лабораторными животными, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (принята 18.03.1986 г. и подтверждена 15.06.2006 г., Страсбург, Франция).

Техника операции: оперативное вмешательство проводили под масочным наркозом (Севоран). Оперировали только один (правый) глаз экспериментального животного. После обработки операционного поля и наложения двух пружинных векторасширителей (второй служил для ретракции «третьего века» кролика), конъюнктиву орошали раствором бетадина 5% с экспозицией 2 минуты. В верхней половине глазного яблока, в лимбальной зоне, отступя на 0,5 мм в сторону центра роговицы, формировали основной операционный доступ шириной 3,0 мм и два дополнительных (шириной 1,0 мм) напротив основного разреза и слева от него, на расстоянии 3-х часов. Со стороны эпителия наносили круговую метку роговицы диаметром 8,0 мм. После первых двух операций стала очевидна необходимость введения через парацентез в переднюю камеру растворов мезатона (1% – 0,2 мл), и гепарина (5000 Ед – 0,3 мл) для профилактики эксудативного выпота из радужки во влагу передней камеры. После этого влагу передней камеры замещали на раствор когезивного вискоэластика (1% раствор гиалуроната натрия в объеме 0,2–0,3 мл). Микрокрючком (по Сински с обратным профилем)

с тупым кончиком проводили круговой десцеметорексис диаметром около 8,0 мм (рис. 1а) с последующим удалением десцеметовой мембраны пинцетом с тупыми браншами, после чего вискоэластик аспирировали и восстанавливали переднюю камеру сбалансированным солевым раствором. Корнеосклеральный диск реципиента размещали в держателе эндотелием вверх. Трепаном диаметром 8,0 мм наносили круговую метку с эндотелиальной стороны, на эндотелий наносили 2–3 капли 0,15% раствора трепанового синего (Membrane Blue-Dual DORK, Голландия) для контрастирования. Десцеметову мембрану донора, расположенную к периферии от зоны трепанации, отсепаровывали с помощью роговичного пинцета с тупыми браншами (рис. 1б). Затем край ДМ захватывали пинцетом и подтягивали в сторону центра роговицы, отслаивая до половины, и укладывали в исходное положение. Аналогичным способом захватывали и отслаивали противоположный край десцеметовой мембраны. Поверхность эндотелия при этом неоднократно капельно орошали консервационной средой из шприца объемом 2,0 мл без канюли. Полученный трансплантат диаметром 8,0 мм разрезали на две равные половины с помощью микролезвия (рис. 1в). На каждой половине десцеметовой мембраны проводили краевую ориентирную насечку в виде неравностороннего треугольника. Сформированные трансплантаты помещали в раствор для хранения роговицы (ТУ 9398-013-29039336-2008, производитель – ООО «НЭП «Микрохирургия глаза», Москва). Введение трансплантата в переднюю камеру глаза кролика (самки) проводили с использованием прямой стеклянной пипетки, соединенной трубкой со шприцом объемом 5,0 мл, содержащим физиологический раствор (рис. 1г). Далее трансплантат расправляли и центрировали поглаживающими движениями по наружной поверхности роговицы канюлей 25G и шпателем

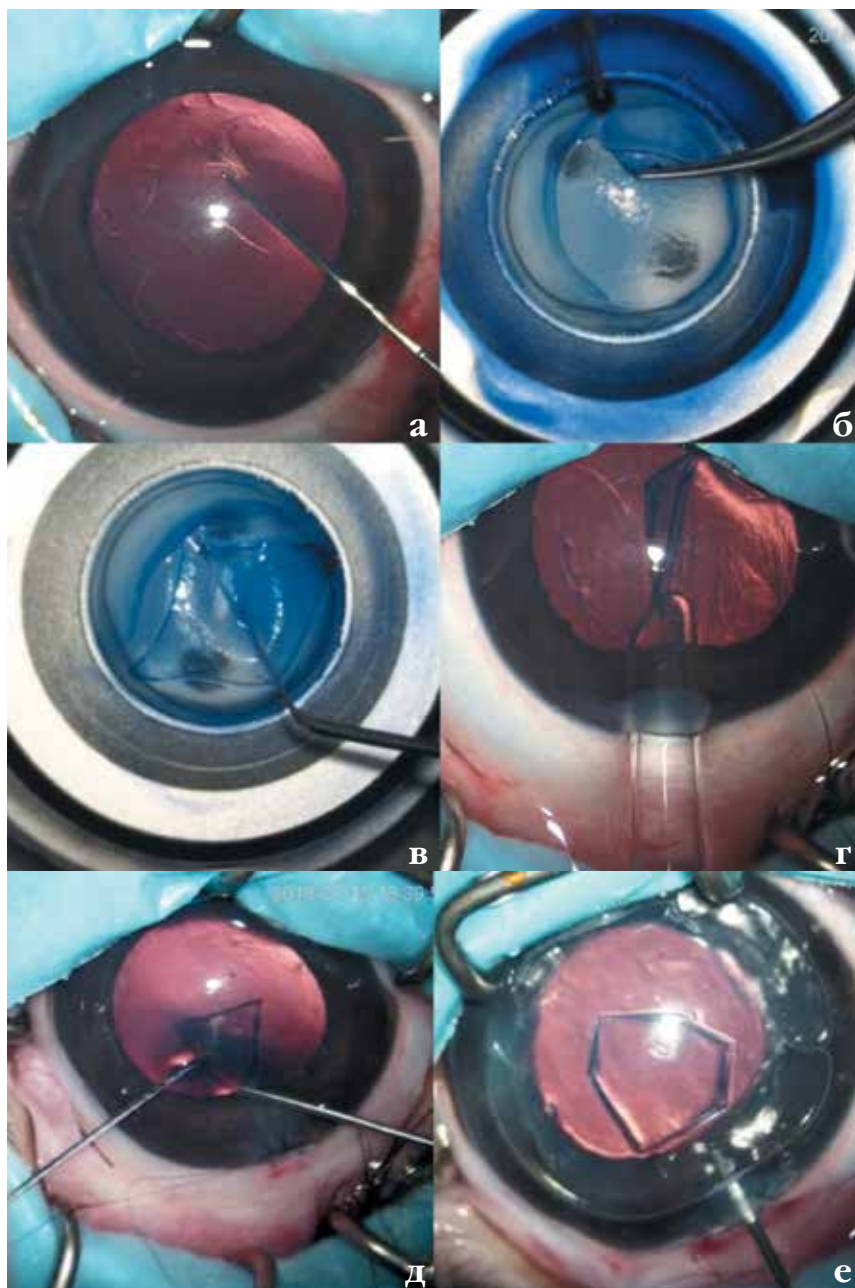


Рис. 1. Этапы оперативного вмешательства: а) проведение десцеметорексиса диаметром 8,0 мм с использованием крючка Сински с обратным загибом; б) выкраивание трансплантата десцеметовой мембраны и эндотелия (диаметр 8,0 мм); в) разделение трансплантата на две части; г) введение трансплантата в переднюю камеру глаза в виде рулона через стеклянный инжектор с применением ирригационного метода; д) процесс расправления донорского трансплантата в передней камере глаза кролика при мидриазе; е) вид расправленного трансплантата ДМ с подвернутыми краями вследствие естественных эластических свойств ДМ экспериментального животного, фиксированный пузырьком воздуха, введенным в переднюю камеру

Fig. 1. Stages of surgery: а) performing descemetorhexis with a diameter of 8.0 mm using a Sinski hook with a reverse bend; б) grafting of the Descemet's membrane with endothelial cells (diameter 8.0 mm); в) separation of the transplant into two parts; г) graft implantation into the anterior chamber of the eye in the roll-form by a glass injector using the irrigation method; д) the process of expansion of the donor transplant in the anterior chamber of the rabbit eye with mydriasis; е) view of the expanded DM graft with tucked edges due to the natural elastic properties of the DM of the experimental animal, fixed by an air bubble introduced into the anterior chamber

(рис. 1д). После расправления и центрации трансплантат фиксировали при помощи пузырька воздуха, введенного в переднюю камеру (рис. 1е).

Таким образом, по завершении операции вокруг трансплантированной ДМ донора была сформирована «оголенная» зона стромы роговицы кролика-реципиента (самки) шириной около 2,0–2,5 мм, не прикрытая ни собственной, ни донорской десцеметовой мембраной. Указанная зона роговицы реципиента

являлась в последующем предметом для изучения на наличие эндотелиальных клеток реципиента (кролика-самки) или донора (кролика-самца) с целью определения направленности эндотелиального трансфера.

В послеоперационном периоде всем кроликам проводили антибактериальную и противовоспалительную терапию (инстилляцией 0,5% раствора левофлоксацина и 0,1% раствора дексаметазона 3–4 раза в день). Осмотр животных и фото-

регистрацию послеоперационных результатов проводили на сроках 1 день, 7 дней и 1 мес. Лабораторных животных выводили из эксперимента через 1 мес. после операции.

Исследования по установлению половой принадлежности эндотелиальных клеток трансплантированной десцеметовой мембраны и участка стромы роговицы, оголенного в процессе хирургического вмешательства, энуклеированного глаза кролика проводили на основа-

нии полового диморфизма клеток на 2-х глазах. Исследование выполняли сразу после забоя экспериментальных животных на сроке 1 мес. после операции. Для анализа были использованы изолированные эндотелиальные клетки глаза кролика-реципиента из двух зон заднего слоя роговицы: первая – центральная область трансплантата диаметром 3 мм, вторая – периферическая зона на расстоянии 6–8 мм от центра. Суспензию эндотелиальных клеток зафиксировали на предметном стекле, после чего проводили окрашивание азури-эозином с последующей световой микроскопией, а также раствором акрихина и дальнейшей визуализацией люминесцентной микроскопией. В клетках периферической области проанализированы ядра, находящиеся в интерфазе, на предмет наличия хроматиновых телец – телец Барра.

Пять других энуклеированных глаз кроликов были помещены в 10% формалин и находились в нем в течение четырех месяцев. Для дальнейшего исследования глаза были извлечены из консервационного раствора и промыты дистиллированной водой. Из глаз вырезаны фрагменты роговицы с десцеметовой мембраной и монослоем эндотелиальных клеток из зоны операции. Вырезанный материал инкубировали при +8° С в течение 72 часов в Tris-глициновом буфере со сменой буфера два раза в сутки. Выделение ДНК из фрагмента ткани проводили по стандартной методике: обработка в течение 16 часов при 56° С протеиназой К в присутствии дитиотреитола, фенол-хлороформная экстракция, концентрирование переосаждением этиловым спиртом. Полученную ДНК использовали в полимеразной цепной реакции (ПЦР) для амплификации *sex-determining region Y*-хромосомы (gSRY) у кролика с использованием праймеров SRYfor: CAGGAACGGGTCAAGCGAC и SRYrev: AGATCAGTACGCCTTCTTG. Результаты амплификации анализировали с помощью электрофоре-

за в 1% агарозном геле. Учет результатов проводили в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм. Размеры молекул анализируемых образцов ДНК определяли путем сопоставления их электрофоретической подвижности в геле с подвижностью маркеров – фрагментов ДНК известной молекулярной массы (100+ bp DNA Ladder, Евроген).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Через 1 сутки после операции у всех кроликов наблюдали умеренный блефароспазм, смешанную инъецию конъюнктивы и выраженный отек роговицы. Во всех случаях при биомикроскопии с помощью щелевой лампы трансплантаты были расположены правильно и прилежали к задней поверхности роговицы реципиента. Пузырь воздуха занимал примерно 1/3 от объема передней камеры. На 7 сутки после операции воздух полностью рассосался, полной резорбции отека удалось достигнуть в 3-х случаях из 10. Несмотря на полную резорбцию отека вокруг трансплантата наблюдали участки помутнения, соответствующие с зонами оголенной в результате десцеметорексиса стромы роговицы. В 4 случаях наблюдали отёк роговицы, сопровождавшийся развитием её помутнения, соответствующим с зоной десцеметорексиса.

В сроки от 7 до 30 суток после операции из исследования были исключены 2 кролика (2 глаза) в связи со смертью лабораторных животных от естественных причин.

Через 1 мес. после операции у 3-х кроликов (3 глаза) была достигнута полная резорбция отека с четко сформировавшимся помутнением, ограничивающим трансплантат от оголенной стромы (рис. 2). У одного кролика (1 глаз), прооперированного без введения гепарина в переднюю камеру, наблюдали полупрозрачное приживление трансплантата, что, по нашему мнению, связано с активным выбросом фибрина в переднюю камеру и последующим

образованием множества фибриновых пленок, которые препятствовали полному прилеганию трансплантата десцеметовой мембраны к задней поверхности стромы кролика-реципиента (рис. 4).

У 4 кроликов (4 глаза) сформировалось центральное помутнение роговицы, соответствующее зоне десцеметорексиса (рис. 3).

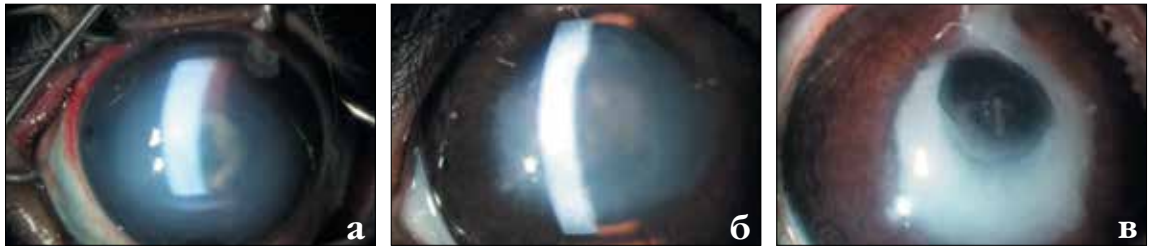
При цитологическом исследовании в клетках эндотелия исследуемых роговиц (2 глаза) были обнаружены овальные глыбки X-хроматина с гомогенным окрашиванием, прилежащие к внутренней поверхности ядерной оболочки. Вокруг глыбок четко выявлялась светлая зона, наличие которой позволяет дифференцировать X-хроматин от других гетерохроматиновых образований ядра. В 80% интерфазных ядер эндотелиальных клеток периферической области обнаружили X-хроматин. В эндотелиальных клетках, полученных из центральной зоны, образования X-хроматина в интерфазных ядрах составили 8%. Отсутствие спирализованной гиперпикнотической X хромосомы в интерфазном ядре части эндотелиальных клеток периферической зоны может свидетельствовать о миграции клеток трансплантата на оголенные участки стромы. В то же время наличие X-хроматина в центральной области предположительно является причиной замещения трансплантата клетками реципиента.

Молекулярно-генетический анализ (6 глаз) показал, что при амплификации с помощью праймеров SRYfor и SRYrev к gSRY, локализованному на Y-хромосоме в регионе, определяющем половую принадлежность, положительные отклики не регистрировались (рис. 5) ни для одной из исследуемых областей роговицы с десцеметовой мембраной и монослоем эндотелиальных клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на стремительную популяризацию методики трансплан-

Глаз № 1
Eye No. 1



Глаз № 2
Eye No. 2



Глаз № 3
Eye No. 3



Рис. 2. Биомикроскопическая картина глаз кроликов в динамике послеоперационного периода при прозрачном приживлении трансплантата десцементовой мембраны с эндотелием: а) 1 сутки п/о, отмечается тотальный отек стромы центральной зоны роговицы с утолщением её оптического среза и нарушением прозрачности; б) 7 суток п/о, отмечается частичная резорбция отека на периферии и сохранение отека различной степени выраженности в центральной зоне; в) 1 мес. п/о, участок стромы роговицы в проекции трансплантата прозрачен, тотальное помутнение стромы вокруг трансплантата

Fig. 2. Biomicroscopic details of rabbit eyes in the dynamics of the postoperative period with transparent graft engraftment of the Descemet membrane with endothelium: а) 1 day postop, there is a total stromal edema of the central zone of the cornea with a corneal thickening and a decrease of transparency; б) 7 days postop, there is a partial resorption of corneal edema on the periphery and preservation of edema of varying severity in the central zone; в) 1 month postop, the part of the corneal stroma in the projection of the graft is transparent, total clouding of the stroma around the graft

тации эндотелия и десцементовой мембраны (ТЭДМ), исследований по определению вектора и источника трансфера эндотелиальных клеток к настоящему моменту крайне мало. Имеющиеся работы основаны на клиническом материале, экспериментальные исследования в доступной нам литературе не встречены.

Группа исследователей во главе с Lavy I. в 2016 г. поставили целью оценку выживаемости донорских эндотелиальных клеток при ТЭДМ в глазу реципиента в отдаленном послеоперационном периоде: они провели разделение доноров и реципиентов по половой принадлежности, а затем, в отдаленные сроки после операции (в среднем 2,6 года) *in vivo* путем определения флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) в глазу ре-

ципиента определяли половую принадлежность эндотелиальных клеток трансплантата и на участках с оставшимися клетками реципиента. В результате авторы заключили, что имеет место преимущественно замещение клетками реципиента клеток донорского трансплантата [9].

Galagi N. с соавт. (2010) также использовали принцип разделения реципиента и донора по половой принадлежности с дальнейшим проведением FISH-исследования. Однако по результатам данного исследования они не получили достоверных данных, позволяющих судить о направленности трансфера эндотелиальных клеток [13].

Результаты, полученные Hos D. [8], также свидетельствуют в пользу того, что источником мигрирующих эндо-

телиальных клеток является трансплантат. Автор описывает два случая трансплантации десцементовой мембраны пациентам с эндотелиальной патологией, у которых в послеоперационном периоде развилась аутоиммунная реакция с образованием преципитатов на трансплантате и на окружающем его участке стромы, которая была заселена в результате трансфера эндотелиальных клеток. Однако при этом участок собственной десцементовой мембраны, оставшейся на периферии с монолоем собственных эндотелиальных клеток пациента, не был вовлечен в воспалительную реакцию.

В противовес вышеуказанным сообщениям, представляющим донорский трансплантат как источник трансфера эндотелиальных кле-

Глаз № 1
Eye No. 1



Глаз № 2
Eye No. 2



Глаз № 3
Eye No. 3



Глаз № 4
Eye No. 4



Рис. 3. Биомикроскопическая картина глаз кроликов в динамике послеоперационного периода в случае непрозрачного приживления трансплантата: а) 1 сутки после операции, отмечается тотальный отек всех слоев роговицы, трансплантат и его края не визуализируются; б) 7 суток после операции, сохраняется тотальный отек роговицы, в отличие от глаз кроликов с прозрачным приживлением трансплантата, не отмечается резорбции отека по периферии; в) 1 мес. п/о, отек периферической части роговицы полностью резорбировался, в зоне десцеметорексиса сформировалось стойкое тотальное помутнение роговицы

Fig. 3. Biomicroscopic details of the eyes of rabbits in the dynamics of the postoperative period in the case of cloudy graft engraftment: a) 1 day postop, there is a total edema of all layers of the cornea, the graft and its edges are not visualized; б) 7 days postop, total corneal edema persists, in contrast the eyes of rabbits with transparent graft engraftment there is no resorption of edema along the periphery; в) 1 month postop, edema of the peripheral part of the cornea was completely resorbed, a persistent total corneal opacity formed in the area of descemetorhexis

ток, имеют место множественные исследования ауто-миграции собственных эндотелиальных клеток и уменьшения отека роговицы после изолированного десцеметорексиса [4, 5, 10]. Эти данные коррелируют с полученными нами результатами о направленности эндотелиального трансфера из собственной роговицы пациента.

Используя цитологический метод исследования, нам не удалось четко доказать пути распространения кле-

ток трансплантата или клеток донора –самцов при ТЭДМ. В связи с тем, что в ядрах клеток самцов могут встречаться хроматиновые образования, имитирующие по форме и локализации X-хроматин, а также с тем, что не во всех ядрах клеток самок выявляется данное образование, нами дополнительно проведено установление половой принадлежности интересующих клеток с помощью молекулярно-генетического исследования. В резуль-

тате в биопсийных пробах периферической области роговиц после ТЭДМ не обнаружили клетки, несущие Y-хромосому в зону десцеметорексиса.

Таким образом, по результатам проведенного исследования можно предположить, что восстановление разрушенного слоя эндотелиальных клеток происходит в направлении от периферии к центру, т.е. «оголенная» зона стромы роговицы реципиента кролика-самки заполняется

Глаз № 1
Eye No. 1



Рис. 4. Биомикроскопическая картина глаз кроликов в динамике послеоперационного периода в случае полупрозрачного приживления трансплантата: а) 1 сутки после операции, отмечается тотальный отек всех слоев роговицы, трансплантат и его края не визуализируются; б) 7 сутки после операции, отмечается уменьшение отека роговицы; в) 1 мес. п/о, отек периферической части роговицы полностью резорбировался, в зоне десцеметорексиса сформировалось стойкое тотальное помутнение роговицы, в центральной оптической зоне наблюдается полупрозрачное приживление донорского трансплантата

Fig. 4. Biomicroscopic details of the eyes of rabbits in the dynamics of the postoperative period in the case of semitransparent graft engraftment: а) 1 day postop, there is a total edema of all layers of the cornea, the graft and its edges are not visualized; б) 7 days postop, there is a decrease in corneal edema; в) 1 month postop, edema of the peripheral part of the cornea was completely resorbed, a stable total clouding of the cornea was formed in the descemetorhexis zone, and a semitransparent engraftment of the donor transplant was observed in the central optical zone

мигрирующими собственными эндотелиальными клетками с периферии роговицы, а не клетками донорского трансплантата кролика-самца.

Установление факта миграции собственных клеток реципиента в зону дефекта ДМ может свидетельствовать в пользу обоснованности применения тканесберегающих методов эндотелиальной кератопластики, при которых размер трансплантата меньше размера дефекта эндотелиального монослоя. Следует при этом подчеркнуть, что формирование циркулярного помутнения роговицы на глазах с прозрачной центральной зоной, по-видимому, свидетельствует о недостаточном регенераторном потенциале периферических клеток либо о слишком большом ятрогенном дефекте ткани. В этой связи, нам представляется перспективным определение оптимального соотношения пересаживаемой ткани и зоны задней поверхности роговицы, которая в результате операции остаётся не прикрытой трансплантатом ТЭДМ, что требует дальнейших исследований в данном направлении.

возможность выполнения частичной ТЭДМ в эксперименте на глазах кроликов, обеспечивающая полное восстановление прозрачности центральной зоны роговицы в 37,5% (3 из 8 глаз) случаев. Особенностью регенераторного ответа роговиц экспериментальных животных следует считать формирование помутнения стромы, окружающей прозрачную центральную зону роговицы. Невозможность идентифицировать эндотелиальные клетки донора (кролика-самца) на средней периферии роговицы реципиента (кролика-самки) позволяет сделать обоснованное предположение об отсутствии их миграции в зону дефекта. Согласно полученным данным, при прозрачном приживлении трансплантата ДМ, содержащего эндотелий роговицы, восстановление ятрогенно удаленного слоя эндотелиальных клеток вместе с десцеметовой мембраной происходит в направлении от периферии к центру.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-315-00144

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования впервые в мире продемонстрирована техническая воз-

ЛИТЕРАТУРА

1. Малюгин Б.Э., Мороз З.И., Дроздов И.В. и др. Эндотелиальная кератопластика (обзор литературы). Офтальмохирургия. 2013;1: 66–72. [Malyugin BE,

Moroz ZI, Drozdov IV, Aiba EE, Pashtaev AN. Endothelial keratoplasty (a literature review). Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery. 2013;1: 66–72 (In Russ.).]
 2. Паштаев Н.П., Поздеева Н.А., Паштаев А.Н., Шипунов А.А. Задняя послойная кератопластика (обзор литературы). Вестник Тамбовского университета. 2016;21(4): 1628–33. [Pashtaev NP, Pozdeyeva NA, Pashtaev AN, Shipunov AA. Zadnyaya posloynaya keratoplastika (obzor literatury). Vestnik Tambovskogo Universiteta. 2016;21(4): 1628–33 (In Russ.).] doi:10.20310/1810-0198-2016-21-4-1628-1633.
 3. Busin M, Madi S, Santorum P, Scordia V, Beltz J. Ultrathin descemet's stripping automated endothelial keratoplasty with the microkeratome double-pass technique: two-year outcomes. Ophthalmology. 2013 Jun;120(6): 1186–9. doi: 10.1016/j.ophtha.2012.11.030.
 4. Малюгин Б.Э., Малютина Е.А., Тонаева Х.Д., Борзенко С.А., Островский Д.С. Изучение процессов миграции эндотелиоцитов роговицы человека в зону ятрогенного дефекта в условиях эксперимента ex vivo. Практическая медицина. 2018;5: 151–7. [Malyugin BE, Malyutina EA, Borzenok SA, Tonaeva KhD, Ostrovskiy DS. Study of human cornea endothelial cells migration into iatrogenic defect zone in experiment ex vivo. Practical Medicine. 2018;5: 151–7 (In Russ.).] doi:10.1018.74617.713.
 5. Малюгин Б.Э., Измайлова С.Б., Малютина Е.А., Антонова О.П., Гелястанов А.М. Клинико-функциональные результаты оперативного лечения пациентов с катарактой и первичной эндотелиальной дистрофией роговицы Фукса методом одноментной фазоэмульсификации и центрального десцеметорексиса. Вестник офтальмологии. 2017;133(6): 16–22. [Malyugin BE, Izmaylova SB, Malyutina EA, Antonova OP, Gelyastanov AM. Clinical and functional results of one-step phaco surgery and central descemetorhexis for cataract and Fuchs primary endothelial corneal dystrophy. Vestnik oftalmologii. 2017;133(6): 16–22 (In Russ.).] doi:10.17116/ofitama2017133616-22.
 6. Gain P, Rémy Jullienne R, Zhiguo He et al. Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. JAMA Ophthalmol. 2016;134(2): 167–73. doi:10.1001/jamaophthalmol.2015.4776.
 7. Galvis V, Tello A, Berrospi RD, Cuadros MO, Blanco NA. Descemetorhexis Without Endothelial Graft in Fuchs Dystrophy Cornea. 2016;Sep;35(9): e26–8. doi:10.1097/ICO.0000000000000931.
 8. Hos D, Heindl LM, Bucher F, Cursiefen C. Evidence of donor corneal endothelial cell migration from immune reactions occurring after descemet membrane endothelial keratoplasty. Cornea. 2014;33(4): 331–4. doi:10.1097/ICO.0000000000000054.
 9. Itay Lavy, Robert M Verdijk, Marieke Bruinsma, Hein F Sleddens, Ing, Silke Oellerich, Perry S Binder, Gerrit RJ. Melles, Sex Chromosome Analysis of Postmortem Corneal Endothelium After Sex-Mismatch Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. Cornea. 2016;Sep. doi:10.1097/ICO.0000000000001019.
 10. Lam FC, Baydoun L, Dirisamer M, Lie J, Dapena I, Melles GR. Hemi-Descemet membrane endothelial

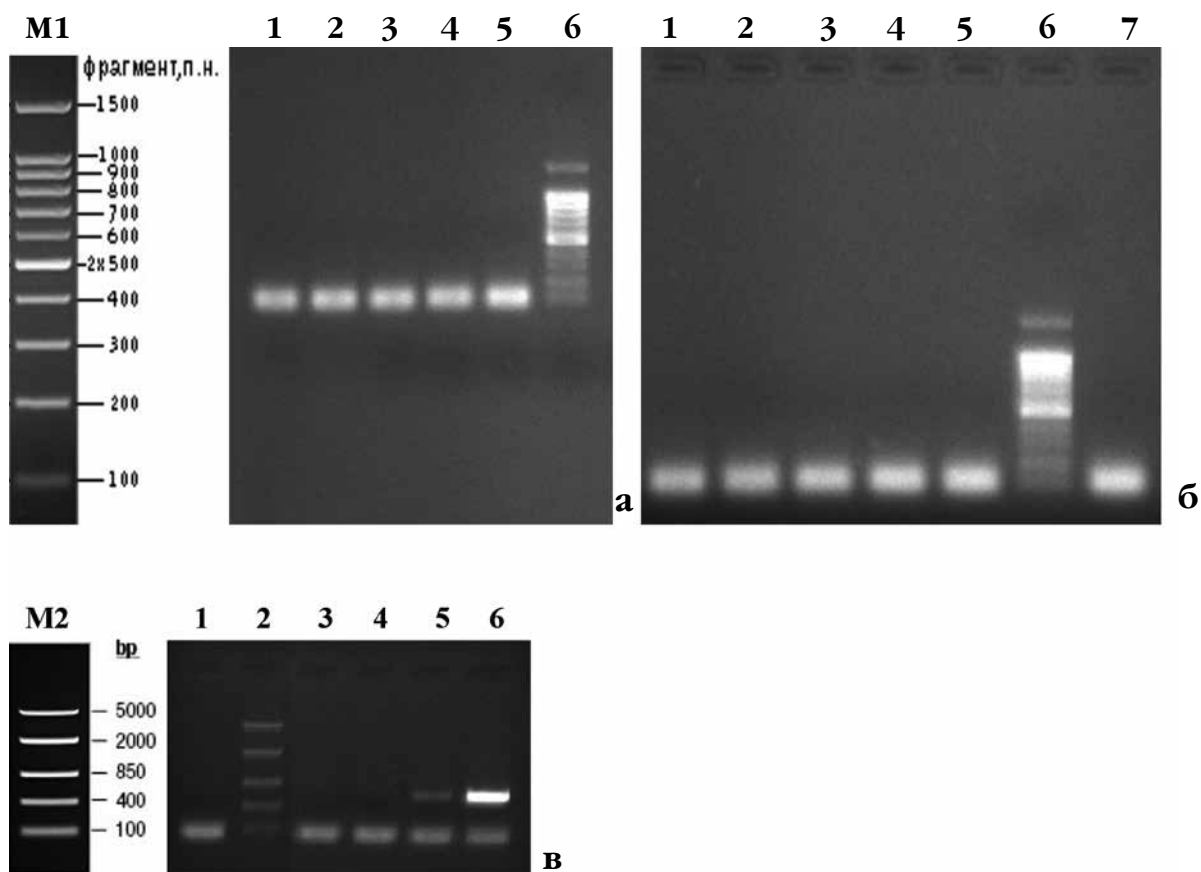


Рис. 5. Электрофореграмма продуктов амплификации gSRY с использованием праймеров LepSRY-SRY-1396: а) 1-2 – ПЦР-проба, в которых в качестве матрицы использовали ДНК клеток роговицы с десцеметовой мембраной и монослоем эндотелиальных клеток кролика D3; 3-4 – ПЦР-проба, в которых в качестве матрицы использовали ДНК клеток роговицы с десцеметовой мембраной и монослоем эндотелиальных клеток кролика D5; 5 – ПЦР-проба, в которых в качестве матрицы использовали ДНК клеток роговицы с десцеметовой мембраной и монослоем эндотелиальных клеток кролика D13; 6 – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК – M1; б) 1-2 – ПЦР-проба, в которых в качестве матрицы использовали ДНК клеток роговицы с десцеметовой мембраной и монослоем эндотелиальных клеток кролика D11; 3-4 – ПЦР-проба, в которых в качестве матрицы использовали ДНК клеток роговицы с десцеметовой мембраной и монослоем эндотелиальных клеток кролика D7; 5 – ПЦР-проба, в которых в качестве матрицы использовали ДНК клеток роговицы с десцеметовой мембраной и монослоем эндотелиальных клеток кролика D8; 6 – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК – M1; 7 – контроль на загрязнение реактивов для ПЦР аэрозольной ДНК; в) 1 – контроль на загрязнение реактивов для ПЦР аэрозольной ДНК; 2 – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК – M2; 3-4 – ПЦР-пробы, в которых в качестве матрицы использовалась ДНК лейкоцитов крови кроликов-самок; 5-6 – ПЦР-пробы, в которых в качестве матрицы использовалась ДНК лейкоцитов крови кроликов-самцов, разведенные в 200 и 10 раз соответственно; M1: 100+ bp DNA Ladder (0,5 мкг на дорожку, 2% агароза); M2: FastRuler Middle Range DNA Ladder (20 мкл на дорожку, 1% агароза)

Fig. 5. Electrophoregram of gSRY amplification products using LepSRY primers – SRY-1396: а) 1-2 – PCR test, in which the DNA of corneal cells with a Descemet’s membrane and a monolayer of rabbit endothelial cells D3 was used as a matrix; 3-4 – PCR test, in which the DNA of corneal cells with a Descemet’s membrane and a monolayer of rabbit endothelial cells D5 was used as a matrix; 5 – PCR test, in which the DNA of corneal cells with a Descemet’s membrane and a monolayer of rabbit endothelial cells D13 was used as a matrix; 6 – Marker of molecular masses of DNA fragments – M1; б) 1-2 – PCR test, in which the DNA of corneal cells with a Descemet’s membrane and a monolayer of rabbit endothelial cells D11 was used as a matrix; 3-4 – PCR test, in which the DNA of corneal cells with a Descemet’s membrane and a monolayer of rabbit endothelial cells D7 was used as a matrix; 5 – PCR test, in which the DNA of corneal cells with a Descemet’s membrane and a monolayer of rabbit endothelial cells D8 was used as a matrix; 6 – Marker of molecular masses of DNA fragments – M1; 7 – contamination control of reagents for PCR of aerosol DNA; в) 1 – contamination control of reagents for PCR of aerosol DNA; 2 – Marker of molecular masses of DNA fragments – M2; 3-4 – PCR tests, in which the blood leukocyte DNA of female rabbits was used as a matrix; 5-6 – PCR tests, in which the blood leukocyte DNA of male rabbits, diluted 200 and 10 times, respectively, was used as a matrix; M1: 100+ bp DNA Ladder (0.5 µg per lane, 2% agarose); M2: FastRuler Middle Range DNA Ladder (20 µl per lane, 1% agarose)

keratoplasty transplantation: a potential method for increasing the pool of endothelial graft tissue. JAMA Ophthalmol. 2014;Dec;132(12): 1469–73. doi:10.1097/ICO.0000000000001019.

11. Melles GR, Ong TS, Ververs B, van der Wees J. Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK). Cornea. 2006;Sep;25(8): 987–90. doi:10.1097/ICO.0000248385.16896.34.

12. Maloney G, Chan UT, Hamilton A, Zahidin AM, Grigg JR, Devasahayam RN. Descemetorhexis for Fuchs’ dystrophy. Can J Ophthalmol. 2015;Feb;50(1): 68–72. doi:10.1016/j.cjco.2014.10.014.

13. Neil Lagali, Ulf Stenevi, Margareta Claesson, Per Fagerholm, Charles Hanson, Birgitta Weijdegård, Anne-Sophie Strömbeck, Donor and Recipient Endothelial Cell Population of the Transplanted Human Cornea: A Two-Dimensional Imaging Study. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010;51: 1898–1904. doi:10.1167/iovs.09-4066.

Поступила 14.09.2019