

ЭНКИНА АННА ВЛАДИМИРОВНА

**РАЗРАБОТКА И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ
НОВОЙ МОДЕЛИ КЕРАТОПРОТЕЗА**

14.01.07 – глазные болезни

14.01.24 – трансплантология и искусственные органы

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

Малюгин Борис Эдуардович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕН, заместитель генерального директора по научной работе ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России

Борзенко Сергей Анатольевич – доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕН, руководитель центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России

Официальные оппоненты:

Калинников Юрий Юрьевич – доктор медицинских наук, профессор кафедры глазных болезней Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова

Астрелина Татьяна Алексеевна – доктор медицинских наук, руководитель Центра биомедицинских технологий ФГБУ «ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна» ФМБА России

Ведущая организация: ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России

Защита состоится «21» сентября 2020 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д.208.014.01 при ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России по адресу: 127486, г. Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59А.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России по адресу: 127486, г. Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59А.

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

И.А. Мушкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

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 (Кобаева 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; Choysе 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 C., 1998; Chirila T.V., 2001; Калинин Ю.Ю., 2005; Макаров П.В., 2009; Акрек Е.К., 2014).

Существует несколько классификаций кератопротезов, основанных на типе фиксации (экстракорнеальный, интрастромальный, эпикорнеальный) и материале опорного элемента – синтетические: полиметилметакрилат (Choyce D.P., Dohlman C. H., 1967), дакрон (Pintucchi B., 1995), гидрогель (Hicks C.R., 2003), силикон, политетрафторэтилен (Legeais J.M., 1992), гидроксиапатит (Barraquer L., 1965) и коралл (Liu C., Hille K., 2008); биологические материалы, такие как зуб (Strampelli B., 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

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

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.

Положения, 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.

Внедрение в практику

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.

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.

Объем и структура диссертации

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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Для достижения поставленной цели работа была разделена на последовательные этапы, соответствующие задачам исследования.

Характеристика материала для опорной пластины кератопротеза (ОПК)

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.

Математическое моделирование

На первом этапе работы проводили математическое моделирование конструктивных параметров опорной пластины кератопротеза – диаметра, радиуса кривизны, толщины, размера отверстий с учетом анатомо-топографических особенностей роговицы человека. Для этого определяли минимально достаточную жесткость (J_{\min}) опорной пластины кератопротеза, которая обеспечивает ее минимальную безопасную деформацию. Далее оптимизировали конструктивные параметры ОПК таким образом, чтобы при варьировании параметров жесткость моделируемого варианта ОПК не была ниже значения минимально достаточной жесткости.

При выбранном материале акриле – главным практическим средством увеличения жесткости является маневрирование геометрическими параметрами ОПК. На жесткость существенно влияют размеры и форма поперечных сечений.

Момент инерции поперечного сечения пропорционален произведению ширины полосок сетки ОПК на куб толщины. Если разделить ОПК на одинаковые элементарные малые квадратные элементы с одним отверстием в центре, то структурным элементом ОПК будет являться квадрат. Пористость (γ) ОПК будет равна отношению площади отверстия к площади этого квадрата. Следовательно, формула расчета жесткости будет представлена в виде зависимости коэффициента снижения жесткости ОПК (r) от величины пористости материала (γ):

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

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

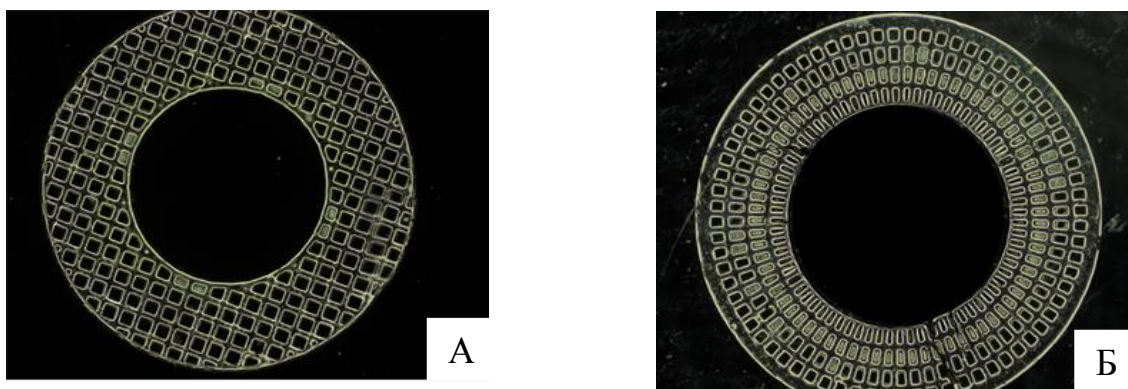
Общая площадь всех отверстий в опорном элементе составляет 17,5 мм², площадь всей поверхности (без учета сквозных отверстий) равна 26 мм². Соответственно, пористость опорного элемента кератопротеза составляет 67% от общей площади всей поверхности. По результатам математического моделирования было получено значение минимально достаточной жесткости ОПК, учитывая данные пористости опорного элемента, равное $J_{\min} = 0,036$ 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, общим диаметром 4 мм с радиусом кривизны 8 мм и толщиной 100 мкм. 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 малы. Выпуклая форма опорной пластины, в соответствии с теоремой Гаусса, гарантирует высокую изгибную жесткость при достаточно больших значениях радиуса кривизны.

Таким образом, 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.

Материалы и методы исследования

Согласно разработанному алгоритму доклинического исследования биосовместимость исследуемых моделей ОПК изучена на экспериментальных моделях: культура клеток стромы роговицы *in vitro*, кадаверной роговице человека *ex vivo* и на глазах экспериментальных животных (кроликов) *in vivo*. 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). 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) (рисунок 1).



А – модель №1; Б – модель №2

Рисунок 1 – Макрофотография экспериментальных полимерных ОПК

Экспериментально-морфологические исследования in vitro

Изучение пролиферативной активности и адгезивных свойств к поверхности ОПК проводили на экспериментальной модели двумерного культивирования выделенных клеток стромы роговицы (КСР). В 1-ую экспериментальную группу включили 4 образца ОПК модели №1. Ко 2-ой группе отнесли 4 образца ОПК модели №2. В контрольной группе суспензию клеток в таком же количестве

вносили в пустую чашку Петри ($d=35\text{мм}$). Данная группа была сформирована с целью контроля роста клеточной культуры. В условиях ламинара (Ламинарный бокс II класса безопасности MSC-Advantage, Technologies, Германия) стерильные образцы пинцетом помещали в чашки Петри ($d=35\text{мм}$) с добавлением культуры КСР объемом $3 \cdot 10^5/\text{мл}$. Проводили культивирование в стандартных условиях (температура 37°C , концентрация CO_2 – 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).

Экспериментально-морфологические исследования ex vivo

Для проведения третьего этапа работы было отобрано 12 кадаверных роговиц. В опытную группу №1 ($n=4$) вошли роговицы глаз, в строму которых имплантировали ОПК модели №1, в опытной группе №2 ($n=4$) имплантированными ОПК модели №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 CO_2 инкубаторе NU-5510 с концентрацией CO_2 5% при температуре $+37^\circ\text{C}$ в течение 3 месяцев. Замену среды производили каждые трое суток в связи с изменением показателя рН в сторону закисления и соответствующего ему изменения рН- индикатора среды. По окончании исследования оценивали на изучаемых поверхностях (поверхности ОПК, «крышки» и стромального «ложа»

роговицы) наличие клеток, новообразованных волокнистых соединительнотканых элементов с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (JEOL JSM-6000PLUS, Япония).

Экспериментально-морфологические исследования in vivo

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 модели №1. Во вторую группу вошли 5 кроликов (5 глаз), в роговицу которых имплантировали ОПК модели №2. Животным контрольной группы имплантировали 1/2 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 расщепителем формировали карман в центральной зоне роговицы диаметром 4 мм, что соответствовало диаметру ОПК. Опорные пластины имплантировали в сформированное роговичное ложе, на разрез накладывали узловыи 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 роговицы (ОКТ) (Optovue, США) в сроки 1, 3, 7, 14, 30 и 90 суток. На сроке 3 месяца животных выводили из эксперимента для проведения морфологических исследований.

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.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследования *in vitro*

При выполнении световой микроскопии в каждой из экспериментальных групп отмечали тенденцию к постепенному увеличению количества клеток от 1-х к 9-ым суткам наблюдения, что свидетельствовало о сохранении пролиферативной активности КСР в присутствии полимера. 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. В ходе выполнения клеточного культивирования, ожидаемым результатом явилось доказательство нетоксичной природы исследуемых моделей ОПК. 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 свидетельствовало об их потенциальной пригодности к интрастромальной имплантации. Однако данный

факт требовал дальнейшего изучения исследуемых изделий в условиях *ex vivo* и *in vivo*, с целью выявления наиболее подходящей модели опорного элемента.

Результаты исследования *ex vivo*

На сроке 90 суток органотипического культивирования при проведении СЭМ во всех образцах стромы роговицы было определено собственное вещество роговицы, представленное волокнистой структурой, состоящей из разно ориентированных коллагеновых волокон. При рассмотрении образцов контрольной группы на поверхности «ложа» и «крышки» интрастромального кармана (ИСК) выявили исчерченность, что соответствовало наличию коллагеновых волокон. Данная картина стала примером для сравнения изменений, возникающих в полости ИСК в опытных группах, где проводили имплантацию ОПК. На поверхности «крышки» и «ложа» интрастромального кармана опытной группы №2 определялась менее выраженная исчерченность коллагеновых волокон, по сравнению с группой №1. При выполнении СЭМ исследуемых моделей опорных пластин 1-ой группы отмечено образование фиброзной капсулы вокруг ОПК с проращением новообразованных волокон стромы роговицы в ячейки ОПК, при этом во 2-ой группе наблюдали единичные участки с волокнами стромы роговицы в ячейках ОПК модели №2 и отсутствие капсулообразования на ее поверхности. 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.

Результаты исследования *in vivo*

В ходе проведенного исследования при биомикроскопии у всех кроликов опытных групп в ранние сроки наблюдения (первые 3 суток) визуализировали незначительный отек роговицы в области операционного шва. Умеренная поверхностная инъекция сосудов конъюнктивы, расценивалась как ответная

реакция ткани на хирургическую травму, которая постепенно исчезала к 14-м суткам после операции. 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. Во 2-ой 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. Также в группе 2 (1 глаз) при биомикроскопии наблюдали помутнение передних слоев роговицы над ОПК на сроке 90 суток. 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 отделов стромы не наблюдали.

При выполнении ОКТ определяли глубину и равномерность залегания ОПК; толщину роговицы в проекции ОПК и вне её. Согласно результатам ОКТ, в 1-ой группе был выявлен 1 случай протрузии ОПК, 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. 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.

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. В обеих группах в строме передних отделов отмечали умеренный отек, в задних отделах признаков патологических изменений не выявлено. Во второй группе роговица была не полностью эпителизирована во всех случаях. Наблюдали последовательное истончение эпителия от периферии к центру, в центральных отделах эпителий отсутствовал. При этом в группе 1 визуализировали полость в строме с фрагментами капсулообразования, в группе 2 элементы капсулы в полости отсутствовали. 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.

Согласно результатам, СЭМ, 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, что совпадало с данными световой микроскопии. В опытных группах на поверхности роговичного «ложа» определяли комплементарно сформированные ячеистые структуры ОПК с наличием коллагеновых волокон. На поверхности роговичной «крышки» визуализировали подобные структуры с коллагеновыми волокнами различного диаметра и в меньшем количестве, по сравнению с поверхностью «ложа». 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.

Ввиду полученных данных, ОПК с отверстиями 200x200 мкм (группа №1) была определена перспективной для использования в качестве основы конструкции новой модели кератопротеза.

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, диаметром 4мм (d_1), длина его наружной части 0,1 мм (h_1), внутренней – 0,05 мм (h_2) (рисунок 2).

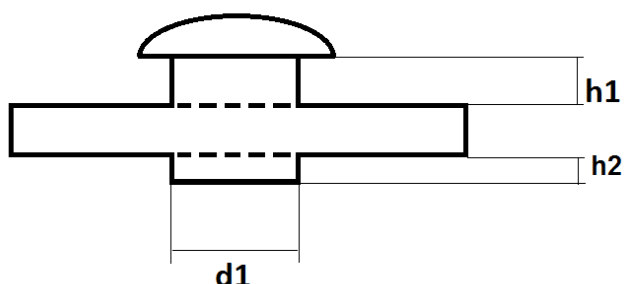


Рисунок 2 – Графическое изображение модели кератопротеза

Имплантиацию кератопротеза выполняли 7 кроликам при общей анестезии (севарановый наркоз). 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 ОКТ. На сроке 90 дней животных выводили из эксперимента для выполнения 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. В 1-м случае определяли истончение передних слоев стромы над оптической частью кератопротеза с язвенным дефектом. К трем месяцам наблюдения в указанном случае наблюдали сохранение язвенного дефекта стромы роговицы с последующей протрузией кератопротеза. 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).

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. К трем месяцам наблюдения при проведении ОКТ в вышеописанном 1-м случае, с выявленным при биомикроскопии язвенным дефектом над оптической частью кератопротеза, визуализировали истончение слоев роговицы в центре оптической части кератопротеза.

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. Воспалительных явлений отмечено не было. Гистологическая картина полностью соответствовала клинической картине по данным биомикроскопии.

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.

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.

Суммируя 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.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Энкина, А. В. Результаты хирургического лечения витреоретинальной патологии у пациентов с сосудистыми бельмами IV категории после кератопротезирования/ А.В. Энкина, Б.Э. Малюгин, А.В. Головин, Е.В. Ковшун, И.М. Горшков // Офтальмохирургия. – 2017. – № 4. – С. 31-36.

2. Энкина, А.В. Результаты экспериментального исследования новой модели опорной пластины кератопротеза / А.В. Энкина, Б.Э. Малюгин, А.В. Головин, Е.В. Ковшун, Е.В. Ерохина // Современные технологии в офтальмологии. – 2018. – № 4. – С. 282-286.

3. Энкина, А.В. Оценка морфологических изменений роговицы кролика при имплантации новой модели кератопротеза / А.В. Энкина, Б.Э. Малюгин, С.А. Борзенко, А.В. Головин, Е.В. Ковшун, А.В. Шацких и др. // Вестник офтальмологии. – 2020. – № 5. – С. 10-18.

ПАТЕНТ РФ НА ИЗОБРЕТЕНИЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., Ковшун Е.В., Головин А.В., Энкина А.В. Способ обработки донорской роговицы с проведением двухстороннего ультрафиолетового кросслинкинга для кератопротезирования осложненных сосудистых бельм 4-5 категории Патент РФ № 2613442. Оpubл. 16.03.2017 (Приоритет от 28.04.2016).

2. Малюгин Б.Э., Ковшун Е.В., Головин А.В., Энкина А.В. Способ формирования интрастромального кармана для имплантации кератопротеза с использованием фемтосекундного лазера Патент РФ № 2644850. Оpubл. 14.02.2018 (Приоритет от 20.04.2017).

БИОГРАФИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

Энкина Анна Владимировна, 1991 года рождения, в 2014 г. окончила Курский Государственный Медицинский Университет по специальности «Лечебное дело».

В период с 2014 по 2016 гг. проходила ординатуру по специальности «Офтальмология» в ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. С 2016 по 2019 г. обучалась в очной аспирантуре по специальности «Глазные болезни» на базе отдела трансплантационной и оптико-реконструктивной хирургии переднего отрезка глазного яблока в ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

В 2018 г. победитель XIII Всероссийской конференции молодых ученых с докладом на секции «Фундаментальные биомедицинские подходы к разработке инновационных методов лечения офтальмологической патологии».

Автор 3-х научных работ: из них 2 – в журналах, рецензируемых ВАК РФ; 2-х патентов РФ на изобретение.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- ВГД** – внутриглазное давление
- Г-Э** – гематоксилин-эозин
- ИСК** – интрастромальный карман
- КСР** – клетки стромы роговицы
- ОКТ** – оптическая когерентная томография
- ОПК** – опорная пластина кератопротеза
- ПММА** – полиметилметакрилат
- ПТФЭ** – политетрафторэтилен
- РНЕМА** – поли-2-гидроксиэтилметакрилат
- СЭМ** – сканирующая электронная микроскопия
- 2D** – (англ. two-dimensional) двумерный