

## ОЦЕНКА ЛЕНТИКУЛЫ РОГОВИЦЫ ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭЛЕКТРОННОЙ И ЛАЗЕРНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ МИКРОСКОПИИ, ПОЛУЧЕННОЙ ПРИ ФЕМТОЛАЗЕРНОЙ КОРРЕКЦИИ МИОПИИ

*О.В. Писаревская<sup>1</sup>, Н.П. Судаков<sup>2</sup>, А.П. Лопатин<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Иркутский филиал ФГАУ НМИЦ «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Иркутск;

<sup>2</sup>ФГБУН «Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук», Иркутск

**Аннотация.** В настоящее время наиболее распространенной, безопасной и комфортной операцией по коррекции миопии является технология экстракции лентиккулы через малый доступ. Короткий период реабилитации и стабильность результата данной технологии объясняется минимальным повреждением коллагеновых волокон, активацией и дегенеративными изменениями кератоцитов, которые в большинстве случаев имеют обратимый характер.

**Ключевые слова:** экстракция лентиккулы через малый доступ, ультраструктура, апоптоз, Ф-актин.

## EVALUATION OF HUMAN CORNEAL LENTICULE USING ELECTRON AND LASER SCANNING MICROSCOPY OBTAINED BY FEMTOSECOND LASER CORRECTION OF MYOPIA

*O.V. Pisarevskaya<sup>1</sup>, N.P. Sudakov<sup>2</sup>, A.P. Lopatin<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Irkutsk Branch of S.N. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Ministry of health of the Russian Federation, Irkutsk;

<sup>2</sup>Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk

**Abstract.** Currently, the most common, safe and comfortable operation for the correction of myopia is the technology of small-incision lenticule extraction. The short period of rehabilitation and the stability of the result of this technology is due to minimal damage of the collagen fibers, activation and degenerative changes in keratocytes, which in most cases are reversible.

**Keywords:** small-incision lenticule extraction, ultrastructure, apoptosis, F-actin.

Фемтосекундная экстракция лентиккулы через малый доступ является операцией выбора при коррекции близорукости и миопического астигматизма. Основными преимуществами данной технологии является высокий рефракционный результат и его стабильность, устойчивость и высокие характеристики опорных свойств роговицы [5, 7], что в целом зависит от состояния коллагеновых волокон, структуры кератоцитов, участвующих в синтезе и поддержании внеклеточного матрикса [6, 8, 9]. Для комфорта пациентов во время операции, для устранения дискомфорта используется местная анестезия, позволяющая эффективно справиться с поставленной задачей [4].

Исследования процессов заживления после SMILE, проведенные на модели кроликов, показали, что фемтосекундные операции сопровождаются умеренной экспрессией Ki-67 положительных клеток к фибронектину и антител к антигену CD11b, которые, с одной стороны, участвуют в создании временной матрицы для миграции эпителиальных клеток или кератоцитов в зону повреждения, а с другой – отражают степень воспалительной реакции и пролиферации [11, 10].

Исследования Nicolaus Luft лентиккул, извлеченных в ходе проведения операции SMILE у человека, выявили снижение концентрации противовоспалительных цитокинов (IL-1 b, TNF α), наличие единичных измененных стромальных кератоцитов с TUNEL-положительным результатом, отражающих их апоптотическую гибель [1].

Однако полученные результаты не позволяют однозначно ответить на вопрос о механизмах послеоперационного заживления после операции SMILE и формирования предпосылок к регрессу рефракционного эффекта [2, 3]. В связи с этим выяснение особенностей альтерации стромы роговицы в ответ на фемтосекундную экстракцию роговичной лентиккулы через малый разрез является весьма актуальным.

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценить информативность ультраструктурных и иммуногистохимических исследований лентиккулы роговицы, полученной в ходе рефракционной операции SMILE.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено исследование 6 лентикул роговицы, полученных в ходе плановых операций по коррекции зрения с помощью фемтосекундного лазера Visumax Carl Zeiss, Германия по технологии Смайл, основанной на формировании в строме роговицы линзы толщиной от 89 до 124 мкм, с роговичным клапаном от 100 до 130 мкм, диаметром оптической зоны 7 мм и размером роговичного доступа 2,38 мм. Лазерный этап операции проводился с использованием режима Fast (энергия 180 пДж, точечный интервал 4,5 мкм), механическое разделение ткани проводилось с помощью шпателя Geuder AG, Германия, удаление лентикулы – с помощью одноразового зубчатого пинцета, 23 G DORC, Нидерланды. Степень исходной миопии варьировала от 4,0 до 6,0 дптр. Все операции выполнены одним хирургом.

Для оценки микроструктуры и биохимических изменений тканей использовалась сканирующая, просвечивающаяся, лазерная конфокальная микроскопия с оценкой актина, нейтральных липидов и ядер клеток. Для просвечивающей микроскопии лентикулы из роговицы глаза фиксировали в 2,5%-м растворе глутарового альдегида (Sigma-Aldrich, USA) на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) (1 ч), промывали тем же буфером (3 раза по 10 мин), 12 часов дофиксировали 2%-м раствором четырехоксида осмия (Sigma-Aldrich, USA) и заливали в эпоксидную смолу. После полимеризации на ультрамикротоме Ultracut R (Leica) изготавливали ультратонкие срезы (70–80 нм), которые исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа Leo 906 E (Zeiss, Германия). Для изучения поверхностных структур лентикулы фиксировали по вышеописанной методике и обезвоживали в спиртах

возрастающей концентрации (30, 50, 70, 96, 100 %). После обезвоживания материал исследовали в сканирующем электронном микроскопе Quanta 200 (FEI Company).

Для лазерной конфокальной микроскопии лентикулы отмывали в среде 199 и фиксировали 15 мин в 4%-м параформальдегиде (Sigma-Aldrich, USA). Для визуализации актиновых микрофиламентов материал после фиксации пермеабелизовали 20 мин в 1%-м растворе Тритона X100 (Sigma-Aldrich, USA) и обрабатывали фаллоидином-FITC (ex/em 490/525 nm) 40 мин. Для выявления ядер клеток материал окрашивали DAPI (Sigma-Aldrich, USA, ex/em 340/488 nm), 0,5 мкг/мл в течение 15 мин.

Все изображения, полученные с помощью LSM 710 (Zeiss), обрабатывали с помощью двух программ: ZEN 2010 (Zeiss) и Imaris® Bitplane 7.2.3. Всю полученную по каждому из выделенных фрагментов информацию суммировали и обрабатывали методами непараметрической статистики, применяя пакет программ Statistica 10 и Microsoft Excel 2010.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Лентикула, выделенная из роговицы человека, имеет размеры 5 x 3,5 мм (рис. 1).

По данным просвечивающей электронной микроскопии основная масса межклеточного матрикса стромы лентикулы представлена разнонаправленно ориентированными слоями волокон коллагена. В некоторых участках стромы такие нити формировали более плотные скопления, которые располагались в непосредственной близости с клеточными элементами либо в свободном межклеточном пространстве лентикулы (рис. 2).

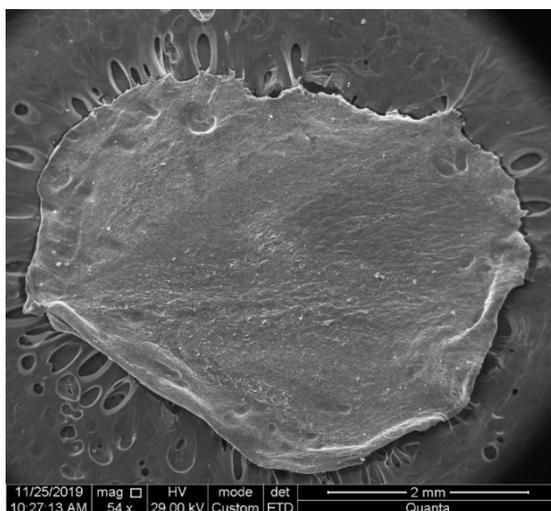


Рис. 1. Лентикула, выделенная из роговицы по данным сканирующей электронной микроскопии

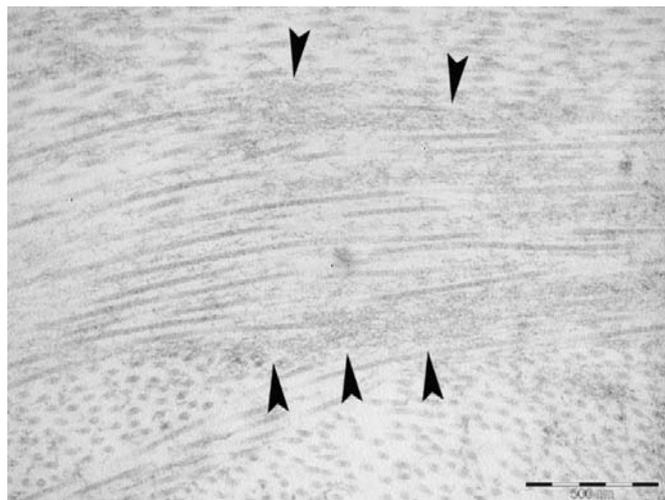


Рис. 2. Участки плотно расположенных сетей (показаны стрелками) мелкоструктурированных филаментов внеклеточного матрикса в строме лентикулы

Характерно, что, по данным конфокальной микроскопии, окраска препаратов фаллоидином, меченым FITC, дает положительную реакцию на актиновые микрофиламенты во внеклеточном пространстве.

Это говорит о том, что в матриксе стромы лентикулы могут присутствовать области, содержащие кластеры F-актина – биополимера, характерного преимущественно для внутриклеточной среды (рис. 3).

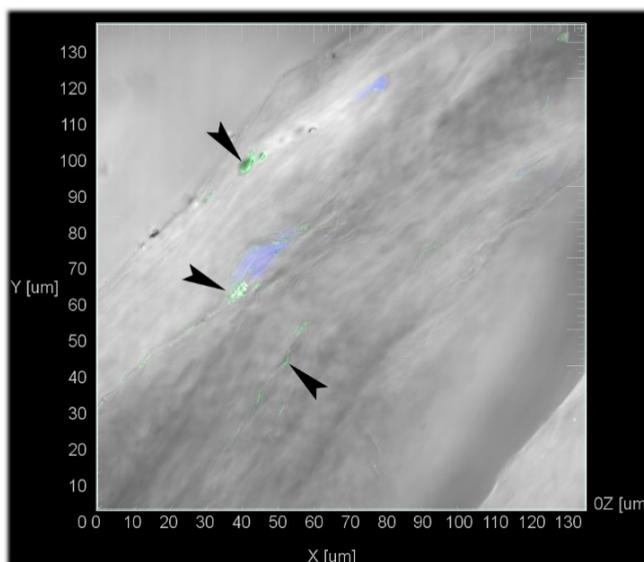


Рис. 3. Оптический срез стромы лентикулы с ядрами (DAPI, синий) кератоцитов и актиновыми микрофиламентами (фаллоидин-FITC, зеленый), которые отмечены стрелками.  
Лазерная конфокальная микроскопия

В толще стромы среди пучков коллагена выявляются также отдельные, расположенные вдоль плоскости лентикулы кератоциты. Основную часть этих клеток занимает крупное, вытянутое вдоль клетки ядро с неровными краями. К внутренней стороне ядерной мембраны плотным слоем примыкает фибриллярная сеть ядерной ламины. В матриксе ядра среди глыбок хроматина выявляется хорошо выраженное ядрышко.

Такая структура ядерного вещества обычно не свойственна для жизнеспособных кератоцитов в норме и может быть связана с коагуляцией белков, вызванной локальным воздействием лазера в процессе формирования лентикулы.

В цитоплазме отчетливо выявляются компоненты цитоскелета, детальный состав которого возможно определить только с помощью подробного иммуноцитохимического анализа (рис. 4).

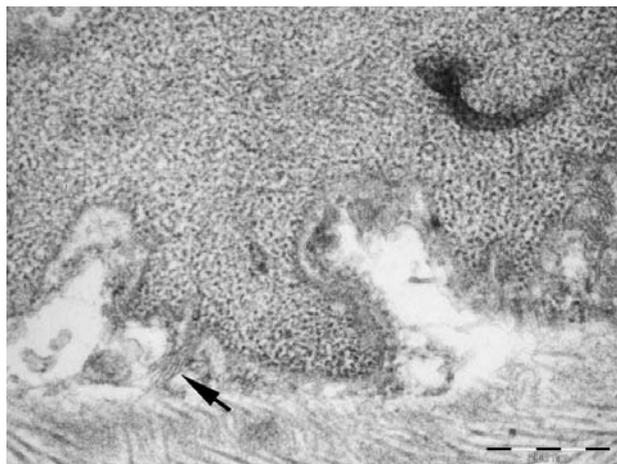


Рис. 4. Нити цитоскелета в цитоплазме кератоцита отмечены стрелкой

Селективная окраска клеток фаллоидином-FITC (см. рис. 3) показывает, что одним из распространенных компонентов цитоскелета кератоцитов являются актиновые микрофиламенты.

Судя по данным трансмиссионной микроскопии, среди нативных кератоцитов выявляются также клетки, которые по морфологическим признакам соответствуют клеткам в состоянии апоптоза, или аутофагии.

Сканирующая электронная микроскопия вогнутых и выпуклых фрагментов лентикул показала, что их поверхность имеет выраженный рельеф в той или иной степени упорядоченной ребристой структуры (рис. 5). Возможно, что данный рельеф отражает направленность нитей коллагена в слоях матрикса, составляющих строму лентикулы, что согласуется с данными, полученными с помощью просвечивающей электронной микроскопии.

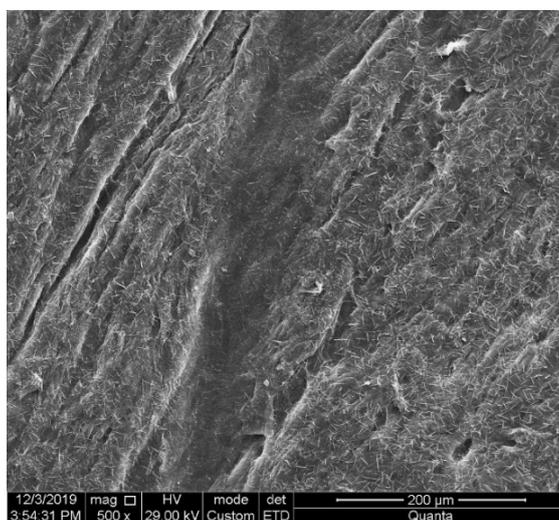


Рис. 5. Ультраструктура вогнутой поверхности лентикулы. Сканирующая электронная микроскопия

Биологические механизмы, лежащие в основе повреждения и заживления ран роговицы, в том числе и после рефракционных операций, являются ключевым фактором, определяющим течение послеоперационного периода, рефракционный эффект и остроту зрения пациентов.

Проведенные исследования позволили выявить на поверхности лентикулы многочисленные игольчатые структуры, которые, судя по их размерам и локализации, представляют собой механически разорванные коллагеновые микрофибриллы и волокна, которые

осуществляли интрастромальные связи между параллельными коллагеновыми пластинами.

Прямое локальное воздействие фемтосекундного лазера сопровождается патологическими изменениями некоторых кератоцитов, при исследовании которых установлены признаки обратимых и необратимых дегенеративных изменений. Кроме того, было показано, что в лентикуле присутствуют кератоциты, содержащие Ф-актин в цитоплазме. Этот факт имеет двойное значение. Прежде всего, он свидетельствует о способности кератоцитов продуцировать Ф-актин и, вероятно,

секретировать его в межклеточное пространство, принимая участие в регуляции актин-опосредуемого апоптоза. Кроме того, накопление Ф-актина в цитоплазме кератоцитов указывает на дифференцировку этих клеток в миофибробласты. Известно, что кератоциты в разреженной среде начинают превращаться в так называемый «ремонтный фенотип» и в миофибробласты, активно секретирующие элементы внеклеточного матрикса.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, операция, проведенная по технологии SMILE, основанная на фемтосекундной фотодеструкции с последующим механическим разделением ткани роговицы, характеризуется минимальным повреждением коллагеновых волокон, активацией и дегенеративными изменениями кератоцитов. Все выявленные изменения клеток и внеклеточного матрикса наблюдаются только вдоль передней и задней поверхности лентиккулы.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Писаревская О.В., Шуко А.Г., Юрьева Т.Н. SMILE – инновационная технология в рефракционной хирургии // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2016. – № 3 (65). – С. 76–78.
2. Писаревская О.В., Шуко А.Г., Юрьева Т.Н. и др. Экстракция лентиккулы через малый разрез – новая технология в рефракционной хирургии // Практическая медицина. – 2015. – № 2-1 (87). – С. 124–126.
3. Шуко А.Г., Писаревская О.В., Букина В.В., Юрьева Т.Н. Эффективность и безопасность технологии SMILE в рефракционной хирургии // Современные технологии в офтальмологии. – 2014. – № 3. – С. 236–239.
4. Шуко А.Г., Хлебникова Л.С., Олещенко И.Г. и др. Место инстилляционной анестезии в рефракционной хирургии у детей // Офтальмология. – 2018. – Т. 15, № 52. – С. 82–88.
5. Blum M., Täubig K., Gruhn C., et al. Five-year results of small incision lenticule extraction (ReLEx SMILE) // British Journal of Ophthalmology // British J Ophthalmol. – 2016. – No. 100 (9). – P. 1192–1195.
6. Fausone Pellegrini M.S., Popescu L.M. Telocytes // Biomol Concepts. – 2011. – No. 2. – P. 481–489.
7. Guo H., Hosseini-Moghaddam S.M., Hodge W. Corneal biomechanical properties after SMILE versus FLEX, LASIK, LASEK, or PRK: a systematic review and meta-analysis // BMC Ophthalmol. – 2019. – No. 19 (1). – P. 167.
8. Holmes D.F., Gilpin C.J., Baldock C., et al. Corneal collagen fibril structure in three dimensions: Structural insights into fibril assembly, mechanical properties, and tissue organization // Proc Natl Acad Sci U. S. A. – 2001. – No. 98 (13). – P. 7307–7312.
9. Meek K.M., Knupp C. Corneal structure and transparency // Prog Retin Eye Res. – 2015. – No. 49. – P. 1–16.

10. Nishida T. The role of fibronectin in corneal wound healing explored by a physician-scientist // Jpn J Ophthalmol. – 2012. – No. 56 (5). – P. 417–431.

11. Tervo K., van Setten G.B., Beuerman R.W., et al. Expression of tenascin and cellular fibronectin in the rabbit cornea after anterior keratectomy. Immunohistochemical study of wound healing dynamics // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 1991. – No. 32 (11). – P. 2912–2828.

### REFERENCES

1. Pisarevskaya O.V., Shchuko A.G., Iureva T.N. SMILE – innovacionnaja tehnologija v refrakcionnoj hirurgii [SMILE – innovative technology in refractive surgery]. *Tihookeanskij zhurnal* [Pacific Medical Journal], 2016, no. 3 (65), pp. 76–78. (In Russ.; abstr. in Engl.).
2. Pisarevskaya O.V., Shchuko A.G., Iureva T.N., et al. Jekstrakcija lentikuly cherez malyj razrez – novaja tehnologija v refrakcionnoj hirurgii [Extraction of lenticule through a small incision – a new technology in refractive surgery]. *Prakticheskaja medicina* [Practical medicine], 2015, no. 2-1 (87), pp. 124–126. (In Russ.; abstr. in Engl.).
3. Shchuko A.G., Pisarevskaya O.V., Bukina V.V., Iureva T.N. Jeffektivnost' i bezopasnost' tehnologii SMILE v refrakcionnoj hirurgii [Effectiveness and safety of SMILE technology in refractive surgery]. *Sovremennye tehnologii v oftal'mologii* [Modern technologies in ophthalmology], 2014, no. 3, pp. 236–239. (In Russ.; abstr. in Engl.).
4. Shchuko A.G., Khlebnikova L.S., Oleshchenko I.G., et al. Mesto instilljacionnoj anestezii v refrakcionnoj hirurgii u detej [Instillation anesthesia in refractive surgery in children]. *Oftal'mologija* [Ophthalmology in Russia], 2018, vol. 15, no. 52, pp. 82–88. (In Russ.; abstr. in Engl.).
5. Blum M., Täubig K., Gruhn C., et al. Five-year results of small incision lenticule extraction (ReLEx SMILE). *British Journal of Ophthalmology*, 2016, no. 100 (9), pp. 1192–1195.
6. Fausone Pellegrini M.S., Popescu L.M. Telocytes. *Biomol Concepts*, 2011, no. 2, pp. 481–489.
7. Guo H., Hosseini-Moghaddam S.M., Hodge W. Corneal biomechanical properties after SMILE versus FLEX, LASIK, LASEK, or PRK: a systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmol*, 2019, no. 19 (1), p. 167.
8. Holmes D.F., Gilpin C.J., Baldock C., et al. Corneal collagen fibril structure in three dimensions: Structural insights into fibril assembly, mechanical properties, and tissue organization. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, 2001, no. 98 (13), pp. 7307–7312.
9. Meek K.M., Knupp C. Corneal structure and transparency. *Prog Retin Eye Res*, 2015, no. 49, pp. 1–16.
10. Nishida T. The role of fibronectin in corneal wound healing explored by a physician-scientist. *Jpn J Ophthalmol*, 2012, no. 56 (5), pp. 417–431.
11. Tervo K., van Setten G.B., Beuerman R.W., et al. Expression of tenascin and cellular fibronectin in the rabbit cornea after anterior keratectomy. *Immunohistochemical study of wound healing dynamics*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1991, no. 32 (11), pp. 2912–2828.

### Контактная информация

**Писаревская Олеся Валерьевна** – к. м. н., заведующая рефракционным отделением, врач-офтальмолог высшей категории Иркутского филиала ФГАУ НМИЦ «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Федорова» Минздрава России, e-mail: lesya\_pisarevsk@mail.ru