

# 飞秒激光深基质切削供体角膜基质面的规则性评估

周李<sup>1</sup>, 樊映川<sup>2</sup>, 鲁齐<sup>3</sup>

基金项目:四川省医学科研青年创新课题计划(No. Q14010);  
爱尔眼科医院集团科研基金项目(No. AF144D12)

作者单位:<sup>1</sup>(610041)中国四川省成都市,爱尔眼科医院集团股份有限公司成都康桥眼科医院;<sup>2</sup>(610041)中国四川省成都市,四川省人民医院眼科;<sup>3</sup>(610041)中国四川省成都市,爱尔眼科医院集团股份有限公司成都爱尔眼科医院

作者简介:周李,女,硕士,副教授,副主任医师,研究方向:角膜病。

通讯作者:周李.28745481@qq.com

收稿日期:2016-08-11 修回日期:2016-11-30

## Irregularity of human donor lamellar surface after femtosecond laser deep stroma cutting

Li Zhou<sup>1</sup>, Ying-Chuan Fan<sup>2</sup>, Qi Lu<sup>3</sup>

**Foundation items:** Medical Association and Scientific Research Youth Innovation Subject in Sichuan Province (No. Q14010); Scientific Research Fund Project of Aier Eye Hospital Group (No. AF144D12)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Chengdu Cambridge Eye Hospital, Aier Eye Hospital Group Co., Ltd., Chengdu 610041, Sichuan Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Sichuan Province People's Hospital, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Chengdu Aier Eye Hospital, Aier Eye Hospital Group Co., Ltd., Chengdu 610041, Sichuan Province, China

**Correspondence to:** Li Zhou. Department of Ophthalmology, Chengdu Cambridge Eye Hospital, Aier Eye Hospital Group Co., Ltd., Chengdu 610041, Sichuan Province, China. 28745481@qq.com

Received:2016-08-11 Accepted:2016-11-30

## Abstract

• **AIM:** To observe the accuracy and smooth degree of the matrix surface of the corneal donor in the laser ablation of the femtosecond laser.

• **METHODS:** The FS200 laser cut 5 eye bank donors to get 5 anterior lamellar discs (ALD) and the corresponding 5 posterior lamellar discs (PLD). The thickness of PLD was not less than 150 $\mu$ m. The laser frequency was 200KHz. The lamellar cut energy was 1.2 $\mu$ J and the trephination cut energy was 1.2 $\mu$ J. The thickness of PLD, the histological changes of corneas(HE staining) and the degree of surface roughness under scanning electron microscope were recorded.

• **RESULTS:** The corneal thickness before cutting was 534 $\pm$ 24 $\mu$ m. The preset posterior lamellar corneal thickness

was 199 $\pm$ 7 $\mu$ m. The obtaining posterior lamellar thickness was 196 $\pm$ 40 $\mu$ m ( $Z=-0.13$ ,  $P=0.89$ ). With HE staining, the corneal cutting surface was slightly rough. Under the scanning electron microscopy, the smoothness score of the anterior lamellar stromal surface was 1.2 $\pm$ 0.4, the posterior lamellar stromal surface smoothness score was 2.4 $\pm$ 0.5 ( $Z=-2.12$ ,  $P=0.03$ ).

• **CONCLUSION:** The precision of deep corneal stroma cutting made by FS200 femtosecond laser is good. The cutting surface of the ALD is smoother than that of the PLD.

• **KEYWORDS:** keratoplasty; femtosecond laser; surface roughness

**Citation:** Zhou L, Fan YC, Lu Q. Irregularity of human donor lamellar surface after femtosecond laser deep stroma cutting. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2017;17(1):174-176

## 摘要

**目的:**观察飞秒激光深基质切削角膜供体的精准性及基质面光滑程度。

**方法:**FS200型飞秒激光对眼库中期保存的供体角膜5只做深基质切削,将同一供体角膜分割为板层植片和内皮植片,预留后板层厚度大于150 $\mu$ m。激光频率200kHz,激光能量基质切削选择1.2 $\mu$ J,边切能量1.2 $\mu$ J。观察指标:角膜内皮瓣厚度、切割后的角膜组织学变化(HE染色)、电镜下角膜基质面规则程度评级。

**结果:**供体角膜平均厚度为534 $\pm$ 24 $\mu$ m。预设角膜后板层厚度为199 $\pm$ 7 $\mu$ m,获得后板层厚度在196 $\pm$ 40 $\mu$ m( $Z=-0.13$ ,  $P=0.89$ )。角膜组织HE染色显示切削面略有不光滑。扫描电镜下,前板层基质面规则程度评分1.2 $\pm$ 0.4分,角膜后板层基质规则程度评分为2.4 $\pm$ 0.5分,差异有统计学意义( $Z=-2.12$ ,  $P=0.03$ )。

**结论:**FS200飞秒激光深基质切削精准性良好。FS200飞秒激光制备供体角膜的前板层较后板层基质面光滑。

**关键词:**角膜移植;飞秒激光;切割面粗糙度

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.1.49

**引用:**周李,樊映川,鲁齐.飞秒激光深基质切削供体角膜基质面的规则性评估.国际眼科杂志2017;17(1):174-176

## 0 引言

我国角膜供体缺乏,导致许多角膜盲患者因没有角膜供体长期生活在黑暗中。采用同一供体角膜材料给两个患者分别实施板层角膜移植术和角膜内皮移植术是提高角膜材料利用率的好方法<sup>[1]</sup>。但术者手工制备角膜板层植片和内皮瓣容易失败。飞秒激光精准性好,并可个体化设置植片大小、切割的位置及深度,较手工剥离法有

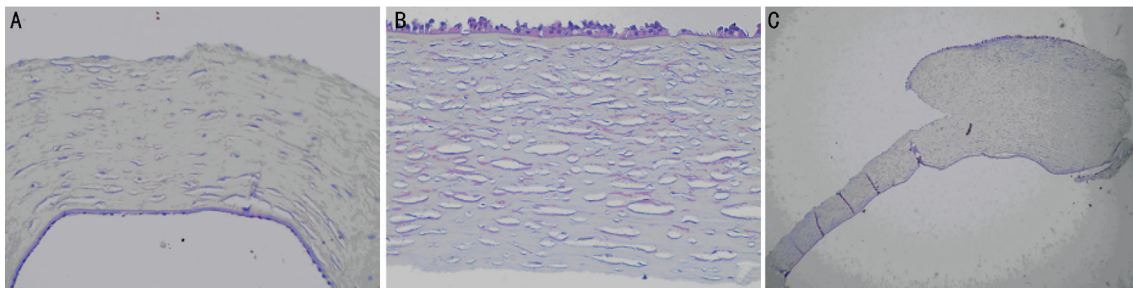


图1 PLD的HE染色剖面 A:后板层角膜剖面,激光切割面略粗糙(400×);B:前板层角膜剖面,切割面较光滑(400×);C:后板层角膜剖面,切割区周边部略厚于中央(100×)。

很多优势。早期由于激光设备及参数问题,飞秒激光制备的角膜内皮瓣( posterior lamellar disc, PLD) 基质面较粗糙,这会影 响角膜内皮移植术后患者视力恢复<sup>[2-4]</sup>。近年飞秒激光参数设置调整后飞秒激光制内皮瓣的基质光滑程度改善<sup>[5-6]</sup>。鹰视飞秒激光 FS200 有角膜移植专用模式。本研究采用 FS200 激光机推荐的深板层切削参数做供体角膜切削,观察激光切削的精准度以及获得的前板层( anterior lamellar disc, ALD) 和 PLD 基质面光滑程度。

## 1 对象和方法

**1.1 对象** 所有供体均来自成都康桥眼库。角膜组织在 2013-09/2015-03 由眼库专业人员摘取。捐献者及家属均同意将捐献角膜用于临床或科学研究。这些角膜材料因乙肝表面抗原阳性或淋巴系统肿瘤不适合临床使用而用于科学研究。供体共 5 片角膜,年龄为 12 ~ 60 岁。所有组织在捐献者死亡 6h 内原位摘取角膜巩膜组织放入 Dextsol 液(美国 Chiron Ophthalmics 公司),4℃ 冰箱保存。平均死亡时间到保存时间为 3.60±1.84h。

## 1.2 方法

**1.2.1 飞秒激光制瓣** 供体角膜组织在黏弹剂保护下放在人工前房上。人工前房内的压力由黏弹剂维持。指测压力 T+1。鹰视飞秒激光 FS200 切削角膜深基质制作 8.5mm 直径的角膜瓣。预留 PLD 大于 150μm,避免切穿角膜。激光频率 200kHz。基质切削选择的激光能量为 1.2μJ,边切能量 1.2μJ。激光作用完毕后形成一个游离的 ALD 和 PLD。

**1.2.2 角膜测厚** 使用 SP3000 超声测厚仪器测量角膜厚度。角巩膜片置于人工前房上测量。每片角膜在手术前后各测量 5 次,取最小值。PLD 的厚度在激光切割后用虹膜恢复器掀开角膜基质瓣后测量。测量完成后将游离的基质瓣放回原处并用吸血海绵将水分吸干,将整个角膜放回 Dextsol 液保存。

**1.2.3 HE 染色** 将角膜用锐刀剖成两半,一半做常规 HE 染色,一半做扫描电镜检查。角膜石蜡切片:(1)二甲苯去蜡(经 2 次)5 ~ 10min。(2)无水乙醇、95% 乙醇、80% 乙醇、70% 乙醇各 1 ~ 2min,然后蒸馏水洗 3min(换 3 次)。(3)苏木紫液染色约 3 ~ 5min。(4)水洗,1% 盐酸分化,显微镜下控制。(5)流水浸洗至少 15min,至细胞核呈蓝色。(6)伊红液染 0.5 ~ 1min 后,95% 乙醇 2 次,无水乙醇 2 次,每次约 1 ~ 2min。(7)苯酚二甲苯(1:3)共 5min。(8)二甲苯 2 次,每次 3 ~ 5min。(9)用中性树脂盖片封片。HE 染色观察角膜基质形态结构、切割面、上皮及内皮细胞形态。

## 1.2.4 扫描电镜( scanning election microscopy, SEM)

角膜标本用 4% 戊二醛固定 30min,乙醇梯度脱水 70%, 90%, 100%, 5min/次。醋酸异戊酯置换乙醇。CO<sub>2</sub> 临界点干燥仪干燥,喷镀处理角膜标本。扫描电镜 inspect F50 观察角膜切割面。电镜下观察切割面有无灰泥样变或同心圆形隆起。电镜下角膜基质面规则程度评级:1 = 非常光滑,2 = 光滑,3 = 粗糙,4 = 非常粗糙<sup>[7]</sup>。

统计学分析:采用统计软件 SPSS 17.0 进行统计学分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,预设 PLD 厚度与实际厚度比较以及 ALD 与 PLD 的光滑度比较均采用 Wilcoxon 秩和检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

所有角膜均成功用飞秒激光进行深基质切削,没有发生层间粘连现象。飞秒激光切割前测得的角膜厚度为 534±24μm。预设 PLD 为 199±7μm,获得内皮片厚度为 196±40μm,差异有统计学意义( $Z = -0.13, P = 0.89$ )。测量所得 PLD 与预设偏差在 -2±37(-34 ~ 45)μm。角膜石蜡切片 HE 染色提示:经飞秒激光切削后的角膜上皮细胞层和内皮细胞层完整,角膜基质排列整齐染色均匀,切割面有轻微不整齐(图 1A,B),后板层角膜存在中央薄周边厚的现象(图 1C)。扫描电镜下,飞秒激光切割面可见泥灰样变,未见同心圆形隆起(图 2)。ALD 光滑度评分为 1.2±0.4 分,PLD 光滑度平均评分为 2.4±0.5 分。ALD 与 PLD 的光滑程度比较,差异有统计学意义( $Z = -2.12, P = 0.03$ )。

## 3 讨论

以往报道的用于角膜深基质切削的激光机主要是 Intralase(美国 AMO 集团)、FEMTEC(德国海德堡公司)和达芬奇飞秒激光(瑞士 Ziemer 眼科股份有限公司)<sup>[7]</sup>。不同激光机达到最佳深基质切削效果的参数设置是不同的<sup>[5]</sup>。本研究采用以往未报道过的 FS200 型飞秒激光做供体角膜切削。

本研究中,激光切割前没有去除供体角膜上皮,避免在保存过程中基质过度水肿引起测量误差<sup>[8]</sup>。测量角膜厚度后将 ALD 复位,避免发生角膜水肿和后弹力层剥脱<sup>[9]</sup>。我们采用能量为 1.2μJ 对 5 只眼库保存角膜行深基质切削成功,未发生层间粘连现象。这和以往报道的结果相同<sup>[4,7]</sup>。既往报道飞秒激光深板层切削偏差在 15 ± 14μm,预设 PLD 厚度与实际获得的 PLD 厚度高度相关<sup>[10]</sup>。本研究测量所得 PLD 与预设厚度偏差在 -2 ± 37μm,其差异无统计学意义。FS200 型飞秒激光机推荐的角膜移植模式(能量 1.2μJ)做深基质切削厚度偏差在角膜移植可接受的范围内。本研究中,HE 染色的 PLD 角膜组织剖面有中央薄周边厚的现象。既往研究也发现了



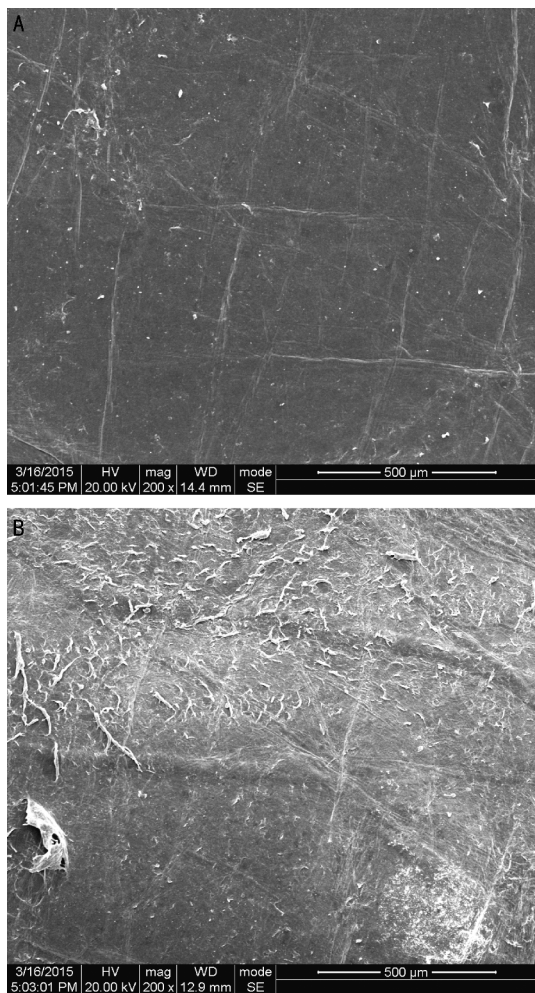


图2 扫描电镜下同一供体的角膜基质面 A:ALD 切削面;B:PLD 切削面。

这一现象<sup>[7,11-12]</sup>。因为激光机计算厚度时是从角膜前表面开始计算的,所以采用飞秒激光制做内皮瓣的角膜内皮移植患者术后可能出现轻度远视。

电镜下,飞秒激光切削角膜基质面可见泥灰样质地改变。本研究采用 FS200 的 Keratoplasty 模式切削基质面也有泥灰样改变,Soong 等<sup>[3]</sup>推测产生泥灰样质地可能的原因有两个:(1)激光能量在水肿的深基质角膜中散射和稀薄化;(2)深基质纤维疏松。Intralase 采用 Spiral 模式深基质切削会出现轻微同心圆形隆起。同心圆形隆起可能是压平锥压平角膜产生皱褶引起的,疏松的深基质在压平时更容易产生皱褶<sup>[2]</sup>。Sarayba 等<sup>[13]</sup>报道 Intralase 激光机采用 raster 模式比 spiral 模式深基质切削面光滑,出现同心圆形隆起几率小。本研究中 FS200 型激光机做的角膜深基质切削面没有出现同心圆形隆起。

Mian 等<sup>[12]</sup>对兔角膜深板层切削试验后进行组织切片观察,发现切削面存在轻度到中度粗糙。本研究中,角膜切削后的组织 HE 染色提示切削后的角膜基质排列整齐,内皮细胞层完好,但是基质切削面可见到轻微不整齐的现象。扫描电镜下,这种现象得到了印证<sup>[3,7,11]</sup>。Cheng 等<sup>[7]</sup>对电镜下粗糙程度进行了半定量分析。本研究参考 Cheng 等的分级方法得出 ALD 光滑度评分为  $1.2 \pm 0.4$  分,PLD 光滑度评分为  $2.4 \pm 0.5$  分。ALD 较 PLD 光滑 ( $P < 0.05$ )。这与 Cheng 等报道的结果相似,即 ALD 较 PLD 光滑。该报道没有对这种现象作解释,我们推测这可能是由

于 PLD 的基质面是飞秒激光的光爆破作用的焦点所致。

飞秒激光做深基质切削的基质光滑程度与能量设置有关<sup>[14]</sup>。FS200 飞秒激光选择  $1.2 \mu\text{J}$  能量可以成功制作预设厚度的角膜内皮瓣和角膜基质瓣,使同一供体用于 2 例患者做角膜移植有了成功保障。但是由于供体来源有限,本研究没有对不同激光能量角膜切削进行分组比对。FS200 是否可以其他能量参数获得更光滑的切削面还需要进一步研究。此外,由于扫描电镜存在标本处理过程中发生标本收缩、金属镀层影响标本表面形态等问题,对角膜标本表面形态进行定量评估困难。原子力显微镜 (atomic force microscopy, AFM) 可以克服这些缺点,它能提供粗糙度的均方根值<sup>[5,15]</sup>。AFM 可能成为角膜激光切削研究的重要工具。

#### 参考文献

- 1 吴护平,董诺,李程,等.同一供体角膜分别用于全板层角膜移植和深板层角膜内皮移植的临床研究.中华移植杂志 2011;5(1):31-35
- 2 Terry MA, Ousley PJ, Will B. A practical femtosecond laser procedure for DLEK endothelial transplantation: cadaver eye histology and topography. *Cornea* 2005;24(4):453-459
- 3 Soong HK, Mian S, Abbasi O, et al. Femtosecond laser-assisted posterior lamellar keratoplasty: initial studies of surgical technique in eye bank eyes. *Ophthalmology* 2005;112(1):44-49
- 4 Vetter JM, Butsch C, Faust M, et al. Irregularity of the posterior corneal surface after curved interface femtosecond laser-assisted versus microkeratome-assisted descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea* 2013;32(2):118-124
- 5 Serrao S, Lombardo M, De Santo MP, et al. Femtosecond laser photodisruptive effects on the posterior human corneal stroma investigated with atomic force microscopy. *Eur J Ophthalmol* 2012;22 (Suppl 7):S89-97
- 6 Lombardo M, De Santo MP, Lombardo G, et al. Surface quality of femtosecond dissected posterior human corneal stroma investigated with atomic force microscopy. *Cornea* 2012;31(12):1369-1375
- 7 Cheng YY, Kang SJ, Grossniklaus HE, et al. Histologic evaluation of human posterior lamellar discs for femtosecond laser Descemet's stripping endothelial keratoplasty. *Cornea* 2009;28(1):73-79
- 8 Suwan-Apichon O, Reyes JM, Griffin NB, et al. Microkeratome versus femtosecond laser predissection of corneal grafts for anterior and posterior lamellar keratoplasty. *Cornea* 2006;25(8):966-968
- 9 Ide T, Yoo SH, Kymionis GD, et al. Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty: effect of anterior lamellar corneal tissue-on/off storage condition on Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty donor tissue. *Cornea* 2008;27(7):754-757
- 10 Mehta JS, Shilbayeh R, Por YM, et al. Femtosecond laser creation of donor cornea buttons for Descemet-stripping endothelial keratoplasty. *J Cataract Refract Surg* 2008;34(11):1970-1975
- 11 Monterosso C, Fasolo A, Caretti L, et al. Sixty-kilohertz femtosecond laser-assisted endothelial keratoplasty: clinical results and stromal bed quality evaluation. *Cornea* 2011;30(2):189-193
- 12 Mian SI, Soong HK, Patel SV, et al. In vivo femtosecond laser-assisted posterior lamellar keratoplasty in rabbits. *Cornea* 2006;25(10):1205-1209
- 13 Sarayba MA, Maguen E, Salz J, et al. Femtosecond laser keratome creation of partial thickness donor corneal buttons for lamellar keratoplasty. *J Refract Surg* 2007;23(1):58-65
- 14 Mootha VV, Heck E, Verity SM, et al. Comparative study of descemet stripping automated endothelial keratoplasty donor preparation by Moria CBm microkeratome, horizon microkeratome, and Intralase FS60. *Cornea* 2011;30(3):320-324
- 15 Ziebarth NM, Dias J, Hürmeriç V, et al. Quality of corneal lamellar cuts quantified using atomic force microscopy. *J Cataract Refract Surg* 2013;39(1):110-117