

Поручикова Евгения Павловна

**РАЗРАБОТКА И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ НОВОЙ
МОДЕЛИ РОГОВИЧНОГО СЕГМЕНТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ КЕРАТЭКТАЗИЙ
РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА**

14.01.07 – глазные болезни

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2017

Работа выполнена в ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза»
им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России

Научный руководитель:

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

Официальные оппоненты:

Калинников Юрий Юрьевич – доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕН, врач-офтальмолог высшей категории ФГБУ «Клиническая больница» Управления делами Президента РФ

Оганесян Оганес Георгиевич - доктор медицинских наук, профессор, старший научный сотрудник отдела травматологии и реконструктивной хирургии ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт глазных болезней»

Защита диссертации состоится 19 июня 2017 года в _____ часов на заседании Диссертационного совета № Д.208.014.01 при ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России по адресу: 127486, Москва, ул. Бескудниковский бульвар, дом 59А.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России по адресу: 127486, Москва, ул. Бескудниковский бульвар, 59А.

Автореферат разослан « ___ » _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Мушкова И.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Последние два десятилетия в офтальмологической практике отмечается тенденция к развитию микроинвазивных технологий, позволяющие значительно уменьшить как объем операционной травмы, так и сроки послеоперационной реабилитации пациента (Мороз З.И., 2010; Измайлова С.Б. 2014; Ferrara P., 1995; Colin J., 1997; Wollensack G., 2003 и др.).

Одним из активно развивающихся направлений этой области является интрастромальная кератопластика (ИСКП), которая относится к разряду микроинвазивных процедур, а использование полимерных роговичных сегментов (РС) определяет данную процедуру как тканесберегающую, не зависящую от применения донорского материала (Мороз З.И., 2010; Измайлова С.Б. 2014; Barraquer J., 1950; Ferrara P., 1995; Colin J., 1997; Wollensack G., 2003). В офтальмологической практике наиболее распространенными и активно используемым являются роговичные импланты зарубежного производства, моделей FerraraRing, Intacs и MyoRing, а также отечественные РС, разработанные в МНТК «Микрохирургия глаза». Отличаясь параметрами, различные модели роговичных имплантов не всегда в полной мере отвечают современным требованиям, предъявляемым к лечению кератэктазий в аспекте получаемых результатов и развития побочных оптических феноменов. Данный факт обосновывает необходимость исследований по разработке новой модели роговичного сегмента с оптимизированными геометрическими параметрами (Мороз З.И., 2009; Измайлова С.Б. 2014; Ferrara P., 1995; Colin J., 1997; Alio J.L., 2007, Coskunseven E., 2008; Daxer A., 2010).

Разработка нового РС включает оценку и выявление ряда принципиальных технических требований, выполнение которых обеспечивает увеличение эффективности данного метода лечения. К таким требованиям, безусловно, можно отнести высокую биосовместимость, отсутствие капсулообразования при длительном нахождении импланта в строме роговицы, высокое качество поверхности РС. С учетом этого, для новой модели РС была использована

одностадийная технология получения полимерных имплантов, основанная на методике фотолитографии (Треушников В.М., 2015), предполагающая применение полимерного материала на основе бисфенол-А-диглицидилметакрилата (бисГМА), ранее в хирургии роговицы не используемого (Kostoryz E.L., 2003; Abdulmajeed A.A., 2014).

Учитывая отсутствие предшествующего опыта использования данного материала в хирургии роговой оболочки, необходимым и обязательным условием является исследование взаимодействия клеток и тканей роговицы с полимерным материалом и готовым изделием. Логичным является использование с этой целью ряда экспериментальных методик, результаты которых будут максимально приближены к клинической ситуации (Хенч Л., Джонс Д. Б., 2007; Фрешни Р.Я., 2010).

Таким образом, представляется актуальной разработка новой модели РС, выполненного на основе биосовместимого полимерного материала с учетом недостатков имеющихся у аналогов. В связи с вышеизложенным в данной работе определена следующая **цель**:

Разработать новую модель роговичного сегмента и произвести его всестороннюю оценку в условиях экспериментального моделирования *ex vivo* и *in vitro*.

Для достижения указанной цели поставлены следующие **задачи**:

1. Провести математическое обоснование путей оптимизации дизайна и геометрических параметров полимерных интрастромальных сегментов с учетом анатомо–топографических особенностей строения роговицы человека.

2. Изучить в эксперименте влияние различных моделей роговичных сегментов на форму передней и задней поверхностей роговицы кадаверных глаз.

3. Исследовать *in vitro* реакцию выделенных клеток стромы роговицы на различные полимерные материалы, используемые для изготовления роговичных сегментов.

4. Определить особенности реакции кадаверной роговицы человека в условиях ее органотипического культивирования *in vitro* на введение имплантов

выполненных из полимеров на основе полиметилметакрилата и гидроксиэтилметакрилата (ПММА/ГЭМА) и бисГМА.

5. Дать оценку морфо-функциональным особенностям изменений роговицы кролика *in vivo* после проведения интрастромальной кератопластики с использованием роговичных сегментов, изготовленных из полимеров на основе ПММА/ГЭМА и бисГМА в различные сроки послеоперационного периода.

Научная новизна результатов исследования

1. Впервые, на основе математического моделирования изменений формы роговице при интрастромальной кератопластике, проведен расчет оптимальных параметров новой модели роговичного сегмента (патент РФ на изобретение №2456971 от 20.09.2014), которые создают предпосылки для повышения эффективности операций данного типа и снижения вероятности развития послеоперационных осложнений.

2. На основании данных оптической когерентной и Шаймпфлюг кератотомографии кадаверных глаз человека определено влияние имплантированных роговичных сегментов новой модели на форму роговицы.

3. Впервые в условиях двухмерного культивирования выделенных клеток стромы и исследований на модели органотипической культуры кадаверных роговиц, изучены особенности морфо-функциональных изменений, степени адгезии и коэффициента пролиферации клеток, которые убедительно показали более высокие характеристики биосовместимости материала на основе бисГМА.

Практическая значимость результатов исследования

1. Проведены расчеты оптимальных параметров роговичного сегмента для интрастромальной кератопластики у пациентов с кератэктазиями различного генеза. Использование данных сегментов в клинической практике имеет потенциал существенной оптимизации рефракционного эффекта операции на фоне снижения числа осложнений.

2. Даны рекомендации по выбору оптимального полимерного материала для изготовления роговичных сегментов исходя из параметров биосовместимости на клеточном и органном уровнях.

3. Предложен принципиально новый подход к выбору и оценке полимерных имплантатов для внутрироговичного использования на основе моделирования *in vivo* и *in vitro* на моделях культивирования выделенных клеток стромы роговицы в присутствии полимерных материалов и длительного органотипического культивирования изолированных роговиц с имплантированными полимерными изделиями

Основные положения выносимые на защиту

На защиту выносится принципиально новая модель роговичного сегмента для интрастромальной кератопластики показанная к применению у пациентов с кератэктазиями различного генеза, большая эффективность и безопасность которой доказана на основе математического моделирования и в ходе экспериментальных исследований в условиях *in vitro* и *in vivo* на клеточном и органном уровнях как у экспериментальных животных, так и на кадаверных глазах.

Внедрение в практику

Результаты исследований внедрены в работу отдела трансплантационной и оптико-реконструктивной хирургии переднего отрезка глазного яблока головной организации ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Научно-образовательного центра ФГАУ «МНТК «Микрохирургии глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, лаборатории трансплантологии и консервации с глазным тканевым банком ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Федорова» Минздрава России, Чебоксарского филиала ФГАУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Апробация работы

Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на совместных заседаниях научно-практических конференций ФГАУ МНТК «МГ» им. акад. С.Н. Федорова Минздрава России (Москва, 2016). Результаты проведенных исследований были доложены на конференции молодых ученых «Современные технологии офтальмологии» (Москва, 2016).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, из них 5 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ, получено положительное решение на патент РФ.

Структура и объем диссертации

Работа изложена на 203-х страницах машинописного текста; иллюстрирована 27 таблицами, 62 рисунками. Список литературы включает 209 источника, из них 45 отечественных и 164 иностранных. Диссертация состоит из введения, 4-х глав, включая обзор литературы, материалы и методы и 2 главы собственных исследований, заключения и выводов.

Работа выполнена на базе отдела трансплантационной и оптико-реконструктивной хирургии переднего отрезка глазного яблока и Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени акад. С.Н. Федорова» Минздрава России» и Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Экспериментальные исследования *in vivo* на модели экспериментальных животных (кролики) проведены на базе Калужского филиала ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Сканирующую электронную микроскопию выполняли на базе Лаборатории анатомии микроорганизмов ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи.

Гистологические исследования проводили совместно с сотрудниками курса патологической анатомии на кафедре физиологии и общей патологии Факультета Фундаментальной Медицины Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова.

Производство экспериментальных образцов полимерных материалов и экспериментальных моделей роговичных сегментов было проведено на базе предприятия Экспериментально-техническое производство «Микрохирургия глаза» (Москва) и ООО «Репер-НН» (Н.-Новгород).

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 15-29-03882 «код офи-м» по теме: «Исследование биосовместимости внутрироговичных имплантов из современных полимерных материалов (гидроксиэтилметакрилат, олигоуретанметакрилат, полиметилметакрилат) для коррекции аномалий рефракции и лечения кератэктазий различного генеза».

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для достижения поставленной цели работа была разделена на 4 последовательных этапа, соответствующих задачам исследования.

Математическое обоснование и оценка эффективности новой модели роговичного сегмента

На первом этапе работы проводили математическое моделирование изменений, возникающих в роговице при ИСКП, проведен расчет оптимальных параметров РС. Для вычисления параметров РС использовали геометрические закономерности, характерные для оптически центрированных систем, с учетом факторы, влияющих на изменение оптических параметров роговицы (параметры РС). Расчет оптического эффекта имплантации РС с заданными параметрами проводили на основе формулы Барракера. При расчетах рефракционного эффекта от имплантации РС разной высоты рассматривали соотношения сначала на примере нормальной роговицы (рис.1), где R_n – радиус кривизны передней поверхности роговицы до имплантации РС, R_k – радиус кривизны передней поверхности роговицы после имплантации РС, d – диаметр роговичного сегмента (расстояние между диаметрально противоположными «боковыми» внутренними поверхностями сегмента), h – высота роговичного сегмента.

Расчет оптического эффекта от имплантации РС с заданными параметрами высоты и внутреннего диаметра проводили по следующей формуле:

$$(1) D = 337,5 \left(\frac{1}{R_n} - \frac{1}{R_k} \right),$$

где D – оптический эффект имплантации РС (в диоптриях).

Учитывая тот факт, что роговица является вогнуто-выпуклой линзой, ее преломляющая способность может быть рассчитана в модели, где оптически однородные среды с различными коэффициентами преломления n и n' отделены друг от друга сферическими поверхностями (коэффициент преломления для воздуха равен $n=1$, для роговицы $n'=1,377$, для влаги передней камеры $n''=1,33$). Для оптически-центрированных систем характерна следующая закономерность:

$$(2) \frac{1}{f} = \frac{1}{x} - \frac{n''}{x''} = \frac{1-n'}{R_1} - \frac{n'-n''}{R_2},$$

где $R_п$ и $R_з$ – радиусы кривизны передней и задней поверхностей роговицы.

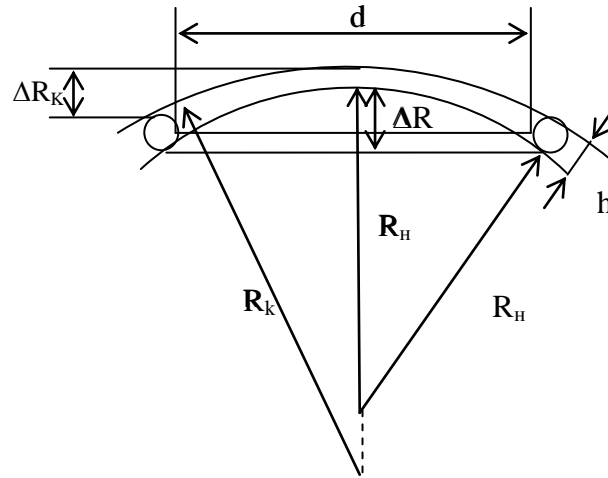


Рисунок 1 - Схема геометрических параметров (Барракера) при имплантации сегмента в строму роговицы

Результативную высоту роговичного сегмента высчитывали по формуле:

$$h = a + h_0,$$

где a – высота передней поверхности сегмента (величина a изменяется от 150 мкм до 350 мкм с шагом 50 мкм), h_0 – высота задней поверхности РС.

Для оптимизации расположения РС ось его поперечного сечения должна быть перпендикулярна радиусу глазного яблока в точке расположения сегмента. Следовательно, сегмент должен быть расположен под углом γ (рис. 2). Соблюдение данного условия будет способствовать более равномерному распределению сил натяжения, действующих в строме роговицы и направленных от поверхности РС к передней и задней поверхностям роговицы, и уменьшению сил напряжения на ребре РС. Значение угла γ рассчитывали по формуле:

$$(3) \sin\gamma = R/d.$$

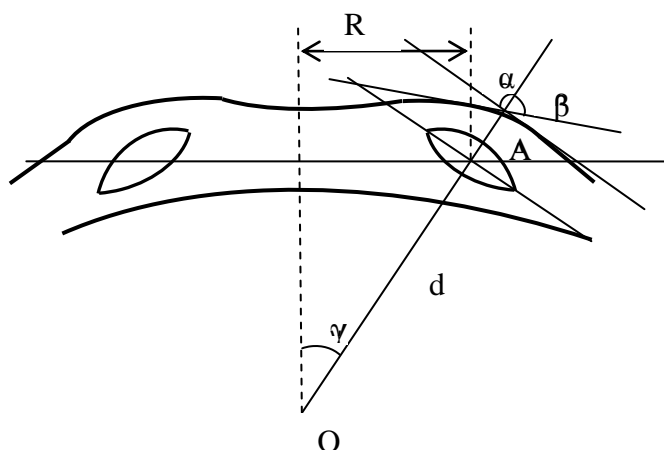


Рисунок 2 - Схема положения роговичного сегмента в строме с учетом угла наклона поперечной оси γ (О – геометрический центр глаза, γ – угол наклона поперечной оси сегмента относительно нормали, R – внутренний радиус роговичного сегмента, d – радиус кривизны передней поверхности роговицы)

Было установлено, что оптимальной формой поперечного сечения РС, для равномерного распределения сил натяжения в строме роговицы, является форма двояковыпуклой линзы с расположением продольной оси поперечного сечения относительно горизонтали под углом $\gamma = 30 \pm 5^\circ$.

На основании геометрического соотношения Барракера (1) определили, что максимальный рефракционный результат достигается при минимальных значениях величины внутреннего радиуса РС, когда внутреннее ребро РС располагается близко к краю зрачка, дальнейшее уменьшение внутреннего радиуса РС приводит к искажениям оптического изображения. Условие, накладываемое на радиус РС, состоит в том, что эта величина должна быть больше параметров зрачка в мезопических условиях. Таким образом, необходимо увеличить внутренний диаметр РС до величины, при которой еще достигается хороший рефракционный результат, но вероятность возникновения искажений максимально снижена. Второе условие выполняется в случае превышения величины внутреннего радиуса РС значения диаметра зрачка в мезопических условиях. За такое значение внутреннего диаметра РС нами было принято расстояние равное 6,0 мм.

С учетом вышесказанного, рассчитанные геометрические параметры новой модели РС составили: форма поперечного сечения в виде двояковыпуклой линзы с осью поперечного сечения располагающейся под углом $\gamma = 30 \pm 5^\circ$, со значением внутреннего диаметра 6,0 мм, ширина поперечного сечения 600 мкм, значение высоты передней поверхности РС варьиabelно (от 150 до 350 мкм), значение высоты задней поверхности РС постоянно (50 мкм). Увеличение высоты РС с внутренним диаметром 6,0 мм на каждые 50 мкм дает прибавку к диоптрийному эффекту в 1,5 Дптр, при этом степень выраженности диоптрийного эффекта не зависит от стадии кератэктазии.

Оценку эффективности рассчитанных параметров РС проводили на основании исследований изменения кривизны передней и задней поверхностей роговицы кадаверных глаз по данным проекционного Шаймпфлюг кератотомографа Pentacam HR (Oculus Optikgerate GmbH, Германия) и оптического когерентного томографа ОКТ Visante (Carl Zeiss Meditec, Германия). В ходе проведения эксперимента было выделено 2 группы. Группу контроля составили кадаверные глаза с имплантированными РС известной модели (производитель ООО «НЭП МГ», Москва) (5 глаз), группа эксперимента была представлена роговицами кадаверных глаз с имплантированными РС новой модели (5 глаз). Во всех случаях имплантацию РС проводили по классической методике механическим путем. Исследования кривизны роговицы выполняли до и после имплантации РС, с предварительной разметкой роговичным маркером положения основных меридианов.

При анализе результатов полученных в ходе оптической когерентной томографии (ОКТ) роговиц кадаверных глаз глубина залегания тоннеля в экспериментальной и контрольной группах составила $356 \pm 30,6$ и $458 \pm 39,6$ мкм от передней поверхности роговицы и $281,67 \pm 28,3$ и $240,0 \pm 29,15$ мкм от задней поверхности роговицы соответственно.

Более равномерное распределение задних слоев стромы роговицы относительно соответствующей поверхности РС отмечали в экспериментальной группе. Угол наклона продольной оси поперечного сечения относительно горизонтали в экспериментальной группе соответствовал $32,2 \pm 3,9^\circ$. Изменение

параметра «угол наклона продольной оси поперечного сечения РС» способствует уменьшению давления граней РС на передние и задние слои роговицы, а, значит, уменьшает риск прорезывания РС.

Основными параметрами, для определения действия РС на ткани роговицы, были выбраны следующие: изменение кривизны передней и задней поверхностей роговицы относительно «идеальной» сферы (BFS), разница этих показателей до и после имплантации РС, значение величины максимальной кератометрии (K_{max}) в главных меридианах, изменения толщины роговицы в проекции зрачка и величины передней камеры.

В ходе анализа элевационных карт группы контроля, полученных с использованием Шаймпфлюг кератотомографа выявили снижение максимального значения элевации передней поверхности роговицы в среднем на $25,05 \pm 8,09$ мкм ($p < 0,05$), снижение максимального значения элевации задней поверхности роговицы – на $11,85 \pm 16,22$ мкм ($p < 0,05$). В группе эксперимента после имплантации РС выявлено снижение максимального значения элевации передней поверхности роговицы с на $16,07 \pm 3,55$ мкм ($p < 0,05$) и уменьшение максимального значения элевации задней поверхности роговицы на $20,6 \pm 13,32$ мкм ($p < 0,05$).

Изменение максимального значения элевации передней поверхности роговицы свидетельствовало об уплощении ее центральной зоны и коррелировало со снижением показателей максимальной кератометрии. Так, в группе контроля максимальное значение кератометрии во взаимно перпендикулярных меридианах до операции было равно $42,9 \pm 0,53$ и $44,1 \pm 0,48$ дптр, после имплантации РС – $30,1 \pm 0,79$ и $42,9 \pm 0,88$ дптр соответственно, а в группе эксперимента - $42,2 \pm 0,86$ и $44,3 \pm 0,59$ дптр до имплантации и $40,3 \pm 1,02$ и $43,7 \pm 0,67$ дптр после, соответственно. Более выраженное уплощение роговицы в группе контроля объясняется меньшим значением величины внутреннего диаметра РС.

Разница в изменении кривизны центральной зоны в экспериментальных группах обусловлена величиной внутреннего диаметра РС. Так, в случае РС с величиной внутреннего диаметра 5,0 мм (группа контроля) относительная разница величины силы преломления роговицы в центральной зоне в среднем составила $12,7 \pm 2,23$ дптр, а при величине внутреннего диаметра 6,0 мм (группа

эксперимента) - $9,82 \pm 0,64$ дптр, в проекции положени РС этот показатель соответственно равен $7,01 \pm 1,38$ дптр и $6,38 \pm 1,86$ дптр. Изменения кривизны задней поверхности роговицы в группе контроля практически не наблюдали как в центральной зоне ($\Delta=0,5$ дптр), так и в проекции положения РС ($\Delta=0,74 \pm 0,38$ дптр). В группе РС новой модели (группа эксперимента) изменений кривизны центральной зоны зафиксировано не было ($\Delta=0,05$ дптр), однако отмечали уменьшение кривизны роговицы в проекции залегания РС ($\Delta=2,9 \pm 0,38$ дптр). Полученные результаты изменений задней поверхности роговицы объяснимы с позиции разницы формы и величиной угла наклона продольной оси поперечного сечения РС представленных групп.

Таким образом, при имплантации в роговицу кадаверного глаза РС новой модели, методами оптической когерентной томографии и Шаймпфлюг кератотомографии выявили более равномерное распределение слоев стромы роговицы относительно поверхности РС, соответствие угла наклона продольной оси поперечного сечения сегмента расчетному. Меньшее влияние на силу преломления центральной зоны передней поверхности роговицы было отмечено в опытной группе, в сравнении с группой контроля. В опытной группе в проекции залегания РС так же отмечали более существенное уменьшение кривизны задней поверхности роговицы, тогда как в группе контроля данные изменения были незначительны. Полученные результаты соответствовали данным, полученным при математических расчетах оптимальных геометрических параметров РС.

В результате проведения первого этапа работы было определено, что использование новых параметров РС позволит обеспечить оптимальное распределение биомеханических напряжений в строме роговицы, и послужит повышению эффективности операции и снижению вероятности развития послеоперационных осложнений.

На втором этапе работы в ранних доклинических исследованиях новой модели РС осуществляли выбор наиболее подходящего по техническим характеристикам полимерного материала, обладающий высокой биосовместимостью. Исследование проводили на нескольких экспериментальных

моделях: культура выделенных клеток стромы роговицы (КСР) человека (*in vitro*), органотипическая культура роговиц кадаверных глаз (*in vitro*), глаза экспериментальных животных (*in vivo*).

Исследования в условиях двумерного клеточного культивирования (in vitro)

Двумерное культивирование выделенных КСР проводили в присутствии опытных образцов полимеров, потенциально пригодных для внутрироговичной имплантации (группы Кл-1 (на основе олигоуретанметакрилата марки 2000Т (ОМА-2000Т)), Кл-2 (на основе олигоуретанметакрилата марки 6000Т (ОМА-6000Т)), Кл-3 (на основе бисфенол-А-диглицидилметакрилата и бензилметакрилата (бисГМА/бензМА)), Кл-4 (на основе бисфенол-А-диглицидилметакрилата (бисГМА)), Кл-5 (на основе полиметилметакрилата (ПММА)). Группа контроля характеризовалась отсутствием экспериментального образца (Кл-К). Во всех группах для проведения исследования использовали стандартную ростовую среду (Du Y., 2012; Zhang S., 2013), 24-луночный планшет из полистирола. Экспериментальные образцы представляли собой полимерные диски диаметром 10 мм и высотой – 0,5 мм. Подсчет количество клеток проводили на протяжении 6-ти суток со 2-го дня культивирования ежедневно. Используемые в эксперименте КСР предварительно пассировали до 7 раз, количество вносимых КСР в эксперимент равнялось 20 тыс. клеток. По итогам проведенного исследования осуществляли построение графиков кривой роста для каждой экспериментальной группы и подсчет индекса пролиферации. На основании полученных данных делали вывод о токсических и адгезивных свойствах исследуемых материалов.

В результате проведенного эксперимента начиная со вторых суток во всех группах отмечали экспоненциальный рост КСР. Характер графика позволял исключить токсичную природу материалов. В группе материала на основе бисГМА (группа Кл-4) отмечали наименьшую тенденцию к адгезии выделенных КСР ($p < 0,05$), в сравнении с активно используемым в офтальмологической практике материалом на основе ПММА (группа Кл-5), связи с чем эти материалы

были выбраны для дальнейшего исследования в условиях органотипического культивирования (таблица 1).

Таблица – 1 Распределение количества клеток в экспериментальных группах по срокам выделения, тыс. клет. \pm ст.кв.откл.

Группа	Кл-1	Кл-2	Кл-3	Кл-4	Кл-5	Кл-К	
Сутки наблюдения	1	21 \pm 3,01	21,875 \pm 3,4	15,25 \pm 3,7	18,62 \pm 1,1	13,7 \pm 1,2	19,63 \pm 0,9
	2	45,3 \pm 2,5	40,4 \pm 4,3	31,7 \pm 3,8	31,1 \pm 5,2	31,9 \pm 2,4	32,08 \pm 1,4
	3	72,31 \pm 2,3	85,56 \pm 4,72	77,56 \pm 4,6	87,06 \pm 5,7	90,9 \pm 3,1	85,06 \pm 1,8
	4	151,75 \pm 3,1	137,87 \pm 5,5	135,94 \pm 4,9	132,06 \pm 6,3	161,95 \pm 3,7*	128,31 \pm 2,3
	5	262,75 \pm 2,8*	249,56 \pm 4,7*	213,94 \pm 5,2	210,06 \pm 6,8	226,4 \pm 7,4*	202,56 \pm 6,5
	6	279,25 \pm 3,2*	272,94 \pm 4,8	256,1 \pm 5,4*	237,94 \pm 7,1	297,65 \pm 7,46*	220,63 \pm 5,9

* $p < 0,05$

При проведении статистического анализа данных, полученных с первого по шестой дни эксперимента, были выявлены следующие закономерности: группы Кл-5 с каждой из групп начиная с третьего дня отмечали статистически значимую разницу со всеми группами кроме Кл-1 и Кл-2 ($p > 0,05$), данная тенденция отмечалась и в группе Кл-4.

Исследования в условиях органотипического культивирования (in vitro)

Для выполнения исследования на кадаверных роговицах были изготовлены экспериментальные образцы РС из полимерных материалов на основе ПММА (группа Ор-1) (5 глаз), ПММА/ГЭМА (группа Ор-2) (5 глаз) и бисГМА (группа Ор-3) (5 глаз), геометрические параметры во всех группах были одинаковы. В группу контроля вошли парные кадаверные глаза с сформированными роговичными тоннелями, но без имплантированных РС. Имплантацию РС проводили по стандартной механической методике с использованием кругового ножа. После имплантации проводили выкраивание корнеосклерального диска

(КСД) с дальнейшим его культивированием в стандартной питательной среде на протяжении 75 суток. После чего КСД фиксировали в 10% растворе формалина и исследовали с применением флуоресцентной и электронно-сканирующей микроскопий. Для проведения флуоресцентной микроскопии (ФМ) и электронно-сканирующей микроскопии (ЭСМ) по окончании срока культивирования роговичный тоннель вскрывали с отслаиванием его верхней и нижней стенок. Определение процента жизнеспособных клеток проводили с помощью флуоресцентной микроскопии стенок роговичного тоннеля и поверхности РС, окрашенных флуоресцирующими красителями (Ноасchst 33258, йодид пропидия).

При оценке клеточно-тканевой реакции стромы роговицы кадаверных глаз на присутствие различных полимерных материалов обращали внимание на наличие скоплений КСР на поверхности стенок роговичного тоннеля, интактной части стромы и поверхности РС, а так же ориентацию коллагеновых волокон. Присутствие КСР в просвете роговичного тоннеля свидетельствовало об активации клеточных процессов регенерации в ответ на механическую травму. На сканограммах поверхностей стенок тоннеля обращали внимание на наличие клеточных и волокнистых элементов.

При анализе результатов ФМ и ЭСМ экспериментальных образцов каждой группы выявили следующие особенности: в случаях РС из полимерных материалов на основе ПММА (группы Ор-1 и Ор-2) была зафиксирована адгезия КСР к поверхности РС, при этом в группе Ор-2 (ПММА/ГЭМА) выраженность адгезии КСР ниже, чем в первой, что было объяснено присутствием ГЭМА в составе материала ПММА/ГЭМА. Из литературы известно, что наличие данного вещества в составе полимерной смеси на основе ПММА, изменяет ее гидрофильные свойства и увеличивает биосовместимость материала. В группе материала на основе бисГМА отмечали практически полное отсутствие адгезии КСР к поверхности РС.

При анализе данных ФМ и ЭСМ поверхности стенок тоннеля в группах материалов на основе ПММА (группы Ор-1 и Ор-2) статистически значимых

различий с группой контроля выявлено не было ($p > 0,05$). В группе РС, выполненных из материала на основе бисГМА, были выявлены статистически значимые отличия от групп РС из других материалов - во всех случаях их поверхность имела значительно меньшие скопления КСР ($p < 0,05$). При исследовании поверхностей стенок тоннеля на всем их протяжении наблюдали не столь значительную миграцию КСР, в сравнении с другими группами, что было расценено как тканевая реакция на механическое повреждение тканей роговицы. На электронограммах поверхностей стенок тоннеля хорошо визуализировались разнонаправленные коллагеновые волокна. Данные были сопоставимы с результатами, полученными при проведении ФМ, и свидетельствовали о меньшей адгезивной способности КСР к полимерному материалу на основе бисГМА, чем в других группах.

Согласно полученным результатам исследований на моделях клеточного и органотипического культивирования *in vitro* было установлено следующее: наименьшая адгезивная активность в отношении клеток стромы роговицы человека характерна для полимерного материала на основе бисГМА в сравнении с материалами на основе ПММА. Полученные данные могут свидетельствовать о наименьшей тенденции к капсулообразованию вокруг импланта, выполненного из этого материала при его длительном нахождении в строме роговицы. Данные результаты требовали подтверждения на модели *in vivo*.

Исследование биосовместимости полимерных материалов in vivo

Исследование было проведено с целью подтверждения эффективности предложенных моделей двухмерного клеточного и органотипического культивирования в присутствии различных полимерных материалов РС, как методов определения их биосовместимости с клетками и тканями глаза человека. В эксперименте на модели *in vivo* были изучены морфологические изменения роговицы экспериментального животного (кролик) происходящие на различных сроках после проведения ИСКП с имплантацией РС из различных материалов.

Исследование биосовместимости полимерных материалов на модели *in vivo* базировалось на изучении морфо-функциональных изменений роговицы 18 кроликов породы шиншилла, которым проводили ИСКП с имплантацией РС используемой в клинической практике модели (производитель ООО «НЭП МГ», Москва) и модели РС, выполненной из материала на основе бисГМА, выбранного при проведении исследований на моделях клеточного и органотипического культивирования. Группой контроля стали парные (правые) глаза животных других экспериментальных групп. Используемые РС имели одинаковые геометрические параметры, что позволило значительно нивелировать отличия в механическом воздействии на ткань роговицы для более точной оценки гистологической реакции. Операции проводили под общей анестезией с иммобилизацией животного.

Формирование роговичного тоннеля проводили механическим путем по классической методике с применением кругового ножа. Сроки наблюдения составили от 1 до 90 дней (1, 3, 7, 14, 30, 90 дней) после имплантации с соответствующим выведением животных из эксперимента на выбранных сроках. Данные сроки были обусловлены особенностями течения раневого процесса в раннем и позднем послеоперационном периоде. На дооперационном этапе и на всех сроках наблюдения в экспериментальных группах проводили биомикроскопию переднего отрезка глаза на щелевой лампе для определения признаков воспаления, отека роговицы, неоваскуляризации, степени эпителизации и образование депозитов вокруг РС и оптической когерентной томографии для определения глубины залегания РС, распределение волокон стромы роговицы. После выведения животных из эксперимента проводили энуклеацию глаз с последующим гистологическим исследованием стромы роговицы с использованием стандартного гистологического окрашивания (гематоксилин-эозин).

При проведении биомикроскопии во всех группах в сроке до 7-го дня после ИСКП отмечали умеренную ответную реакцию со стороны тканей роговицы, соответствующую степени тяжести проведенного вмешательства,

уменьшение которой происходило к 10 – 14 дню исследования. Во всех группах и на всем сроке наблюдения роговица в центральной зоне оставалась прозрачной, положение РС соответствовало первоначальному. Изменений глубжележащих сред отмечено не было. На 30-е сутки в группе РС из ПММА/ГЭМА у двух экспериментальных животных (2 глаза) при биомикроскопии переднего отрезка глаза вокруг имплантированного РС определяли незначительное образование стромальных депозитов, что в последствии было подтверждено гистологическими исследованиями. При проведении ОКТ на сроке 30 дней после имплантации РС во всех экспериментальных группах не было зафиксировано повышение рефлекторности на границе РС и стромы роговицы, что свидетельствовало об отсутствии капсулообразования. Однако в группе РС из ПММА/ГЭМА отмечали чуть более выраженную границу между стромой и имплантом. Более подробно эта область была исследована на гистологических срезах. Так же было отмечено истончение наружного эпителия роговицы в проекции положения передней поверхности РС, что объясняли особенностями строения роговицы кролика в сравнении с роговицей человека (ее меньшая толщина и больший диаметр). При анализе снимков группы контроля отчетливо визуализировали положение роговичного тоннеля на заданной глубине: отсутствие просвета тоннеля, говорит о завершении процесса заживления послеоперационной травмы. На сроке 90 дней после имплантации РС, образования стромальных депозитов, неоваскуляризации роговицы выявлено не было. Роговичный тоннель во всех случаях был сформирован на глубине 70-80% от толщины роговицы.

При рассмотрении гистологических срезов роговиц экспериментальных животных, во всех случаях на разных сроках наблюдения визуализировали полость в строме роговицы, соответствующую положению роговичного тоннеля. На сроке 1-3 дня после проведения ИСКП во всех экспериментальных группах выявляли гистологические признаки отека роговицы, скопление тканевого детрита по ходу роговичного тоннеля и разрушения эпителия, что соответствовало механической травме при формировании роговичного тоннеля и коррелировало с клинической картиной раннего послеоперационного периода.

Нивелирование данных изменений происходило к 10 – 14-ым суткам. Количество клеток на границе роговичного тоннеля и стромы в области граней РС не отличалось от такого параметра в группе контроля и по сравнению с интактными участками стромы роговиц рассматриваемых групп. В экспериментальных группах материалов ПММА/ГЭМА и бисГМА фиксировали скопление КСР в области положения граней РС и в просвете манипуляционных отверстий. Клеточный состав был представлен единичными элементами эпителиального пласта, макрофагами, фибробластами.

На серии гистологических срезов экспериментальных групп в сроки от 14 и 30 дней зафиксировали неравномерное распределение клеточных скоплений по всей длине роговичного тоннеля. Ни в одном случае формирования истинной капсулы вокруг импланта выявлено не было. Однако, было зафиксировано более интенсивное окрашивание ткани роговицы на границе с РС. В литературе это явление описывается как образование псевдокапсулы, однако с нашей точки зрения такое определение не совсем корректно. Формирование псевдокапсулы предполагает появления склероза и атрофии участков ткани, подвергающихся какому-либо воздействию. Более правильное определение для данного явления – артефакт ретракции, связанный со сдавлением прилежащих к роговичному импланту тканей, приводящим к увеличению ее плотности. Данный признак был более выражен в группе материала на основе ПММА.

Таким образом, в ходе выполнения работы проведено математическое обоснование наиболее оптимальных геометрических параметров полимерных роговичных сегментов, применяемых при интрастромальной кератопластике как методе лечения кератэктазий различного генеза. По результатам проведенных доклинических исследований на моделях *in vitro* и *in vivo* доказана биосовместимость используемого в клинической практике полимерного материала на основе ПММА/ГЭМА и ранее не применяемого для хирургии роговицы материала на основе бисГМА. Разработанные изделия могут быть рекомендованы к дальнейшему изучению в клинических условиях в рамках существующего порядка регистрации изделий медицинского назначения.

ВЫВОДЫ

1. На основании математического моделирования базирующегося на учете анатомо-топографических особенностей строения роговицы человека, рассчитаны наиболее оптимальные форма и геометрические размеры новой модели роговичного сегмента в соответствии с нижеследующими: форма поперечной сечения – двояковыпуклая линза, угол наклона оси поперечного сечения - $30\pm 5^\circ$, высота передней части РС – переменная (от 150 до 350 мкм), высота задней части РС постоянная (50 мкм), внутренний диаметр - 6,0 мм, ширина основания – 600 мкм, длина дуги окружности: 90° , 160° , 210° и 250° .

2. При имплантации в роговицу кадаверного глаза в эксперименте, методами оптической когерентной томографии и Шаймпфлюг кератотомографии при имплантации разработанной модели РС выявлены: равномерная индентация слоев стромы роговицы, соответствие угла наклона продольной оси поперечного сечения сегмента расчетному ($32,2\pm 3,9^\circ$), на фоне меньшего влияния на силу преломления центральной зоны передней поверхности роговицы $9,82\pm 64$ дптр (опытная группа) и $12,7\pm 2,23$ дптр (контрольная), а также более существенное уменьшение кривизны задней поверхности роговицы в проекции залегания РС - $2,9\pm 0,38$ дптр (опытная группа) и $0,74\pm 0,38$ дптр (группа контроля).

3. Двухмерное культивирование выделенных клеток стромы роговицы в присутствии различных полимерных материалов, установило, что наименьшая степень клеточной адгезии и индекс пролиферации в изучаемых группах характерны для материала на основе бисфенол-А-диглицидилметакрилат ($p < 0,05$), таким образом, последний обладает высокой биосовместимостью.

4. Флуоресцентная и электронно-сканирующая микроскопия образцов кадаверных роговиц после органотипического культивирования в течение 75 суток показала наибольшую склонность к адгезии клеток стромы роговицы к роговичным сегментам, выполненным из ПММА и наименьшую – в группе бисГМА ($p < 0,05$).

5. Исследование морфофункциональных изменений роговицы кролика после интрастромальной кератопластики с имплантацией роговичных сегментов на

основе бисГМА показало отсутствие выраженных структурных изменений роговичной ткани (в виде скопления клеток и капсулообразования), что подтверждает целесообразность выбора данного материала для изготовления РС.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Измайлова С.Б., Малюгин Б.Э., Пронкина С.А., Мерзлов Д.Е., **Поручикова Е.П.** Тактика лечения и исходы осложнений имплантации роговичных сегментов при кератэктазиях различного генеза // Офтальмохирургия.- 2014.- №2. – С. 16-19.

2. Малюгин Б.Э., Измайлова С.Б., Мерзлов Д.Е., Пронкина С.А., **Поручикова Е.П.**, Семькин А.Ю. Отдаленные результаты использования различных техник УФ-кроссликинга у пациентов с прогрессирующими кератэктазиями // Офтальмохирургия.- 2014. -№4. – С. 42-45.

3. Малюгин Б.Э., Измайлова С.Б., **Поручикова Е.П.**, Семькин А.Ю. Результаты комплексного лечения пациента с прозрачной маргинальной дегенерацией (ПМД)» (клинический случай) // Офтальмохирургия. - 2015. - №3. – С. 47-51.

4. Измайлова С.Б., Малюгин Б.Э., **Поручикова Е.П.** 10 лет имплантации роговичных сегментов, собственный опыт // Тезисы научно – практической конференции «X Съезд офтальмологов России» - 2015. Москва.- 2015. - С. 186

5. **Поручикова Е.П.**, Островский Д.С., Попов И.А., Измайлова С.Б., Борзенко С.А., Малюгин Б.Э. Исследование биосовместимости интрастромальных роговичных сегментов из полимерных материалов на модели органной культуры трупной роговицы человека // Материалы XI Всероссийская научная конференции молодых ученых «Актуальные проблемы офтальмологии – 2016», Москва. - 2016. - С.

6. Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., Измайлова С.Б., **Поручикова Е.П.**, Попов И.А., Островский Д.С. Изучение биосовместимости полимерных материалов (полиметилметакрилат и бисфенол-А-диглицидилметакрилат) на модели культуры клеток стромы роговицы // Офтальмохирургия. – 2016. - №4. – С. 16-19.

7. Малюгин Б.Э., Измайлова С.Б., **Поручикова Е.П.** Математическое обоснование новой модели полимерных роговичных сегментов для интрастромальной кератопластики. // Офтальмохирургия. – 2016. - №4. – С. 30-34.

Патенты по теме диссертации

Патент РФ № 2528649 от 04.07.2013 года. «Роговичный сегмент для лечения кератэктазий различного генеза». Авторы: Малюгин Б.Э., Измайлова С.Б., Поручикова Е.П., Поручиков П.В.

Биографические данные

Поручикова Евгения Павловна – 1988 г.р., в 2010 г. окончила Факультет фундаментальной медицины Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова по специальности «Лечебное дело».

С 2010 по 2012 гг. проходила обучение в клинической ординатуре по специальности «Офтальмология» на базе ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. С 2012 по 2016 гг. обучалась в очной аспирантуре по специальности «Офтальмология» на базе ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России в отделе трансплантационной и оптико-реконструктивной хирургии переднего отрезка глазного яблока.

Автор 7 печатных работ (из них 5 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ) и 1 патента РФ.

Участник коллектива исследователей, выполняющих работу при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 15-29-03882 «код офи-м» по теме: «Исследование биосовместимости внутрироговичных имплантов из современных полимерных материалов (гидроксиэтилметакрилат, олигоуретанметакрилат, полиметилметакрилат) для коррекции аномалий рефракции и лечения кератэктазий различного генеза».

Объем: 1,0 усл.п.л.

Тираж: 100 экз.

Отпечатано в типографии "Реглет"

г.Москва, Ленинский проспект, д.2

8(495)978-66-63