

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«МЕЖОТРАСЛЕВОЙ НАУЧНО–ТЕХНИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС
«МИКРОХИРУРГИЯ ГЛАЗА» ИМЕНИ АКАДЕМИКА С.Н. ФЕДОРОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ЭНКИНА АННА ВЛАДИМИРОВНА

**РАЗРАБОТКА И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ
НОВОЙ МОДЕЛИ КЕРАТОПРОТЕЗА**

14.01.07. – глазные болезни

14.01.24 – трансплантология и искусственные органы

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Малюгин Борис Эдуардович

доктор медицинских наук, профессор

Борзенко Сергей Анатольевич

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Исторические аспекты кератопротезирования	14
1.2. Эволюция дизайна кератопротезов	17
1.2.1. Материалы, применяемые для изготовления кератопротезов.....	17
1.2.2. Модели кератопротезов в зависимости от вида фиксации.....	24
1.2.2.1. Экстракорнеальная фиксация	25
1.2.2.2. Интрастромальная фиксация	26
1.2.2.3. Эпикорнеальная фиксация	28
1.3. Современные подходы к решению проблем кератопротезирования	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	35
2.1. Общая характеристика материалов и методов исследования	35
2.2. Характеристика полимерной опорной пластины кератопротеза	39
2.3. Двумерное культивирование клеток стромы роговицы человека в присутствии различных моделей опорной пластины кератопротеза в эксперименте <i>in vitro</i>	41
2.4. Исследование биосовместимости материала опорной пластины кератопротеза на модели органотипического культивирования в эксперименте <i>ex vivo</i>	43
2.5. Исследование биосовместимости различных моделей опорной пластины кератопротеза на модели экспериментальных животных в эксперименте <i>in</i> <i>vivo</i>	44
2.6. Лабораторные методы исследования	46

2.7. Статистические методы исследования	48
ГЛАВА 3. МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ОПОРНОЙ ПЛАСТИНЫ КЕРАТОПРОТЕЗА	50
3.1. Определение минимально достаточной жесткости опорной пластины кератопротеза.....	50
3.2. Обоснование и расчеты параметров опорной пластины кератопротеза ...	53
3.3. Сравнительный математический анализ влияния различных моделей кератопротезов на биомеханические характеристики бельма роговицы.....	57
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ БИОСОВМЕСТИМОСТИ ОПОРНОЙ ПЛАСТИНЫ КЕРАТОПРОТЕЗА	61
4.1. Результаты двумерного культивирования выделенных клеток стромы роговицы человека в присутствии опорной пластины кератопротеза	61
4.2. Результаты экспериментально-морфологического исследования влияния опорной пластины кератопротеза в роговицу человека в эксперименте <i>ex vivo</i>	65
ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ НАБЛЮДЕНИЙ И МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В РАННЕМ И ОТДАЛЕННОМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДАХ.....	72
5.1. Морфофункциональные изменения роговицы кролика после имплантации полимерных опорных пластин кератопротеза	72
5.1.1. Результаты исследования роговицы кролика методом биомикроскопии	73
5.1.2. Результаты исследования роговицы кролика методом оптической когерентной томографии	78
5.1.3. Результаты гистологического исследования роговицы кролика методом световой микроскопии	83

5.1.4.Результаты исследования роговицы кролика методом сканирующей электронной микроскопии	86
5.2.Морфофункциональные изменения роговицы кролика после имплантации полимерного кератопротеза	93
5.2.1.Результаты исследования роговицы кролика методом биомикроскопии	93
5.2.2.Результаты исследования роговицы кролика методом оптической когерентной томографии	97
5.2.3.Результаты гистологического исследования роговицы кролика методом световой микроскопии	100
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	104
ВЫВОДЫ	112
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	115
ОСНОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	117

ВВЕДЕНИЕ

По данным Всемирной организации здравоохранения во всем мире 4,9 миллиона человек страдают двусторонней слепотой вследствие патологии роговицы, что составляет 12% от глобальной слепоты (Riau A. K., Dohlman C. H., Mehta J. S., 2017). К наиболее тяжелым повреждениям роговой оболочки, исходом которых является формирование сосудистого бельма IV-V категории, относятся ожоги глаз (Филатов В.П., 1947). В структуре глазного травматизма ожоги составляют до 38,4%, при этом 50% пострадавших вследствие этого становятся инвалидами по зрению (Бирич Т.В., Гундорова Р.А., Малаев А.А., 1979). В результате тяжелых ожогов глаз происходят изменения переднего отрезка, сопровождающиеся грубой рубцовой деформацией век, укорочением конъюнктивальных сводов, лимбальной недостаточностью, дистрофическими изменениями всех слоев роговицы, формированием ретрокорнеальных мембран, зрачковым блоком, вторичной глаукомой на фоне топографо-анатомических изменений структур угла передней камеры, хроническим кератоувеитом, помутнением хрусталика. Основной оптической операцией при помутнениях роговицы, формирующихся в результате тяжелых травм, ожогов глазного яблока, а также терминальных стадиях дистрофий роговицы является трансплантация донорской роговицы (Ченцова Е.В., 1996; Каспаров А.А., 2001). Сквозная кератопластика в таких случаях осложняется неоваскуляризацией роговичного трансплантата (Копеева В.Г., 1997) и является неэффективной вследствие развития иммунных осложнений различного генеза, приводящих к помутнению роговицы (Кротова Е.В., 1994; Комах Ю.А., 1995; Muraine M., 2003; Ghaffariyeh, A., 2010; Bachmann B., 2010). Единственным способом восстановления зрения у пациентов этой тяжелой группы остается протезирование роговицы (Cardona H., 1964, 1977; Barraquer J., 1965; Choусе D., 1965; Dohlman C., 1967; Гундорова Р.А., 1969; Федоров С.Н., 1969; Зуев

В.К., 1974; Якименко С.А., 1985; Мороз З.И., 1987; Hicks С., 1998; Chirila T.V., 2001; Калинин Ю.Ю., 2005; Макаров П.В., 2009; Акрек Е.К., 2014).

Все современные модели протезов роговицы, несмотря на многообразие их конструктивных особенностей, имеют общее строение – состоят из опорной и оптической частей. Опорная часть (опорный элемент, опорная пластина) представляет собой периферическую часть кератопротеза, в которой по центру закреплена оптическая часть (оптический элемент). Основная функция опорного элемента заключается в обеспечении надежной фиксации всей конструкции протеза в патологически измененной ткани роговицы. Оптический элемент заменяет центральные мутные слои роговицы и позволяет сфокусировать на сетчатке глаза изображение от окружающих предметов. Кератопротезы могут быть неразборными и разборными, при этом оптический элемент фиксирован с опорной пластиной посредством резьбового соединения (Хапчаев Р.Т., 2006).

Существует несколько классификаций кератопротезов, основанных на типе фиксации (экстракорнеальный, интрастромальный, эпикорнеальный) и материале опорного элемента – синтетические: полиметилметакрилат (Choyse D.P., Dohlman С. Н., 1967), дакрон (Pintucchi В., 1995), гидрогель (Hicks С.Р., 2003), силикон, политетрафторэтилен (Legeais J.M., 1992), гидроксиапатит (Barraquer L., 1965) и коралл (Liu С., Hille K., 2008); биологические материалы, такие как зуб (Strampelli В., Falcinelli G., 1963), большеберцовая кость (Temprano J., 1993).

Долгий путь становления кератопротезирования характеризовался экспериментальными поисками и клиническими испытаниями различных моделей кератопротезов, но развитие отдаленных осложнений до сих пор остается основной причиной неудач. Наиболее частым осложнением кератопротезирования остается протрузия протеза в результате асептического некроза ткани роговицы (Пучковская Н.А., Якименко С.А., 2001; Макаров П.В., Гундорова Р.А., 2007; Chirila T.V., 2001). Развитие осложнений зависит от многих факторов – конструкции кератопротеза,

методики его имплантации, этиологии бельма, правильного ведения послеоперационного периода (Мороз З. И., Глазко В.И., 1983).

Попытки имплантаций кератопротезов прошлого столетия, изготовленных из стекла и кварца были прекращены, из-за высокой частоты протрузий (Myung D., Duhamel P.E., 2008). Современный период кератопротезирования начался в конце 1940-х г.г. с момента введения синтетических полимеров (Chirila T.V., Crawford G.J., 1996). Использование полимерных материалов является более перспективным, так как это позволяет изготавливать изделия сложной геометрической конструкции со стабильными оптическими и биомеханическими свойствами. В последующие десятилетия было разработано и оценено клинически большое разнообразие одно- или двухкомпонентных кератопротезов из гомополимеров, сополимеров (Whitcher J. P., 2001; Li F., 2005), биосополимеров (Trinkaus-Randall V., 2000) и взаимопроникающих полимерных сетей (Калинников Ю.Ю., 2005; Wilhelmus K. R., 1995). В настоящее время в мире преимущественно используют 3 варианта кератопротезов: Бостонскую модель, остео-одонто кератопротез и модель Федорова-Зуева (Ghaffariyeh A., Moroz Z.I., 2010; Lam F.C, Liu C., 2011). Несмотря на разнообразие форм, размеров и материала, доля отторжения кератопротезов, по данным литературы составляет 10-75% случаев (Hille K, 2002; Salvador-Culla B., 2016).

В последние годы стало очевидным, что наличие отверстий в опорных пластинах предотвращает полное разобщение передних и задних слоёв роговицы, способствует лучшей фиксации кератопротеза в роговице и снижает риск отторжения в результате асептического некроза ткани (Chirila T.V., 2001; Kim M.K., Lee J.L., 2002). Однако имплантация усовершенствованных моделей не привела к полному устранению послеоперационных осложнений. Основные причины заключались в структуре материала и дизайне опорного элемента кератопротеза. Следует констатировать, что вышеперечисленным авторам так и не удалось найти

идеально подходящих для кератопротезирования химических параметров полимера и предложить материал с заданной структурой пористости.

Таким образом, потребность в повышении эффективности метода кератопротезирования, обусловленная значительной долей осложнений в виде асептического некроза поверхностных слоёв роговицы, приводящей к протрузии протеза, свидетельствуют о необходимости дальнейшей работы в данном направлении. Актуальность проблемы послужила основанием к выбору цели исследования.

Цель исследования

Разработать и обосновать в эксперименте модифицированную конструкцию кератопротеза с учетом использования биосовместимого гибкого полимерного материала и оптимизации дизайна опорной пластины.

Задачи исследования

1. Разработать математическую модель опорной пластины кератопротеза с оптимальным дизайном, учитывающим анатомо-топографические особенности роговицы.

2. Исследовать *in vitro* особенности поведения культуры клеток стромы роговицы на полимерный материал новой опорной пластины с помощью метода двумерного клеточного культивирования.

3. Изучить в эксперименте *ex vivo* особенности клеточно-тканевой реакции на интеграцию и фиксацию полимерной опорной пластины с помощью метода органотипического культивирования кадаверной роговицы человека.

4. Оценить в эксперименте *in vivo* влияние модели полимерной опорной пластины кератопротеза на переднюю и заднюю поверхности роговицы экспериментального животного, в сравнении с опорным элементом, выполненным из титана.

5.Изучить реакцию стромы роговицы экспериментального животного на имплантацию предложенной модели кератопротеза, имеющей опорную пластину из гибкого полимерного материала.

Научная новизна работы

1.Впервые на основании методов математического моделирования с учетом биомеханических свойств полимера, а также анатомо-топографических особенностей роговицы, разработана новая модель опорной пластины кератопротеза, которая создает реальные предпосылки повышения эффективности кератопротезирования и снижения вероятности послеоперационных осложнений.

2.Впервые изучена биосовместимость имплантированной полимерной опорной пластины кератопротеза выполненной из гидрофобного акрила в условиях двумерного культивирования выделенных клеток стромы и исследований на модели органотипической культуры кадаверных роговиц человека, определены сохранение пролиферативной способности клеток и высокая степень их адгезии к полимерному материалу.

3.Впервые изучены отдаленные морфологические изменения, происходящие в тканях роговицы кролика, после имплантации кератопротеза предложенной модели. Выявлено, что волокна новообразованной соединительнотканной капсулы прорастают в ячеистую структуру опорного элемента из гидрофобного акрила, тем самым надежно фиксируя его и исключая смещение по отношению к поверхности роговицы и оптической оси глаза.

Практическая значимость работы

1.На основании математического моделирования рассчитаны оптимальные геометрические параметры опорной пластины новой модели кератопротеза выполненной из гибкого гидрофобного акрилового полимера отечественного производства перспективные для последующего внедрения в производство.

2. Разработана методология изучения и оценены результаты особенностей приживления кератопротеза при имплантации в интрастромальный карман роговицы в эксперименте *in vivo* на глазах лабораторных животных (кроликов) и *in vitro* на моделях клеточного культивирования выделенных клеток стромы роговицы, а также органотипического культивирования изолированных кадаверных роговиц человека с имплантированными полимерными изделиями. Указанный подход представляет собой базис для дальнейшего сравнительного анализа существующих и вновь предложенных полимерных биоимплантатов, внедренных в ткань роговицы.

3. Сочетание всех требуемых характеристик, необходимых для современного кератопротеза, относительная простота технологической обработки и лёгкость стерилизации, позволяют рассматривать новый полимерный опорный элемент из гидрофобного акрила как перспективный для дальнейшего клинического применения.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. На защиту выносится разработанная модель кератопротеза, оптимизированная по геометрическим параметрам его опорной пластины (диаметру, радиусу кривизны, толщине, размеру отверстий и жесткости), что обеспечивает оптимальную анатомическую совместимость с тканью роговицы, и предупреждение рисков развития осложнений.

2. Предложенная модель кератопротеза, выполненная из гидрофобного акрилового полимера, не обладает токсическими свойствами и характеризуется высокой степенью адгезии клеточных элементов, что доказано рядом экспериментальных исследований в условиях *in vitro*.

3. Интрастромальная имплантация предложенного кератопротеза повышает надежность его биологического приживления в глазах экспериментальных животных (кроликов) и обеспечивает профилактику

осложнений, благодаря формированию соединительнотканной капсулы вокруг опорной пластины.

Апробация работы

Результаты исследований доложены и обсуждены на научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы офтальмологии» (Москва, 2018) (1-е место за доклад), международных научно-практических конференция «Современные технологии катарактальной, роговичной и рефракционной хирургии» (Москва, 2018 и 2019 гг.), на еженедельной научно-клинической конференции ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России (2019).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 3 печатные работы, из них – 2 в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации основных результатов диссертационных исследований. Получено 2 положительных решения о выдаче патентов РФ на изобретения.

Внедрение результатов работы

Результаты исследований внедрены в работу отдела трансплантационной и оптико-реконструктивной хирургии переднего отрезка глазного яблока головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, лаборатории трансплантологии и клеточных технологий Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем, а также в Научно-педагогическом центре ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России и кафедры Глазных

болезней Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова.

Структура и объём работы

Диссертация изложена на 131 странице машинописного текста и состоит из введения и 5-ти глав, включающих обзор литературы, материалы и методы исследования, 3 главы результатов собственных исследований *in vitro* и *in vivo*, содержит заключение, выводы и практические рекомендации. Список литературы включает всего 136 источников, из них 40 отечественных и 96 иностранных. Диссертация иллюстрирована 6 таблицами, 54 рисунками и 3 формулами.

Диссертационная работа выполнена на основании государственного задания Минздрава России на 2016 -2019 гг. (УДК 617.7 № гос. Регистрации АААА-А17-117040410111-1) по теме «Медико-технологическая система оптического кератопротезирования на основе новой модели протеза роговой оболочки глаза». Математическое моделирование выполнено на базе вычислительного центра ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, при непосредственном участии заведующего отделом научно-математического обеспечения – к.т.н. Бессарабова А. Н.

Экспериментальные образцы и изделия из полимерных материалов на основе гидрофобного акрила были изготовлены и предоставлены ООО «Репер НН» г. Нижний Новгород, при непосредственном участии директора по новым разработкам - к.х.н. Джонса М.М.

Экспериментальные исследования *in vitro* и *ex vivo* выполнены на базе Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем (зав. центром – д.м.н., проф. Борзенко С.А.) ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России при участии научного сотрудника к.б.н. Островского Д.С.

Экспериментальные исследования *in vivo* выполнены на базе Калужского филиала ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России под руководством заместителя директора по научной работе к.м.н. Трифаненковой И.Г. и непосредственном участии заведующего операционным блоком Головной организации учреждения к.м.н. Головина А.В., а также к.м.н. Ковшун Е.В.

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

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Исторические аспекты кератопротезирования

При детальном ознакомлении с литературой обнаружено, что впервые идея имплантации в роговицу искусственного материала, с целью восстановления зрения, была предложена в 1789 году французским офтальмологом из Тулузы Pellier de Quengsi, который имплантировал стеклянную пластинку в эксперименте на животных [91]. Позднее в 1853 году протезирование роговицы в эксперименте выполнил J.Nussbaum. В своем исследовании он использовал конструкции, изготовленные из горного хрусталя, имеющие вид запонки или часового стекла [110]. Данные модели располагались интраламеллярно в слоях роговицы, в раннем послеоперационном периоде пациенты отмечали правильную светопроектицию, но позднее протезы отторгались из-за асептического некроза роговичной ткани [20]. В последующем офтальмологи экспериментировали с различными материалами: Heusser из Швейцарии описал интраламеллярную имплантацию искусственной роговицы из кварца [71]; Salzer F. (1898) из Германии впервые предложил использовать материал, более легкий, чем стекло [62], так в 1895 году он разработал модель из кварцевого диска с окружающим его платиновым кольцом с зубцами; Dimmer F. (1897) использовал целлулоид, первый коммерчески доступный термопластик, который он сформировал и имплантировал в глаз человека, но с неудовлетворительными анатомическими результатами в послеоперационном периоде, однако он был первым, кто использовал полимерный материал в качестве протезного устройства [62].

На рубеже веков наблюдался спад интереса к искусственным роговицам из-за первой трансплантации донорской роговицы трупа, которую

Zirm E. С. успешно выполнил пациенту с щелочным ожогом роговицы в 1906 году [43]. С улучшением хирургических методов и материалов, а также увеличением результативности трансплантации донорской роговицы, интерес к кератопротезам снизился. Однако накопленный клинический опыт показал, что при сосудистых бельмах роговицы ожоговой этиологии пересадка донорской роговицы не эффективна. Поэтому офтальмологи вновь обратились к идее протезирования роговицы с использованием прозрачных искусственных материалов. Они в основном касались экспериментальных исследований, но в отдельных случаях проводились попытки клинического кератопротезирования [80].

Во время Второй мировой войны произошло открытие, когда Ridley H. заметил, что акриловый пластик разрушенного купола кабины самолета оказался инертным в глазах пилотов. Так Ridley H. впервые в 1951 году выполнил имплантацию искусственного хрусталика из полиметилметакрилата (ПММА) в глаз человека после интракапсулярной экстракции катаракты. После этого использование полимерных материалов вошло в широкую практику в офтальмохирургии [60, 132]. По мере развития технологий полимеры стали применять в хирургии патологий всех отделов глазного яблока (полимерные нити, интрастромальные импланты, интраокулярные линзы и т.д.) [12]. В качестве материала для изготовления протезов стали исследовать гидрофобные полимеры, такие как нейлон, тефлон, дакрон, модифицированный гортэкс, полиуретан, политетрафторэтилен (ПТФЭ), ПММА [45, 95, 114].

Именно на этом этапе был приобретен опыт, необходимый для дальнейших исследований. Binder H., Binder R. (1956) считали, что протрузия кератопротеза возникает, вследствие его плохой интеграции в ткани ожогового бельма. В эксперименте они применили кератопротез с опорной частью, изготовленной из гибкой полиэтиленовой пленки толщиной в 1 мм и диаметром 8 мм, которая прикреплялась к оптическому цилиндру, выполненному из плексигласа диаметром 2,5 мм и длиной 1,5 мм.

Положительными сторонами в предложенной конструкции протеза было выстояние оптического цилиндра в переднюю камеру и наличие 3-4 полуовальных отверстий в его опорной части, что также получило развитие в дальнейшем [48].

В течение этой эры были изготовлены другие конструкции с частично перфорированной гапстикой Barraquer (1956) и Barraquer-Cardona (1958). Позже, в 1960-х годах Stone W. и Herbert E. разработали модели моноблочного кератопротеза из ПММА с отверстиями на периферии опорного элемента для интрастромальной фиксации. Их идея заключалась в том, что наличие отверстий в опорных пластинах предотвращает полное разобщение передних и задних слоёв роговицы и способствует лучшей фиксации кератопротеза в строме роговицы [59, 132]. Авторы испытали в эксперименте кератопротез, фиксационный диск которого имел множество отверстий и размещался интраламеллярно. Преимуществом данной модели явилось большое количество отверстий, что позволило фиксироваться интрастромально, в сравнении с моделью протеза с неперфорированной опорной частью. По мнению Stone W. (1958), перфорация фиксирующей части должна предупреждать инфицирование и фильтрацию [129]. Эта идея в дальнейшем нашла свое обоснование.

Dolhman C., Bueried в 1965 году апробировали в качестве материала для изготовления кератопротеза силиконовую резину с индексом рефракции 1,482. Авторы отметили преимущества силиконовой резины: термостабильность при автоклавировании; гибкость, позволяющая соответствовать кривизне роговицы при повышении внутриглазного давления [77]. Однако недостатком протеза из силикона является отсутствие перфораций невозможность изготовления разборной модели кератопротеза.

Так Bock R., Maumenee A. (1953), Knowles W. (1961), Polack F. (1971), изучая степень гидратации слоев роговицы, при разделении их непроницаемыми дисками для внутриглазной жидкости, показали, что жидкость из передней камеры направляется к эпителию через строму,

поэтому наличие препятствия на этом пути вызывает дегидратацию передних слоев роговицы. В связи с чем, авторы сообщили о преимуществе использования перфорированных опорных пластин кератопротезов, что в меньшей степени нарушало питание слоев роговицы и способствовало лучшей фиксации кератопротеза [49, 116, 133].

1.2. Эволюция дизайна кератопротезов

Наряду с изучением физиологических процессов в роговице, обусловленных интраламеллярной имплантацией дисков различных конструкций, проводились экспериментальные исследования на глазах животных в поиске материала для изготовления кератопротеза, обладающего инертностью по отношению к тканям глаза.

1.2.1. Материалы, применяемые для изготовления кератопротезов

Начиная с конца 40-ых годов XX века, исследователи изучали возможности использования различных материалов для изготовления кератопротезов. Большое значение для дальнейшего развития кератопротезирования имели работы Cardona H. (1962, 1965-1967, 1969), Cardona H., Castroviejo R., De Voe A. (1962, 1966, 1969). Так Cardona H. в своих первых экспериментальных работах для изготовления опорной пластины протеза использовал коготь кролика. Однако автор пришел к выводу, что полимерный материал является более биосовместимым для роговицы, чем ткань когтя. В своих работах Cardona H. был сторонником применения протезов небольших размеров без перфораций в опорной части и считал, что большой размер опорной пластины требует расслаивания роговицы для образования интрастромального кармана на большом протяжении, что затруднительно выполнить в патологически измененной

роговице. По этой причине залогом успешной имплантации кератопротеза, с точки зрения Cardona H., является микроинвазивная и менее травматичная хирургическая методика для тканей глаза [56].

Для определения оптимальной локализации интраламеллярной части протеза в роговице, Cardona H. в 1967 году провел исследования на трех группах экспериментальных животных, в которых опорную часть имплантировали на различную глубину. Автор пришел к выводу, что чем глубже расположена опорная часть, тем меньше риск отторжения протеза [53]. Сравнив в эксперименте ряд моделей кератопротезов предложенных ранее, и не получив удовлетворительных результатов, Cardona H. провел испытания кератопротезов собственной конструкции и пришел к выводу, что лучшей является "послойно-сквозная" модель, оптический цилиндр которой имел длину и диаметр 1,5 мм, а опорная часть была выполнена в виде диска диаметром 3,5 мм. Оптический цилиндр и опорная часть такой модели были изготовлены из акрила [49]. По данным гистологических исследований, Cardona H. установил, что если задняя часть оптического цилиндра выступает в переднюю камеру, то рубцовая ткань разрастается только вокруг цилиндра и не закрывает его заднюю поверхность. Автор считал это обязательным условием для предупреждения зарастания задней поверхности оптического цилиндра ретропротезной мембраной.

В 1969 году Castroviejo R., De Voe A. сообщили о первых успешных результатах клинического применения кератопротеза и методики операции, предложенных Cardona H. В этом же году Cardona H. предложил новую модель кератопротеза с контактной линзой, присоединяемой к оптическому цилиндру. "Грибовидный" кератопротез имплантировали в трепанационное отверстие в роговице и фиксировали поддерживающей пластиной, располагающейся за роговицей. В последующие годы Cardona H., De Voe A. (1977) применяли кератопротезы с перфорированной опорной частью из ПММА и "грибовидный" кератопротез "болт-гайка", совершенствуя в основном методику имплантации протезов. Именно в результате

экспериментальных исследований авторы пришли к выводу о необходимости достаточно широкой перфорированной опорной части кератопротеза. По их утверждению, это одно из главных условий предупреждения инфицирования и фильтрации камерной влаги между роговицей и протезом. Последующие клинические наблюдения подтвердили правильность этого вывода [53].

Существенный вклад в развитии кератопротезирования внес Choусе D. P. (1968 - 1969), автором были разработаны две модели кератопротезов. Протез Choусе-1 представлял собой неразборную модель из полиметилметакрилата (ПММА), опорная пластина которого была выполнена в виде диска с четырьмя отверстиями. Имплантацию кератопротеза в слои роговицы проводили одноэтапно. Кератопротез Choусе-2 был выполнен как двусоставная модель из ПММА, состоящая из опорной пластины с 36 перфорационными отверстиями, расположенными в 3 ряда, и оптического цилиндра. Имплантацию кератопротеза Choусе-2 производили также интрастромально, но в 2 этапа. После расслоения роговицы трепанировали только задние ее слои. Вторым этапом через несколько месяцев производили трепанацию передних слоев роговицы, и вкручивали сквозной оптический цилиндр. Автор пришел к выводу о преимуществах разборных моделей, так как это позволило исправить в послеоперационном периоде рефракцию при неправильных расчетах; удалить ретропротезную мембрану или катаракту; заменить оптический цилиндр в случаях, если он располагался ниже поверхности роговицы или значительно выступал над ней. Однако был выявлен и ряд недостатков кератопротеза Choусе-2, которыми явились: большой вес (96 мг); круглая форма опорной пластины кератопротеза диаметром 8,0 мм, требующая расслоения практически всей площади роговицы; толстая опорная пластина (0,2 мм) с малым количеством перфораций, значительно разобщающая слои бельма и не обеспечивающая питания передних слоев роговицы; необходимость вскрытия передней камеры глаза на 1 этапе кератопротезирования, приводящая к просачиванию влаги в слои бельма, вызывая дегенеративные изменения в них [66].

В период с 1967 по 1986 год Пучковская Н.А., Якименко С.А. с соавт. применяли различные модели кератопротезов, изготовленные из ПММА, титана, тантала и лавсановой сетки. При этом авторы отметили, что при имплантации протезов из тантала случаев язвенных дефектов над опорным элементом было меньше [25]. В 1968 году Бедило В.Я. в своих экспериментальных исследованиях сравнивал исходы имплантаций 6 моделей кератопротезов и пришел к выводу о преимуществе моделей с опорной частью из тантала и титана, по сравнению с моделями такого же размера с опорной частью из ПММА, в связи с менее выраженной реакцией глаза [1].

Мороз З.И. и Зуев В.К. проанализировали собственные результаты имплантации моделей кератопротезов Cardona и Choусе и, изучив причины их отторжения, пришли к решению о необходимости создания модели кератопротеза с уменьшением его массы, диаметра оптического цилиндра и увеличением при этом площади перфорации в опорной пластине [13,15]. Авторы разработали следующие модели кератопротезов: Федорова-Зуева (1972) для имплантации в постожоговые бельма [13, 20], Мороз-Глазко (1972) – в дистрофические бельма [21], “Сеточка 1 и 2” (1992) – в бельма различной этиологии [6, 104].

Конструктивными преимуществами разборной модели протеза Федорова-Зуева перед кератопротезом Choусе-2 явились: значительно меньший вес (24,29 мг вместо 96 мг); наличие двух больших диаметрально расположенных отверстий с общей площадью перфорации 75%, что уменьшало площадь разобщения слоев бельма (3,65 мм² вместо 43,6 мм²), а также наличие в опорной пластине втулки из ПММА и закручивающейся в нее временной заглушки, что исключало зарастание внутренней резьбы и необходимость трепанации внутренних слоев бельма во время первого этапа операции [1, 13, 29]. Однако разборный принцип устройства способствовал высокому риску послеоперационных осложнений, в первую очередь, фильтрации влаги передней камеры и как следствие развитие гипотонии,

асептического некроза роговицы и протрузии кератопротеза [7, 21, 78, 87]. Исследованиями Мороз З.И. было доказано, что асептический некроз роговицы, при имплантации протеза Федорова-Зуева в сосудистые бельма 4-5-й категории, возникает при ожоговой этиологии бельма в 3 раза чаще, чем при дистрофической [20].

С целью предупреждения развития протрузии кератопротеза, авторы предложили выполнять укрепление бельма за 3-4 месяца до кератопротезирования аутотрансплантатами [20, 28]. Одним из первых методов была поверхностная кератопластика донорской роговицей [55, 65]. Girard L. для укрепления бельма предложил эпикорнеальный послойный склеральный трансплантат, но в ряде случаев в послеоперационном периоде наблюдал некроз донорской склеры с последующим отторжением кератопротеза [79]. Castroviejo R. с соавт. применял склеральный гомотрансплантат и лоскут конъюнктивы на ножке [56]. Однако Ушаков Н.А. сообщил об отторжении лоскута гомосклеры через 1-6 месяцев в половине случаев и рекомендовал укреплять бельмо местными тканями на ножке с замещением дефекта аутослизистой губы [28]. В настоящее время наиболее часто осуществляется интрастромальное укрепление бельма аутохрящом ушной раковины [2, 19, 40], слизистой оболочкой полости рта [20, 40], теноновой оболочкой или аутонадкостницей большеберцовой кости [28].

Достаточно высокий процент осложнений кератопротезирования у пациентов с неравномерными по толщине бельмами, требующими предварительного или одномоментного укрепления бельма биологическими материалами, приводит к выводу, что необходим новый подход к проблеме кератопротезирования. В связи с чем, был предложен новый метод, заключающийся в комбинации сквозной кератопластики и кератопротезирования. Первым этапом донорскую роговицу подвергали процедуре рибофлавин-UVA-индуцированного кросслинкинга для повышения ее прочностных свойств. Далее в кросслинкинг-модифицированную донорскую роговицу имплантировали кератопротез

Федорова-Зуева (опорную пластину с оптической частью). Затем выполняли пересадку полученного роговично-протезного комплекса (РПК) в один этап наподобие сквозной кератопластики [5, 30, 31].

В последующем была предложена модификация РПК. В эксперименте *in vivo* было показано, что имплантация биокератопротезного комплекса в роговицу кроликов, на основе кросслинкинг-модифицированной роговицы и культуры аутологичных фибробластов кожи, способствовало развитию репаративных процессов в строме и полости интрастромального кармана. По мнению авторов, данный комплекс обеспечивал профилактику специфических осложнений за счет активного формирования соединительнотканной капсулы вокруг опорной пластинки кератопротеза, тем не менее, предложенный метод не вошел в широкую клиническую практику [39].

Становилось очевидным, что материал опорного элемента кератопротеза помимо высокой биологической инертности должен обладать способностью к биоинтеграции и фиксироваться в окружающей его ткани посредством клеточной инвазии, для создания плотного контакта между материалом и тканью роговицы. Ввиду этого предпринимали попытки использования синтетических пористых полимеров в качестве материала для опорной пластины с целью улучшения приживления кератопротезов в строме роговицы. Синтетические полимеры обладают рядом достоинств: высокой биосовместимостью с тканями глаза, малым весом, доступностью в производстве, простой техникой имплантации. Различными исследователями (Trinka-Randall V., 1988; Grandon S.C., 1988; Chirila T.V., 1990; Barber J.C., 1993; Jacob-LaBarre J.T. и Caldwell D.R., 1997; Legeais J.M., 1998) был проявлен интерес и предложены собственные модели с опорной частью из полимерных материалов.

Позднее в работах Mester U. с соавт. (1979) и Smetana T. с соавт. (1987) было сделано сообщение о применении гидрофильного гидроксипропилметакрилата в качестве материала для изготовления

кератопротеза. По мнению автора, данный материал обеспечивал питание роговицы, пропуская водянистую влагу, кислород и электролиты. После имплантации кератопротеза из гидрофильной пластмассы его размеры увеличивались в результате гидратации примерно на 20%, что способствовало более плотному прилеганию протеза к роговице и уменьшению его подвижности. При наблюдении в сроки до 21 месяца признаков отторжения не наблюдали. Однако в литературе сообщений о применении данного кератопротеза в клинике не найдено [102, 128].

Группа исследователей из Бостона во главе с Trinkaus-Randall V. (1988) выбрали в качестве материала для опорного элемента кератопротеза сополимер полибутилена. Сетчатая структура материала со смежными ячейками размером от 10 до 100 мкм обеспечивала пролиферацию стромальных фибробластов в материал. Для материала оптики протеза авторами были предложены прозрачные материалы из сополимеров винилового спирта. Однако, несмотря на неоднократные исследования *in vivo* и *in vitro* нами не найдено данных об имплантации целого кератопротеза ни животным, ни человеку [133].

С 1990 года Chirila T.V. с группой авторов начали исследования поли-2-гидроксиэтилметакрилата (PHEMA) в качестве цельной модели кератопротеза. Данный материал позволил создать гибкий протез, не оказывающий дополнительной механической нагрузки на зону имплантации [59]. При имплантации более 35 пациентам протез был удален в 10 случаях из-за снижения прозрачности оптики вследствие поверхностных отложений (Chirila TV, Vijayasekaran S, Horne R, et al., 1994).

Jacob-LaBarre J.T. и Caldwell D.R. (1997) провели всестороннее экспериментальное исследование на кроликах семи керамических и пористых материалов сетчатого или губчатого строения из политетрафторэтилена (ПТФЭ), а также десяти гибких прозрачных полимеров из полиуретана. Результаты гистологического исследования имплантов показали отсутствие в течение 3-х месяцев выраженных

послеоперационных осложнений и хорошую интеграцию в роговице. Были сделаны выводы, что наиболее применимыми материалами для опорной части являются пористый ПТФЭ, а для оптики – эластомер полиуретана [88, 89]. Legeais J.M. (1998) с соавторами разработали кератопротез с опорной частью из пористого ПТФЭ и оптики из ПММА, соединенных титановым кольцом. При наблюдении в отдаленном послеоперационном периоде было зафиксировано 2 случая отторжения из 10, данные по остальным имплантам не были представлены [94].

Анализ исторических данных по применению различных моделей кератопротезов показал, что удельный вес тех или других осложнений зависит от конструкции протеза и метода его фиксации в роговице. Следовательно, необходимы дальнейшие поиски как наиболее рациональной модели кератопротеза, так и новых совершенных методов его имплантации с целью уменьшения количества послеоперационных осложнений, что, несомненно, может повлиять на длительность сохранения имплантата в роговице.

1.2.2. Модели кератопротезов в зависимости от вида фиксации

На протяжении более чем двухсотлетней истории кератопротезирования модели кератопротезов постоянно совершенствовались. Конструктивные изменения касались не только использования различных материалов, но также форм и размеров опорной и оптической частей. Различным вариациям подвергались методы фиксации кератопротеза в роговице и этапность выполнения оперативных вмешательств [17, 25, 29, 44].

1.2.2.1. Экстракорнеальная фиксация

Упомянутый выше кератопротез Nussbaum J. имел форму запонки. Протезы с экстракорнеальной фиксацией в различных модификациях используются и в настоящее время [52, 53]. Наиболее известная из них Бостонская модель кератопротеза, устанавливаемая предварительно в донорскую роговицу, которая затем фиксируется в глазу пациента, как при сквозной кератопластике [36, 73]. Ранее известный как «Кератопротез Dohlman-Doane», бостонская модель кератопротеза состоит из двух основных частей: передней пластины из полиметилметакрилата (ПММА) диаметром 5,5 мм с центральным оптическим цилиндром диаметром 3,35 мм и защелкивающейся титановой задней пластиной диаметром 7,0-8,5 мм с 16 отверстиями, которые облегчают доступ влаги передней камеры к ткани роговицы. Между пластинами фиксируется донорская роговица, и роговично-протезный комплекс имплантируют пациенту одноэтапно, как стандартный трансплантат [122]. Авторы ретроспективного анализа сообщали об успешных результатах имплантации Бостонской модели в 36 случаях у 59 пациентов с дистрофическими изменениями роговицы через 16 месяцев [58]. Однако при имплантации данной модели в роговицу после химического и термического повреждения по данным исследований авторы отмечали развитие асептического некроза и бактериального эндофтальмита в 16 из 19 случаев в отдаленном послеоперационном периоде [46].

В последнее десятилетие были достигнуты значительные успехи в разработке Бостонской модели кератопротеза, а также в лечении послеоперационных осложнений. Одним из изменений было введение суточной дозы местной антибиотикопрофилактики широкого спектра действия для снижения частоты инфекционного кератита и эндофтальмита [46]. Также для решения этой проблемы группа исследователей изучала использование новых материалов, таких как гидроксиапатит [135] и титан [123], чтобы вызвать более прочную связь между роговицей и

кератопротезом. В недавнем исследовании авторы показали, что благодаря введению кольца из титана вокруг оптического цилиндра, адгезия между роговицей и кератопротезом может быть значительно выше и вероятность послеоперационных осложнений, таких как кератит и эндофтальмит может быть снижена [122, 123]. Другие модификации были направлены на профилактику образования ретропротезных мембран с помощью увеличенной задней пластины кератопротеза (9,5 мм). По данным исследований данная трансформация эффективно снижает вероятность образования ретропротезных мембран и не оказывает неблагоприятного воздействия на угол передней камеры [69].

1.2.2.2. Интрастромальная фиксация

В настоящее время существуют модели биоинтегрируемых кератопротезов с эпикорнеальной (надроговичной) и интрастромальной фиксацией. Из последних доступным на мировом рынке является интрастромально имплантируемый кератопротез Legeais [94]. На основе фторуглеродных полимеров, используемых, в частности, для производства одежды и обуви, западноевропейскими учеными были созданы две модели биоинтегрантивных кератопротезов – модели Legeais Bio Kpro I-III [94] и ВЮКОР [41].

Модель Legeais BioKpro I, созданная 13 лет назад, состояла из 4 частей: 9- миллиметровой непрозрачной гаптической части из ПТФЭ; оптической части длиной 2,67 мм, диаметром 4 мм из ПММА; хомута из ПММА диаметром 5 мм; крепежного кольца из ПММА диаметром 5 мм. Модель Legeais BioKpro II изготавливали из двух компонентов – оптической части из эластичного полидиметилсилоксана (ПДМС), покрытого поливинилпирролидоном (ПВП), диаметр которой увеличивался с 4 до 7 мм, толщина уменьшалась с 2,37 до 0,55 мм и гаптической части из ПТФЭ

диаметром 11 мм, толщиной 250 мкм, с порами размером 80 мкм. Оптика была соединена с периферической частью путем взаимопроникновения ПДМС и ПТФЭ. Благодаря меньшей толщине и большому диаметру оптики имплантация протеза могла осуществляться на факичных глазах. Отсутствие значительного снижения частоты возникновения асептического некроза и отторжения импланта в сравнении с первой моделью вызвало необходимость увеличить в Legeais BioKpro III диаметр гаптики до 10 мм и уменьшить диаметр оптики до 5 мм при той же толщине. По данным гистологического исследования удаленных кератопротезов из ПТФЭ в зоне прорастания отмечали выраженное разрастание фиброзной ткани с умеренными признаками воспаления. В зоне слабой интеграции тканей в имплантат отмечали признаки хронической воспалительной инфильтрации. При имплантации данной модели пациентами с термическими ожогами результаты были неудовлетворительными, протрузии в 6-ти случаях из 7, происходящие через 2-28 месяцев после операции [85].

Известным биоинтегративным кератопротезом с интрастромальной фиксацией является AlphaCor, который был разработан в Западной Австралии и одобрен FDA в 2003 году [83]. Данная модель представляет собой монолитную конструкцию, состоящую из пористой гаптической части диаметром 7 мм, центральной прозрачной оптической части диаметром 4,5 мм и общей толщиной 0,6 мм [63, 81, 82]. Обе части сделаны из поли-2-гидроксиэтилметакрилата (pHEMA), при этом оптическую часть изготавливали с уменьшенным содержанием воды в гидрогеле, а периферическая часть была выполнена из того же полимера, но с высоким содержанием воды [80]. По данным клинических исследований, одним из распространенных осложнений являлся некроз стромы роговицы, в 60% случаев, эндофтальмит был менее частым осложнением, в пределах 1-7% [83]. По данным гистологических исследований кератопротезов, отмечена пролиферация кератоцитов в направлении периферической части кератопротеза, что обеспечивало надежную интеграцию в ткани роговицы,

но сохранить оптические свойства не удалось по причине поверхностных отложений на оптическом элементе. В связи, с чем данная модель не вошла в широкую клиническую практику [83].

Таким образом, несмотря на передовые технологии, обеспечивающие взаимопроникновение тканей бельма и импланта, частота возникновения трофических осложнений, асептического некроза при использовании кератопротезов AlphaCor, Legeais BioKpro оставалась высокой.

1.2.2.3. Эпикорнеальная фиксация

Особым направлением в кератопротезировании следует считать применение гетеро-, ауто- и гомотканей для изготовления опорной пластины кератопротеза. Для этих целей применяли альвеолярный отросток зуба [130], роговицу, высушенную на силикагеле [24], большеберцовую кость [132]. Применяя гетеро-, ауто- и гомоткани, авторы стремились уменьшить контакт живой ткани бельма с пластмассой. Однако, данное направление не нашло широкого применения в клинике, в связи с присоединением иммунологической реакции несовместимости, за исключением остео-одонтокератопротеза (ООК) [131].

В начале 60-х г.г. Strampelli В. применил кератопротез, опорная часть которого состояла из аутотрансплантата альвеолярного отростка зуба пациента и впервые описал свою методику остео-одонтокератопротезирования (ООКП). Протез состоял из оптического цилиндра из ПММА с двумя сегментами: передний со средним диаметром 3,65 мм (3,3–4,0 мм) и задний со средним диаметром 4,1 мм (3,6–4,6 мм). Разница в диаметре позволяла прикрепить оптический цилиндр к зубу таким образом, чтобы задний сегмент действовал как опора, предотвращая самопроизвольную экструзию цилиндра. Хирургическую процедуру

выполняли в два или три этапа, разделенных интервалом в 3–5 месяцев [97]. Сообщая о результатах имплантации данной модели у 181 пациента с ожоговыми бельмами, в период с 1973 по 1999 г., Falcinelli G. отмечал их эффективность в 85 % случаев [77]. Однако мнения хирургов об этом способе противоречивы. Так, по данным Liu С., в ретроспективном анализе с 1996 по 2006 г. было отмечено 75 % случаев протрузий кератопротеза в результате резорбции пластины ООК [99]. Недостатками данного метода является многоэтапность, высокая травматичность, связанная с необходимостью извлечения здорового зуба [41]. Несколько лет спустя Temprano J. (1993) представил другой вариант, когда использовал фрагмент большеберцовой кости у пациента, у которого не было зубов. Были представлены сопоставимые анатомические и функциональные результаты, хотя резорбция кости происходила чаще, что приводило к увеличению скорости протрузии [102].

Кератопротез Pintucci является альтернативным и жизненно важным вариантом для реабилитации зрения, поскольку он менее инвазивен, чем ООК [84]. Кератопротез Pintucci был введен в 1979 году для пациентов с химическими ожогами роговицы, трахомой, рецидивирующим тяжелым герпетическим кератитом, синдромом Стивенса-Джонсона. Модель протеза имеет структуру, аналогичную ООК, но для гаптической части использовали ткань дакрона [115]. Дакрон — это синтетический биоинтегрируемый материал, через который легко проникают сосудистые ткани [72]. Операцию по имплантации протеза осуществляли в 2 этапа. На первом этапе бельмо укрепляли лоскутом слизистой оболочки полости рта, а кератопротез помещали в ткани нижнего века, через 60 дней кератопротез извлекали и имплантировали на бельмо под слизистую оболочку после предварительной трепанации бельма. В исследовании, проведенном Pintucci et al., в послеоперационном периоде от 24 до 96 месяцев наблюдали различные осложнения, включая некроз слизистой оболочки полости рта, отслоение хориоидеи, сетчатки, вторичную глаукому [101, 113].

Таким образом, отсутствие адекватной интеграции между оптическими и гаптическими элементами кератопротеза лежит в основе большинства осложнений кератопротезирования. Это свидетельствовало о том, что кератопротезирование продолжает оставаться сложной и трудноразрешимой проблемой офтальмологии, для решения которой были сделаны только первые шаги.

1.3. Современные подходы к решению проблем кератопротезирования

Накопленные знания по анатомии и физиологии роговицы, появление новых высокополимерных прозрачных пластмасс, развитие хирургической техники позволили подойти к решению проблемы кератопротезирования с принципиально новых позиций. На современном этапе развития науки возникла необходимость создания кератопротезов на основе взаимопроникающего соединения донорских тканей и полимеров с улучшенными прочностными и оптическими свойствами.

В этой связи Калинин Ю.Ю. и соавторы (2004) предлагают оригинальное решение вопроса биокератопротезирования. В их биокератопротезе опорная (периферическая) часть выполнена из донорской ткани (нативной или дубленной роговицы, склеры, твердой мозговой оболочки ксеноперикарда), оптическая часть — из биосовместимого материала на основе поли-НЭМА [15]. Показано, что в месте соединения оптической и периферической частей формируется переходная зона, которую можно представить, как систему взаимопроникающих сеток синтетического полимера поли-НЭМА и биополимеров донорской ткани. Исследованы процессы приживления в роговице кролика опорной части, выполненной из

нативной роговицы, склеры, твердой мозговой оболочки. Показано, что приживление биокератопротеза в бельме происходит за счет клеточной инвазии и прорастания опорной части протеза тканью хозяина. По заключению авторов, при использовании предложенной модели происходит истинное приживление биокератопротеза в роговице пациента [15].

Исходя из вышеописанных конструкций кератопротезов, Wolfgang Müller-Lierheim с соавт. из Германии разработали новый кератопротез Miro Cornea в период с 2005 по 2008 г.г. Кератопротез представлял собой монолитную конструкцию, изготовленную из гидрофобного акрилового полимера, с отверстиями в периферической области. Диаметр оптической части составлял 3,0 мм, общий равен 8,0 мм, а диаметр отверстий периферической части - 0,8 мм. Авторы провели экспериментальное исследование на 10 кроликах в течение 2-х месяцев. Результаты гистологического исследования имплантатов показали отсутствие выраженных послеоперационных осложнений и хорошую интеграцию в роговице. По данным литературы доступны только предварительные результаты имплантаций этих устройств пациентам и необходимо долгосрочное наблюдение в дальнейшем [75, 125].

Позднее исследователями из Бостона был разработан кератопротез KeraKlear (Keramed), предназначенный для интрастромальной фиксации с использованием фемтосекундного лазера [112]. Новый кератопротез выполнен из гидрофобного акрилового полимера общим диаметром 7 мм, диаметр оптики 4 мм и включает 18 отверстий в периферической части. Потенциальным преимуществом данного протеза, по мнению авторов, является возможность выполнения наименьшего разреза для имплантации протеза, благодаря его способности к складыванию, а также отсутствие потребности в донорской роговице. Авторы рекомендуют проводить ультрафиолетовый кросслинкинг роговицы, по крайней мере, через 6-12 месяцев после имплантации KeraKlear, что, по их мнению, способствует пролиферации кератоцитов стромы роговицы в периферические отверстия

протеза. Стоит отметить, что нет данных о широком применении в клинике ввиду ограниченных показаний для имплантации данной модели [125].

Перспективным направлением исследований является разработка покрытий для оптической и гаптической части кератопротезов. При изучении эпителизирующих свойств различных полимеров показано увеличение адгезии кератоцитов к диметиламиноэтилметакрилату (ДМАЭМ) или феноксиэтилметакрилату (ФЭМ) к оптической части кератопротеза [124].

Поверхностные свойства биоматериала играют решающую роль в биоинтеграции имплантата. Исходное соединение между имплантатом и тканью необходимо для того, чтобы клетки могли мигрировать на поверхность имплантата и внедряться во внеклеточный матрикс, что обеспечивает их рост, благоприятные биологические реакции, и в конечном итоге биоинтеграцию кератопротеза на длительный срок. Liqiang Wang с соавторами (2011) предложил использовать гидроксиапатит (НАр) для покрытия поверхности ПММА с целью улучшения интеграции Бостонской модели кератопротеза, а также снижения вероятности бактериальной инфекции. Гидроксиапатит является основным компонентом кости и широко используется для поверхностного изменения имплантатов благодаря электростатической связи с заряженными биологическими молекулами [104]. В результате проведенного экспериментального исследования авторы пришли к выводу, что пластины ПММА с покрытием гидроксиапатитом способствовали дополнительной адгезии имплантатов к тканям, в сравнении с немодифицированной поверхностью ПММА [135].

Введение или изменение поверхностных функциональных групп, является наиболее важным параметром в модификации поверхности для улучшения адгезии клеток/ткани. Dohlman С.Н с соавт. (2017) в своем исследовании проводили модификацию поверхности инертного материала (ПММА), используя покрытие из фосфата кальция (СаР), нанесенное на активированный дофамином ПММА. Было показано, что покрытие из фосфата кальция улучшало адгезию к коллагену типа I (основной компонент

стромы роговицы) по сравнению с необработанными поверхностями ПММА. Тем не менее, покрытие CaP может легко подвергаться расслаиванию, что снижает его потенциал для модификации оптических цилиндров кератопротеза [120].

Недавняя работа включала в себя: смешивание различных гидрогелей полимеров с целью создания сополимеров, которые объединяют полезные свойства отдельных полимеров. Так, группа авторов Стэнфордского университета в Калифорнии (США) Bio-X разработала и изготовила гидрогелевую конструкцию с фотолитографической структурой на основе оптики, изготовленной из двойной сети полиэтилена с высоким содержанием воды, гликоль/полиакриловая кислота (PEG/ПАА) с прослойкой из микроперфорированного гидрогеля (полигидроксиэтилакрилат) [106]. Принцип дизайна этого протеза основан на знаниях, полученных из всех предшествующих устройств. Материал гаптики пористый с микроперфорациями, созданный методом использования фотолитографии, с целью пролиферации волокон стромы роговицы и фиксации протеза. При этом оптический элемент проницаем к метаболическому потоку глюкозы, что способствует эпителизации передней поверхности устройства [108].

В институте глаза Ottawa (группа Griffith) первоначальные исследования проводили на гидратированных сополимерах коллагена и N-изопропилакриламиде, которые образовали прозрачный проницаемый биосинтетический материал для поддержания роста клеток *in vitro* [96]. С тех пор различные типы коллагена были стабилизированы сшиванием с водорастворимым карбодиамидом, что было подтверждено в экспериментальных исследованиях на роговице животных. Механическое испытание через 12 месяцев продемонстрировало бесшовную интеграцию в роговице и поддержание оптической четкости [100]. Показано, что сшитый рекомбинантный коллаген превосходил амниотическую мембрану в качестве каркаса для трансплантации лимбальных стволовых клеток при тестировании *in vitro* [75].

Таким образом, анализируя данные литературы в области кератопротезирования следует, что современные исследования по вопросу о материалах для изготовления кератопротезов и дизайна моделей активно продолжаются и направлены на поиск биологически инертных материалов для разработки новых моделей кератопротезов. В связи с чем, актуальным представляется изучение биосовместимости материала, потенциально пригодного для разработки новой модели кератопротеза, с улучшенными прочностными и оптическими свойствами, способного надежно фиксироваться в слоях роговицы, с учетом недостатков, имеющих у отечественных и зарубежных аналогов. Несмотря на передовые технологии, обеспечивающие взаимопроникновение тканей роговицы и имплантата, частота возникновения трофических осложнений, асептического некроза при использовании современных биоинтегративных кератопротезов остается высокой. Очевидно, что “идеальный” технологичный кератопротез должен быть простым в изготовлении и созданным из одного материала. При этом необходимо, чтобы имплантат не нарушал структуру стромы роговицы и питание тканей, находящихся над ним. Учитывая незаменимость кератопротезирования и наличие большого количества нерешенных, но вполне определенных задач, можно утверждать, что проблема создания идеального кератопротеза является весьма значительной, а научные исследования в этом направлении важны и перспективны. В связи, с чем актуально стремление разработать биоинтегрируемый кератопротез, лучший, чем ныне существующие, и обладающий всеми сформулированными выше необходимыми свойствами, чему и посвящено данное исследование.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Общая характеристика материалов и методов исследования

В данной работе для решения поставленных задач была проведена серия экспериментально-морфологических исследований, включающих эксперименты *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*. При этом биосовместимость исследуемых моделей опорных пластин кератопротеза (ОПК) изучена на экспериментальных моделях: культура клеток стромы роговицы *in vitro*, кадаверной роговице человека *ex vivo* и на глазах экспериментальных животных (кроликов) *in vivo* (таблица 1).

Донорский материал (кадаверные роговицы и выделенные клетки стромы роговицы доноров-трупов) использовали в качестве источника биоматериала для экспериментальных исследований. Первый этап экспериментального исследования осуществляли в условиях *in vitro* в соответствии с официально принятыми процедурами и специальным разрешением в рамках законодательства РФ, на основании лицензии Федеральной государственной службы по надзору за Здравоохранением № ФС-34-01-000011-18 от 19.09.2018, которая позволяет использовать ткани, выделенные из трупных человеческих глаз для целей трансплантации и научных исследований.

Перед введением глаза донора трупа в эксперимент проводили серологическую диагностику трупов-доноров на инфицированность вирусами ВИЧ I/II, гепатитов В и С, сифилисом, представляющих потенциальную угрозу для персонала. Клинико-лабораторную диагностику указанных инфекций проводили в микробиологической лаборатории ФГАУ "НМИЦ "МНТК "Микрохирургия глаза" им. акад. С.Н. Федорова" Минздрава России по образцам крови, поставляемым вместе с тканями глазных яблок от

доноров-трупов. После прохождения проверки на инфекционную безопасность сотрудник Глазного тканевого банка проводил оценку морфофункционального показателя трансплантабельности по классификации Борзенка С.А. [3].

Критериями отбора для дальнейшего эксперимента были: возраст доноров до 66 лет, время от момента смерти донора до начала экспериментальных исследований не более 18-ти часов, показатели адреналиновой пробы А и В, морфологические показатели роговицы 2 и 3 по классификации Борзенка С.А. [3].

Таблица 1 – Дизайн исследования

Этапы исследования	Методы исследования	Описание (количество, сроки наблюдения)
In vitro	Двумерное культивирование	Количество роговиц от доноров-трупов человека (n=6) Количество ОПК (опорных пластин кератопротеза): модель №1 (n=4); модель №2 (n=4)
		Количество клеток, полученных из кадаверной роговицы, в одном образце– $3 \cdot 10^5$ /мл
		Наблюдение в течение 9 суток
Ex vivo	Органотипическое культивирование	Состав питательной среды: DMEM/F12; эмбриональная телячья сыворотка 5%; смесь антибиотиков 1%; L-глутамин 2 ммоль/л
		Срок культивирования 3 месяца
	Интрастромальная имплантация	1 группа: модель №1 (n=4)
		2 группа: модель №2 (n=4)

		3 группа (контроль): без имплантации ОПК (n=4)
In vivo	Биомикроскопия	Количество кроликов (n=22)/глаз (n=22)
		Фоторегистрация переднего отрезка глаза кроликов
		Срок наблюдения: 1, 3, 7, 14, 30 и 90 сутки
	Оптическая когерентная томография (Optovue, США)	Срок наблюдения: 1, 3, 7, 14, 30 и 90 сутки Количество кроликов (n=22)/глаз (n=21)
Общие лабораторные методы	Конфокальная лазерно - сканирующая микроскопия («Fluo View FV10i»; Olympus, Япония)	Количество ОПК (n=8)
	Сканирующая электронная микроскопия (микроскоп 6000plus, Jeol, Япония)	Фоторегистрация поверхности ОПК, «крышки» и стромального «ложа» роговицы.
		Количество кадаверных роговиц человека (n=6)
		Количество роговиц кролика (n=14)
Световая микроскопия	Количество роговиц кролика (n=21)	

2.2. Характеристика полимерной опорной пластины кератопротеза

В качестве материала для новой модели ОПК был выбран пространственно сшитый гидрофобный акрил, разработанный компанией «Репер-НН» (г. Нижний Новгород), и обладающий высокими биосовместимостью и биостабильностью по отношению к тканям организма. В основе изготовления лежит технология фронтальной полимеризации, позволяющая контролировать профиль материала с точностью до единиц нанометров. Для материала характерна межмолекулярная проницаемость, но крайне ограниченная в силу высокой частоты межмолекулярных сшивок. Широко используется в медицинской практике, как один из ареактивных материалов для различных имплантатов, применяемых в офтальмологии [72, 75, 80, 112], пластике грыж, челюстной лицевой хирургии [70, 118]. Совместно с инженерами компании «Репер-НН» и сотрудниками ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России были разработаны несколько вариантов опорных пластин различной конфигурации и толщины, имеющие как сквозную, так и несквозную структуру ячеек. После проведенных предварительных исследований из группы были исключены варианты, имеющие отверстия маленького диаметра, а также модели с сотами неперфорированного типа.

Для дальнейшего эксперимента в качестве наиболее оптимальных, из всех вариантов были отобраны две модели, которые имели:

- 1) сквозную структуру отверстий, позволяющую с максимальной степенью интегрироваться в ткани роговицы после имплантации;
- 2) минимальную толщину пластины при максимальной устойчивости к деформации;
- 3) максимально возможное количество отверстий на пластине при минимальной потере жёсткости конструкции.

Полученные от производителей экспериментальные изделия обладали следующими параметрами: монолитная сферическая форма диаметром 4 мм с

радиусом кривизны 8,0 мм, толщина опорной пластины 100 мкм. Модель ОПК №1 представляет собой пластину сетчатой структуры со сквозными квадратными отверстиями (200x200 мкм) (рисунок 1). Модель ОПК №2 представляет собой пластину сетчатой структуры со сквозными отверстиями трапецевидной формы и изменяющейся величины от периферии к центру (от 170x130 мкм до 180x70 мкм) (рисунок 2).

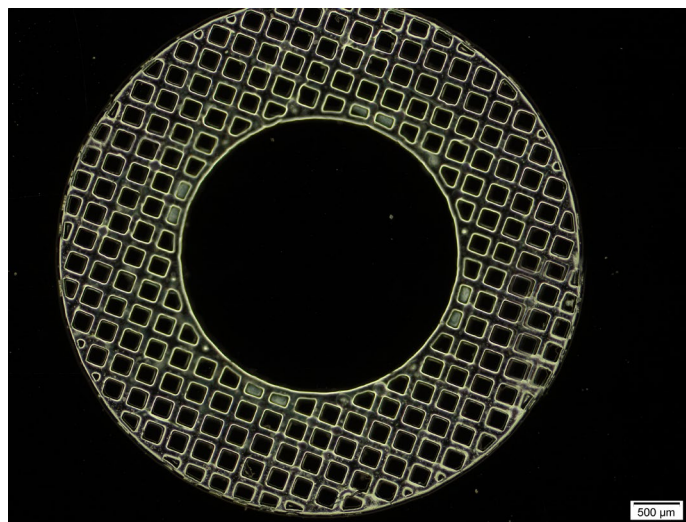


Рисунок 1 – Модель опорной пластины кератопротеза №1

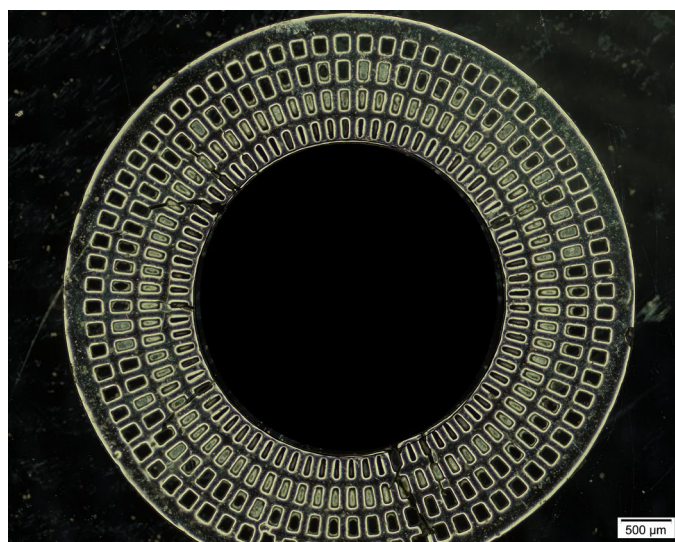


Рисунок 2 – Модель опорной пластины кератопротеза №2

2.3. Исследование биосовместимости материала опорной пластины кератопротеза на модели двумерного культивирования в эксперименте *in vitro*

Изучение пролиферативной активности и адгезивных свойств клеток проводили на экспериментальной модели двумерного культивирования выделенных клеток стромы роговицы (КСР) в присутствии исследуемых ОПК модели №1 и №2.

Протокол выделения КСР:

1. Выкраивание центральной зоны роговицы трепаном 8 мм.
2. Механическая дезагрегация роговицы хирургическими ножницами.
3. Химическая дезагрегация роговицы в растворе коллагеназы 2-го типа (MPBiomedicals, LLC, США), (20 мин, 37°C).
4. Центрифугирование в режиме 1800 об/мин при температуре 37°C (Центрифуга SL-40 R, Thermo Scientific, Германия).
5. Перенос полученной взвеси клеток в чашку Петри диаметром 35 мм с добавлением питательной среды: DMEM/F12 (ПанЭко, Россия), эмбриональная телячья сыворотка 5% (HyClone, США), смесь антибиотиков 1% (Sigma Aldrich, Канада), L-глутамин 2 ммоль/л (ПанЭко, Россия).

В результате получали первичную 2D культуру КСР (рисунок 3). Экспериментальные исследования были направлены на изучение в условиях *in vitro* реакции взаимодействия выделенных КСР с исследуемыми ОПК, имеющими различную структуру ячеек. Исследовали 8 образцов двух моделей ОПК. В условиях ламинара (Ламинарный бокс II класса безопасности MSC-Advantage, Technologies, Германия) стерильные образцы пинцетом помещали в чашки Петри (d=35мм) с добавлением культуры КСР объемом $3 \cdot 10^5$ /мл. В контрольной группе суспензию клеток в таком же количестве вносили в пустую чашку Петри (d=35мм).

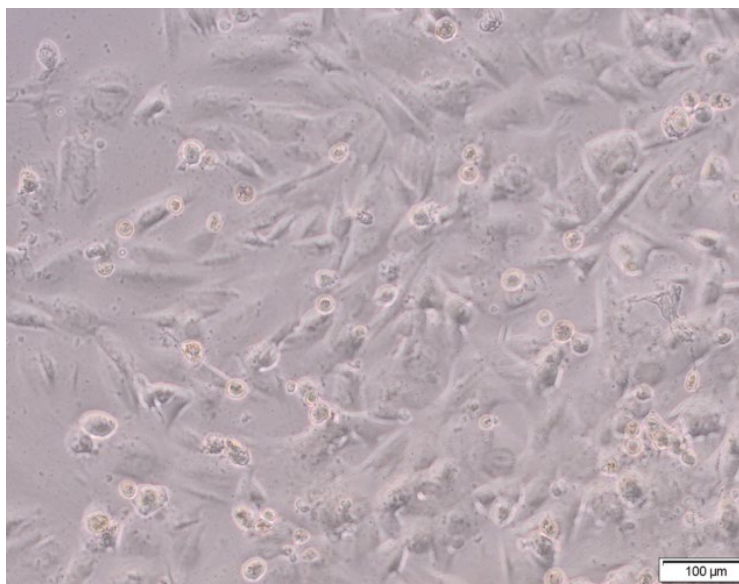


Рисунок 3 – 2D культура клеток стромы роговицы, световая фазово-контрастная микроскопия ув. 100х

Данная группа была сформирована с целью контроля роста клеточной культуры. Проводили культивирование в стандартных условиях (температура 37°C, концентрация CO₂ – 5%, влажность – 95%) в инкубаторе NU-5510 (Nu-Aire, США). Питательную среду заменяли раз в три дня. Оценку плотности монослоя культуры клеток осуществляли при помощи инвертированного микроскопа IX-81 (Olympus, Япония) в течение 9 суток. Выполняли фоторегистрацию с помощью цифровой фотокамеры (микроскоп IX-81 с цифровой камерой XC-10, Olympus, Япония). Для оценки адгезии клеток к поверхности ОПК осуществляли окраску ядер флуоресцентным красителем бисбензими́дом – Hoechst 33258, с последующей оценкой на конфокальном лазерно-сканирующем микроскопе (Fluoview FV10I, Olympus, Япония).

2.4. Исследование биосовместимости материала опорной пластины кератопротеза на модели органотипического культивирования в эксперименте *ex vivo*

Экспериментальные исследования *ex vivo* на модели органотипического культивирования были направлены на изучение особенности взаимодействия ткани роговицы человека с исследуемыми ОПК различного дизайна: образования капсулы, реакции КСР кадаверных глаз, а также оценки структурных изменений материала ОПК. Для этой цели проводили имплантацию ОПК в строму роговиц кадаверных глаз с последующим органотипическим культивированием в стандартной ростовой среде в условиях нормотермии.

Для проведения исследований было отобрано 12 кадаверных роговиц. В опытную группу №1 (n=4) вошли роговицы кадаверных глаз, в строму которых имплантировали ОПК сетчатой структуры со сквозными квадратными отверстиями (200x200 мкм) толщиной 100 мкм (модель №1), в опытную группу №2 (n=4) – роговицы кадаверных глаз с имплантированными ОПК толщиной 100 мкм сетчатой структуры со сквозными отверстиями трапециевидной формы и изменяющейся величины от периферии к центру (от 170x130 мкм до 180x70 мкм) (модель №2). Контролем служили роговицы кадаверных глаз (n=4), в которых проводили формирование роговичного тоннеля без имплантации ОПК. Для органотипического культивирования применяли среду, включающую DMEM/F12 (ПанЭко, Россия), эмбриональную телячью сыворотку 5% (HyClone, США), смесь антибиотиков 1% (Sigma Aldrich, Канада), L-глутамин 2 ммоль/л (ПанЭко, Россия).

Культивирование роговиц кадаверных глаз проводили в CO₂ инкубаторе NU-5510 (NuAire, США) с концентрацией CO₂ 5% при температуре +37⁰С в течение 3 месяцев. Замену среды производили каждые трое суток в связи с изменением показателя pH в сторону закисления и соответствующего ему

изменения pH - индикатора среды. По окончании исследования оценивали наличие на изучаемых поверхностях клеток, новообразованных волокнистых соединительнотканых элементов с помощью сканирующей электронной микроскопии (JEOL JSM-6000PLUS, Япония).

2.5. Исследование биосовместимости различных моделей опорной пластины кератопротеза в эксперименте *in vivo* на экспериментальных животных

Материалом для исследования *in vivo* послужили кролики породы Шиншилла (n=15). Исследования проводили в экспериментальной лаборатории Калужского филиала ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России. Для проведения экспериментов в соответствии с дизайном имплантируемых материалов, были сформированы 3 группы исследования. Первую составили 5 кроликов (5 глаз), в роговицу которых имплантировали ОПК из гидрофобного акрила со сквозными квадратными отверстиями размерами 200x200 мкм (модель №1). Во вторую группу вошли 5 кроликов (5 глаз), в роговицу которых имплантировали ОПК из гидрофобного акрила со сквозными отверстиями трапециевидной формы и изменяющейся величины от периферии к центру с размерами ячеек от 170x130 мкм до 180x70 мкм (модель №2). Животным контрольной группы имплантировали ½ части ОПК модели Федорова-Зуева, выполненную из титана.

При моделировании эксперимента на животных учитывали факт наличия у кроликов тонких роговиц (от 350 мкм в центральной области и до 400 мкм на периферии), что предопределяло техническую сложность хирургического вмешательства, связанную с высоким риском перфорации роговицы. С учетом биоэтических норм и правил гуманного обращения с животными, операции проводили под общей анестезией (наркоз севараном).

После обработки операционного поля и установки векорасширителя, производили несквозной разрез в прозрачной части роговицы кролика протяженностью 5 мм на 2/3 глубины концентрично лимбу и отступая от него на 1-1,5 мм. Металлическим расслаивателем формировали карман в центральной зоне роговицы диаметром 4 мм, что соответствовало диаметру ОПК. Опорные пластины имплантировали в сформированное роговичное ложе, на разрез накладывали узловые швы (нейлон 10-0) с последующим введением под конъюнктиву растворов антибиотика (гентамицин 0,3 мл) и стероида (дексаметазон 0,4 мл). Операцию завершали частичной блефарорафией единичным швом (викрил 6-0). В послеоперационном периоде проводили терапию в виде инстилляций в конъюнктивальную полость растворов антибиотика (моксифлоксацин 0,5%) и стероида (дексаметазон 0,1%) 2 раза в день в течение 7 дней.

В каждой группе экспериментальных животных наблюдали с выполнением биомикроскопии и оптической когерентной томографии (ОКТ) роговицы (Optovue, США) в сроки 1, 3, 7, 14, 30 и 90 сутки. При изучении структурных особенностей роговицы после операции регистрировали следующие параметры: глубина и равномерность залегания ОПК, наличие протрузии или экстррузии, глубина формирования интрастромального кармана, толщина роговицы в проекции ОПК и вне её.

На сроке 3 месяца животных выводили из эксперимента под внутривенным наркозом (этаминалом натрия в дозе 50 мг/кг) методом воздушной эмболии через ушную артерию, производили энуклеацию глаза, с дальнейшим промыванием его физиологическим раствором. Выкроенные корнеосклеральные диски помещали в 10% раствор забуференного нейтрального формалина (рН 7,4) на срок 24 часа, для дальнейшего проведения морфологических исследований.

2.6. Лабораторные методы исследования

Все манипуляции с клеточными культурами проводили в стерильных условиях ламинарных боксов II класса безопасности. В таблице 2 перечислено используемое в работе оборудование.

Таблица 2 – Используемое оборудование

Оборудование	Цель использования	Производитель
Ламинарный бокс II класса безопасности MSC-Advantage	Стерильные манипуляции с 2D клеточными культурами, с органными культурами	Termo Fisher Scientific, Германия
Центрифуга SL-40R	Центрифугирование	Termo Fisher Scientific, Германия
Инкубатор NU-5510	Инкубирование клеточных культур и роговиц <i>ex vivo</i>	NuAire, США
Инвертированный световой фазово-контрастный микроскоп IX81 с интегрированной цифровой фотокамерой XC10	Микроскопия и цифровая фотография	Olympus, Япония
Одноканальный механический дозатор Biohit Proline переменного (объема дозирования 2-200 мкл)	Дозирование жидкостей	Biohit, Финляндия
Оптическая когерентная томография	Глубина и равномерность залегания ОПК; толщина роговицы в проекции ОПК и	Optovue, США

	вне её	
Конфокальная лазерно - сканирующая микроскопия	Микроскопия и цифровая фотография	«Fluo View FV10i», Olympus, Япония
Сканирующая электронная микроскопия (микроскоп 6000plus)	Фоторегистрация поверхности ОПК, «крышки» и стромального «ложа» роговицы	Jeol, Япония
Световая микроскопия	Микроскопия и цифровая фотография	Leica Microsystems, Германия

Для гистологических исследований материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, промывали проточной водой, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Выполняли серии гистологических срезов с применением окраски гематоксилин-эозином. Препараты изучали под микроскопом Leica DM LB2 с камерой DFC-320 при 50х и 200х кратном увеличении с последующим фотографированием. Световая микроскопия полученных образцов была выполнена в Лаборатории патологической анатомии и гистологии глаза ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им акад. С.Н. Фёдорова» МЗ России, Москва (зав. лабораторией - к.м.н. Шацких А.В.).

Клеточное и органотипическое культивирование, конфокальную и сканирующую электронную микроскопию проводили в Центре фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им акад. С.Н. Фёдорова» МЗ России, Москва (зав. центром - д.м.н., проф. Борзенко С.А.).

Для подготовки образцов к сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) роговично-склеральные диски извлекали из фиксирующего раствора (10% формалин), далее с помощью вакуумного трепана Barron (Katena, США) диаметром 6 мм выкраивали сквозной роговичный диск. Затем

проводили два разреза на роговице по краю сформированного роговичного кармана для вскрытия его полости. После этого одним пинцетом фиксировали часть выкроенного диска со стороны Десцеметовой мембраны, а другим – край роговичного клапана и производили раскрытие с отсечением «крышки» и обнажением «ложа» роговичного кармана. После вскрытия данного кармана во всех исследуемых группах изучали поверхность имплантированной ОПК, поверхностные слои - «крышки» и стромального «ложа» роговицы. На этапе подготовки образцов применяли методику обезвоживания с использованием ацетоновой батареи (10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100%) 3х-кратно по 10 минут в каждом растворе с последующим вакуумным высушиванием в критической точке (K850 Critical Point Dryer, Quorum, Великобритания).

Далее все образцы фиксировали на алюминиевых предметных держателях (по одному для каждого образца) с помощью карбонового скотча таким образом, чтобы исследуемая поверхность стромы роговицы была обращена вверх. После фиксации производили напыление образцов золотом (проба 999, толщина слоя 5 нм) на установке JEOL Company Smart Coater (Япония) для создания электронно-проводящего слоя на поверхности исследуемых объектов. Затем образцы помещали в камеру двулучевого сканирующего электронного микроскопа JCM-6000 PLUS (JEOL Company, Япония) и анализировали в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 10 кВ при увеличениях 20, 100, 400, 1000, 2000х.

2.7. Статистические методы исследования

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 непараметрического критерия Крускала - Уоллиса: в случаях, когда распределение признаков в каждой выборке не является нормально распределенной случайной величиной.

ГЛАВА 3. МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ОПОРНОЙ ПЛАСТИНЫ КЕРАТОПРОТЕЗА

Цель данной главы - выполнить математическое моделирование конструктивных параметров опорной пластины кератопротеза - диаметра, радиуса кривизны, толщины, размера отверстий, характеристик жесткости, а также глубины залегания, с учетом анатомо-топографических особенностей роговицы человека.

Для достижения указанной цели необходимо было определить минимально достаточную жесткость опорной пластины кератопротеза, с последующим обоснованием и расчетом параметров, выбранных для изучения в данной работе, а также выполнить сравнительный анализ влияния различных моделей кератопротезов на биомеханические характеристики бельма роговицы.

3.1. Определение минимально достаточной жесткости опорной пластины кератопротеза

Математическое моделирование состояло из двух этапов. На первом этапе определили ОПК мин – опорный элемент с минимально достаточной жесткостью (J_{min}), которая обеспечивает минимальную безопасную деформацию. На втором этапе оптимизировали конструктивные параметры ОПК таким образом, чтобы при варьировании параметров, количества отверстий, толщины ОПК жесткость моделируемого варианта ОПК не была ниже минимально достаточной J_{min} .

Жёсткость — это способность конструктивных элементов ОПК сопротивляться деформации при взаимодействии с роговицей, являющаяся характеристикой, обратной податливости, гибкости при деформации изгиба.

В случае изгиба жёсткость можно определить, как произведение модуля упругости Юнга на соответствующую геометрическую характеристику сечения элемента, например, площадь поперечного сечения или осевой момент инерции.

Жёсткость конструкций определяют следующие факторы:

1. Модуль упругости материала или модуль нормальной упругости E ;
2. Геометрические характеристики сечения деформируемого тела, момент инерции поперечного сечения;
3. Линейные размеры деформируемого тела, например, диаметр ОПК (d).

При выбранном материале акриле – главным практическим средством увеличения жёсткости является маневрирование геометрическими параметрами ОПК. На жёсткость существенно влияют размеры и форма поперечных сечений. Момент инерции поперечного сечения пропорционален произведению ширины полосок сетки ОПК на куб толщины. Жёсткость существенно зависит от диаметра – обратно пропорциональна третьей степени диаметра ОПК – чем меньше диаметр, тем более жёсткий ОПК, однако диаметр выбирают не только из условий увеличения жёсткости.

Сферическая форма ОПК, задняя поверхность которого конгруэнтна поверхности роговичного ложа в зоне контакта, является геометрически неизгибаемой. Геометрическая неизгибаемость сферической формы поверхности для ОПК означает, что при равномерной нагрузке форма ОПК не изменится и занимает стабильное положение. Это математическое свойство неизгибаемости свидетельствует о том, что при неравномерной нагрузке на ОПК его деформация в одном меридиане по теореме Гаусса приводит к компенсаторной деформации в противоположном меридиане, чтобы полная Гауссова кривизна, равная произведению значений кривизны главных меридианов, оставалась постоянной. То есть, силы упругости ОПК будут препятствовать пусковому процессу деформации, оказывая

сопротивление изменению сферической формы поверхности ОПК, в отличие от, например, плоской формы поверхности.

В связи с этим обстоятельством при расчете J_{\min} необходимо учитывать энергию изгиба, когда моменту сил изгиба ОПК, обусловленному неравномерной нагрузкой на разные зоны ОПК, возникает момент сил сопротивления, зависящий от жесткости ОПК, который отсутствует при плоской поверхности ОПК.

Представляется целесообразным предположить, что в математической модели максимально возможная нагрузка на ОПК равна напряжению разрыва стромы роговицы 19,1 МПа в зоне контакта стромы с элементами сетки ОПК, так как нагрузка выше указанной физически невозможна. При максимально возможном напряжении в математической модели задано максимально допустимое перемещение элемента ОПК.

Следовательно, формула расчета жесткости будет представлена в виде зависимости коэффициента снижения жесткости ОПК (r) от величины пористости материала (γ):

$$r = -1,5831\gamma^3 + 4,0264\gamma^2 - 3,4433\gamma + 1,0 \quad (1)$$

где γ – пористость материала, равная отношению площади отверстия к площади структурного элемента ОПК.

Если разбить ОПК на одинаковые элементарные малые квадратные элементы с одним отверстием в центре, то структурным элементом ОПК будет являться этот квадрат (рисунок 4). Пористость ОПК (γ) будет равна отношению площади отверстия к площади этого квадрата. Общая площадь всех отверстий в опорном элементе составляет 17,5 мм², площадь всей поверхности (без учета сквозных отверстий) равна 26 мм². Таким образом, пористость опорного элемента кератопротеза составляет 67% от общей площади всей поверхности.

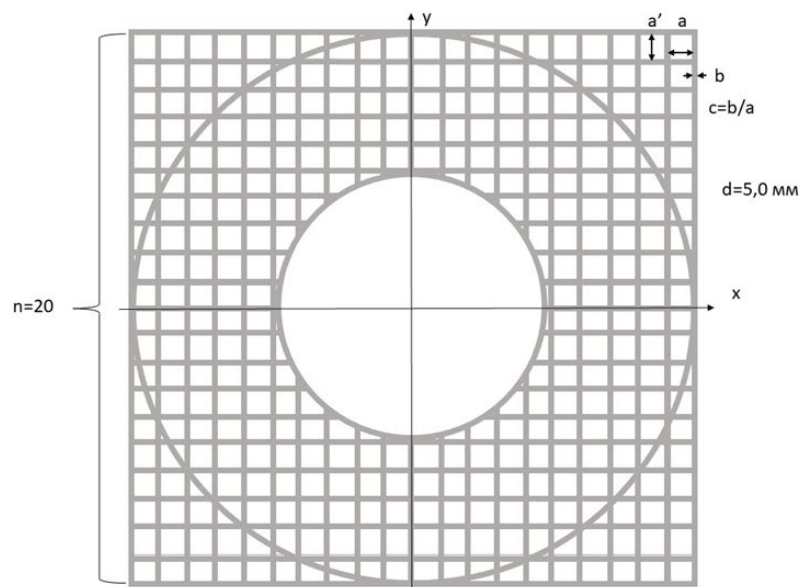


Рисунок 4 – Математическая модель ОПК

Таким образом, согласно проведенному математическому моделированию, расчет минимально достаточной жесткости ОПК, учитывая значение пористости опорного элемента, позволил получить значение $J_{\min} = 0,036$ Н/мм², которое соответствует ОПК с 20 отверстиями в одном ряду, с площадью 1-ого отверстия 0,04 мм², шириной полоски между отверстиями 0,14 мм.

3.2. Обоснование и расчеты параметров опорной пластины кератопротеза

При жесткости ОПК выше минимально достаточной (J_{\min}) положение ОПК стабильно и вероятность изгибания его и вдавливания в поверхность малы. При меньших значениях жесткости ОПК относительно минимально достаточной жесткости (J_{\min}) вероятность изгиба краев ОПК велика. На рисунке 5 представлены зависимости жесткости ОПК от диаметра.

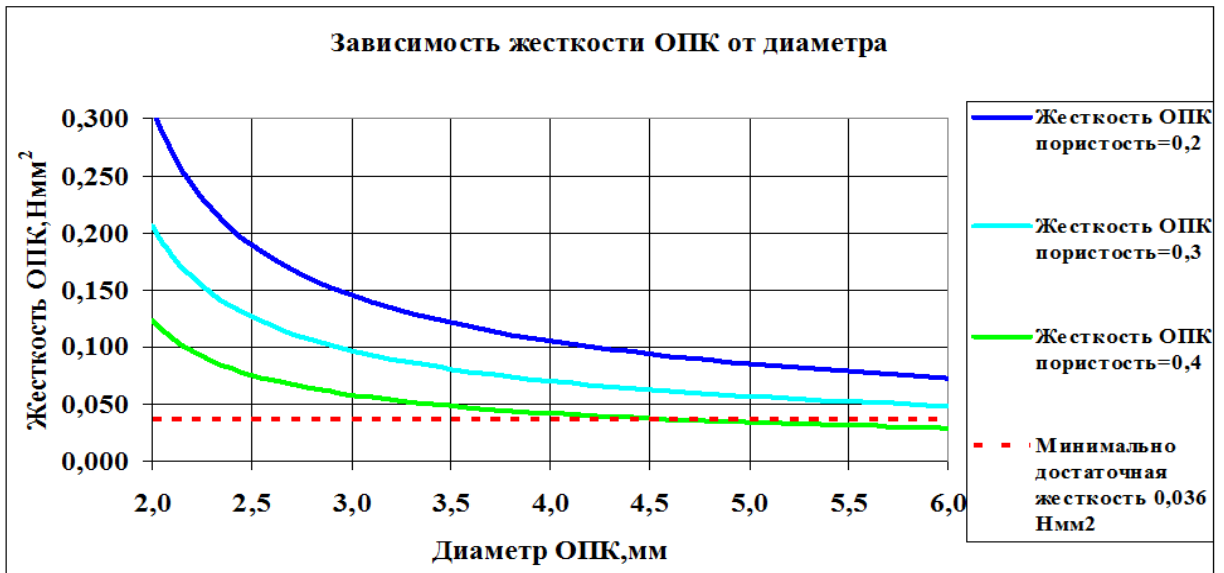


Рисунок 5 – Зависимость жесткости ОПК от диаметра

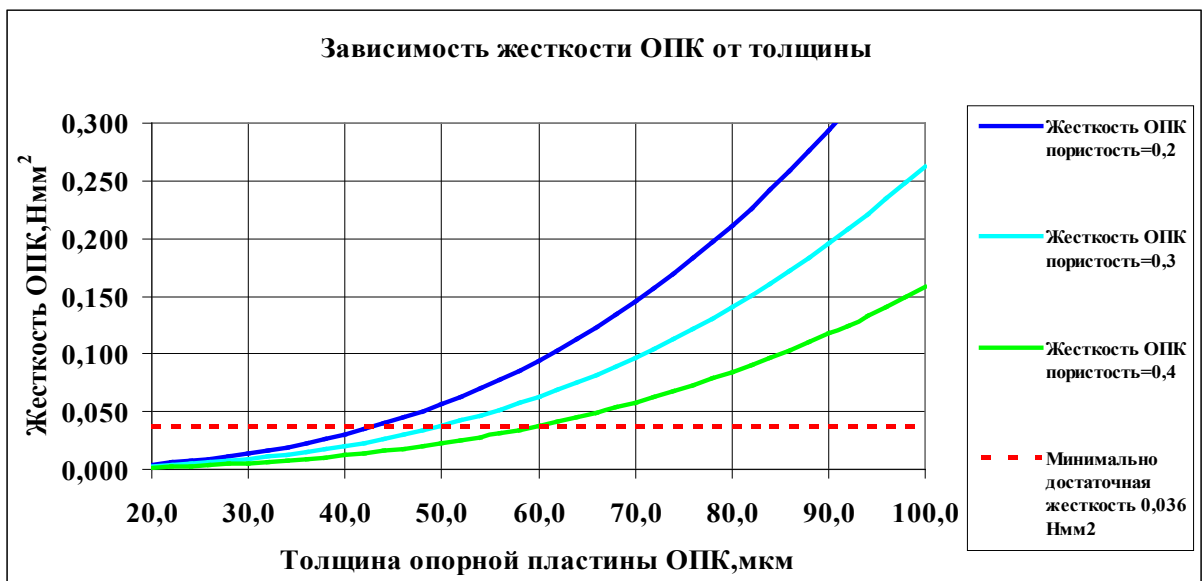


Рисунок 6 – Зависимость жесткости ОПК от толщины

На рисунке 6 представлены зависимости жесткости ОПК при различных значениях жесткости от толщины опорной пластины. Эта зависимость, как указано выше, пропорциональна кубу толщины опорной

пластины. При жесткости выше минимально достаточной положение ОПК стабильно и вероятность изгиба и вдавливания в поверхность мала.

На рисунке 7 представлены зависимости жесткости ОПК от радиуса кривизны опорной пластины. Выпуклая форма опорной пластины, в соответствии с теоремой Гаусса, как указано выше, гарантирует высокую изгибную жесткость при достаточно больших значениях радиуса кривизны.

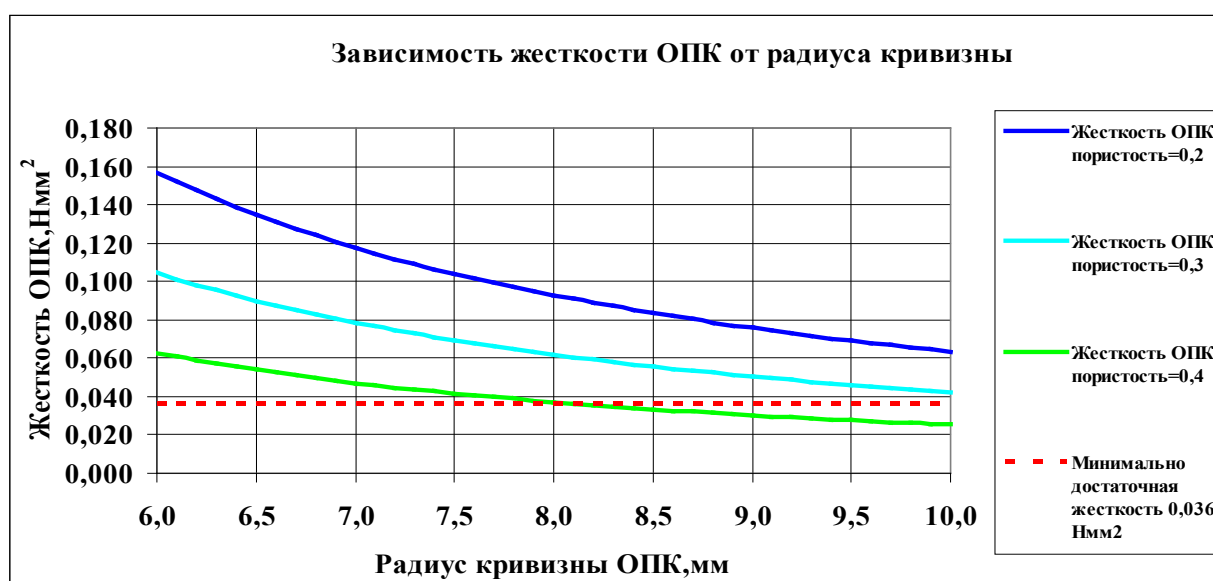


Рисунок 7 – Зависимость жесткости ОПК от радиуса кривизны

Однако, кроме геометрической жесткости, зависящей от радиуса кривизны, важно учитывать то обстоятельство, что для устойчивого положения пластины в строме роговицы необходима конгруэнтность поверхностей пластины поверхностям интрастромального ложа. Задняя поверхность опорной пластины находится под достаточно высоким постоянным давлением, несколько меньшим, чем внутриглазное давление (ВГД), и случайные несимметричные воздействия, такие как внешние инерционные воздействия – саккадические и прочие движения глаз, резкое торможение, могут вывести пластину из состояния равновесия. Давление по закону Паскаля действует равномерно по нормали к задней поверхности и

при неконгруэнтной ориентации поверхностей может возникнуть момент сил поворота опорной пластины. А при поворотном движении края пластины к эпителию сила сопротивления уменьшается, что повышает риск протрузии ОПК.

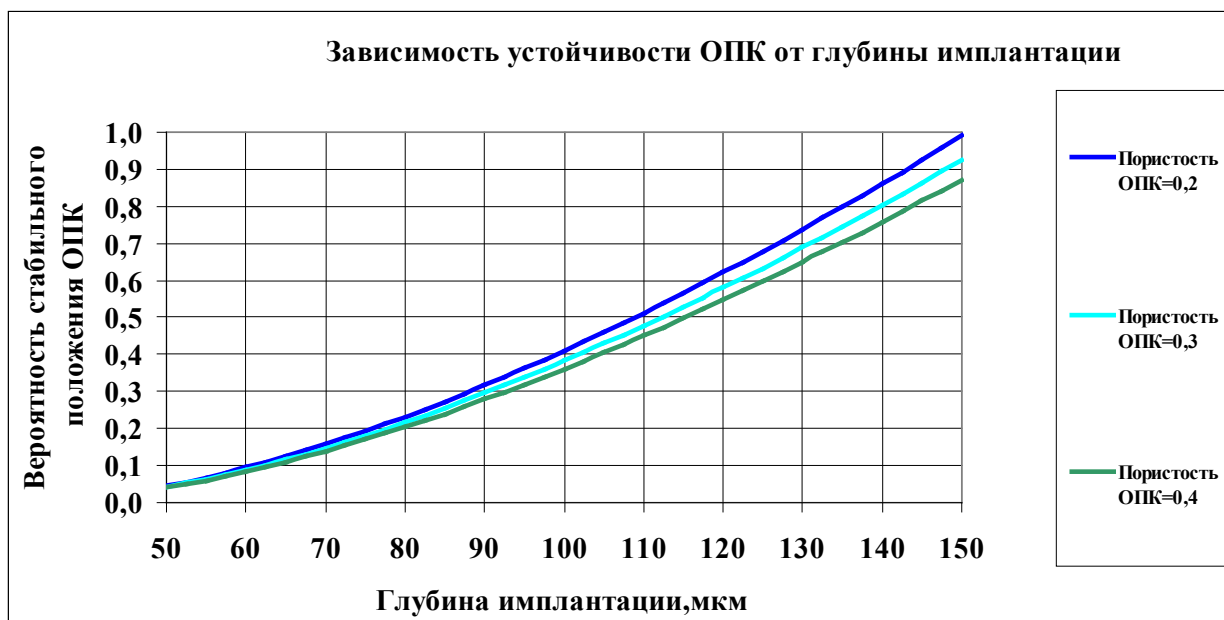


Рисунок 8 – Зависимость устойчивости ОПК от глубины имплантации

На рисунке 8 представлены зависимости устойчивости ОПК от глубины имплантации. Целесообразно представить устойчивость в виде вероятности стабильного состояния, когда 0 соответствует практически неизбежной протрузии, а 1 соответствует стабильному состоянию опорной пластины. На зависимость устойчивости ОПК от глубины имплантации влияют много случайных факторов. Для объективной основы предположим, что все факторы сводятся к одному инерционному воздействию в виде кратковременной перегрузки (то есть, движению с ускорением, например, падение), направленной под углом 45° к нормали, причем вероятность нулевой перегрузки равна 1, вероятность перегрузки 10g, которую кратковременно может перенести человек, равна 0. А вероятность промежуточного значения перегрузки линейно зависит от нее.

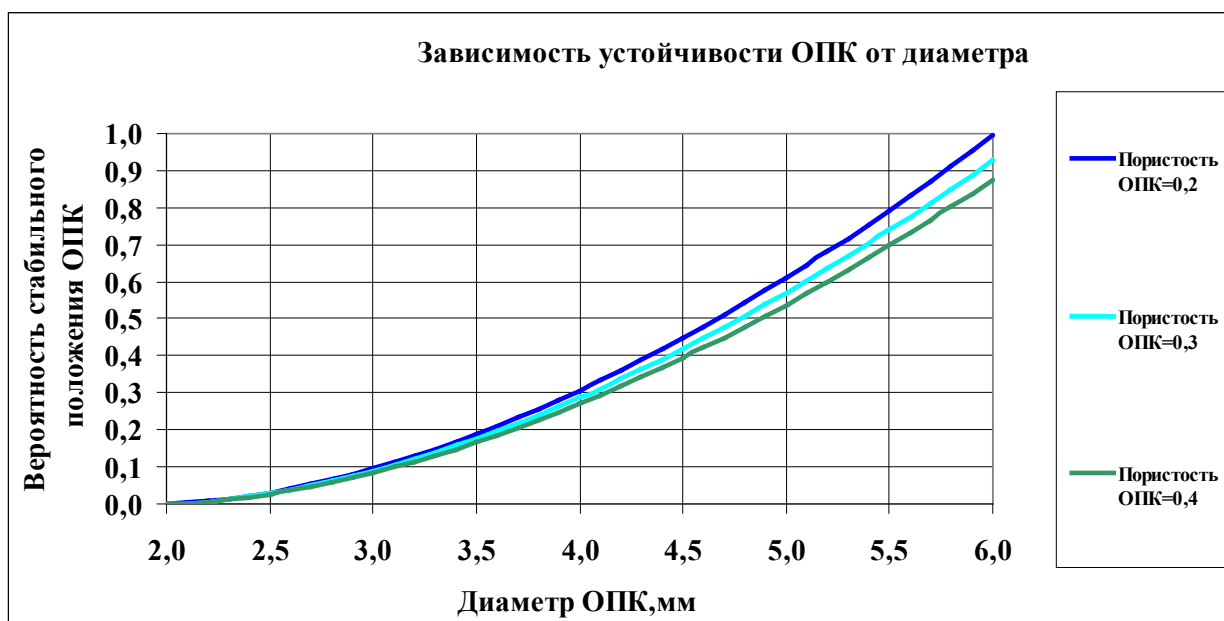


Рисунок 9 – Зависимость устойчивости ОПК от диаметра

На рисунке 9 представлены зависимости устойчивости ОПК от диаметра. Так же, как и в предыдущем случае, представляется целесообразным представить устойчивость в виде вероятности стабильного состояния, когда 0 соответствует практически неизбежной протрузии, а 1 соответствует стабильному состоянию опорной пластины. Как и в предыдущем случае, для объективной основы предположим, что все факторы сводятся к одному инерционному воздействию в виде кратковременной перегрузки, направленной под углом 45° к нормали, с вероятностью нулевой перегрузки равной 1, вероятностью перегрузки 10g, равной 0 и вероятностью промежуточного значения перегрузки в виде линейной функции перегрузки.

Благодаря математическому моделированию были определены геометрические параметры опорной пластины из полимерного материала на основе гидрофобного акрила с учетом особенностей строения роговицы человека.

3.3. Сравнительный математический анализ влияния различных моделей кератопротезов на биомеханические характеристики бельма роговицы

Для оценки взаимодействия непосредственно тканей бельма роговицы с разработанной ОПК, была рассчитана жесткость полимерной пластины с учетом площади перфорации и концентрация давления его края на бельмо, для последующего сравнительного анализа с кератопротезами модели Федорова-Зуева и модели “Сеточка”.

Жесткость опорного элемента модели Федорова-Зуева и модели “Сеточка” составляет 39,14 Н/м и 0,26 Н/м соответственно. Для новой модели ОПК значение жесткости равно 0,56 Н/м. Данные (G) получили из следующей формулы:

$$G = \frac{E * h}{12(1 - \nu)} \quad (2)$$

где G – жесткость опорной пластины кератопротеза,

E – модуль Юнга материала,

h – толщина опорной пластины кератопротеза,

ν – коэффициент Пуассона материала.

Из этого следует, что жесткость опорной пластины из титана во много раз превышает жесткость опорной пластины из никеля. Опорная пластина, находясь в слоях бельма под действием внутриглазного давления, давит на передние слои бельма, следовательно, целесообразно охарактеризовать давлением, необходимым для прогиба опорной пластины на 1 мм в мм/Нм.

Давление (P) рассчитывали по следующей формуле:

$$P = \frac{0,001 * 64 * G}{R} \quad (3)$$

где G – жесткость опорной пластины кератопротеза,

R – средний размер опорной пластины.

По законам физики концентрация этого давления происходит на краях опорного элемента и рассчитывается с учетом давления для прогиба на 1 мм. Соответственно, давление, необходимое для прогиба новой опорной пластины на 1 мм составило 0,34 мм.рт.ст. Для модели Федорова-Зуева данный показатель составил 30,13 мм рт.ст., а модели “Сеточка” – 0,20 мм.рт.ст. Для модели Федорова-Зуева с опорным элементом из титана при внутриглазном давлении 20 мм.рт.ст. и 25 мм.рт.ст. он составил соответственно 120 и 133 мм/Нм (таблица 3). Для модели “Сеточка” соответственно 20 мм.рт.ст. и 25 мм.рт.ст. Полученные данные говорят о том, что при увеличении внутриглазного давления от 20 до 35 мм.рт.ст. сил ВГД не хватает для необходимой деформации жесткого опорного элемента, поэтому на его краях возникают дополнительные напряжения, которые могут привести к разрыву тканей бельма в этой области. Опорная пластина модели “Сеточка” имеет меньшую жесткость, по сравнению с новой моделью ОПК и моделью Федорова-Зуева, поэтому для ее прогиба требуются усилия значительно меньшие, чем для жесткого элемента. Следовательно, при увеличении ВГД “Сеточка” легко изгибается, что повышает риск протрузий данной модели.

Таблица 3 – Концентрация давления края опорного элемента на строму роговицы, мм рт.ст.

Внутриглазное давление, мм рт.ст.	Модель кератопротеза		
	Федорова-Зуева	"Сеточка"	Новая модель опорной пластины кератопротеза
20	120	20	22
25	133	25	28
35	160	35	39

Из этого следует, что новая модель ОПК имеет большее значение жесткости, чем модель "Сеточка" и меньшее, чем модель Федорова-Зуева. Поэтому концентрация дополнительных напряжений на краях ОПК не происходит, что может привести к уменьшению количества некрозов над краем опорного элемента.

Таким образом, проведенное математическое моделирование позволило получить значение минимально достаточной жесткости ОПК, учитывая данные пористости опорного элемента, равное $J_{\min} = 0,036 \text{ Н/мм}^2$, которое соответствует ОПК с 20 отверстиями в одном ряду, с площадью 1-ого отверстия $0,04 \text{ мм}^2$, шириной полоски между отверстиями $0,14 \text{ мм}$. При меньших значениях относительно минимально достаточной жесткости вероятность изгиба краев ОПК велика. При жесткости выше минимально достаточной положение ОПК стабильно и вероятность его изгибания и вдавливания в поверхность мала. Данные сравнительного математического анализа показали, что жесткость опорной пластины из титана (модель Федорова-Зуева) во много раз превышает жесткость опорных пластин из никеля (модель "Сеточка"). Учитывая значение жесткости новой модели ОПК, на его краях не возникают дополнительные напряжения, которые могут привести к некрозу тканей бельма.

На основании математического моделирования были определены оптимальные геометрические параметры опорной пластины кератопротеза из полимерного материала на основе гидрофобного акрила с учетом особенностей строения роговицы человека, что предопределило предпосылки дальнейшего доклинического изучения разработанных ОПК и решение ряда основных задач диссертационной работы.

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО- МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ БИОСОВМЕСТИМОСТИ ОПОРНОЙ ПЛАСТИНЫ КЕРАТОПРОТЕЗА

Целью данной главы являлось проведение морфологической оценки биосовместимости различных моделей опорных пластин кератопротеза из полимерного материала на нескольких экспериментальных моделях: культура клеток стромы роговицы (*in vitro*), роговицы кадаверных глаз человека (*ex vivo*).

Для этого необходимо было исследовать особенности клеточно-тканевой реакции на интеграцию полимерной опорной пластины с помощью метода двумерного клеточного и органотипического культивирования.

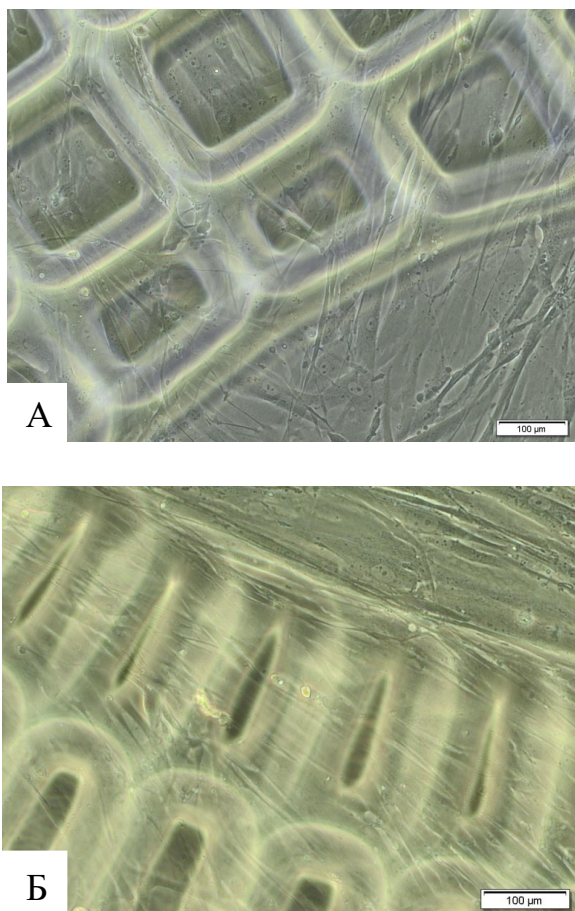
4.1. Результаты двумерного культивирования выделенных клеток стромы роговицы человека в присутствии опорной пластины кератопротеза

Целью данной части работы явилось изучение клеточной реакции на полимерную модель ОПК, потенциально пригодную для изготовления кератопротеза, на основании двумерного клеточного культивирования *in vitro*. Для достижения цели была поставлена задача: оценить биологическую совместимость различных моделей ОПК с культурой клеток стромы роговицы человека на основании пролиферации клеток и адгезии к материалу ОПК.

Группы исследования были представлены двумя экспериментальными группами и группой контроля. В 1-ую экспериментальную группу включили 4 образца ОПК сетчатой структуры со сквозными квадратными отверстиями 200x200 мкм (модель ОПК №1). Ко 2-ой группе отнесли 4 образца ОПК

сетчатой структуры со сквозными отверстиями трапециевидной формы и изменяющейся величины от периферии к центру от 170x130 мкм до 180x70 мкм (модель ОПК №2). Контрольную группу составила суспензия клеток в чашке Петри, для контроля роста клеточной культуры. Для определения адгезии клеток выполняли конфокальную микроскопию полимерной ОПК с использованием красителя Hoechst 33258 на сроке культивирования 9 суток.

При выполнении световой микроскопии в каждой из экспериментальных групп отмечали тенденцию к планомерному увеличению количества клеток от 1-х к 9-ым суткам наблюдения, что свидетельствовало о сохранении пролиферативной активности КСР в присутствии полимера (рисунок 10).



А – модель ОПК №1; Б – модель ОПК №2

Рисунок 10 – Совместное культивирование ОПК с культурой клеток стромы роговицы, 9-е сутки. Световая, фазово-контрастная микроскопия, ув. x100.

На снимках, полученных при выполнении конфокальной лазерно-сканирующей микроскопии 1-ой и 2-ой группы во всех случаях отмечали свечение ядер клеток, фиксированных на поверхности ОПК и в просвете сквозных отверстий (рисунок 11,12).

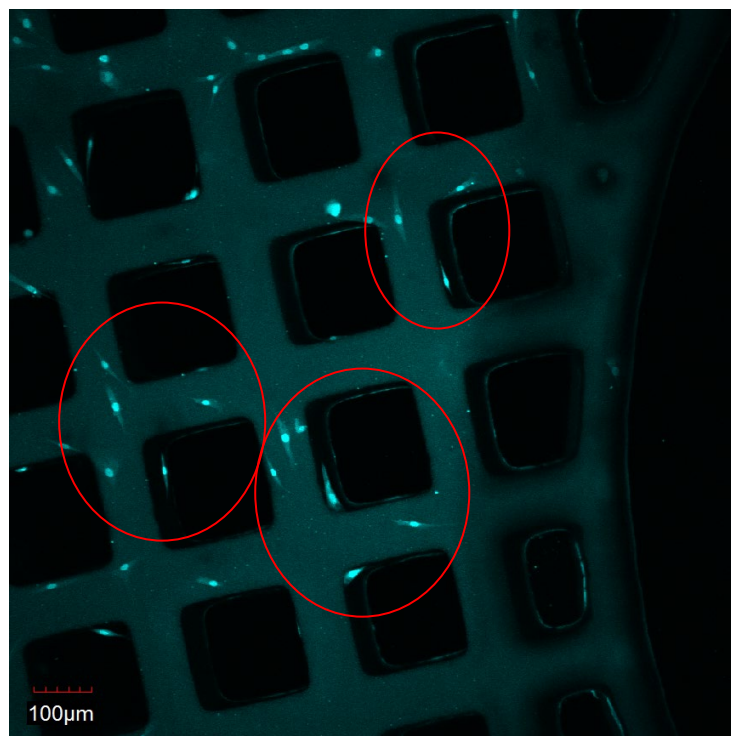


Рисунок 11 – Совместное культивирование ОПК с культурой клеток стромы роговицы, 9-е сутки. Окраска ядер бис-бензими́дом (Hoechst 33258), конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, группа №1, ув. x100

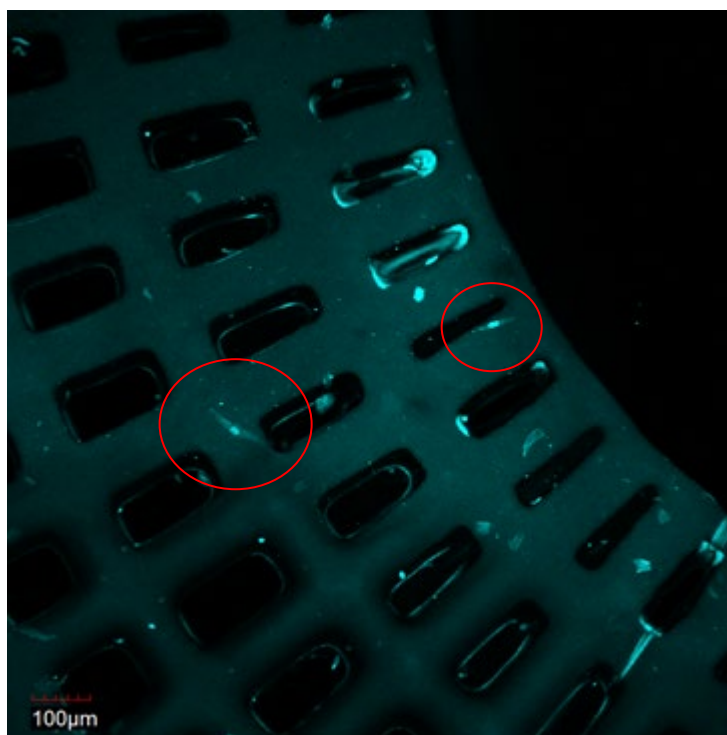


Рисунок 12 – Совместное культивирование ОПК с культурой клеток стромы роговицы, 9-е сутки. Окраска ядер бис-бензими́дом (Hoechst 33258), конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, группа №2, ув. x100

Таким образом, в ходе выполнения клеточного культивирования, ожидаемым результатом явилось доказательство нетоксичной природы исследуемых моделей. В результате проведенного двумерного культивирования была доказана биосовместимость клеток стромы роговицы человека с материалом исследуемых моделей ОПК (*in vitro*), на основании сохранения пролиферативной активности и способности КСР к адгезии к поверхности ОПК в обеих группах, что говорит об их потенциальной пригодности к интрастромальной имплантации. Однако данный факт требует дальнейшего изучения исследуемых изделий в условиях *in vivo*, с целью выявления наиболее подходящей модели опорного элемента.

4.2. Результаты экспериментально-морфологического исследования влияния опорной пластины кератопротеза на кадаверную роговицу человека в эксперименте *ex vivo*

Целью данной части работы явилось изучение в эксперименте особенностей клеточно-тканевой реакции на интеграцию и фиксацию полимерной опорной пластины кератопротеза в кадаверную роговицу человека с помощью метода органотипического культивирования.

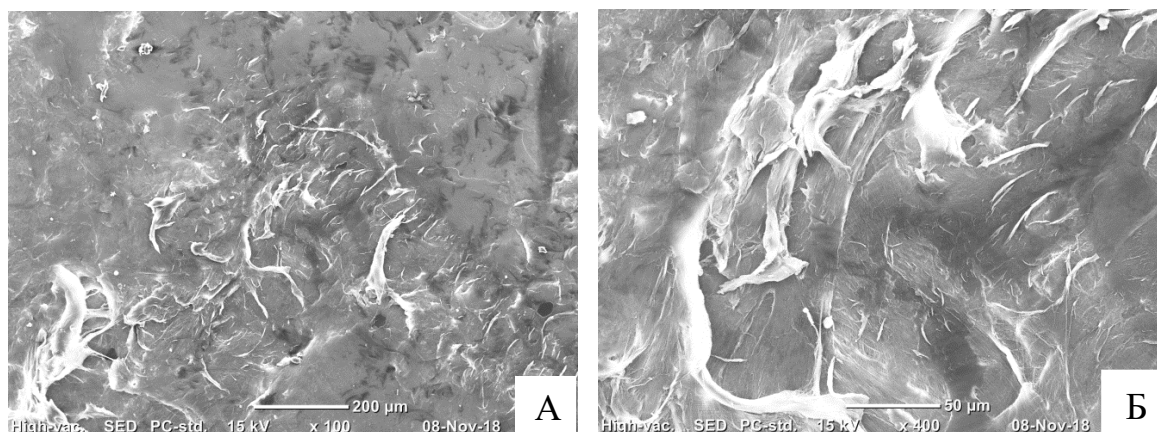
Для этого необходимо было решить следующие задачи: определить тканевую реактивность кадаверной роговицы человека на имплантацию разработанных ОПК в условиях органного культивирования методом сканирующей электронной микроскопии, оценить структурные изменения материала ОПК.

Исследованию с применением СЭМ на сроке культивирования 90 суток, подвергли подготовленные, по описанной во 2-ой главе методике, экспериментальные образцы кадаверной роговицы, после проведения органотипического культивирования в питательной среде в условиях нормотермии.

Группы исследования были представлены двумя экспериментальными группами и группой контроля. Экспериментальные группы включали роговицы кадаверных глаз со сформированными интрастромальными карманами (ИСК) и имплантированными ОПК. Контрольную группу составили выделенные роговицы кадаверных глаз с выполненным ИСК, но без имплантированных в его полость ОПК.

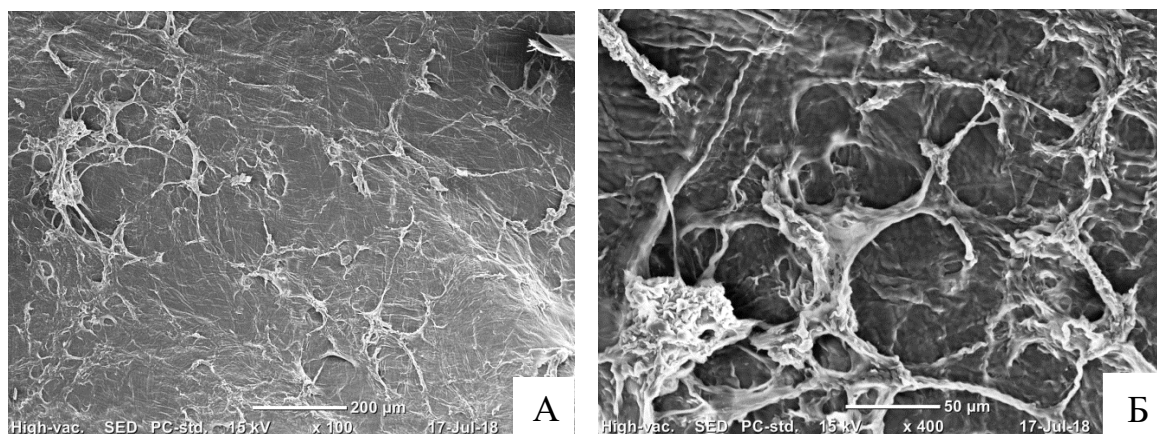
В результате проведения СЭМ во всех образцах стромы роговицы было определено собственное вещество роговицы, представленное волокнистой структурой, состоящей из разно ориентированных коллагеновых волокон, погруженных в аморфное вещество. При рассмотрении образцов контрольной группы на поверхности «ложа» и «крышки» интрастромального

кармана выявили исчерченность, что соответствовало наличию коллагеновых волокон (рисунок 13, 14). Данная картина стала примером для сравнения изменений, возникающих в полости ИСК в опытных группах, где проводили имплантацию ОПК.



А – исчерченность поверхности «крышки» ИСК, ув. x100; Б – ув. x400

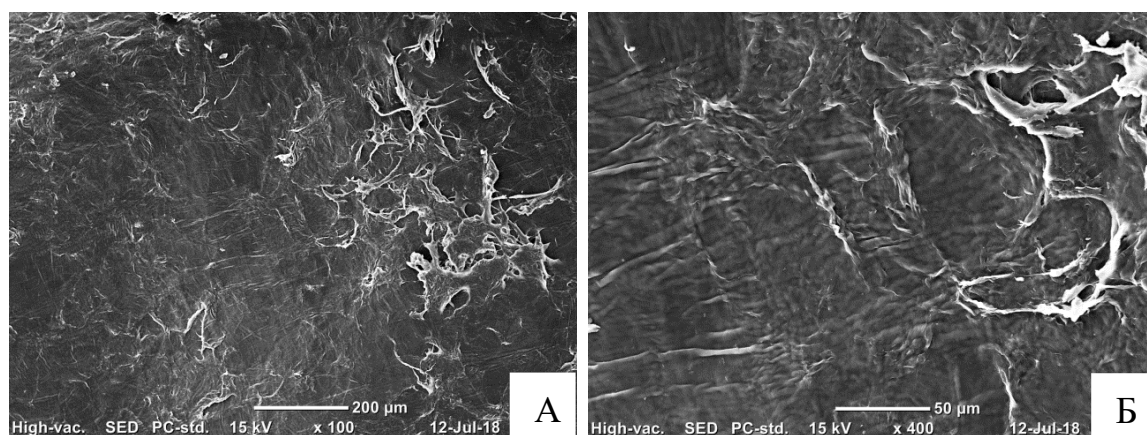
Рисунок 13 – Сканирующая электронная микроскопия. 90- е сутки культивирования. Поверхность «крышки» ИСК, контрольная группа



А – исчерченность поверхности «ложа» ИСК, ув. x100; Б – ув. x400

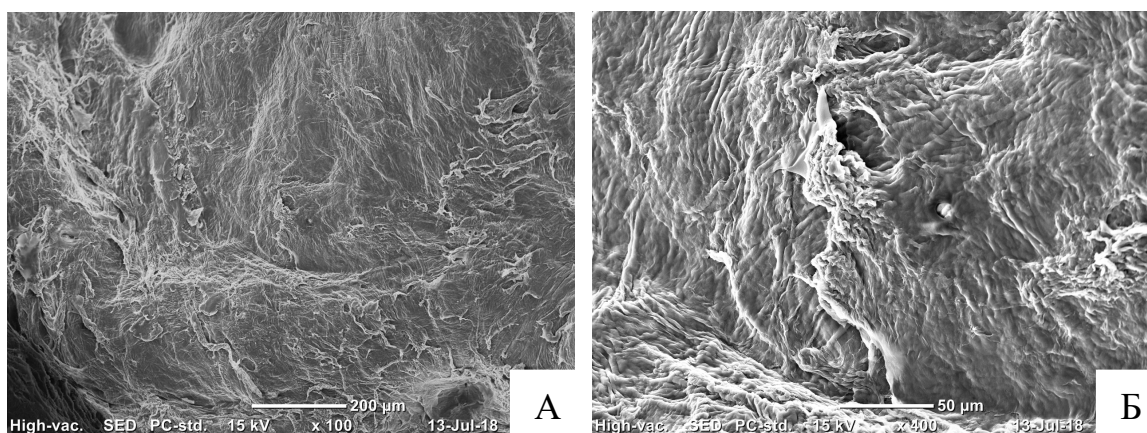
Рисунок 14 – Сканирующая электронная микроскопия. 90- е сутки культивирования. Поверхность «ложа» ИСК, контрольная группа

На поверхности «крышки» интрастромального кармана опытной группы №1 разнонаправленность коллагеновых волокон была более выражена, чем на поверхности «ложа» (рисунок 15, 16).



А – исчерченность поверхности «крышки» ИСК, ув. x100; Б – коллагеновые волокна на поверхности «крышки» ИСК, ув. x400

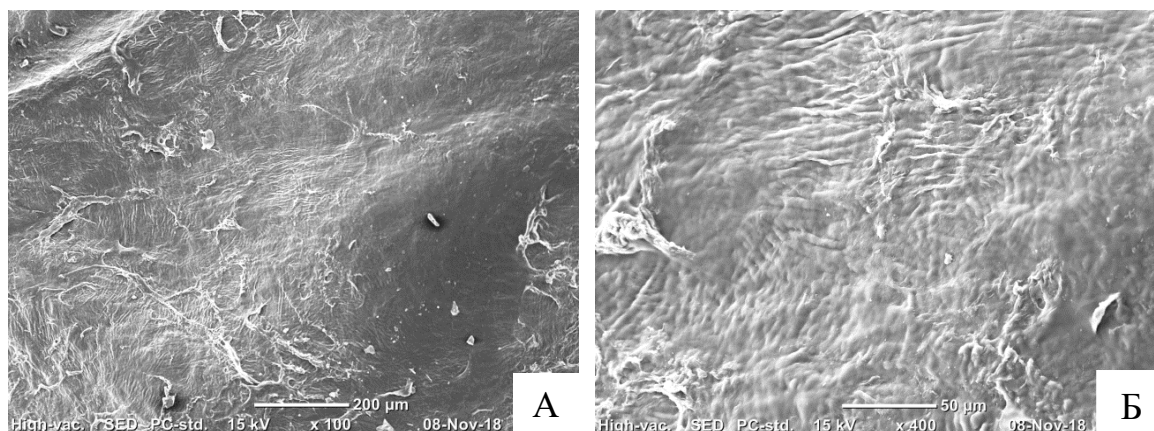
Рисунок 15 – Сканирующая электронная микроскопия. 90- е сутки культивирования. Поверхность «крышки» ИСК, опытная группа №1



А – исчерченность поверхности «ложа» ИСК, ув. x100; Б – коллагеновые волокна на поверхности «ложа» ИСК, ув. x400

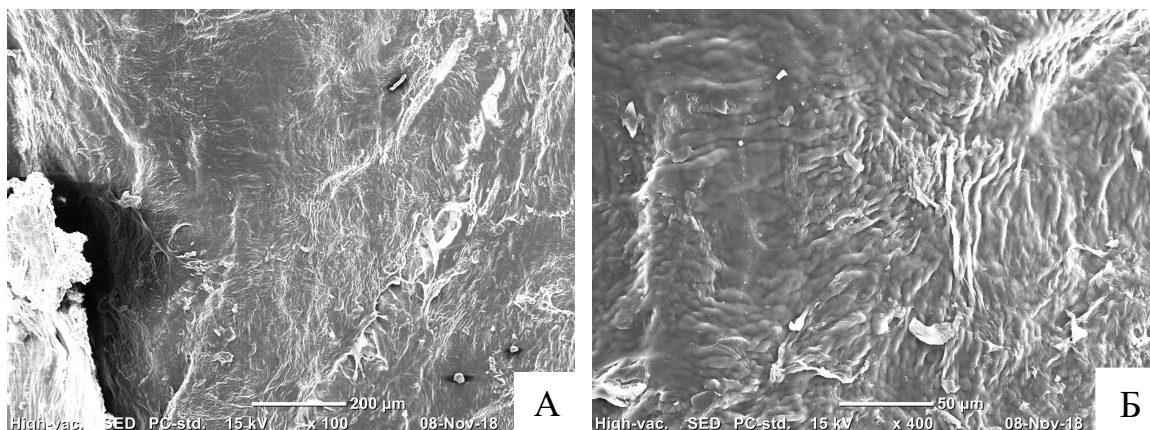
Рисунок 16 – Сканирующая электронная микроскопия. 90- е сутки культивирования. Поверхность «ложа» ИСК, опытная группа №1

На поверхности «крышки» и «ложа» интрастромального кармана опытной группы №2 определялась менее выраженная исчерченность коллагеновых волокон (рисунок 17,18).



А – исчерченность поверхности «крышки» ИСК, ув. x100; Б – коллагеновые волокна на поверхности «крышки» ИСК, ув. x400

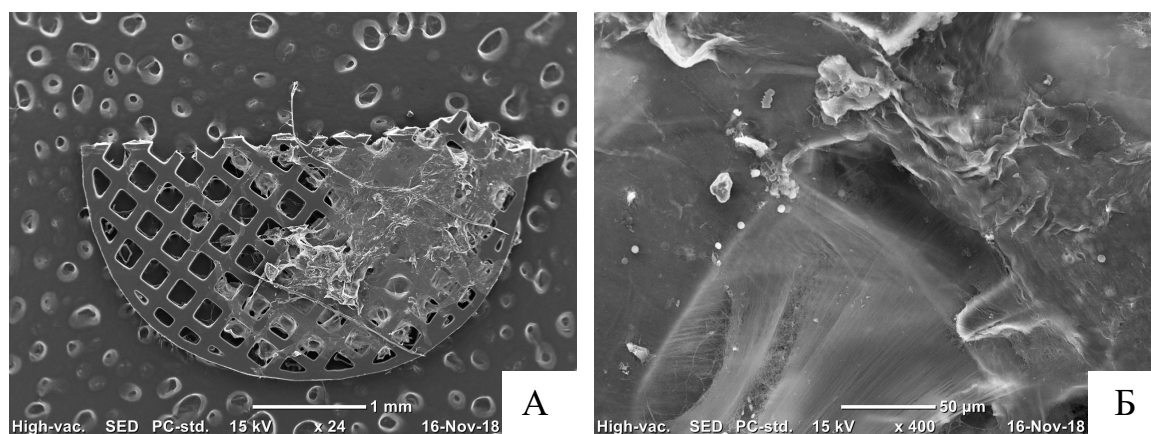
Рисунок 17 – Сканирующая электронная микроскопия. 90- е сутки культивирования. Поверхность «крышки» ИСК, опытная группа №2



А – исчерченность поверхности «ложа» ИСК, ув. x100; Б – коллагеновые волокна на поверхности «ложа» ИСК, ув. x400

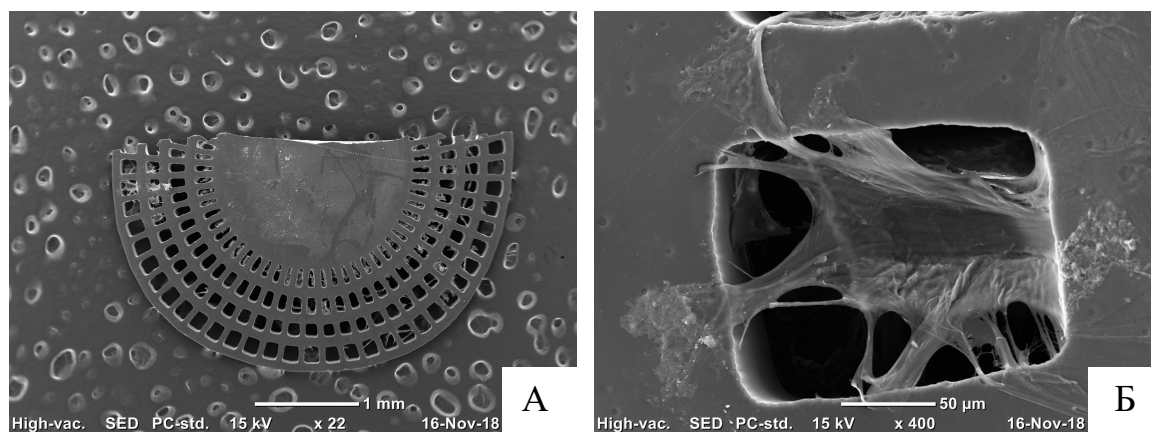
Рисунок 18 – Сканирующая электронная микроскопия. 90- е сутки культивирования. Поверхность «ложа» ИСК, опытная группа №2

При выполнении СЭМ исследуемых моделей опорных пластин 1-ой группы отмечено образование фиброзной капсулы вокруг ОПК с прорастанием новообразованных волокон стромы роговицы в ячейки ОПК, при этом во второй группе наблюдали единичные участки с волокнами стромы роговицы в ячейках ОПК модели №2 и отсутствие капсулообразования на ее поверхности (рисунок 19,20).



А – адгезировавшие волокнистые структуры на поверхности ОПК, ув. x24; Б – новообразованные коллагеновые волокна в ячейках ОПК, ув. x400

Рисунок 19 – Сканирующая электронная микроскопия. 90- е сутки культивирования. Поверхность ОПК, опытная группа №1

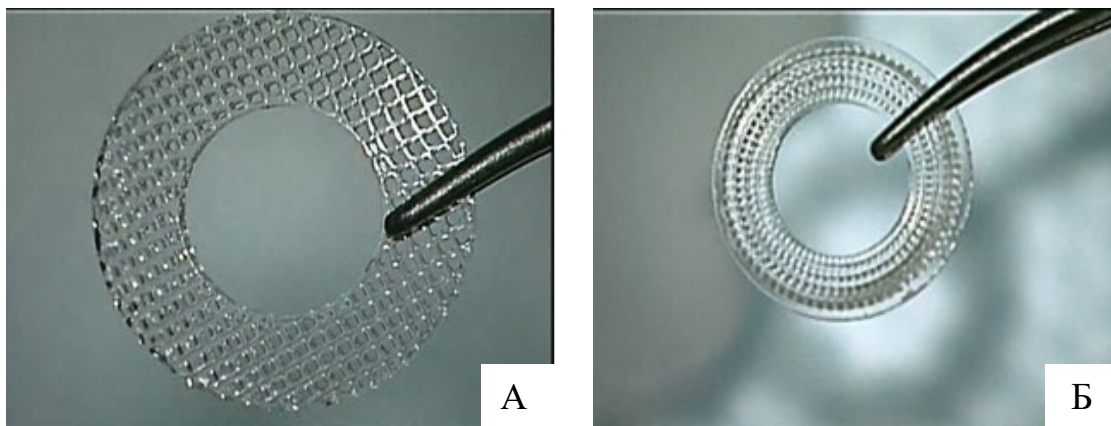


А – волокнистые структуры на поверхности ОПК отсутствуют, ув. x22;
Б – единичные новообразованные коллагеновые волокна в ячейках ОПК, ув. x400

Рисунок 20 – Сканирующая электронная микроскопия. 90- е сутки культивирования. Поверхность ОПК, опытная группа №2

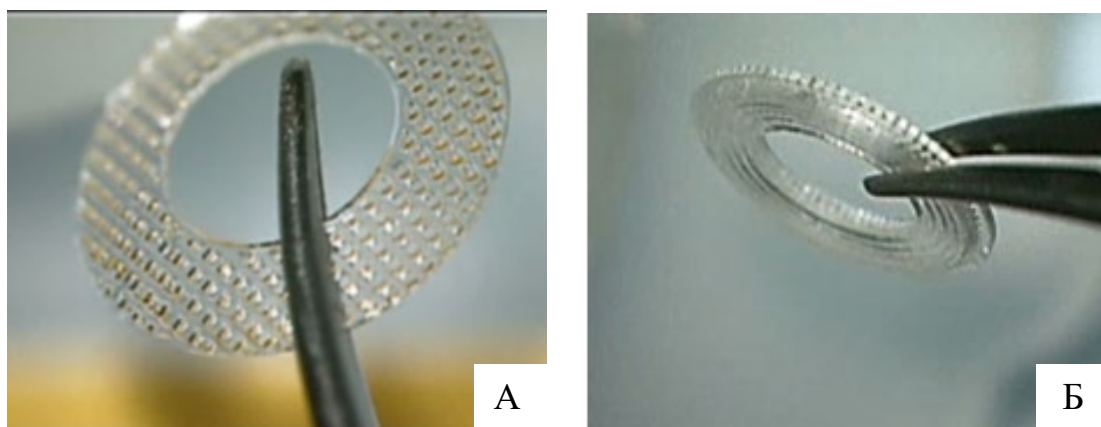
Обобщая результаты проведенных исследований тканевой реакции стромы роговицы кадаверного глаза можно заключить, что в 1-ой группе ОПК с равномерной сетчатой структурой отмечена реакция со стороны стромы роговицы более выраженная, по сравнению со 2-ой группой, что вероятно обусловлено структурой изделия и гидрофобными свойствами материала, о чем свидетельствуют данные сканирующей электронной микроскопии.

Для оценки деградации материала до и после проведения органотипического культивирования выполняли фотографирование исследуемых ОПК двух моделей. Стоит отметить, что все образцы были прозрачны, имели гладкую поверхность. После выведения образцов из эксперимента, образцы полностью сохраняли свою форму, прозрачность и характер поверхности, т.е. не являлись биodeградирующими (рисунок 21, 22).



А – модель №1; Б – модель №2

Рисунок 21 – Макрофотография экспериментальных полимерных ОПК до проведения органотипического культивирования.



А – модель №1; Б – модель №2

Рисунок 22 – Макрофотография экспериментальных полимерных ОПК после проведения органотипического культивирования, срок культивирования 90 суток.

Таким образом, в результате двумерного культивирования выделенных клеток стромы роговицы в присутствии исследуемых моделей при проведении фазово-контрастной и конфокальной лазерно-сканирующей микроскопии была выявлена пролиферативная активность и способность к адгезии клеток стромы роговицы к поверхности ОПК. В ходе исследования через 90 суток после имплантации исследуемых моделей ОПК в кадаверную роговицу человека по данным сканирующей электронной микроскопии было отмечено более выраженное формирование грубой соединительнотканной капсулы вокруг ОПК в группе №1. Из этого можно заключить, что данная модель является потенциально пригодной для имплантации в строму роговицы человека и может быть рассмотрена для внедрения в практику, как основа для изготовления кератопротеза.

ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ НАБЛЮДЕНИЙ И МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В РАННЕМ И ОТДАЛЕННОМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДАХ

Цель данной главы – изучение в экспериментально-морфологическом исследовании *in vivo* влияния разработанных ОПК, изготовленных из полимерного материала на основе гидрофобного акрила, на структуры переднего отрезка глаза экспериментального животного (кролика).

Для достижения поставленной цели исследования были сформулированы и решены следующие задачи: оценить клинимо-морфологические изменения глаза кролика при имплантации разработанных опорных пластин кератопротеза, в сравнении с опорным элементом, выполненным из титана и изучить морфофункциональные изменения роговицы кролика на имплантацию новой полимерной модели кератопротеза.

5.1. Морфофункциональные изменения роговицы кролика после имплантации полимерных опорных пластин кератопротеза

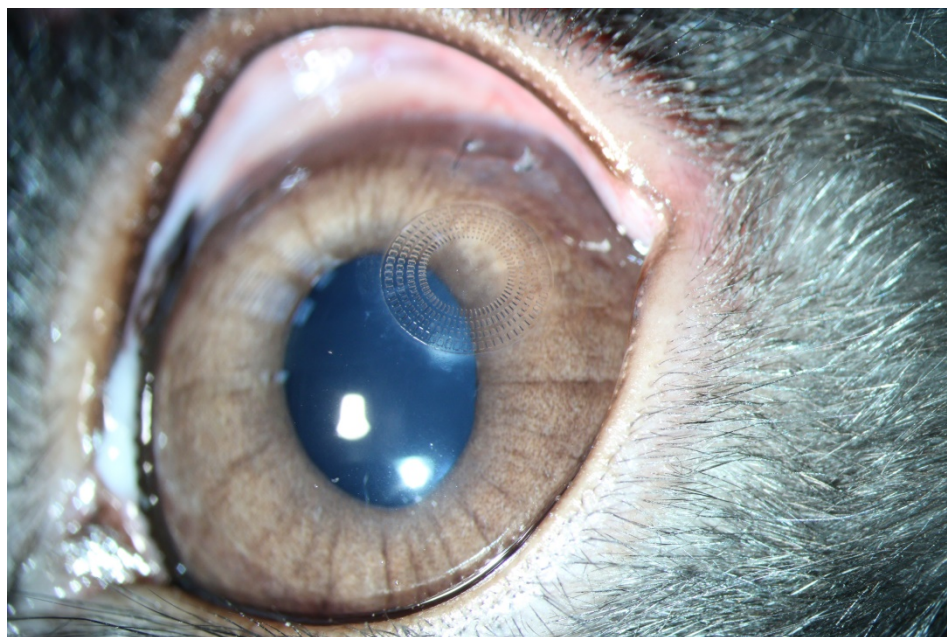
Целью данной части работы явилось изучение биосовместимости разработанных моделей опорных пластин кератопротеза в эксперименте *in vivo* после имплантации в роговицу экспериментальных животных (кролики).

Для достижения цели исследования были поставлены и решены следующие задачи: оценить биосовместимость ОПК клиническими методами исследования: биомикроскопия и оптическая когерентная томография, в динамике послеоперационного периода, а также при помощи световой и сканирующей электронной микроскопии.

5.1.1. Результаты исследования роговицы кролика методом биомикроскопии

Экспериментально-морфологическое исследование *in vivo* включало 15 животных, которых после хирургического вмешательства наблюдали в течение 90 суток, далее всех животных выводили из эксперимента для проведения морфологических исследований. В соответствии с дизайном исследуемых ОПК, были сформированы 3 группы исследования. Первую составили 5 кроликов (5 глаз), в роговицу которых имплантировали ОПК из гидрофобного акрила со сквозными квадратными отверстиями размерами 200x200 мкм (модель №1). Во вторую группу вошли 5 кроликов (5 глаз), в роговицу которых имплантировали ОПК из гидрофобного акрила со сквозными отверстиями трапециевидной формы и изменяющейся величины от периферии к центру с размерами ячеек от 170x130 мкм до 180x70 мкм (модель №2). Животным контрольной группы имплантировали ½ части ОПК модели Федорова-Зуева, выполненную из титана.

При биомикроскопии у всех кроликов опытных групп в ранние сроки наблюдения (первые 3 суток) визуализировали наличие незначительного отека роговицы в области операционного шва (рисунок 23). Умеренная поверхностная инъекция сосудов конъюнктивы, расценивалась как ответная реакция ткани на хирургическую травму. Она постепенно исчезала к 14-м суткам после операции (таблица 4).



Отек роговицы в области операционного шва.

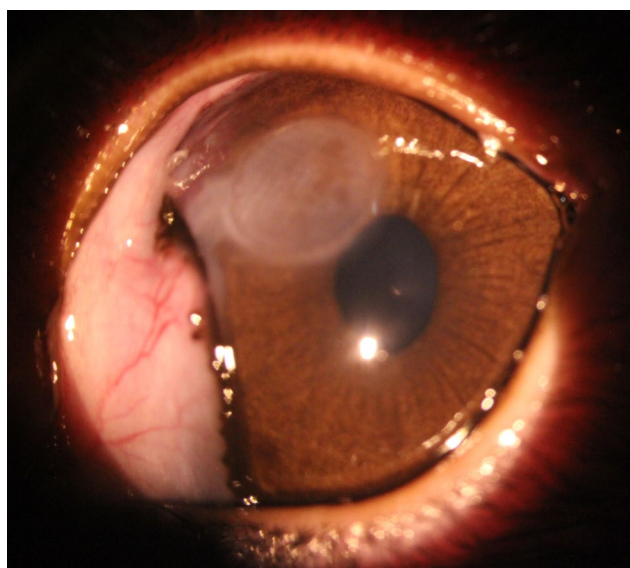
Рисунок 23 – Биомикроскопия глаза кролика через 3 суток после имплантации ОПК модели №2 (группа 2)

Таблица 4 – Результаты биомикроскопического исследования переднего отрезка глаза экспериментальных животных

Сроки наблюдения	7 сутки (n=5)	14 сутки (n=5)	30 сутки (n=5)	90 сутки (n=5)
1 группа	незначительная инъекция сосудов конъюнктивы (5)	незначительная инъекция сосудов конъюнктивы (1), инъекция сосудов конъюнктивы отсутствует (4)	помутнение стромы, протрузия ОПК (1), роговица прозрачная (4)	роговица прозрачная, инъекция сосудов конъюнктивы отсутствует (4), выведение из эксперимента (1)

2 группа	незначительная инъекция сосудов конъюнктивы (5)	незначительная инъекция сосудов конъюнктивы (2), инъекция сосудов конъюнктивы отсутствует (3)	язвенный дефект (1) роговица прозрачная (4)	язвенный дефект (1), помутнение стромы (1) роговица прозрачная (3)
Контроль	незначительная инъекция сосудов конъюнктивы (5)	незначительная инъекция сосудов конъюнктивы (1), инъекция сосудов конъюнктивы отсутствует (4)	роговица прозрачная, инъекция сосудов конъюнктивы отсутствует (5)	роговица прозрачная, инъекция сосудов конъюнктивы отсутствует (5)

Осложнение послеоперационного периода наблюдали у 1 экспериментального животного (1 глаз) из 1-ой группы на 30-е сутки. При биомикроскопии роговицы над зоной ОПК определяли локальное стромальное помутнение с последующей протрузией ОПК (рисунок 24).



Помутнение роговицы над ОПК

Рисунок 24 – Биомикроскопия глаза кролика через 30 суток после имплантации ОПК модели №1 (группа 1)

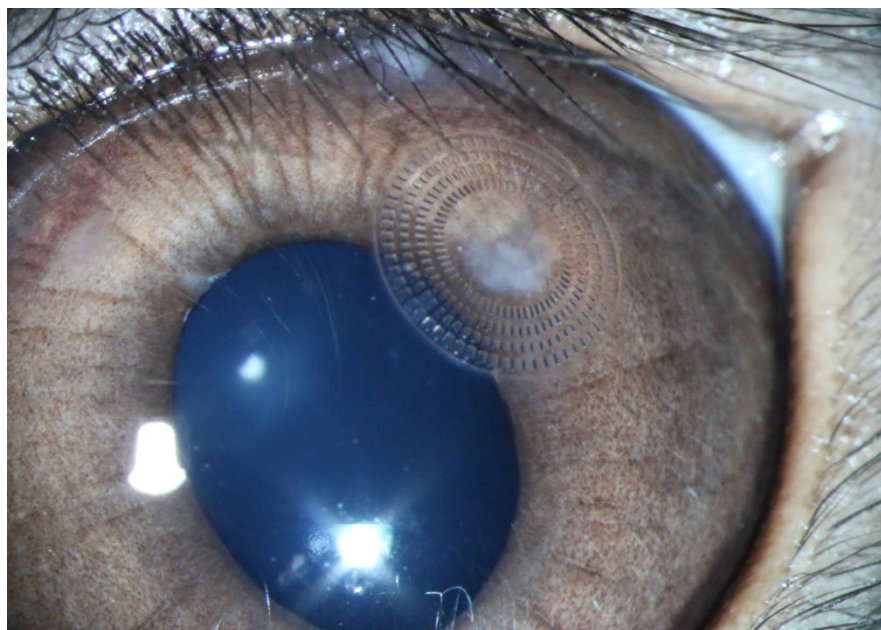
Во второй группе у 1-ого кролика (1 глаз) наблюдали осложнение послеоперационного периода на 30-е и 90-е сутки. При биомикроскопии роговицы над зоной ОПК не имеющей ячеистой структуры определяли небольшую зону стромального помутнения, с последующей десквамацией эпителия, истончением слоев роговицы и формированием язвенного дефекта (рисунок 25).



Роговица прозрачная. Над центральной зоной ОПК язвенный дефект роговицы с неровными краями

Рисунок 25 – Биомикроскопия глаза кролика через 30 суток после имплантации ОПК модели №2 (группа 2)

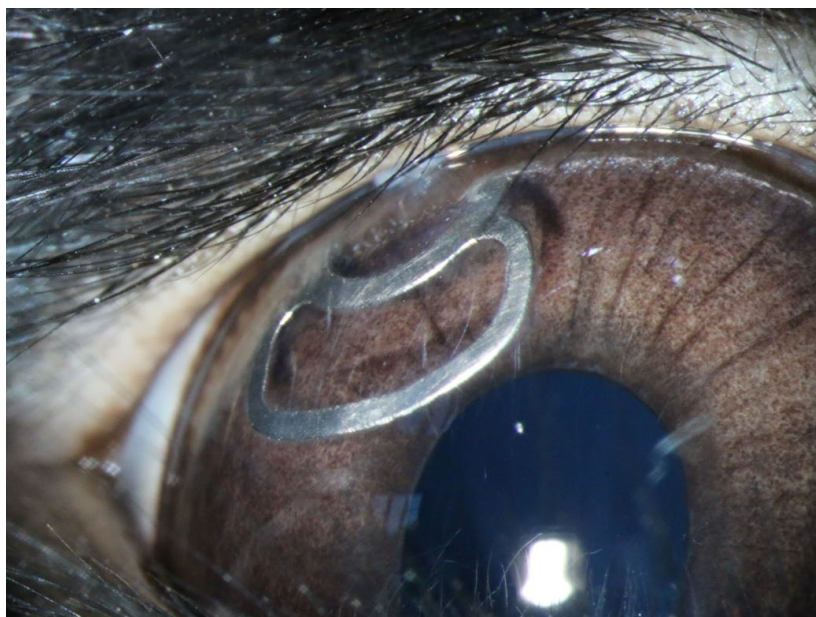
Также в группе 2 (1 глаз) при биомикроскопии наблюдали помутнение передних слоев роговицы над ОПК на сроке 90 суток (рисунок 26).



Роговица прозрачная. Над центральной зоной ОПК локальное
диффузное помутнение стромы роговицы

Рисунок 26 – Биомикроскопия глаза кролика через 90 суток после
имплантации ОПК модели №2 (группа 2)

В остальных случаях в опытных группах визуализировали роговицу без признаков воспалительной реакции, ОПК сохраняли правильное положение в роговичном кармане. В контрольной группе положение ОПК модели Федорова-Зуева в интрастромальном кармане было стабильным во всех случаях. При этом окружающая роговица сохраняла прозрачность, видимых дефектов передних отделах стромы не наблюдали (рисунок 27).



Роговица прозрачная. Воспалительная реакция отсутствует. ОПК в стромальных слоях роговицы

Рисунок 27 – Биомикроскопия глаза кролика через 90 суток после имплантации ОПК контрольной группы

5.1.2. Результаты исследования роговицы кролика методом оптической когерентной томографии

При выполнении оптической когерентной томографии (Optovue, США) определяли толщину роговицы над центральной областью ОПК (таблица 5).

Таблица 5 – Изменение толщины роговицы в центральной зоне над ОПК (мкм, $M \pm m$)

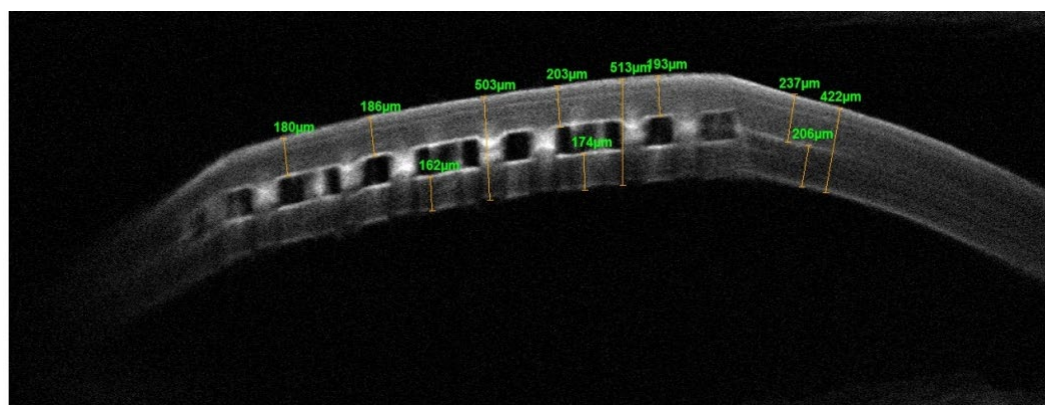
Сроки наблюдения	7 сутки	14 сутки	30 сутки	90 сутки
1 группа	190,8±22,52	175,8±25,71	155,8±42,54	141,5±30,75

2 группа	157,6±8,26	148,2±11,58	122,6±48,72	102±54,66
Контроль	244±23,68	241,8±17,54	221,4±25,99	211±27,68
p*	0,006	0,004	0,010	0,011

* – критерий Крускала - Уоллиса

По данным полученных результатов между 3-мя группами существуют статистически значимые различия по уровню исследуемого признака.

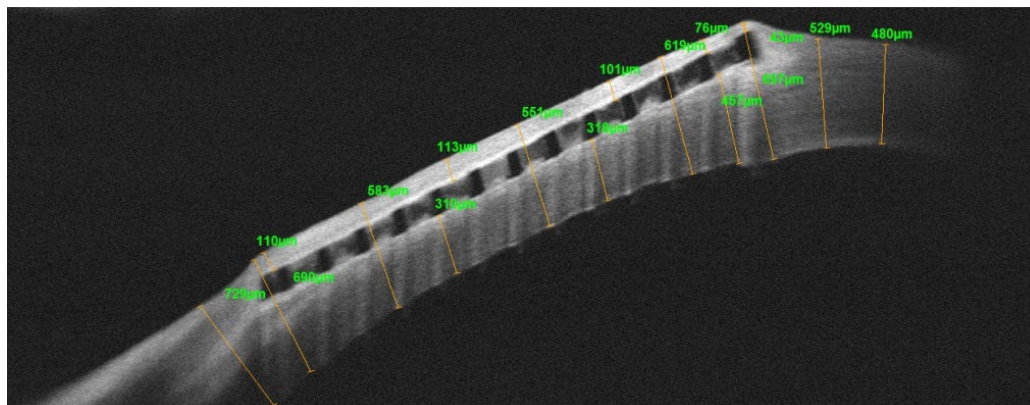
В первой группе в проекции интрастромального кармана визуализировали ОПК, равномерно располагающийся в средних слоях стромы роговицы (на 4-х глазах из 5) (рисунок 28).



ОПК в средних слоях стромы роговицы. Визуализируется ход сформированного интрастромального кармана на глубине 237 мкм

Рисунок 28 – Оптическая когерентная томография роговицы кролика через 30 суток после имплантации ОПК модели №1 (группа 1)

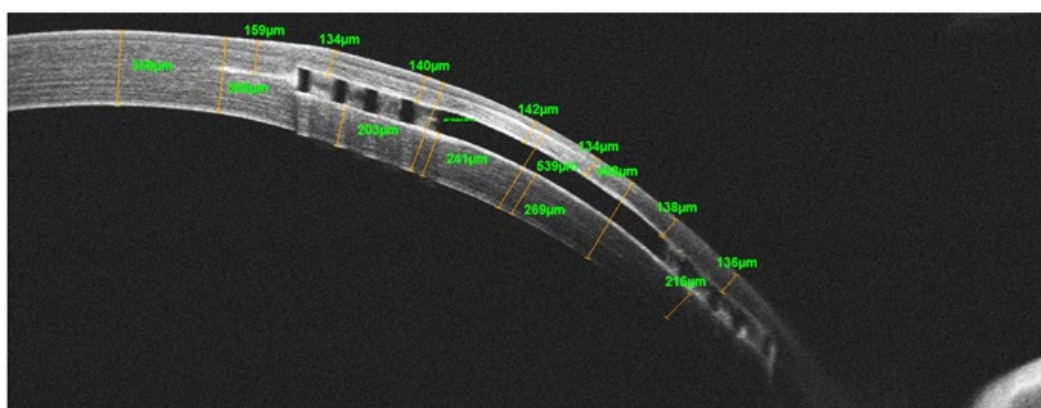
При этом в 1-ой группе (1 глаз) на 30-е сутки зарегистрировали выпячивание ОПК в направлении переднего эпителия с истончением подлежащих слоев стромы роговицы до 101 мкм с последующей протрузией ОПК (рисунок 29).



Выпячивание ОПК в направлении переднего эпителия. Истончение роговицы над имплантом до 101 мкм

Рисунок 29 – Оптическая когерентная томография роговицы кролика через 30 суток после имплантации ОПК модели №1 (группа 1)

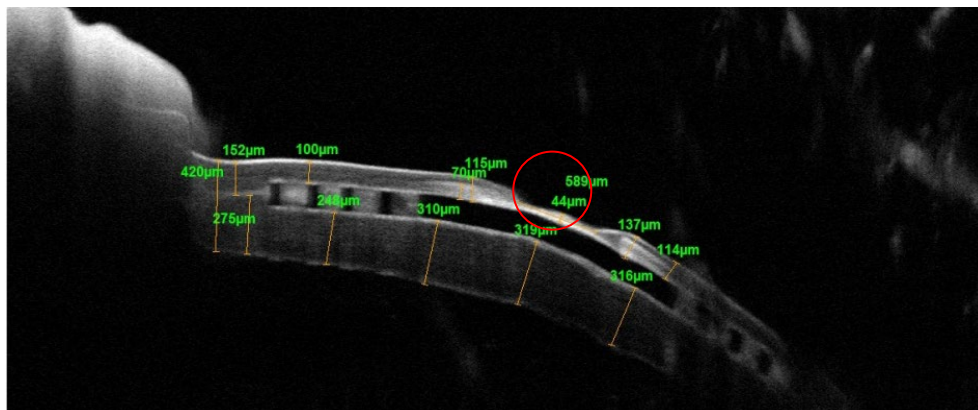
Во второй группе в проекции интрастромального кармана визуализировали ОПК модели №2, равномерно располагающиеся в средних слоях стромы роговицы (на 3-х глазах из 5) (рисунок 30).



ОПК в средних слоях стромы роговицы. Визуализируется ход сформированного интрастромального кармана на глубине 159 мкм

Рисунок 30 – Оптическая когерентная томография роговицы кролика через 30 суток после имплантации ОПК модели №2(группа 2)

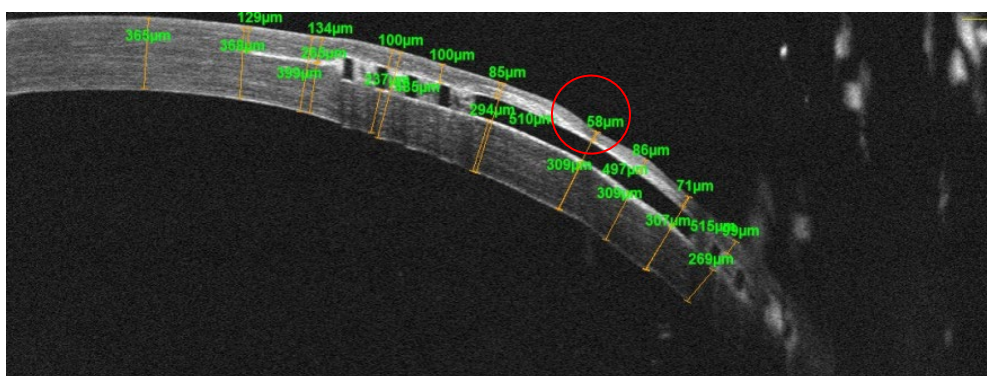
У 1-ого кролика (1 глаз) второй группы определяли язвенный дефект с истончением слоев роговицы до 44 мкм над центральной областью ОПК на 30-е сутки послеоперационного периода (рисунок 31).



Истончение роговицы над центральной зоной ОПК до 44 мкм. Глубина формирования ИСК – 152 мкм

Рисунок 31 – Оптическая когерентная томография роговицы кролика через 30 суток после имплантации ОПК модели №2(группа 2)

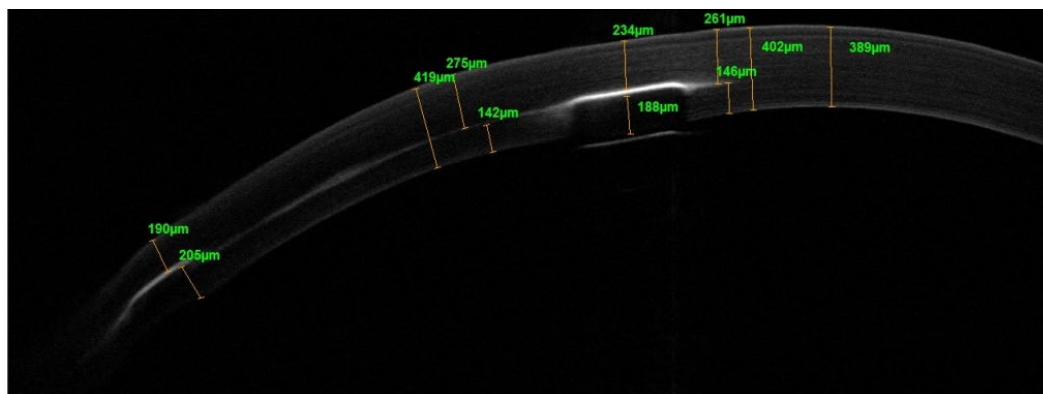
У 1-го кролика (1 глаз) второй группы на 90-е сутки наблюдали зону стромального помутнения над поверхностью ОПК с истончением роговицы до 58 мкм (рисунок 32).



Истончение роговицы над центральной зоной ОПК. Глубина формирования ИСК – 134 мкм

Рисунок 32 – Оптическая когерентная томография роговицы кролика через 90 суток после имплантации ОПК модели №2(группа 2)

При этом в контрольной группе во всех случаях на 30-е и 90-е сутки визуализировали ОПК в проекции интрастромального кармана, равномерно располагающиеся в средних слоях стромы роговицы (рисунок 33).



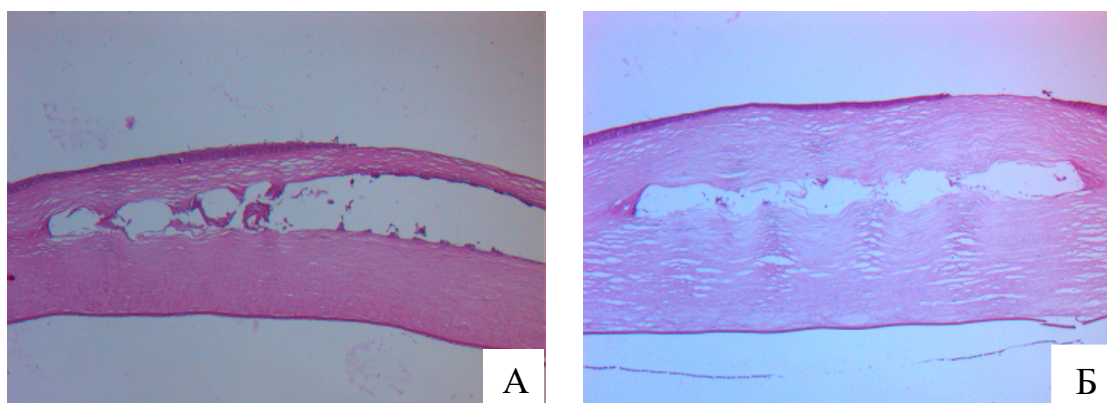
ОПК в средних слоях стромы роговицы. Визуализируется ход сформированного интрастромального кармана на глубине 261 мкм

Рисунок 33 – Оптическая когерентная томография роговицы кролика через 90 суток после имплантации ОПК (контрольная группа)

Согласно результатам оптической когерентной томографии, в 1-ой группе был выявлен 1 случай протрузии ОПК модели №1, что было обусловлено имплантацией ОПК в поверхностные слои стромы роговицы кролика на глубину менее 150 мкм. При этом во второй группе наблюдали истончение роговицы над центральной областью ОПК, что вероятнее всего было связано с разобщением слоев роговицы в зоне без ячеистой структуры и планомерным уменьшением размера ячеек ОПК модели №2.

5.1.3. Результаты гистологического исследования роговицы кролика методом световой микроскопии

По окончании экспериментального исследования на сроке 90 суток при проведении световой микроскопии в группах 1 (4 глаза) и группе 2 (5 глаз) визуализировали полости в строме центральных отделов повторяющие ячеистую форму протеза (рисунок 34).



А – Группа 1 (модель ОПК №1). Визуализируется ИСК, ув. х 50; Б – Группа 2 (модель ОПК №2). Визуализируется ИСК, ув. х 50.

Рисунок 34 – Роговица кролика после имплантации ОПК, 90 сутки.

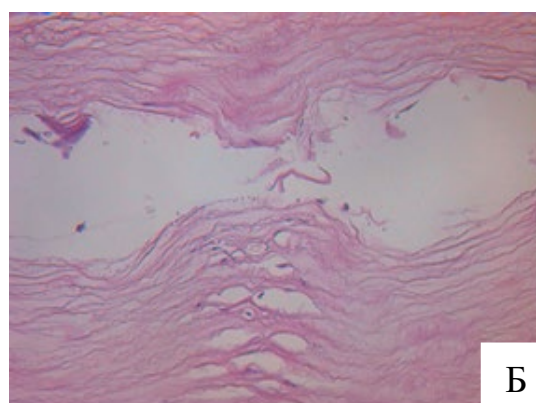
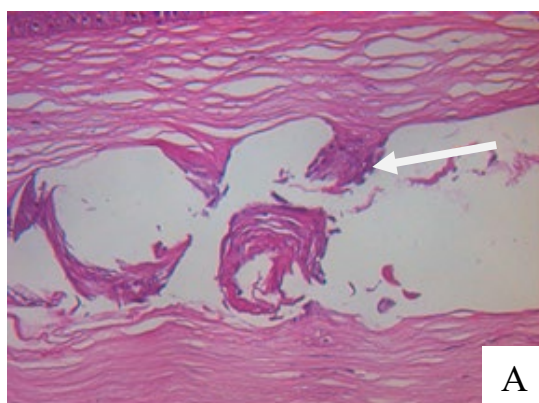
Световая микроскопия, окраска гематоксилин-эозином

В обеих группах в строме передних отделов отмечали умеренный отек, в задних отделах признаков патологических изменений не выявлено. Во второй группе роговица была эпителизирована не полностью во всех случаях, наблюдали последовательное истончение эпителия от периферии к центру, в центральных отделах эпителий отсутствовал (таблица 6).

Таблица 6 – Гистоморфологические параметры роговицы кролика, определяемые методом световой микроскопии

	Ложе роговицы	Уплотнение стромы вокруг ОПК	Капсула вокруг ОПК	Эпителий и эндотелий
Группа 1 (n=4)	Визуализируется (4)	Умеренное (3)	Присутствует (5)	Интактный (4)
Группа 2 (n=5)	Визуализируется (5)	Умеренное (4)	Отсутствует (4)	Эпителий интактен (3), единичные участки с разрывами Десцеметовой мембраны (2)
Группа 3 (n=5)	Визуализируется (5)	Незначительное (5)	Присутствует (4)	Эпителий интактен (5), разрывы Десцеметовой мембраны (3)

При этом в группе 1 визуализировали полость в строме с фрагментами капсулообразования, в группе 2 элементы капсулы в полости отсутствовали (рисунок 35).



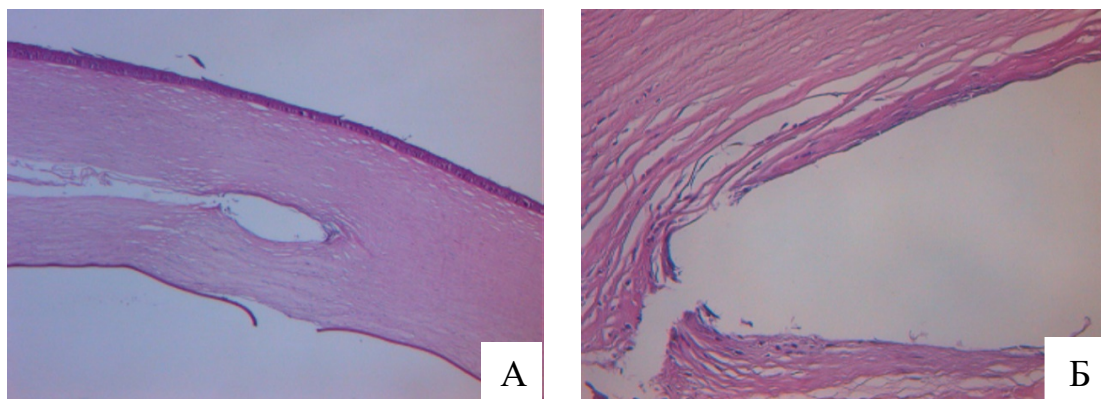
А – Группа 1 (модель ОПК №1). Визуализируется полость в строме роговицы с фрагментами капсулообразования, повторением формы протеза с умеренным клеточным компонентом, ув. х 200; Б – Группа 2 (модель ОПК

№2). Визуализируется полость в строме роговицы с отсутствием капсулообразования, с умеренным клеточным компонентом, ув. х 200.

Рисунок 35 – Роговица кролика после имплантации ОПК, 90 сутки.

Световая микроскопия, окраска гематоксилин-эозином.

В контрольной группе (5 глаз) в зоне сформированного роговичного кармана определяли центральный отдел стромы с фрагментами фиброзного капсулообразования и незначительным наличием клеточных компонентов по периферии, поверхность роговицы была полностью эпителизирована (рисунок 36).



А – Контрольная группа (ОПК Федорова-Зуева). Визуализируется полость в строме роговицы с фрагментами капсулообразования, роговица эпителизирована полностью, ув. х 50; Б – Контрольная группа (ОПК Федорова-Зуева). Визуализируется умеренный клеточный компонент по периферии, ув. х 200.

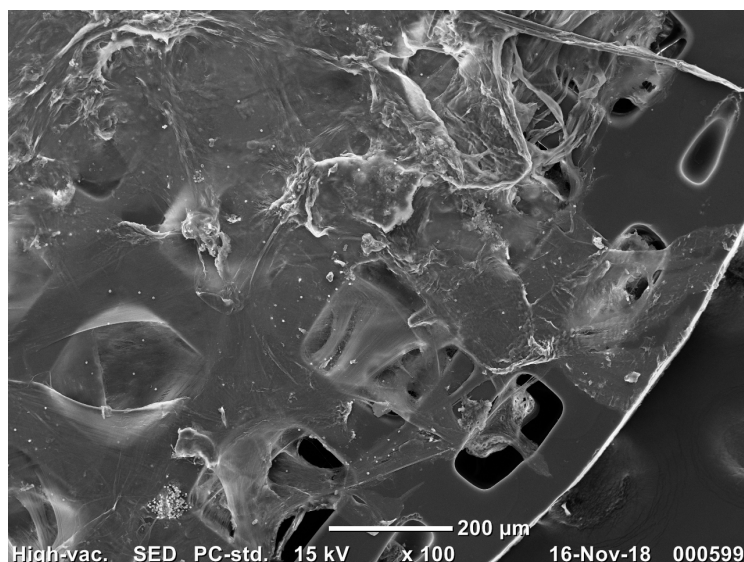
Рисунок 36 – Роговица кролика после имплантации ОПК, 90 сутки.

Световая микроскопия, окраска гематоксилин-эозином.

5.1.4. Результаты исследования роговицы кролика методом сканирующей электронной микроскопии

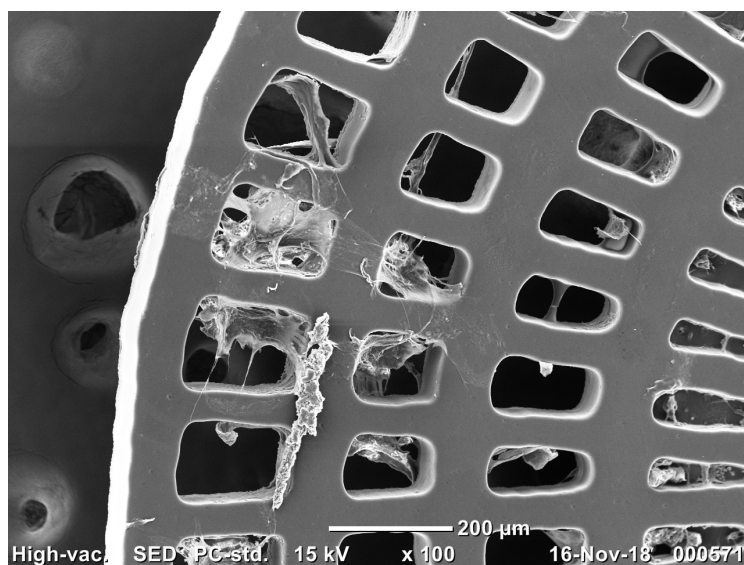
В процессе проведения сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) оценивали ультраструктуру стромального «ложа» и «крышки» роговицы: наличие и ориентацию коллагеновых волокон. Данные параметры косвенно свидетельствуют об активации процесса неколлагеногенеза и формировании капсулы, вокруг имплантированной ОПК. Сканирующую электронную микроскопию ОПК проводили с целью оценки степени взаимодействия клеток и стромальных структур роговицы с выбранными полимерными моделями.

При выполнении исследования оценивали наличие на изучаемых поверхностях клеток, волокнистых соединительнотканых элементов, степень деформации ОПК, сравнивали изображения в опытных и контрольных группах. Согласно результатам электронно-микроскопических исследований, в ячейках полимерных пластин и на их поверхности в обеих опытных группах было обнаружено незначительное количество клеточных элементов. В опытных группах отмечали образование капсулы из новообразованных волокон, при этом в 1-ой группе более выражено как вокруг ОПК, так и в ячейках (рисунок 37,38).



Волокнистые элементы на поверхности ОПК и в ячейках, ув. x100.

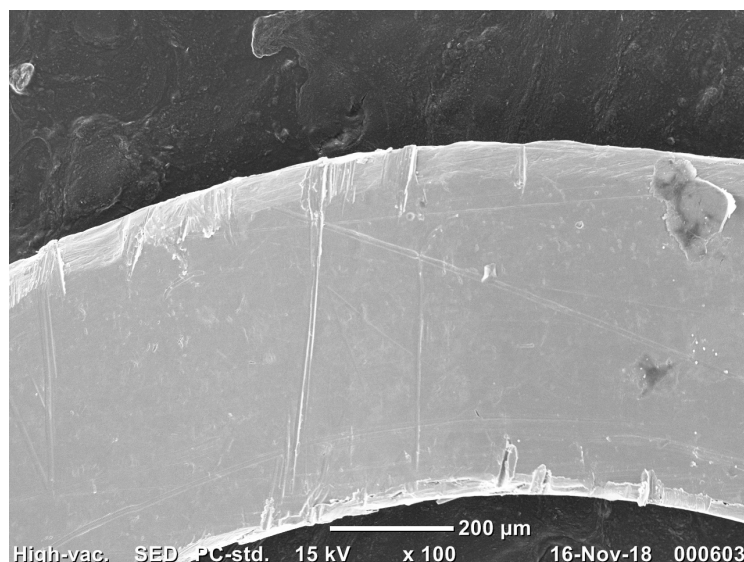
Рисунок 37 – СЭМ Группа с моделью №1. Поверхность ОПК



Единичные волокнистые элементы в ячейках ОПК, ув. x100.

Рисунок 38 – СЭМ Группа с моделью №2. Поверхность ОПК

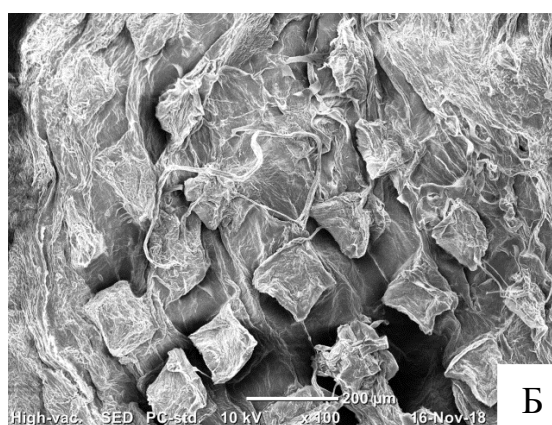
В контрольной группе поверхность титанового опорного элемента была шероховатой, с участками неровных, острых краев и отсутствием клеточных элементов и молодых коллагеновых фибрилл (рисунок 39).

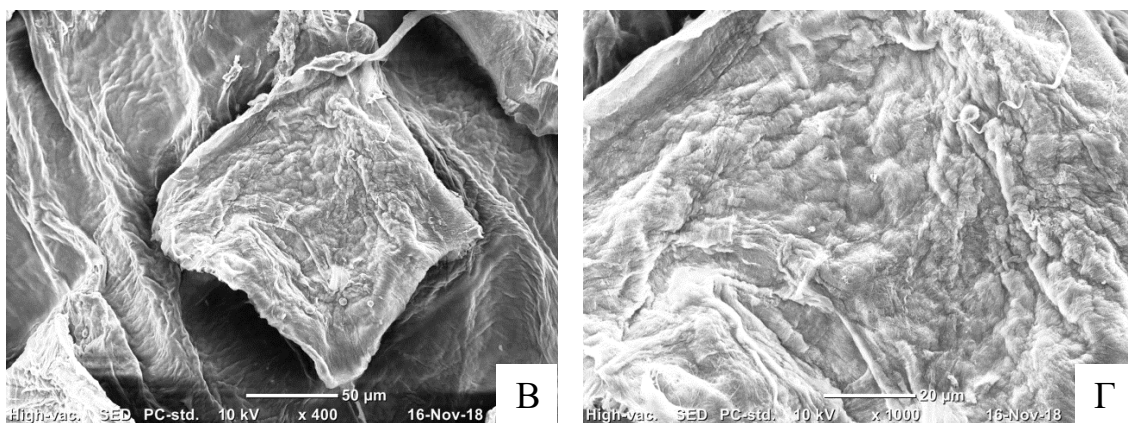


Поверхность опорной пластины без видимых клеток и волокнистых структур, ув. x100.

Рисунок 39 – СЭМ Контрольная группа с 1/2 опорной пластины кератопротеза Федорова-Зуева. Поверхность ОПК

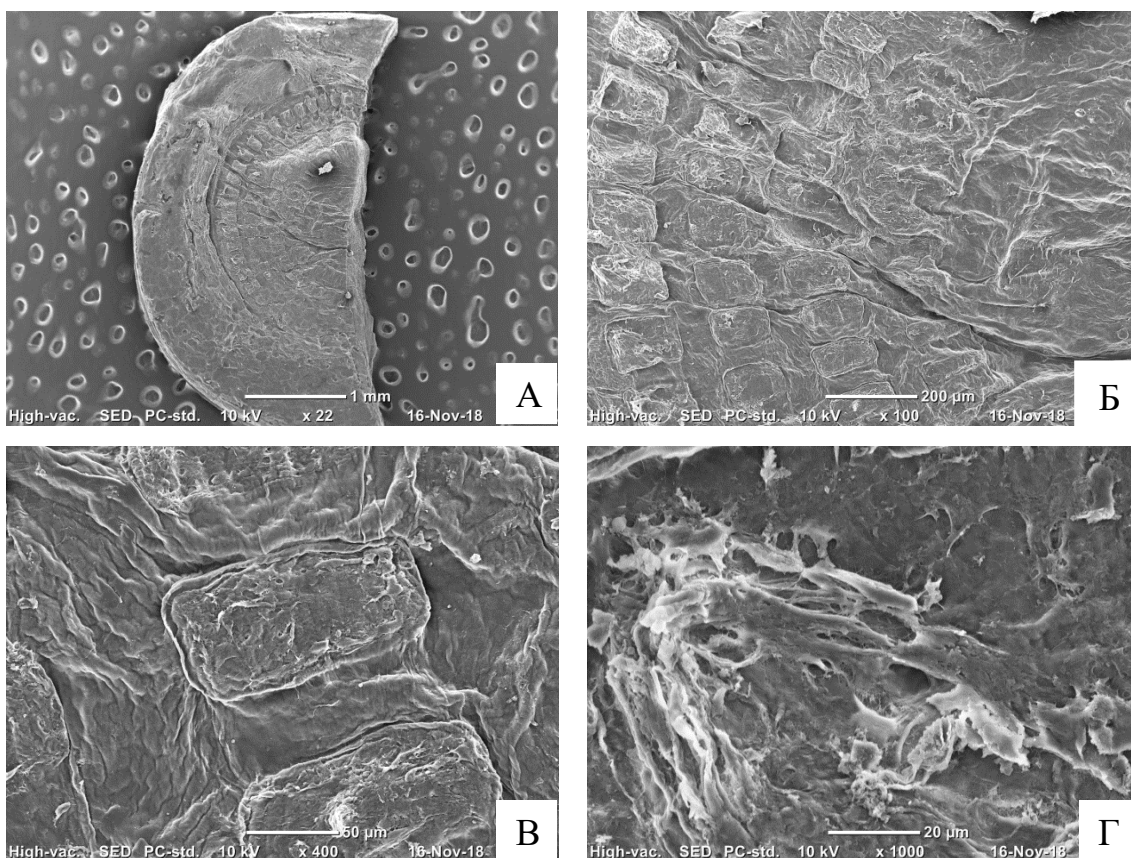
В опытных группах на поверхности роговичного «ложа» определяли комплементарно сформированные ячеистые структуры ОПК с наличием незначительных скоплений клеток и коллагеновых волокон (рисунок 40, 41).





А – общий вид «ложки» ИСК, ув. x22; Б – волокнистые элементы, соответствующие ячейкам ОПК, ув. x100; В – волокнистые элементы, соответствующие ячейкам ОПК, ув. x400; Г – поверхность «ложки» ИСК, ув. x1000.

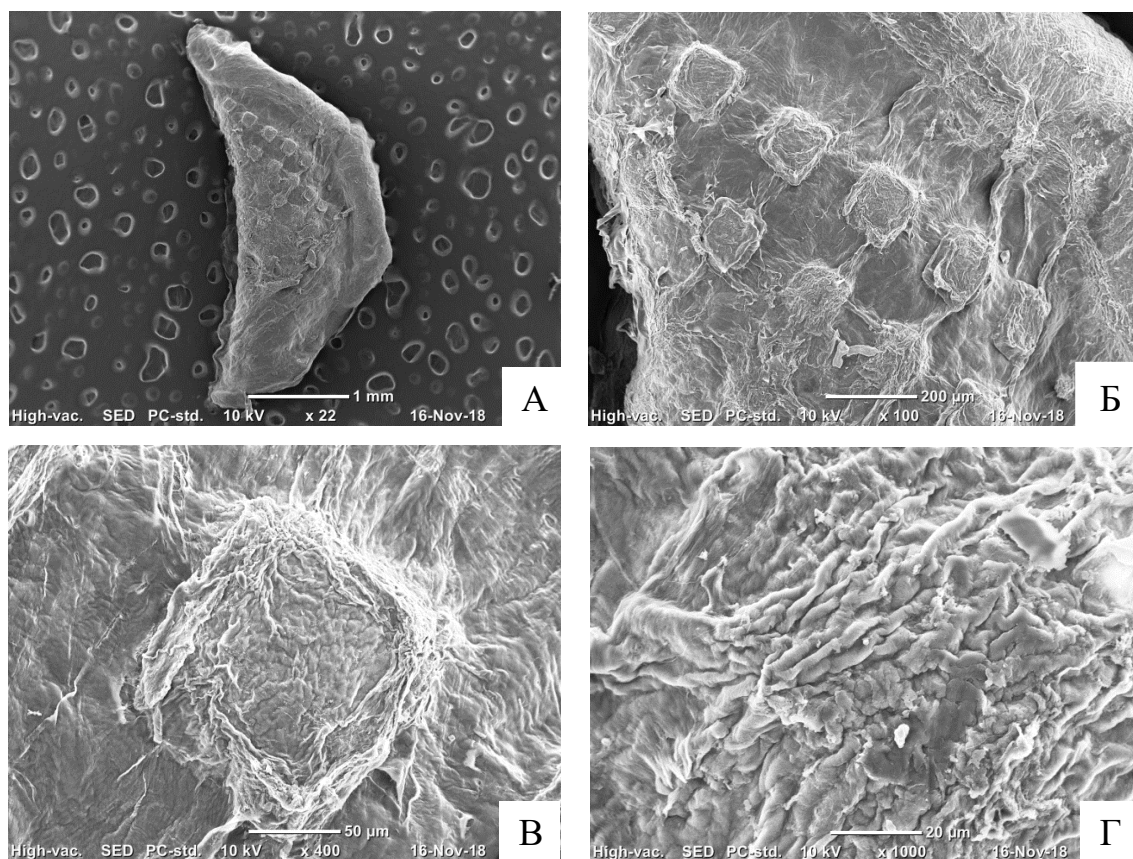
Рисунок 40 – СЭМ Поверхность «ложки» ИСК, модель №1



А – общий вид «ложки» ИСК, ув. x22; Б – коллагеновые волокна на поверхности «ложки», ув. x100; В – волокнистые элементы, соответствующие ячейкам ОПК, ув. x400; Г – поверхность «ложки» ИСК, ув. x1000.

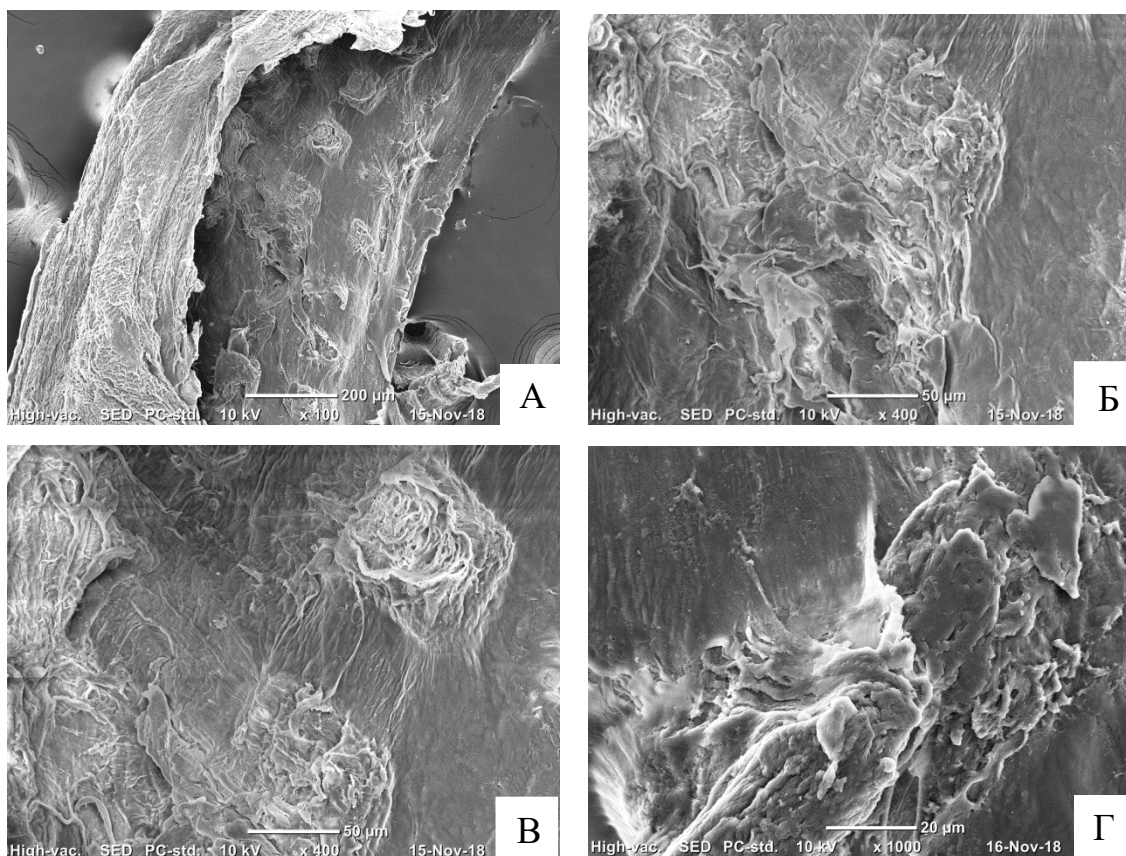
Рисунок 41 – СЭМ Поверхность «ложки» ИСК, модель №2

В опытных группах на поверхности роговичной «крышки» визуализировали подобные структуры с коллагеновыми волокнами различного диаметра и в меньшем количестве, по сравнению с поверхностью «ложа» (рисунок 42, 43).



А – общий вид «крышки» ИСК, ув. x22; Б – клеточно-волоконистые ассоциаты в ячейках ОПК, ув. x100; В – коллагеновые волокна и клеточные элементы, ув. x400; Г – поверхность «крышки» ИСК, коллагеновые волокна и клеточные элементы, ув. x1000.

Рисунок 42 – СЭМ Группа с моделью №1 Поверхность «крышки» ИСК



А – общий вид «крышки» ИСК, ув. x100; Б – разнонаправленность нитей коллагеновых волокон на поверхности «крышки», ув. x400; В – клеточно-волоконистые ассоциаты в ячейках ОПК, ув. x400; Г – поверхность «крышки» ИСК, ув. x1000.

Рисунок 43 – СЭМ Группа с моделью №2 Поверхность «крышки» ИСК

Согласно результатам электронно-микроскопических исследований, в ячейках полимерных пластин и на их поверхности обнаружены адгезированные волокнистые элементы, которые в опытных группах образовывали участки капсулообразования, при этом более выражено на поверхности и в ячейках ОПК модели №1, что совпадало с данными световой микроскопии. В контрольной группе были обнаружены минимальные адгезивные свойства титановой пластины к соединительнотканному остову стромы роговицы без наличия клеточных элементов и молодых волокон. Представленная картина, по всей вероятности, обусловлена биоинертными свойствами титана.

Наличие волокнистых структур на внутренней поверхности ложа в большем количестве, чем на поверхности «крышки», вероятнее всего обусловлено механическим повреждением внутренней поверхности роговицы в процессе имплантации ОПК (альтерации) как первой фазы воспалительного процесса с последующим формированием капсулообразования. Также не исключены различия пролиферативного ответа характерного для поверхностных и глубоких слоёв роговицы в результате различия клеточного состава и условий питания этих слоёв.

Таким образом, проведенные клинические исследования показали, что при максимальном сроке наблюдения (до 90 суток) в первой группе был отмечен 1 случай протрузии ОПК модели №1 обусловленный поверхностной имплантацией в роговицу кролика, во второй группе у 2-х кроликов наблюдали истончение слоев роговицы над центральной частью ОПК модели №2. По данным световой микроскопии, установлено, что пребывание в роговице кролика исследуемых ОПК 1-ой опытной группы в изученные сроки вызывало образование грубой волокнистой соединительной ткани. В опытной группе №1, по данным сканирующей электронной микроскопии, в ячейках полимерной пластины и на ее поверхности обнаружены адгезированные волокнистые элементы, при этом в контрольной группе на поверхности титановой пластины клеточные элементы отсутствовали. Ввиду этого, опорная пластина с отверстиями 200x200 мкм (группа №1) перспективна для использования в качестве основы конструкции новой модели кератопротеза.

5.2. Морфофункциональные изменения роговицы кролика после имплантации полимерного кератопротеза

Целью данной части работы явилось изучение в экспериментально-морфологическом исследовании *in vivo* влияния разработанной новой модели кератопротеза, изготовленной из полимерного материала на основе гидрофобного акрила, на структуры переднего отрезка глаза экспериментального животного (кролика).

Для достижения поставленной цели исследования были сформулированы и решены следующие задачи: оценить клинимоρφологические изменения глаза кролика при имплантации предложенной модели кератопротеза с разработанной опорной пластиной и изучить реакцию стромы роговицы кролика на имплантацию полимерной модели кератопротеза в раннем и отдаленном послеоперационном периодах.

5.2.1. Результаты исследования роговицы кролика методом биомикроскопии

На основании результатов экспериментально-морфологического исследования и математического моделирования ОПК была разработана новая модель кератопротеза компанией «Репер-НН» (г. Нижний Новгород). В данной модели радиус кривизны опорной пластины равен 8 мм. В центре опорной пластины оптический цилиндр с оптической силой 14,5 D, диаметром 4мм (d1), длина его наружной части 0, 1 мм (h1), внутренней – 0,05 мм (h2) (рисунок 44).

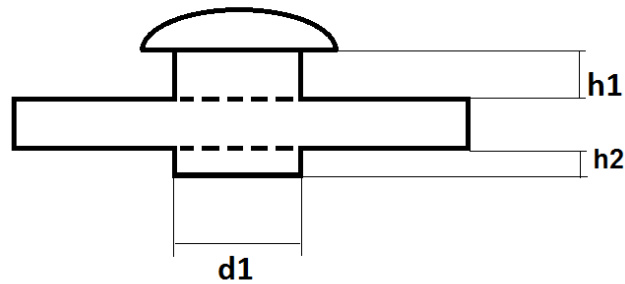


Рисунок 44 – Графическое изображение модели кератопротеза

Имплантиацию кератопротеза выполняли 7 кроликам при общей анестезии (наркоз севараном), по вышеописанной методике во 2-ой главе¹. В послеоперационном периоде проводили терапию в виде инстилляций в конъюнктивальную полость растворов антибиотика (моксифлоксацин 0,5%) и стероида (дексаметазон 0,1%) 2 раза в день в течение 7 дней.

Наблюдение проводили в сроки 1, 3, 7, 14, 30 и 90 дней с выполнением биомикроскопии и оптической когерентной томографии роговицы (Optovue, США). На сроке 90 дней животных выводили из эксперимента. Выкраенные корнеосклеральные диски помещали в 10% растворе забуференного нейтрального формалина (рН 7,4) на срок 24 часа, которые использовали для проведения световой микроскопии.

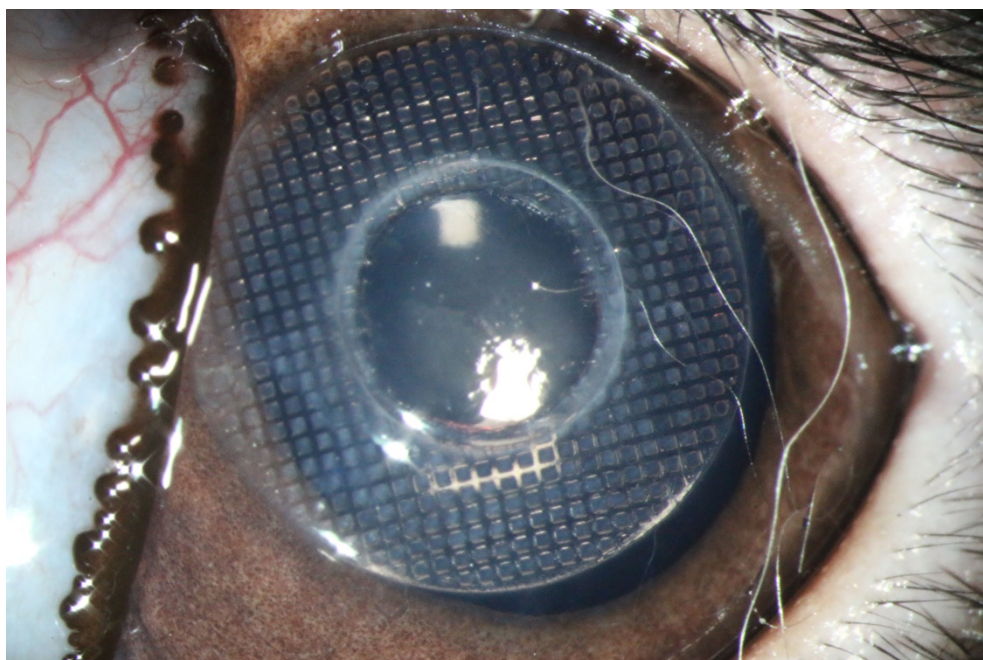
В раннем послеоперационном периоде (срок до 7 суток) отмечали ответную реакцию со стороны тканей роговицы (отек стромы в области роговичного разреза, умеренная инъекция сосудов конъюнктивы), уменьшение которой происходило к 10 - 14 дню наблюдения. Во всех случаях положение кератопротеза соответствовало первоначальному.

К 1-ому месяцу наблюдения во всех случаях наблюдали незначительное помутнение стромы роговицы вокруг кератопротеза (рисунок 45). В 1-м случае определяли истончение передних слоев стромы над оптической частью кератопротеза с язвенным дефектом (рисунок 46).

¹ Исследования проводили в экспериментальной лаборатории Калужского филиала ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России (директор – д.м.н. Терещенко А.В.)

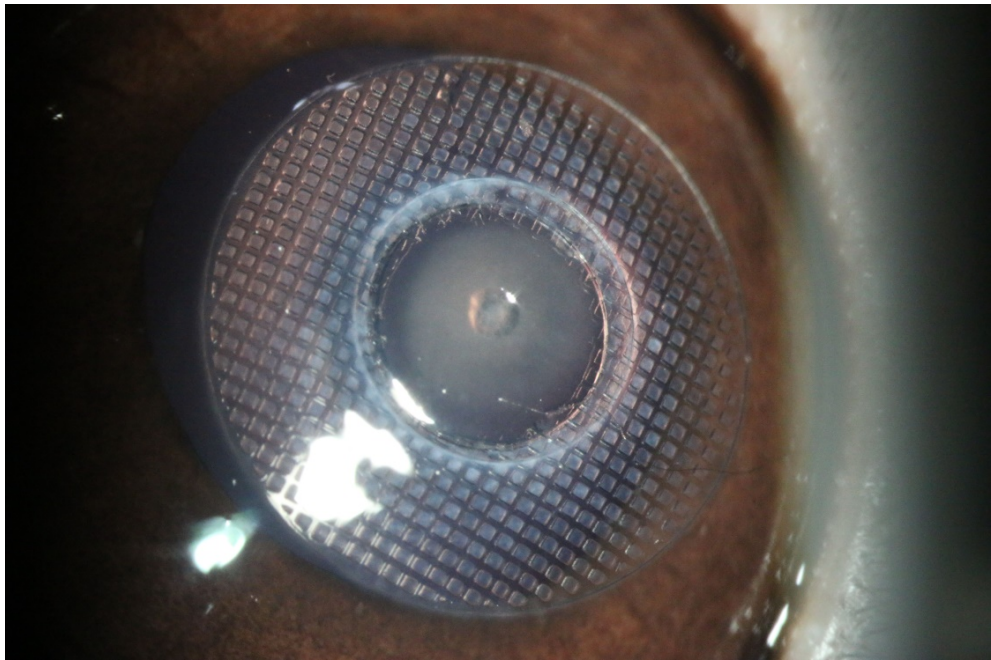
Изменений глубже лежащих сред (величина передней камеры глаза, прозрачность влаги передней камеры глаза, реакция зрачка на свет, прозрачность хрусталика, рефлекс глазного дна) не обнаружили.

К трем месяцам наблюдения в указанном случае наблюдали сохранение язвенного дефекта стромы роговицы с последующей протрузией кератопротеза (рисунок 47). В остальных случаях (6 глаз) положение кератопротеза в интрастромальном кармане было стабильным. Помутнение стромы роговицы вокруг кератопротеза сохранялось в одном случае у 1-ого экспериментального животного (1 глаз).

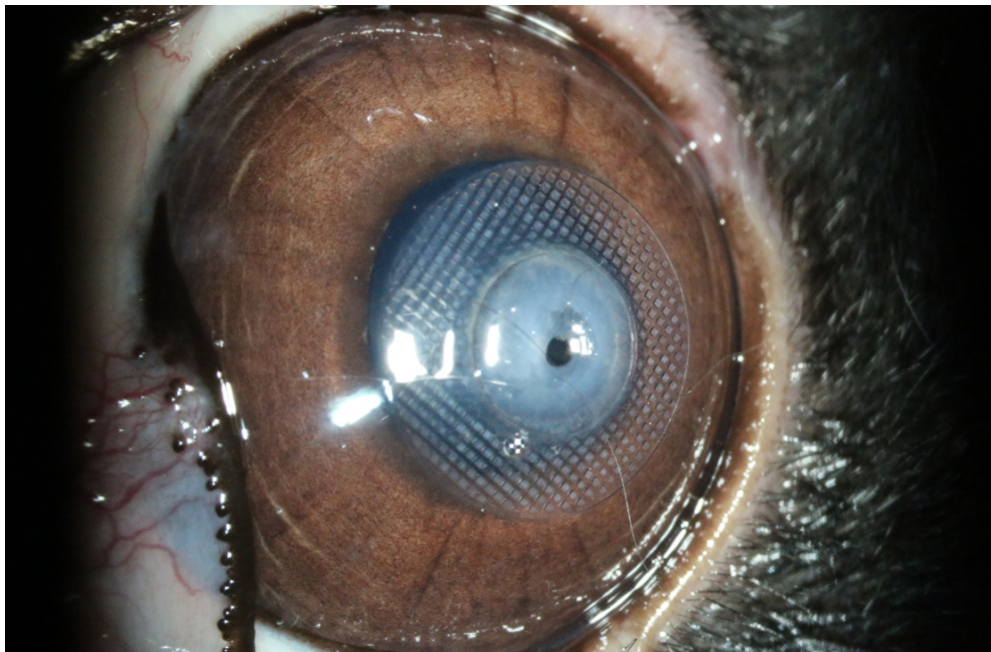


Незначительное помутнение стромы роговицы вокруг кератопротеза

Рисунок 45 – Биомикроскопия глаза кролика, через 30 суток после имплантации кератопротеза



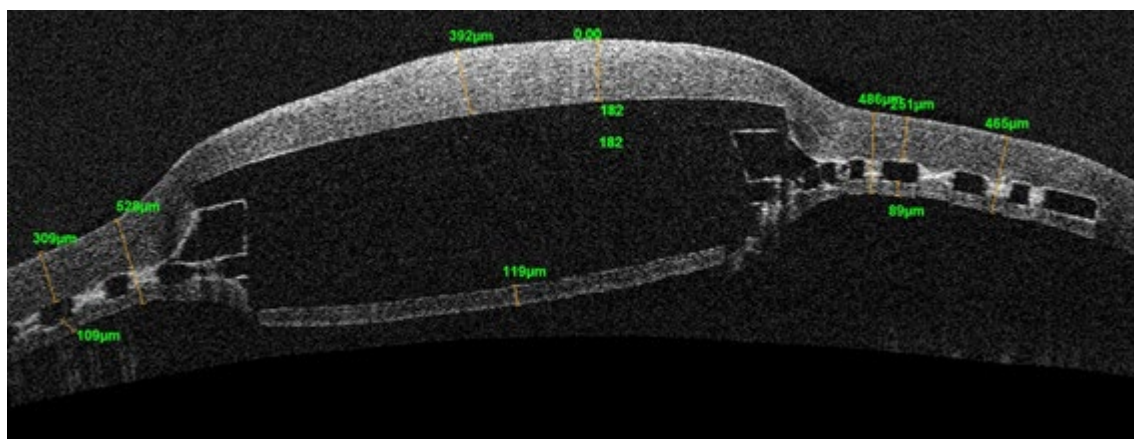
Язвенный дефект над оптической частью кератопротеза
Рисунок 46 – Биомикроскопия глаза кролика, через 30 суток после
имплантации кератопротеза



Язвенный дефект над оптической частью кератопротеза с помутнением
поверхностных слоев роговицы
Рисунок 47 – Биомикроскопия глаза кролика, через 90 суток после
имплантации кератопротеза

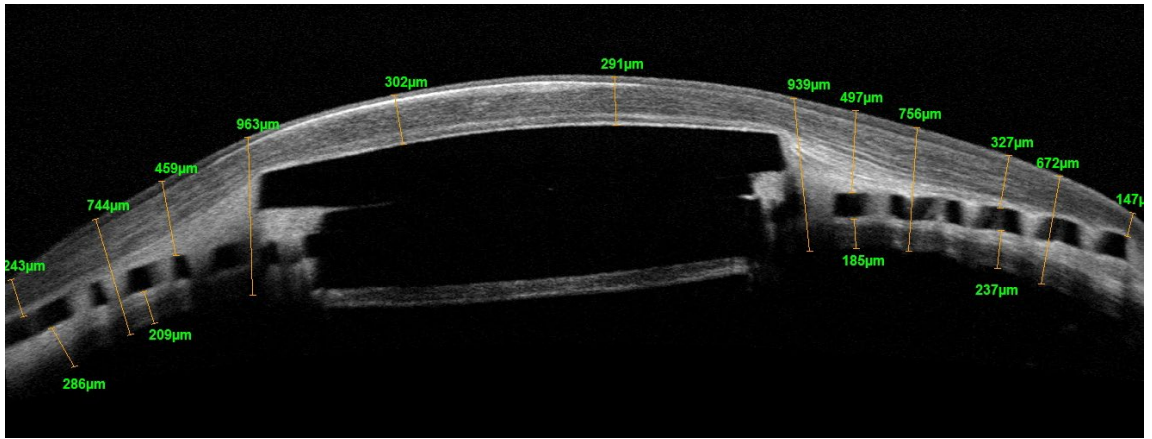
5.2.2. Результаты исследования роговицы кролика методом оптической когерентной томографии

При проведении ОКТ на сроке 14 дней после имплантации кератопротеза во всех случаях в проекции ИСК визуализировали кератопротезы, равномерно располагающиеся в средних слоях стромы роговицы. При анализе данных ОКТ отмечали увеличение толщины роговицы в центральной оптической зоне, в сравнении с дооперационными данными к 14 суткам после операции в 6 случаях, что можно объяснить наличием в строме роговицы кератопротеза, при этом к 90 суткам наблюдения отек поверхностных слоев роговицы над оптическим цилиндром уменьшался (рисунок 48,49,50).



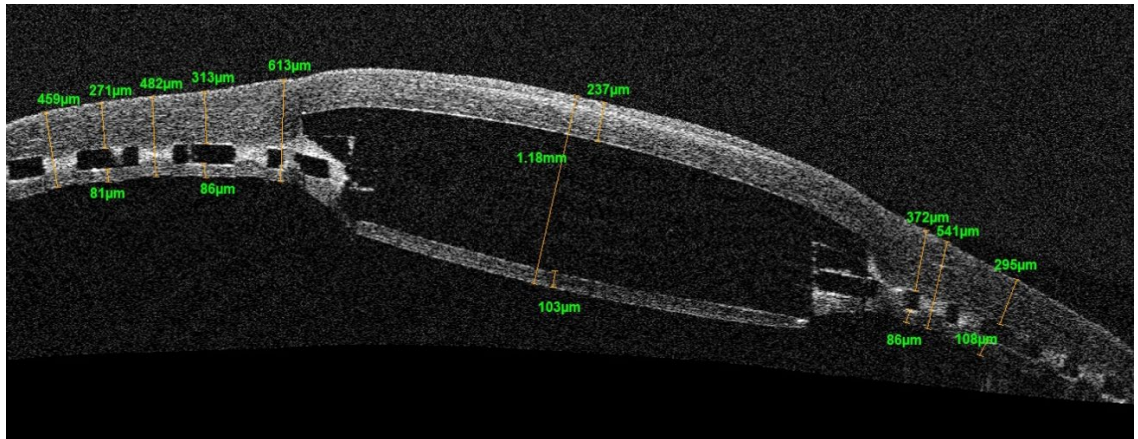
Толщина роговицы над оптической частью кератопротеза – 392 мкм

Рисунок 48 – ОКТ роговицы кролика через 14 суток после имплантации кератопротеза



Толщина роговицы над оптической частью кератопротеза – 291 мкм

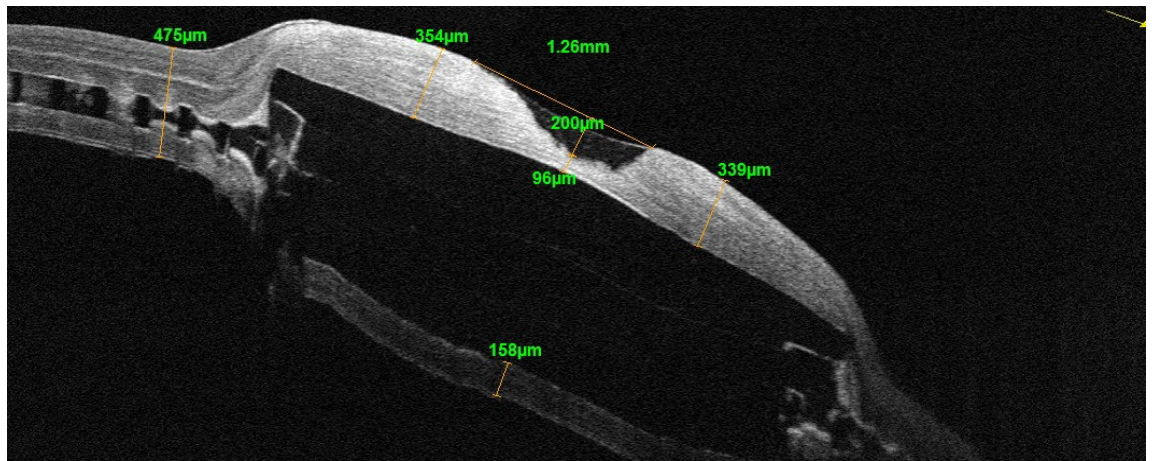
Рисунок 49 – ОКТ роговицы кролика через 30 суток после имплантации кератопротеза



Толщина роговицы над оптической частью кератопротеза – 237 мкм

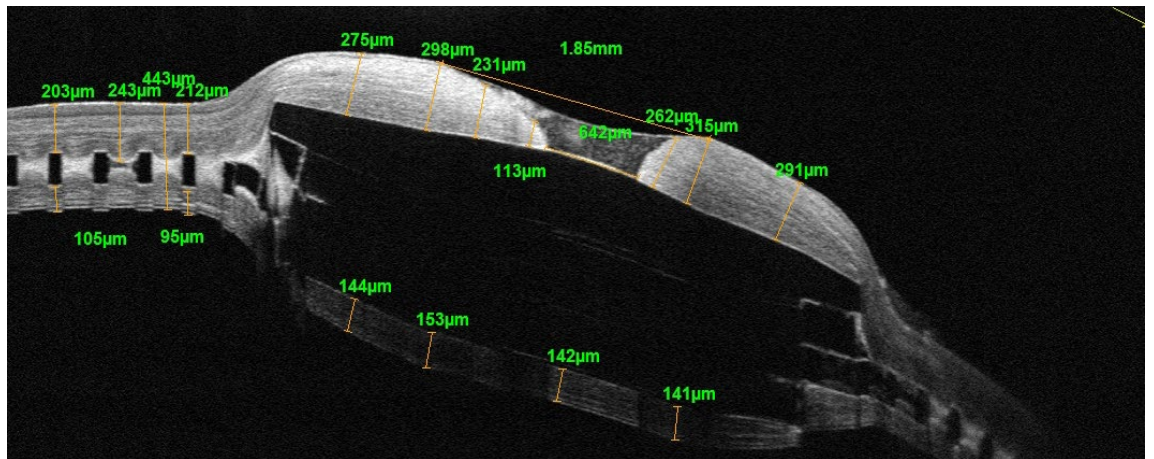
Рисунок 50 – ОКТ роговицы кролика через 90 суток после имплантации кератопротеза

К трем месяцам наблюдения при проведении ОКТ в выше описанном 1-м случае, с выявленным при биомикроскопии язвенным дефектом над оптической частью кератопротеза, визуализировали истончение слоев роговицы в центре оптической части кератопротеза (рисунок 51, 52).



Истончение роговицы в центре оптической части кератопротеза.
Толщина роговицы в центре оптической части кератопротеза – 96 мкм

Рисунок 51 – ОКТ роговицы кролика через 30 суток после имплантации кератопротеза



Истончение роговицы над оптической частью кератопротеза. Глубина формирования ИСК – 243 мкм

Рисунок 52 – ОКТ роговицы кролика через 90 суток после имплантации кератопротеза

5.2.3. Результаты гистологического исследования роговицы кролика методом световой микроскопии

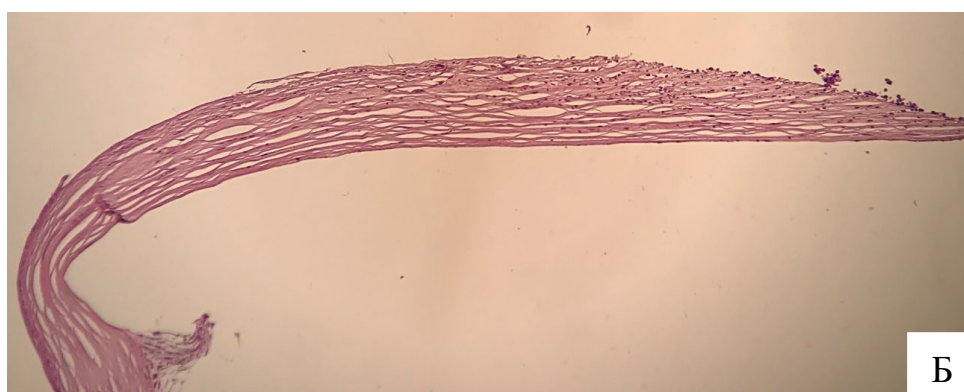
При рассмотрении гистологических срезов роговиц экспериментальных животных на сроке наблюдения 3 месяца во всех случаях определяли наличие полости в строме центральных отделов с повторением контуров фигуры протеза по периферии и оптической части в центре с признаками умеренного капсулообразования. Капсула представлена рыхло расположенными коллагеновыми волокнами, фибробласты имеют различную степень дифференцировки, наблюдается умеренное количество активных клеток. Волокна стромы роговицы располагались упорядоченно, без видимых структурных изменений, при этом распределение волокон стромы ее передних слоев было более равномерное и соответствовало контурам фигуры протеза, по сравнению с задними слоями роговицы, где отмечено более рыхлое расположение волокон роговицы. Так же фиксировали изменение эпителия в области оптической части протеза, отмечается его десквамация и уплощение, связанное с высокой силой натяжения, возникающей в строме роговицы при имплантации протеза. Десцеметова мембрана и эндотелий были сохранены, выраженных изменений вследствие длительного нахождения протеза в строме роговицы кролика не отмечали (рисунок 53). Воспалительных явлений отмечено не было. Гистологическая картина полностью соответствовала клинической картине по данным биомикроскопии.



А – Истончение эпителия над оптической частью протеза. Ув. х 50; Б –
Признаки конгруэнтного умеренно выраженного капсулообразования по
форме гаптического элемента. ув. х 200.

Рисунок 53 – Гистологическая картина роговицы кролика, окраска Г-Э

На сроке 3-х месяцев после хирургического вмешательства в 1-м случае определяли гистологические признаки дефекта эпителия и стромы, наличие лимфоцитарного пластинчатого инфильтрата, что коррелировало с клинической картиной послеоперационного периода, вероятно формирование язвенного дефекта над оптическим цилиндром с локальным помутнением и последующим истончением и было обусловлено исходом воспалительного процесса (рисунок 54).



А – Истончение эпителия и стромы над оптической частью протеза. Ув. x 50; Б – Признаки лимфоцитарного пластинчатого инфильтрата. ув. x 200.

Рисунок 54 – Гистологическая картина роговицы кролика, окраска Г-Э

В результате проведенного экспериментально-морфологического исследования *in vivo* было показано, что кератопротез занимал стабильное положение в сформированном интрастромальном кармане. При имплантации разработанной модели полимерного кератопротеза не было отмечено выраженной воспалительной реакции глаза кролика в большинстве случаев, визуализируемой биомикроскопически и гистологически.

Таким образом, экспериментальное, клинико-морфологическое исследование *in vivo* новой модели кератопротеза, изготовленной из полимерного материала на основе гидрофобного акрила с опорной пластиной

группы №1 показало, что при максимальном сроке наблюдения (до 3 месяцев) был отмечен 1 случай (12,5%) протрузии кератопротеза из 7. По данным световой микроскопии, установлено, что в большинстве случаев пребывание разработанного кератопротеза в роговице кролика в изученные сроки не вызывало видимых структурных изменений слоев роговицы, сохранялось равномерное распределение волокон стромы и соответствовало контурам модели протеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ожоговая травма глаза является одним из наиболее тяжелых и прогностически неблагоприятных его поражений как по характеру изменений в тканях, так и по исходам. Единственно возможным методом восстановления зрения у таких пациентов остается кератопротезирование [9, 15, 24]. Однако, существующие в настоящее время модели кератопротезов, как правило, не обеспечивают истинного приживления в тканях роговицы, в связи с качеством материалов и развитием асептического некроза [5, 6]. Анализ истории кератопротезирования позволил отразить прямую зависимость частоты асептического некроза от конструкции кератопротеза. Большинство авторов видят решение проблемы в сращении опорной части кератопротеза в результате клеточной инвазии и врастании волокон роговицы в материал кератопротеза [68, 93, 133]. Таким образом, актуальной представляется разработка и изготовление новой модели кератопротеза, обладающей высокими оптическими характеристиками и способной надежно интегрироваться в ткани роговицы.

Наиболее часто в настоящее время кератопротезы имплантируют в интрастромальный карман в глубокие слои роговицы. Для облегчения приживления кератопротеза в роговице ряд авторов предлагает использовать синтетические полимерные материалы [72, 94, 133]. Влияние полимера на биологические ткани определяется свойствами поверхности полимерного материала, точнее величиной его свободной поверхностной энергии. Декомпенсация межмолекулярных сил в поверхностном слое является причиной отсутствия адгезии и адсорбции. На основании исследований по изучению поверхностных свойств полимеров, минимальная клеточная адгезия наблюдается на материалах, обладающих высокой гидрофильностью и низкими значениями свободной поверхностной энергии [38, 89]. Изучив

многолетний экспериментальный и клинический опыт различных авторов в использовании синтетических материалов для изготовления кератопротезов и учитывая требования, предъявляемые к кератопротезированию, для изготовления кератопротеза был выбран полимерный материал - пространственно сшитый гидрофобный акрил.

С учетом вышесказанного целью работы явилось: экспериментально-морфологическое обоснование новой конструкции кератопротеза с позиции выбора оптимального материала и дизайна для его опорной пластины. Для достижения поставленной цели работа была разделена на 5 этапов соответствующих задачам исследования, которые включали в себя расчет геометрических параметров ОПК, на основе изучения физических аспектов, математического моделирования с учетом анатомо-топографических особенностей роговицы; изучение клеточной реакции на полимерную ОПК на основании двумерного клеточного культивирования *in vitro*; изучение степени интеграции и фиксации ОПК на модели донорской роговицы человека посредством клеточной инвазии *ex vivo*; изучение в условиях *in vivo* влияния модели ОПК на форму передней и задней поверхностей роговицы экспериментального животного, в сравнении с опорным элементом, выполненным из титана; изучение реакции стромы роговицы экспериментального животного на имплантацию новой модели кератопротеза.

Так, на первом этапе необходимо было провести математическое обоснование оптимизации дизайна полимерной периферической части кератопротеза - диаметра, радиуса кривизны, толщины ОПК, размера ослабляющих отверстий, характеристики жесткости, а также глубины залегания, с учетом анатомо-топографических особенностей роговицы человека и подтвердить эффективность рассчитанных параметров в условиях эксперимента.

В работах [8, 16, 33] определяли коэффициенты снижения жесткости густоперфорированной пластины при ее изгибе. Размеры отверстий

разработанной ОПК составляют десятки микрометров поэтому у данной модели возможно проявление свойств нанопластины с рядом характерных размеров порядка нанометров. В настоящее время учеными активно обсуждаются вопросы наномеханики и нанотехнологий. Основные характеристики и функциональные свойства достаточно малых систем начинают зависеть от размера частиц - эффект, который нельзя наблюдать в объемных материалах или у более крупных частиц. При переходе к нанообъектам и нановеществам наблюдается связи между их размерами и физико-химическими свойствами.

В связи с влиянием характерных размеров на функциональность компонентов и их свойства У. Хартманн в своей монографии [35] приводит следующее определение: «Специфические функциональные параметры в нанотехнологиях достигаются путем связи между соответствующими свойствами уменьшением характерных структурных размеров в тех случаях, когда размеры объектов (по крайней мере, в двух измерениях) не превышают значения 100 нм».

В нанотехнологиях особую ценность приобретают свойства материала на поверхности структуры, поскольку в некоторых случаях весь объект может быть представлен в виде особой «поверхности». При этом поверхностные области материала по своим свойствам начинают существенно отличаться от физико-механических характеристик внутри материала. Соответственно, для систем с размерами более 100 нм, справедливы классические законы физики [98, 120]. Дальнейшее уменьшение масштабов структур и явлений требует учета квантово-механических эффектов и связанных с ними особенностей. В работе [12] показано, что при числе атомарных слоев более 8 изгибная жесткость материала перестает зависеть от межатомарных связей, и стремится к значению классической теории упругости, что имеет место в ОПК. Ввиду этого, при исследовании механических свойств ОПК применяли классические методы биомеханики.

Согласно формуле зависимости коэффициента снижения жесткости ОПК r от величины пористости материала расчет геометрических параметров ОПК позволил получить значение минимально достаточной жесткости ОПК равной $0,036 \text{ Н/мм}^2$. При меньших значениях относительно минимально достаточной жесткости вероятность изгиба краев ОПК велика. Выпуклая форма опорной пластины гарантирует высокую изгибную жесткость при достаточно больших значениях радиуса кривизны. Сферическая форма ОПК является геометрически несгибаемой. Геометрическая несгибаемость сферической формы поверхности для ОПК означает, что при равномерной нагрузке форма ОПК не изменится и занимает стабильное положение. По данным сравнительного математического анализа новая модель ОПК имеет большее значение жесткости, чем модель "Сеточка" и меньшее, чем модель Федорова-Зуева поэтому для ее сферичности требуются меньшие усилия, чем для жесткого элемента. Следовательно, это может привести к уменьшению количества некрозов над краем опорного элемента.

Полученные параметры в ходе математического моделирования, позволили спроектировать новую модель кератопротеза. Дальнейшее подтверждение эффективности данной модели было проведено в условиях эксперимента.

Вторым этапом работы было запланировано проведение экспериментально-морфологического исследования *in vitro*. Для постановки эксперимента было изготовлено 8 образцов, исследуемых ОПК двух моделей сферической формы диаметром 4 мм с радиусом кривизны 8,0 мм и толщиной 100 мкм. Модель ОПК №1 представлена в виде пластины сетчатой структуры со сквозными квадратными отверстиями (200x200 мкм). Модель ОПК №2 представляет собой пластину сетчатой структуры со сквозными отверстиями трапециевидной формы и изменяющейся величины от периферии к центру (от 170x130 мкм до 180x70 мкм). Стоит отметить, что в зарубежной литературе представлены материалы экспериментальных исследований по разработке кератопротезов из пористых полимеров на

основе гидрофобных материалов [134]. Исследования развивались в поиске материалов от жесткого гидрофобного материала, таких как пластмассы и каучуки, до гидрогелей, синтетических гомополимеров, сополимеров, биополимеров [86] и, наконец, взаимопроникающих полимерных сетей [98, 107]. По мнению авторов, использование кератопротезов из полимерных материалов с ячеистой структурой позволяет фиксировать их интрастромально и не прерывать питание поверхностных слоев роговицы, что снижает риск отторжения кератопротеза в результате асептического некроза ткани [108,124,125,135].

При проведении 2D культивирования клеток стромы роговицы человека в присутствии различных моделей ОПК оценивали биологическую совместимость с культурой клеток стромы роговицы человека на основании пролиферации клеток и адгезии к материалу ОПК. В каждой из экспериментальных групп отмечали тенденцию к планомерному увеличению количества клеток от 1-х к 9-ым суткам наблюдения, что подтверждало сохранение пролиферативной активности и способность КСР к адгезии к поверхности ОПК в обеих группах по данным конфокальной лазерно-сканирующей микроскопии. На основании полученных результатов сделали вывод о биосовместимости исследуемых моделей ОПК. Ожидаемым результатом явилось доказательство нетоксичной природы различных моделей ОПК, что подтвердило потенциальную пригодность для интрастромальной имплантации, однако требовалось дальнейшее изучение данных изделий в условиях *ex vivo* на модели кадаверной роговицы человека с целью выявления наиболее подходящей модели. Стоит отметить, что полученные результаты были сопоставимы с имеющимися литературными данными, подтверждающими нетоксичность материала, а так же показали потенциальную пригодность использования полимера на основе гидрофобного акрила для интрастромальной имплантации [42, 57].

Третий этап – экспериментально-морфологическое исследование *ex vivo* в условиях органотипического культивирования роговиц кадаверных

глаз было направлено на изучение тканевой реактивности кадаверной роговицы человека в ответ на имплантацию разработанных ОПК в условиях органного культивирования методами конфокальной и сканирующей электронной микроскопии, а также оценки структурных изменений материала ОПК. В эксперимент вошло 12 роговиц кадаверных глаз, в которые были имплантированы разработанные ОПК. Роговицы культивировали в течение 90 дней в стандартной ростовой среде в условиях нормотермии. В опытную группу №1 (n=4) вошли роговицы кадаверных глаз, в строму которых имплантировали ОПК сетчатой структуры со сквозными квадратными отверстиями (200x200 мкм), во 2-ой опытной группе (n=4) имплантировали ОПК сетчатой структуры со сквозными отверстиями трапециевидной формы и изменяющейся величины от периферии к центру (от 170x130 мкм до 180x70 мкм). В контрольной группе (n=4) проводили формирование роговичного тоннеля без имплантации ОПК. В ходе экспериментального исследования через 90 суток по данным сканирующей электронной микроскопии было отмечено более выраженное формирование грубой соединительнотканной капсулы вокруг ОПК в группе №1 с ячейками одинакового размера. Для определения деградации материала до и после выполнения органотипического культивирования экспериментальные образцы ОПК фотографировали. После выведения образцов ОПК из эксперимента структура их поверхности и форма не изменилась, что позволило исключить биodeградируемую природу материала. Полученные данные соответствовали данным проведенного двумерного клеточного культивирования в присутствии исследуемых ОПК различных моделей, а кроме того, позволили впервые исследовать клеточно-тканевую реакцию роговицы кадаверного глаза на присутствие в строме исследуемых моделей ОПК.

Для подтверждения полученных результатов исследования биосовместимости на моделях *in vitro* и *ex vivo* были проведены клинические исследования *in vivo* на экспериментальных животных в количестве 15

кроликов, которые были разделены на 3 равные группы. В качестве контрольной группы был выбран кератопротез Федорова-Зуева, так как данная модель долгое время являлась единственно используемой в клинической практике на территории Российской Федерации. Наблюдение выполняли в течение 90 дней, далее всех животных выводили из эксперимента, проводили эксплантацию ОПК с последующим морфологическим исследованием методами световой и сканирующей электронной микроскопии. В каждой группе наблюдение проводили в сроки 1, 3, 7, 14, 30 и 90 дней с выполнением биомикроскопии и оптической когерентной томографии роговицы с фоторегистрацией.

В ходе проведенного исследования было показано, что разработанные ОПК при имплантации не вызвали выраженной воспалительной реакции глаза кролика, визуализируемой биомикроскопически и офтальмоскопически, занимали стабильное положение в сформированном ИСК. На сроке наблюдения 90 дней в группе 2 (2 глаза) наблюдали помутнение и язвенный дефект передних отделов роговицы над ОПК и протрузию у 1 кролика (1 глаз) в группе 1 на 30 сутки.

Протрузия ОПК, наблюдаемая в 1 группе, вероятно, была связана с имплантацией в поверхностные слои стромы на глубину менее 160 мкм. При этом протрузия ОПК во 2 группе, вероятно, была обусловлена нарушением питания роговицы в области безъячеистой структуры ОПК, а также уменьшением размера ячеек к центру, с последующей потерей ее прозрачности и развитием асептического некроза, что было подтверждено результатами исследования на оптическом когерентном томографе.

На сроке наблюдения 90 дней после эксплантации ОПК по результатам световой микроскопии во всех случаях в проекции, располагавшейся ранее ОПК, визуализировали полость в строме центральных отделов, повторяющую ячеистую форму протеза. Роговица была эпителизирована не полностью, в строме передних отделов отмечали умеренный отек, в задних отделах патологических изменений выявлено не было. При этом в группе 1

визуализировали полость в строме с фрагментами капсулообразования, в группе 2 элементы капсулы в полости отсутствовали. Стоит отметить, что данные световой микроскопии совпадали с результатами электронно-микроскопических исследований. На поверхности ОПК 1-ой опытной группы наблюдали наличие новообразованной коллагеновой волокнистой ткани, заполняющей ячейки полимерной пластины в более выраженной степени, в отличие от 2-ой опытной и контрольной группы.

Стоит отметить, что в доступной зарубежной литературе найдены работы, посвященные разработке полимерных кератопротезов на основе гидрофобного акрила. Wolfgang Müller-Lierheim (2008 г.) и соавторы изучали биосовместимость кератопротеза на моделях 8 глаз кроликов в течение 3-х месяцев. С целью повышения адгезивных свойств материала использовали покрытие из фибронектина. В своей публикации авторы описывают течение послеоперационного периода в ранние и отдаленные сроки наблюдения и не отмечают развития выраженной воспалительной реакции, предложенная модель кератопротеза занимала стабильное положение. Однако по результатам гистологического исследования только в 2-х случаях разработанный кератопротез был прочно интегрирован в роговицу кроликов без признаков воспаления [92, 125].

Завершающим этапом диссертационной работы явилось конструирование новой модели кератопротеза из гидрофобного акрила на основе модели ОПК 1-ой опытной группы сетчатой структуры со сквозными квадратными отверстиями (200x200 мкм) толщиной 100 мкм и диаметром 8 мм. В центре опорной пластины располагается оптический цилиндр с оптической силой 14,5 D, диаметром 4мм, длина его наружной части 0,1 мм, внутренней – 0,05 мм. В ходе выполнения экспериментально-морфологического исследования *in vivo* на экспериментальных животных в количестве 7 кроликов. Также на основании сопоставления результатов морфологических и клинико-инструментальных методов исследований проводили наблюдение в течение 3 месяцев. В большинстве случаев

воспалительная реакция глаза отсутствовала (в 6 из 7). По данным световой микроскопии отмечено равномерное распределение коллагеновых волокон в области передней поверхности разработанного кератопротеза и истончения эпителия роговицы, которое, происходит ввиду увеличения натяжения слоев стромы роговицы, вызванного наличием кератопротеза, однако, с учетом особенностей строения роговицы экспериментального животного (кролика) и их отличий от роговицы человека, полученные данные могут иметь некоторые отличия при использовании данной модели в клинической работе [106, 108, 109]. Также отмечено вращение волокон новообразованной соединительной ткани в ячеистую структуру опорного элемента, плотно фиксируя кератопротез, что исключает его смещение в слоях роговицы и относительно оптической оси глаза.

Таким образом, с учетом результатов математического моделирования, физических аспектов и анатомо-топографических особенностей роговицы были разработаны ОПК различного дизайна, изготовленные из полимерного материала на основе гидрофобного акрила. На основании экспериментально-морфологических исследований доказана высокая степень адгезии клеток к моделям, по выраженности которой можно говорить о биосовместимости. В 1-ой опытной группе реакция со стороны стромы роговицы и прорастание волокнами соединительной ткани было больше, что обусловлено пористым строением изделий и физическими свойствами данного материала.

Проанализировав данные проведенных исследований на моделях *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* можно сделать общее заключение: выполненное экспериментальное исследование модели кератопротеза из нового эластичного гидрофобного полимера подтверждает его высокую биосовместимость, во всех случаях были получены позитивные результаты. В результате сложилось однозначное мнение о целесообразности его дальнейшего изучения в клинических условиях.

ВЫВОДЫ

1. На основании математического моделирования, базирующегося на учете анатомо-топографических и геометрических особенностей роговицы человека, рассчитаны оптимальные конфигурация и размеры новой модели кератопротеза: опорная пластина кератопротеза сферической формы толщиной 100 мкм, общим диаметром 8 мм с отверстиями размером 200x200 мкм; оптический цилиндр диаметром 4 мм; длиной его наружной части – 0,1 мм, внутренней – 0,05 мм.

2. В результате двумерного культивирования выделенных клеток стромы роговицы кадаверного глаза человека (*in vitro*) в присутствии опорной пластины кератопротеза из гидрофобного акрила доказано отсутствие токсичности исследуемого полимера, а также высокая способность к адгезии клеток стромы роговицы, что подтверждает его пригодность для его имплантации в толщу роговицы.

3. По данным сканирующей электронной микроскопии образцов кадаверных роговиц после проведенного органотипического культивирования в течение 3 месяцев было выявлено более выраженное капсулообразование на поверхности опорной пластины кератопротеза со сквозными квадратными отверстиями 200x200 мкм (в группе №1) по сравнению с опорной пластиной кератопротеза с отверстиями трапециевидной формы от 170x130 мкм до 180x70 мкм (во 2-й группе), что с нашей точки зрения обусловлено особенностями геометрии ячеистой структуры изделия.

4. Исследование морфофункциональных изменений роговицы кролика после имплантации опорных пластин различных моделей показало наличие выраженных структурных изменений роговичной ткани при имплантации опорной пластины с отверстиями 200x200 мкм (в группе №1) (в виде фиброзного капсулообразования), что подтверждает целесообразность

выбора данного образца в качестве прототипа опорного элемента для изготовления предложенной модели кератопротеза.

5. После имплантации новой модели кератопротеза с оптимизированной опорной пластиной в роговицу экспериментальных животных, к третьему месяцу наблюдения кератопротез занимал стабильное положение в сформированном интрастромальном кармане, воспалительная реакция глаза кролика в раннем и отдаленном послеоперационном периодах была минимальной или отсутствовала, что позволяет считать предложенную модель кератопротеза перспективной для применения в клинических условиях.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В качестве материала для изготовления опорного элемента кератопротеза целесообразно использовать гидрофобный акрил толщиной 100 мкм, общим диаметром 8 мм, размером пор 200x200 мкм и общей пористостью 67%.
2. Для серийного производства следует учитывать форму опорного элемента, изогнутую по радиусу кривизны роговицы, в сочетании с пластичностью материала (расчет минимально достаточной жесткости ОПК позволил получить значение $J_{\min} = 0,036 \text{ Н/мм}^2$) что в готовой модели способствует простоте техники имплантации предложенного опорного элемента.

ОСНОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ВГД – внутриглазное давление

Г-Э – гематоксилин-эозин

ДМАЭМ – диметиламиноэтилметакрилат

ИСК – интрастромальный карман

КСР – клетки стромы роговицы

ОКТ – оптическая когерентная томография

ООК – остео-одонто кератопротез

ООКП – остеоодонтокератопротезирование

ОПК – опорная пластина кератопротеза

ПММА – полиметилметакрилат

ПТФЭ – политетрафторэтилен

РНЕМА – поли-2-гидроксиэтилметакрилат

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ФЭМ – феноксиэтилметакрилат

2D – (англ. two-dimensional) двумерный

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бедило, В.Я. Сквозное протезирование «безнадежных» бельм / В.Я. Бедило // Офтальмол. журнал. – 1970. – №7. – С. 511 - 517.
2. Бедило, В. Я. Значение трансплантации тканей, профилактики разрушений роговицы при ее протезировании / В. Я. Бедило, В. И. Тарабукин // Офтальм. Журнал. – 1979. – №7. – С. 394-396.
3. Борзенко, С.А. Медико-технологические и методологические основы эффективной деятельности Глазных тканевых банков России в обеспечении операций по сквозной трансплантации роговицы: дис... д-ра мед. наук:14.00.08 / Борзенко Сергей Анатольевич – М., 2008. – 306 с.
4. Борзенко, С.А., Мороз, З.И., Калинин, Ю.Ю. Средство для консервации донорской роговицы с опорным элементом кератопротеза // Патент РФ № 2204247 от 27.11.2003.
5. Власова, В.А. Медико-технологические аспекты реконструкции переднего отрезка глаза на базе пересадки роговично-протезного комплекса у пациентов с сосудистым бельмом IV категории: дис. ... канд. мед. наук:14.01.07 / Власова Виктория Александровна – М., 2015. – 189 с.
6. Волкова, О.С. Новая модель кератопротеза в лечении бельм различной этиологии: дис. ... канд. мед. наук:14.01.07 / Волкова Ольга Сергеевна – М., 1992. – 110 с.
7. Глазко, В.И. Профилактика и лечение осложнений сквозного кератопротезирования: Автореф. дис. ... канд. мед. наук:14.01.07 / Глазко Валерий Иванович – М., 1983. – 24 с.
8. Григолюк, Э.И. Перфорированные пластины и оболочки/ Э.И. Григолюк, Л.А. Филынтинский // М.: Наука. – 1970. –556 с.

9. Гундорова, Р.А. Травмы глаза / Р.А. Гундорова, А.А. Малаев, А.М. Южаков // М.: Медицина. – 1986. – 367 с.
10. Джавришвили, Г.В. Современные аспекты хирургического лечения ожоговых бельм: дис. ... д-ра мед. наук:14.01.08 / Джавришвили Георгий Вахтангович – М., 2004. – 296 с.
11. Еремеев, В. А. Механические проблемы в нано-технологии/ В. А. Еремеев, Е.А. Иванова, Н.Ф. Морозов // Известия Саратовского ун-та, Серия Математика, Механика, Информатика. – 2008. – Т. 8, №3. – С. 25-32.
12. Животовский, Д.С. Применение внутрироговичных пластмассовых линз в эксперименте и в клинике / Д.С. Животовский // Вестник офтальмологии. – 1972. – №. 2. – С. 38-45.
13. Зуев, В.К. Сквозное протезирование роговой оболочки при ожоговых бельмах: дис. ... канд. мед. наук:14.01.07 / Зуев Виктор Константинович – М., 1974. – 122 с.
14. Иомдина, Е.Н. Механические свойства тканей глаза человека / Е.Н. Иомдина // Современные проблемы биомеханики. – 2006. – Вып. №11. – С. 183-200.
15. Калинин, Ю.Ю. Оптическое биокератопротезирование ожоговых бельм: дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.08 / Калинин Юрий Юрьевич — М., 2005. — 303 с.
16. Каштанова, С.В. Деформирование и устойчивость пластин и оболочек наноразмерной толщины: Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук: 01.02.04 / С. В. Каштанова – СПб, 2017. –18 с.
17. Керимов, К.Т. Ожоги глаз: патогенез и лечение / К.Т. Керимов, А.И. Джафаров, Ф.С. Гахраманов // – М.: Издательство РАМН. – 2005. – 464 с.
18. Макаров, П.В. Осложнения тяжелой ожоговой травмы глаз: патогенез, анализ причин, профилактика и возможные пути оптимизации

- результатов лечения: дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.08 / Макаров Павел Васильевич – М., 2003. – 335с.
19. Макаров, П. В. Оптическое кератопротезирование протезами Фёдорова-Зуева у пациентов, перенесших особо тяжелые ожоги глаз / П.В. Макаров, Р.А. Гундорова, И. С. Чернетский // Офтальмохирургия. – 2007. – № 3. – С. 20-23.
 20. Мороз, З.И. Медико-технологическая система оптического кератопротезирования: дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.08 / Мороз Зинаида Ивановна — М., 1987. — 312 с.
 21. Мороз, З.И. Осложнения при сквозном кератопротезировании / З.И. Мороз, В.К. Зуев // Всесоюзный IV съезд офтальмологов. – Киев. – 1973. – С. 630-633.
 22. Нероев, В.В. Ожоги глаз / В.В. Нероев, Р.А. Гундорова, П.В. Макаров // М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2013. – 224 с.
 23. Поручикова, Е.П. Разработка и экспериментальное обоснование новой модели роговичных сегментов для лечения кератэктазий различного генеза: дис. ... канд. мед. наук: 14.01.07 / Поручикова Евгения Павловна – М., 2017. – 203 с.
 24. Пучковская, Н.А. Отдаленные результаты кератопротезирования / Н.А. Пучковская, С.А. Якименко, Е.А. Голубенко // Офтальмол. журн. – 1979. – № 7. – С. 388 - 391.
 25. Пучковская, Н.А. Ожоги глаз / Н.А. Пучковская, С.А. Якименко, В.М. Непомнящая // – М.: Медицина. – 2001. – 271 с.
 26. Ронкина, Т.И. Особенности регенерации роговой оболочки при различных видах повреждений / Т.И. Ронкина, С.Н. Багров // М.: Морфологические аспекты офтальмологии. – 1983. – С. 49- 51.
 27. Семенова, Н.В. Восстановительная пластика конъюнктивальных сводов и усиление прочностных свойств бельма при кератопротезировании: Автореф. дис. ... канд. мед. наук:14.01.07 / Семенова Н.В. – М., 2001. – 19 с.

28. Ушаков, Н. А. О выборе рационального способа укрепления бельма в интересах сквозного кератопротезирования / Н. А. Ушаков // Вестник офтальмологии. – 1973. – №2. – С. 7-10.
29. Федоров, С.Н. Кератопротезирование / С.Н. Федоров, З.И. Мороз, В.К. Зуев // – М.: Медицина. – 1982. – 143 с.
30. Федоров, С.Н. Новый способ кератопротезирования истонченных сосудистых бельм /С.Н. Федоров, З.И. Мороз, Е.В. Ковшун // Офтальмохирургия. – 1995. – №2. – С. 50-53.
31. Федоров, С.Н. Сквозная кератопластика роговично-кератопротезного комплекса / С.Н. Федоров, З.И. Мороз, Ю.Ю. Калинин // Anales del instituto Barraquen Barselona. – 1999. – Vol.28. – P. 63-64.
32. Филатов, В.П. Выработка категорий бельм для пересадки роговой оболочки / В.П. Филатов, Д.Г. Бушмич // Офтальмол. журнал. – 1947. – № 2. – С.9-14.
33. Фролова, И.А. Численное моделирование изгиба густо перфорированных пластин / И.А. Фролова, А.А. Антипов, М.Н. Жестков, В.А. Иванов // Проблемы прочности и пластичности. Межвуз. Сб. Нижний Новгород. Изд-во ННГУ. – 2015. – Т.77, №4. – С. 360-366.
34. Хапчаев, Р.Т. Биоинтегрируемый опорный элемент для кератопротезирования из плитетрафторэтилена (экспериментальное исследование): дис. ... к-та мед. наук: 14.01.07 / Хапчаев Р.Т. – СПб., 2006. – 111 с.
35. Хартманн, У. Очарование нанотехнологий / У. Хартманн пер. с нем. – 2-е изд., испр. – М.: БИНОМ, Лаборатория знаний, 2010. – 173 с.
36. Чернетский, И.С. Об истории и перспективах кератопротезирования / И.С. Чернетский, П.В. Макаров, Д.С. Беляев, И.А. Кузнецова // Российский офтальмологический журнал. – 2009. – № 2. – С. 47-51.
37. Черныш, В.Ф. Ожоги глаз – состояние проблемы и новые подходы / В.Ф. Черныш, Э.В. Бойко // СПб.: ВМедА. – 2008. – 135 с.

38. Шехтер, А.Б. Тканевая реакция на имплантат / А.Б. Шехтер, И.Б. Розанова // Биосовместимость. – М. – 1999. – С. 174 - 211.
39. Шипунова, А.В. Медико-биологические аспекты конструирования биокератопротезного комплекса с использованием культивированных фибробластов: дис. ... к-та мед. наук: 14.01.07 / Шипунова Анна Владимировна — М., 2012. — 134 с.
40. Якименко, С. А. Двухэтапный метод кератопротезирования с одномоментным интраламеллярным укреплением бельма / С. А. Якименко // Международная конференция офтальмологов городов-побратимов Одессы Тез. докл. Одесса. – 1981. – С. 83-86.
41. Alio, J.L. Five year follow up of biocolonisable microporous fluorocarbon haptic (BIOKOP) keratoprosthesis implantation in patients with high risk of corneal graft failure / J.L. Alio, M.E. Mulet, H. Haroun, J. Merayo, J.M. Ruiz Moreno // Br Journal of Ophthalmology. – 2004. – Vol. 88, № 12. – P. 1585-1589.
42. Ansteinsson, V. Cell toxicity of methacrylate monomers-the role of glutathione adducts formation/ V. Ansteinsson, H.B. Kopperud, E. Morisbak, J.T. Samuelsen // J Biomed Mater Res A. – 2013. – Vol. 101, № 12. – P. 3504-3510.
43. Armitage, W.J. The first successful full-thickness corneal transplant: a commentary on Eduard Zirm's landmark paper of 1906 / W.J. Armitage, A.B. Tullo, D.F. Larkin // Br J Ophthalmol. – 2006. – Vol. 90, № 10. – P. 1222-1233.
44. Avadhanam, V.S. Keratoprostheses for corneal blindness: a review of contemporary devices / V.S. Avadhanam, H.E. Smith, C. Liu // Clin Ophthalmol. – 2015. – Vol. 9. – P. 697–720.
45. Barber, J. C. Keratoprosthesis: past and present / J. C. Barber // Int. Ophthalmol. Clin. – 1988. – Vol. 28, № 2. – P. 103-109.
46. Barraquer, J. Surgical treatment of corneal disease / J. Barraquer // Amer. J. Ophthalmol. – 1965. – Vol. 56, № 2. – P.213-222.

47. Behlau, I. Infectious endophthalmitis in Boston keratoprosthesis: Incidence and prevention / I. Behlau, K.V. Martin, J.N. Martin, E.N. Naumova, J.J. Cadorette, J.T. Sforza, R. Pineda // *Acta Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 92. – P. 546–555.
48. Binder, H. Experiments on plexiglass corneal implants / H. Binder, R. Binder // *Amer. J. Ophthalmol.* – 1956. – Vol. 41, № 5. – P.793-777.
49. Bock, R.H. Corneal fluid metabolism / R.H. Bock, A.H. Maumenee // *Arch Ophthalmol.* – 1953. – Vol. 50. – P. 282-285.
50. Cardona, H. Keratoprosthesis, acrylic optical cylinder with supporting intralamellar plate / H. Cardona // *Am. J. Ophthalmol.* – 1962. – Vol. 54. – P. 284-294.
51. Cardona, H. Plastic keratoprosthesis - a description of plastic material and comparative, histologic study of recipient corneas / H. Cardona // *Am. J. Ophthalmol.* – 1964. – Vol.58. – P. 247-252.
52. Cardona, H. Hushroom transcorneal keratoprosthesis (bolt and nut) / H. Cardona // *Am. J. Ophthalmol.* – 1969. – Vol. 95, № 4. – P. 604-612.
53. Cardona, H. Prosthokeratoplasty / H. Cardona, A.G. De Voe // *Trans. Amer. Acad. Ophthalmol. Otolaringol. M.A.* – 1977. – Vol. 83, № 2. – P. 271-280.
54. Cardona, H. The Cardona keratoprosthesis, 40 years' experience / H. Cardona // *Refract. Corneal Surg.* – 1991. – Vol. 7, № 6. – P. 468-471.
55. Castroviejo, R. Panel eight / R. Castroviejo // *In: The Cornea World Congress. Washington.* – 1965. – P. 685-692.
56. Castroviejo, R. Present status of prosthokeratoplasty / R. Castroviejo, H. Cardona, A.G. De Voe // *Amer. J. Ophthalmol.* – 1969. – Vol. 68, № 4. – P. 613-625.
57. Chan, G.N. Approaches to improving the biocompatibility of porous perfluoropolyethers / G.N. Chan, T.C. Hughes, K.M. McLean, G. McFarland, X.N. Nguyen, J.S. Wilkie, G. Johnson // *Biomaterials.* – 2006. – Vol.27. – P. 1287-1293.

58. Chew, H.F. Boston keratoprosthesis outcomes and complications / H.F. Chew, B.D. Ayres, K.M. Hammersmith, C.J. Rapuano, P.R. Laibson, J.S. Myers et al. // *Cornea*. – 2009. – Vol.28. – P. 989–996.
59. Chirila, T.V. Poly (2-hydroxyethyl methacrylate) sponges as implant materials: In vivo and in vitro evaluation of cellular invasion/ T.V. Chirila, I.J. Constable, G.J. Crawford et al. // *Biomaterials*. – 1993. – Vol. 14, № 1. – P. 26-38.
60. Chirila, T.V. Interpenetrating polymer network (IPN) as a permanent joint between the elements of a new type of artificial cornea / T.V. Chirila, S. Vijayasekaran, R. Horne, Y.C. Chen, P.D. Dalton, I.J. Constable, G.J. Crawford // *J Biomed Mater Res*. – 1994. – Vol. 28. – P. 745-753.
61. Chirila, T.V. Interpenetrating polymer network (IPN) as a permanent joint between the elements of a new type of artificial cornea / T.V. Chirila, S. Vijayasekaran, R. Horne, Y.C. Chen, P.D. Dalton, I.J. Constable et al. // *J Biomed Mater Res*. – 1994. – Vol. 28. – P. 745–753.
62. Chirila, T.V., The origins of the artificial cornea: Pellier de Quengsy and his contributions to the modern concept of keratoprosthesis / T.V. Chirila, C.R. Hicks // *Gesnerus*. –1999. – Vol. 56. – P. 96–106.
63. Chirila, T.V. An overview of the development of artificial corneas with porous skirts and the use of PHEMA for such an application / T.V. Chirila // *Biomaterials*. –2001. – Vol. 22, № 24. – P. 331-337.
64. Chirila, T.V. First development of a polyurethane keratoprosthesis and its Australian connection: an unbeknown episode in the history of artificial cornea / T.V. Chirila // *Clin. Exp. Ophthalmol*. – 2006. – Vol.34, № 5. – P. 485-488.
65. Choyce, D.P. Management of endothelial corneal dystrophy with acrylic cornea 1 inlays II / D.P. Choyce // *Br. J. Ophthalmol*. –1965. –Vol.49, №8. – P. 432-440.
66. Choyce, D.P. Keratoprosthesis / D.P. Choyce // *Amer. J. Ophthalmol*. – 1980. – Vol. 89, № 1. –P. 152-153.

67. Choyce, D.P. Evolution of Choyce 2-piece multistage perforating keratoprosthesis technique: 1967–1978 / D.P. Choyce // *Ann Ophthalmol.* – 1980. – Vol.12. – P. 740–743.
68. Crawford, G.J. Tissue interaction with hydrogel sponges implanted in the rabbit cornea / G.J. Crawford, L.J. Constable, T.V. Chirila, S. Vijayasekaran, D.E. Thompson // *Cornea.* – 1993. – Vol. 12. – P. 348-357.
69. Cruzat, A. Wound anatomy after type 1 Boston KPro using oversized back plates / A. Cruzat, A. Shukla, C.H. Dohlman, K. Colby // *Cornea.* – 2013. – Vol. 32. – P. 1531–1536.
70. Curecek, R. Mesh fixation in laparoscopic reconstruction of inguinal hernias / R. Curecek, Z. Adamova, O. Cech // *Rozhl Chir.* – 2019. – Vol. 98, № 7. – P. 282-286.
71. Day, R. Artificial corneal implants (implantation of plastic discs in cats and rabbits) / R. Day // *Trans Am Ophthalmol Soc.* – 1957. – Vol. 55. – P. 455-475.
72. Dohlman, C.H. Synthetic polymers in corneal surgery / C.H. Dohlman, M.F. Refojo, J. Rose // *Arch. Ophthalmol.* – 1967. – Vol. 77. – P. 252-257.
73. Dohlman, C.H. Prosthokeratoplasty / C.H. Dohlman, H.A. Schneider, M.G. Doane // *Am. J. Ophthalmol.* – 1974. – Vol. 77. – P. 694–770.
74. Dohlman, C.H. Introduction to the use of the Boston Keratoprosthesis / C.H. Dohlman, M. Harissi-Dagher, B.F. Khan, K. Sippel, J.V. Aquavella, J.M. Graney // *Expert Rev. Ophthalmol.* – 2006. – Vol. 1. – P. 41–48.
75. Dravida, S. A biomimetic scaffold for culturing limbal stem cells: a promising alternative for clinical transplantation / S. Dravida, S. Gaddipati, M. Griffith, K. Merrett, S. Lakshmi Madhira, V.S. Sangwan, G.K. Vemuganti // *J Tissue Eng Regen Med.* – 2008 Jul. – Vol. 2, № 5. – P. 263-271.
76. Duncker, Gernot I. W. The fully synthetic, bio-coated MIRO® CORNEA UR keratoprosthesis: development, preclinical testing, and first clinical results / Gernot I. W. Duncker, J. Storsberg, W. G. K. Müller-Lierheim // *Spektrum der Augenheilkunde.* – 2015. – Vol. 28, № 6. – P. 250-260.

77. Falcinelli, G. Modified osteo-odonto-keratoprosthesis for treatment of corneal blindness: Long-term anatomical and functional outcomes in 181 cases / G. Falcinelli, B. Falsini, M. Taloni, P. Colliardo, G. Falcinelli // *Arch. Ophthalmol.* – 2005. – Vol. 123. – P. 1319–1329.
78. Ghaffariyeh, A. Fyodorov-Zuev keratoprosthesis implantation: long-term results in patients with multiple failed corneal grafts / A. Ghaffariyeh, N. Honarpisheh, A. Karkhaneh et al. // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2011. – №1. – P. 93-101.
79. Girard, L. Keratoprosthesis / L. Girard // *Cornea.* 1983. – Vol. 2, № 3. – P. 207-224.
80. Gomma A. Keratoprosthesis in clinical practice – a review / A. Gomma, O. Comyn, C. Liu // *Clin Experiment Ophthalmol.* – 2010. – Vol. 38, № 2. – P. 211–214.
81. Hicks, C.R. Indications and technique: AlphaCor artificial cornea / C.R. Hicks, G.J. Crawford // *Tech Ophthalmol.* – 2003. – Vol. 1. – P. 151–155.
82. Hicks, C.R. Corneal replacement using a synthetic hydrogel cornea, AlphaCor: device, preliminary outcomes and complications / C.R. Hicks, G.J. Crawford, X. Lou, D.T. Tan, Snibson, G.R. Sutton G., N. Downie, L. Werner, T.V. Chirila, I.J. Constable // *Eye.* – 2003. – Vol.17, № 3. – P. 385-392.
83. Hicks, C.R. AlphaCor - Clinical outcomes / C.R. Hicks, G.J. Crawford, J.K.G. Dart // *Cornea.* – 2006. – Vol. 25, № 9. – P. 1034 – 1042.
84. Hille, K. Keratoprosthesis / K. Hille // *Clinical aspects. Ophthalmology.* – 2002. – Vol.99. – P. 523–531.
85. Hollick, E.J. Legeais BioKpro III keratoprosthesis implantation: long term results in seven patients / E.J. Hollick, S.L. Watson, J.K.G. Dart // *Br J Ophthalmol.* – 2006– Vol. 90, № 9. – P. 1146 – 1151.
86. Huang, Y.X. An active artificial cornea with the function of inducing new corneal tissue generation in vivo - a new approach to corneal tissue engineering / Y.X. Huang, Q.-H. Li // *Biomed. Mater.* – 2007. – Vol. 2. – P. 121 - 125.

87. Huang, Y. X. Moscow eye microsurgery complex in Russia keratoprosthesis in Beijing Ophthalmology / Y. X. Huang, J. Yu, L. Liu, G. Du // Am. J. Ophthalmol. – 2011. – Vol. 118, № 1. – P. 41-46.
88. Jacob-LaBarre, J.T. Development of a new type of artificial cornea for treatment of endstage corneal diseases / J.T. Jacob-LaBarre, D.R. Caldwell // Progress in Biomedical Polymers. – 1990. – P. 27-39.
89. Jacob-LaBarre, J.T. Synthetic scleral reinforcement materials: 1: Development and in vivo tissue biocompatibility response / J.T. Jacob-LaBarre, M. Assouline, T. Byrd, M. McDonald // J. Biomed. Mater. Res. – 1994. – Vol. 28, № 6. – P. 699-712.
90. Jiraskova, V. AlphaCor artificial cornea: Clinical outcome / V. Jiraskova, P. Rozsival, M. Burova, M. Kalfertova // Eye (Lond.) – 2011. – Vol. 25. – P. 1138-1146.
91. Keeler, R. Guillaume Pellier de Quengsy: a bold eye surgeon / R. Keeler, A.D. Singh, H.S. Dua // Br. J. Ophthalmol. – 2014. – Vol. 98. – P. 576-578.
92. Kobuch, K.A. Towards an artificial cornea: evaluation of a new designed hydrophobic one-material implant with modified surfaces in vitro and in vivo / K.A. Kobuch // ARVO Meeting Abstracts. – 2008. – Vol. 49. – P. 5706-5717.
93. Legeais, J.M. Effects of pore diameter on corneal ingression patterns in expanded polytetrafluoroethylene / J.M. Legeais, G. Renard, J.M. Parel // Invest Ophthalmol Vis Sci – 1992.– Vol. 33. – P. 992-1001.
94. Legeais, J.M. Novel biocolonizable intrastromal keratoprosthesis. First year study in human / J.M. Legeais, G. Renard, Y. Pouliquen // Invest Ophthalmol Vis Sci – 1993. – Vol. 34 (Suppl) – P. 1367-1374.
95. Legeais, J.M. Expanded fluorocarbon for keratoprosthesis cellular ingrowth and transparency / J.M. Legeais, G. Renard, J. M. Parel, O. Serdarevic, M. Mei-Mui, Y. Pouliquen // Exp. Eye Res. – 1994. – Vol. 58, № 1. – P. 41-51.
96. Li, F. Cellular and nerve regeneration within a biosynthetic extracellular matrix for corneal transplantation / F. Li, D. Carlsson, C. Lohman, E.

- Suuronen, S. Vascotto, K. Kobuch, H. Sheardown, R. Munger, M. Nakamura, M. Griffith // PNAS – 2003. – Vol. 100. – P. 15346-15351.
97. Liu, C. The osteo-odonto-keratoprosthesis (OOKP) / C. Liu, B. Paul, R. Tandon, E. Lee, K. Fong, I. Mavrikakis, J. Herold, S. Thorp, P. Brittain, I. Francis // Semin. Ophthalmol. – 2005. – Vol. 20. – P. 113-128.
98. Liu, L. Glucose permeable poly (dimethyl siloxane) poly(N-isopropylacrylamide) interpenetrating networks as ophthalmic biomaterials / L. Liu, H. Sheardown // Biomaterials – 2005. – Vol. 26. – P. 233-244.
99. Liu, C. Visual rehabilitation in end-stage inflammatory ocular surface disease with the osteo-odontokeratoprosthesis: results from the UK / C. Liu, S. Okera, R. Tandon, J. Herold, C. Hull, S. Thorp // Br J Ophthalmol. – 2008. – Vol. 92. – P. 1211-1217.
100. Liu, C. Keratoprosthesis surgery / C. Liu, K. Hille, Tan D., Hicks C., Herold J. // Dev Ophthalmol. – 2008. – Vol. 41. – P. 171-186.
101. Maskati, Q.B. Asian experience with the Pintucci keratoprosthesis / Q.B. Maskati, B.T. Maskati // Indian J Ophthalmol. – 2006. – Vol. 54. – P. 89-94.
102. Mester, U. Experiences in animal experiments with hydrogel keratoprosthesis of different water content / U. Mester // Ophthalmologica. – 1979. – Vol. 179, № 1. – P. 62-69.
103. Michael, R. Long-term functional and anatomical results of osteo- and osteo-odonto-keratoprosthesis / R. Michael, V. Charoenrook, W. Hitzl, J. Temprano, R.I. Barraquer // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. – 2008. – Vol. 246. – P. 1133–1137.
104. Miller, R.E. Size-dependent elastic properties of nanosized structural elements / R.E. Miller, V.B. Shenoy // Nanotechnology. – 2000. – Vol. 11. – P. 139-147.
105. Moroz, Z.I. Achievements of SN. Fyodorov's school in the field of keratoplasty and cornea replacement / Z.I. Moroz, Iu.Iu. Kalinnikov, E.V. Kovshun, S.A. Borzenok, Iu.A. Komakh // Vestn Ross Akad Med Nauk. – 2007. – Vol. 8. – P. 16-20.

106. Myung, D. Design and fabrication of an artificial cornea based on a photolithographically patterned hydrogel construct / D. Myung, W. Koh, A. Bakri // *Biomedical Microdevices*. – 2007. – Vol. 9, № 6. – P. 911–922.
107. Myung, D. Biomimetic strain hardening in interpenetrating polymer network hydrogels / D. Myung, W. Koh, J. Ko, Y. Hu, M. Carrasco, J. Noolandi, C. N. Ta, C. W. Frank // *Polymer*. – 2007. – Vol. 48. – P. 5376-5387.
108. Myung, D. Glucose-permeable interpenetrating polymer network hydrogels for corneal implant applications: A pilot study / D. Myung, N. Farooqui, D. Waters, S. Schaber, W. Koh, M. Carrasco, J. Noolandi, C.W.Frank, C.N.Ta // *Current Eye Research*. – 2008. – Vol. 33. – P. 29–43.
109. Myung, D. Development of Hydrogel-Based Keratoprostheses: A Materials Perspective / D. Myung, P-E. Duhamel, J.R. Cochran, J. Noolandi, C.W. Frank // *Biotechnology Progress*. Jun – 2008. – Vol. 24, Issue 3. – P. 735-741.
110. Nusbaum, N. Cornea artificialis, ein Substitut fur die Transplantatio Cornea / N. Nusbaum // *Deutsche Klinik*. – 1853. – p. 367.
111. Oliva, M.S. Turning the tide of corneal blindness / M.S. Oliva, T. Schottman, M. Gulati // *Indian J Ophthalmol*. – 2012. – Vol. 60, № 5. – P.423–427.
112. Pineda, R.S. The KeraKlear artificial cornea: A novel keratoprosthesis / R.S. Pineda, Y. Shiuey // *Tech. Ophthalmol*. – 2009. – Vol. 7. – P. 101–106.
113. Pintucci, S. New Dacron tissue colonisable keratoprosthesis: Clinical experience / S. Pintucci, F. Pintucci, M. Cecconi, S. Caiazza // *Br J Ophthalmol*. – 1995. – Vol. 79. – P. 825–829.
114. Pintucci, S. The Dacron felt colonizable keratoprosthesis, after 15 years / S. Pintucci, F. Pintucci, S. Caiazza, M. Cecconi // *Eur. J. Ophthalmol*. – 1996. – Vol. 6, № 2. – P.125-130.
115. Pintucci, S. Influence of Dacron tissue thickness on the performance of the Pintucci biointegrable keratoprosthesis: an in vitro and in vivo study / S. Pintucci, R. Perilli, G. Formisano, S. Caiazza // *Cornea*. – 2001. – Vol. 20, № 6. – P. 647-650.

116. Polack, F.M. Corneal optical prostheses / F.M. Polack // *Br J Ophthalmol.* – 1971. – Vol. 55. – P. 838-843.
117. Pintucci, S. The dacron felt colonizable keratoprosthesis: after 15 years / S. Pintucci, F. Pintucci, S. Caiazza, M. Cecconi // *Eur J Ophthalmol.* – 1996. – Vol. 6, № 2. – P. 125–130.
118. Puri, G. Effect of phosphate group addition on the properties of denture base resins / G. Puri, D.W. Berzins, V.B. Dhuru, P.A. Raj, S.K. Rambhia, G. Dhir, A.R. Dentino // *J Prosthet Dent.* – 2008. – Vol. 100, № 4. – P. 302-308.
119. Resnikoff, S. *Bull World Health Organ* / S. Resnikoff, D. Pascolini, S.P. Mariotti, Pokharel G.P. // 2008. – Vol. 86, № 1. – P. 63-70.
120. Riau, A. K. Surface Modifications of the PMMA Optic of a Keratoprosthesis to Improve Biointegration / A. K. Riau, S.S. Venkatraman, C.H. Dohlman, J.S. Mehta // *Cornea.* – 2017. – Vol. 36, Suppl 1. – P. 15-25.
121. Ridley, H. Intraocular acrylic lenses / H. Ridley // *Trans. Ophthalmol. Soc. UK.* – 1951. – Vol.71, № 4. – P.617-627.
122. Salvador-Culla, B. Keratoprosthesis: A Review of Recent Advances in the Field / B. Salvador-Culla, E. Paraskevi // *J Funct Biomater.* – 2016. – Vol.7, № 2. – P. 13-29.
123. Salvador-Culla, B. Titanium coating of the Boston Keratoprosthesis / B. Salvador-Culla, K.J. Jeong, P.E. Kolovou, H.H. Chiang, J. Chodosh, C.H. Dohlman, D.S. Kohane // *Transl. Vis. Sci. Technol.* – 2016. – Vol. 5 – P. 17-26.
124. Sandeman, S.R. Novel materials to enhance keratoprosthesis integration / S.R. Sandeman, R.G. Faragher, M.C. Allen, C. Liu, A.W. Lloyd // *Brit J Ophthalmol.* – 2000. – Vol. 84, № 6. – P. 640-649.
125. Schrage, N.K. Current treatment options with artificial corneas: Boston Kpro, Osteo-odontokeratoprosthesis, Miro Cornea and KeraKlear / N.K. Schrage, K. Hille, C. Cursiefen // *Ophthalmology.* – 2014. – Vol.111. – P. 1010–1018.

126. Schroder, E. Hydroxyapatite chromatography: altering the phosphate-dependent elution profile of protein as a function of pH / E. Schroder, T. Jonsson, L. Poole // *Anal Biochem.* – 2003. – Vol. 313, № 1. – P. 176–178.
127. Shenoy, V.B. Atomistic calculations of elastic properties of metallic for crystal surfaces / V.B. Shenoy // *Phys. Rev.* – 2005. – Vol. 71, № 9. – P. 94–104.
128. Smetana, K. Intraocular biocompatibility of hydroxyethyl methacrylate and methacrylic acid copolymer/partially hydrolyzed poly (2-hydroxyethyl methacrylate) / K. Smetana, J. Sulc, Z. Krcova, S. Pitrova // *J Biomed Mater Res.* – 1987. – Vol. 21, № 10. – P. 1247-1253.
129. Stone, W.I. Experimental study of plastic material as replacement for the cornea. A preliminary report / W.I. Stone, E. Herbert // *Amer. J. Ophthalmol.* – 1953. – Vol. 36, № 6. – P.168-173.
130. Strampelli, B. Keratoprosthesis with osteodental tissue / B. Strampelli // *Am J Ophthalmol.* – 1963. – Vol. 89. – P.1029–1039.
131. Strampelli, B. Osteo-odonto-keratoprosthesis / B. Strampelli // *Ann. oftalmol.* – 1970. – Vol. 96. – P.51-57.
132. Temprano, J. Keratoprosthesis with tibial autograft / J. Temprano // *Refract Corneal Surg.* –1993. – Vol. 9. – P.192-193.
133. Trinkaus-Randall, V. In vitro evaluation of fibroplasia in a porous polymer / V. Trinkaus-Randall, J. Capecchi, L. Sammon // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 1990. – Vol. 31, № 7. – P. 1321-1326.
134. Vijayasekaran, S. Calcification of poly (2- hydroxyethyl methacrylate) hydrogel sponges implanted in the rabbit cornea, a 3-month study / S. Vijayasekaran, T. V. Chirila, T. A. Robertson, X. Lou, J. H. Fitton, C. R. Hicks, I. J. Constable // *J. Biomater. Sci. Polym.* – 2000. – Vol. 11, № 6. – P. 599-615.
135. Wang, L. Hydroxyapatite for keratoprosthesis biointegration / L. Wang, K.J. Jeong, H.H. Chiang, D. Zurakowski, I. Behlau, J. Chodosh, C.H. Dohlman, R.

Langer, D.S. Kohane // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2011. – Vol. 52 – P. 7392–7399.

136. Zavala, E.Y. Keratocyte attachment to hydrogel materials / E.Y. Zavala, S. Nayak, J.K. Deg, P.S. Binder // *Curr Eye Res.* –1984. – Vol. 3, № 10. – P. 1253-1262.