

*На правах рукописи*

**МАКСИМОВА ОЛЬГА ЮРЬЕВНА**

**КОРРЕКЦИЯ ДЕФЕКТОВ РАДУЖНОЙ ОБОЛОЧКИ  
МЕТОДОМ ВНУТРИРОГОВИЧНОГО ИСКУССТВЕННОГО  
ДИАФРАГМИРОВАНИЯ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

3.1.5. – офтальмология (медицинские науки)

**Автореферат**

диссертации на соискание

ученой степени кандидата медицинских наук

Москва – 2023

Работа выполнена на базе Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научный руководитель:** **Измайлова Светлана Борисовна**

доктор медицинских наук, заведующая отделом трансплантационной и оптико-реконструктивной хирургии переднего отрезка глазного яблока  
ФГАУ «НМИЦ «МНТК  
«Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова»  
Минздрава России

**Научный консультант:** **Перова Надежда Викторовна**

доктор биологических наук, заместитель директора по научно-практической работе Института медико-биологических исследований и технологий

**Официальные оппоненты:** **Слонимский Алексей Юрьевич**

доктор медицинских наук, профессор, врач-офтальмолог ООО «Московская глазная клиника»

**Осипян Григорий Альбертович**

доктор медицинских наук, старший научный сотрудник отдела патологии оптических сред глаза ФГБНУ «НИИ глазных болезней им. М.М. Краснова»

**Ведущая организация:** ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»

Защита состоится «26» июня 2023 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 21.1.021.01 при ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» 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. Фёдорова» Минздрава России.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук

**И.А. Мушкова**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Обширные дефекты радужки, вплоть до полной аниридии, могут быть результатом аномалии развития (врожденная патология), возникать у пациентов после тяжелой травмы глаза или вследствие хирургического вмешательства, например, удаления новообразований радужной оболочки, проведения иридэктомии. Последствия травмы органа зрения являются одной из главных причин слепоты и инвалидности из-за большой распространенности и тяжести клинических проявлений (Мушкова И.А., Соболев Н.П., Ходжаев Н.С. и др., 2014). Социальную значимость проблемы трудно переоценить. Она обусловлена тем, что наиболее часто патология отмечается у лиц молодого, наиболее трудоспособного возраста. Жалобы на низкую остроту зрения в связи с засветами и аберрациями снижают качество жизни. С проблемой больших дефектов радужной оболочки приходится встречаться у пациентов после хирургических вмешательств по поводу новообразований цилиарной зоны (Линник Л.Ф., 1998), а также в случае осложнений в виде стойких мидриазов. Иридохрусталиковая диафрагма (ИХД) необходима человеку для нормального функционирования зрительной системы, поскольку она уменьшает сферические и хроматические аберрации, увеличивает глубину резкости, предохраняет сетчатку от засветов.

С течением времени формировались разные подходы к решению этой проблемы, что отражено в опыте отечественных и зарубежных авторов. Известные способы хирургической коррекции обширных дефектов радужной оболочки и хрусталика наряду с их преимуществами обладают рядом индивидуальных недостатков и не всегда эффективны (Паштаев Н.П., 2001; Поздеева Н.А., 2001; Копаев С.Ю., 2000; Струсова Н.А., 2000; Иошин И.Э., 2001; Соболев Н.П., 2003). Имплантация ИХД – «золотой стандарт» современной офтальмохирургии в лечении больных с аниридиями, однако в ряде случаев он не может применяться по объективным причинам (например, после иридоциклэктомии по поводу новообразования) из-за возможной травматичности и способа фиксации, которые нежелательны у данных пациентов. В таких случаях

перспективным представляется внутрироговичное введение красящего вещества в строму в проекции колобомы радужки для создания диафрагирующего эффекта.

В настоящее время в офтальмологии кератопигментация успешно проводится зарубежными специалистами, однако следует заметить, что на территории Российской Федерации не существует зарегистрированных и разрешенных к применению в клинической практике внутрироговичных окрашенных имплантатов для коррекции дефектов радужки. Таким образом, для решения функциональных и косметических аспектов проблемы аниридии актуальным вопросом является разработка интракорнеального окрашенного имплантата, удобного для введения с минимальной интраоперационной травматизацией, и изучение его биосовместимости с тканями роговицы.

**Цель:** разработать и обосновать в эксперименте технологию коррекции дефектов радужной оболочки методом внутрироговичного искусственного диафрагмирования с применением нового гелевого окрашенного имплантата.

**Задачи:**

1. На основании проведения спектрофотометрии определить светопропускаемость образцов гелевых окрашенных имплантатов для оценки их функционального диафрагирующего эффекта.

2. На основании методов двухмерного клеточного культивирования и органотипического культивирования изучить реакцию культуры кератоцитов и ткани роговицы в эксперименте *in vitro* на образцы новых гелевых окрашенных имплантатов.

3. На основании биомикроскопии и световой микроскопии изучить реакцию стромы роговицы экспериментального животного (*in vivo*) на имплантацию предложенных образцов гелевых окрашенных имплантатов.

4. На основании эксперимента на кадаверных глазах (*ex vivo*) оценить возможность стабильного положения гелевого окрашенного имплантата в роговичном туннеле.

5. Разработать в эксперименте *ex vivo* оптимизированную хирургическую методику внутрироговичного искусственного диафрагмирования с

фемтосекундным лазерным формированием самогерметизирующегося роговичного реза.

### **Научная новизна**

1. Впервые созданы новые композиции химических веществ – гелевые окрашенные имплантаты для кератопигментации: на основе гиалуроновой кислоты и метилцеллюлозы с добавлением нерастворимого органического пигмента и на основе гидролизата коллагена с добавлением неорганического тонера; проведен спектрофотометрический анализ образцов.

2. Впервые проведено экспериментально-морфологическое обоснование возможности применения новых гелевых окрашенных имплантатов для кератопигментации на основании изучения биосовместимости в экспериментах *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo*.

3. Впервые разработана технология фемтолазерной кератопигментации, включающая использование оригинального программного обеспечения для формирования самогерметизирующегося входа в роговичный туннель, созданного на базе отечественного предприятия.

### **Практическая значимость**

1. Разработан гелевый окрашенный имплантат на основе гидролизата коллагена и неорганического пигмента, обладающий высокой биосовместимостью, а также имеющий оптимальные диафрагмирующие свойства, что определяет преимущества его применения в ходе кератопигментации.

2. Выстроена система изучения гелевых окрашенных имплантатов и оценено их влияние при введении в роговичный туннель в эксперименте *in vitro* на моделях клеточного культивирования выделенных клеток стромы роговицы, в процессе органотипического культивирования изолированных кадаверных роговиц человека с введенными имплантатами, а также *in vivo* на глазах лабораторных животных (кроликов).

3. Разработано оригинальное программное обеспечение для отечественного фемтолазера в целях оптимизации технологии фемтолазерной кератопигментации, которое обеспечивает создание самогерметизирующегося входа в роговичный туннель, что позволяет констатировать стабильную фиксацию введенного в роговичный туннель гелевого окрашенного имплантата.

### **Основное положение, выносимое на защиту**

Разработанная в эксперименте технология внутрироговичного искусственного диафрагмирования, заключающаяся в использовании биосовместимого гелевого окрашенного имплантата на основе гидролизата коллагена и неорганического пигмента и выполняемая с помощью новой программы отечественного фемтосекундного лазера, является безопасной и позволяет получить функциональный диафрагмирующий эффект.

### **Внедрение в практику**

Результаты работы внедрены в деятельность отдела трансплантационной и оптико-реконструктивной хирургии переднего отрезка глазного яблока головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России и филиалов названного Учреждения.

Результаты проведенных исследований используются в учебном процессе Института непрерывного профессионального образования ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России.

### **Апробация работы**

Результаты исследований доложены и обсуждены на Научно-практических конференциях молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы офтальмологии» (Москва, 2018, 2021), XIX, XX, XXI Всероссийских конгрессах катарактальных и рефракционных хирургов с международным участием (Москва, 2018, 2019, 2021), на Всероссийской научно-практической конференции Sochi-Cornea (Сочи, 2021), на еженедельной научно-клинической

конференции ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» (Москва, 2021).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы, из них – 3 в научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикации основных результатов диссертационных исследований. Получено 2 патента РФ на изобретение.

### **Объем и структура диссертации**

Текст диссертации изложен на 113 страницах компьютерного текста, включает 6 таблиц и 41 рисунок. Работа состоит из введения и 4 глав, включающих обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты экспериментально-морфологических исследований, описание оптимизации хирургической технологии внутрироговичного искусственного диафрагмирования, содержит общее заключение и выводы. Список литературы состоит из 119 источников, из них 54 отечественных и 65 иностранных публикаций.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

Диссертационная работа представляет собой серию экспериментальных и морфологических исследований, направленных на изучение светопропускаемости созданных образцов гелевых окрашенных имплантатов, на изучение реакции культуры кератоцитов, ткани роговицы в эксперименте *in vitro* и реакции стромы роговицы экспериментального животного на имплантацию предложенных образцов гелевых окрашенных имплантатов (*in vivo*). На основании эксперимента на кадаверных глазах (*ex vivo*) оценивалась возможность стабильного положения гелевого окрашенного имплантата в роговичном туннеле. Завершающим этапом исследования стала разработка способа хирургической коррекции дефектов

радужной оболочки, включающего в себя проведение фемтолазерного формирования интрастромального туннеля с выполнением самогерметизирующегося роговичного реза для входа в туннель в эксперименте *ex vivo*.

В качестве материалов для нового внутрироговичного гелевого окрашенного имплантата были выбраны:

- 1) гиалуронат натрия в концентрации 1,0%, молекулярная масса 4000 кДа;
- 2) протектор эпителия роговицы гелевый, созданный на основе гидролизата коллагена;
- 3) гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ) в концентрации 2%, молекулярная масса от 80 до 100 кДа.

В качестве красителей для введения в состав образцов были выбраны следующие.

1. Органический нерастворимый пигмент коричневого цвета Cromophthal Brown 5R (Item 0149358V7, Lot 001580H0, Ciba Specialty Chemicals), применяемый для окрашивания искусственной радужки модели РСД-3, который в данной работе добавляли к основе из ГПМЦ и гиалуроната натрия. Является азоконденсационным пигментом. Этот пигмент можно представить как конденсацию двух карбоновых моноазокомпонентов с одним ароматическим диамином путем образования амидного (-CONH-) мостика.

2. Неорганический пигмент зеленого цвета, успешно зарекомендовавший себя в дерматокосметологии, созданный на основе оксидов железа, использование которого разрешено в косметической промышленности в качестве красителей для микропигментации кожи лица и тела (производитель Goochie, КНР).

Были сформированы 3 образца гелеобразных окрашенных имплантатов:

- образец 1 – Натрия гиалуронат + органический пигмент Cromophthal Brown;
- образец 2 – Гидролизат коллагена + краситель с неорганическим пигментом;
- образец 3 – ГПМЦ + органический пигмент Cromophthal Brown.



Разработанные образцы представляют собой вязкую гелеобразную субстанцию, состоящую из основы и красителя. Приготовление образцов осуществляли в асептических условиях. Навеску пигмента помещали в емкость объемом 10 мл и несколько раз встряхивали, после чего добавляли полимерную основу, а затем диспергировали в измельчителе IKA-Werke 2005 (Германия) в течение 2 минут. Далее полученный материал закрывали герметично и помещали в холодильную камеру с температурой внутри +4°C для удаления пузырьков воздуха. По истечении 1 суток контролировали визуально дисперсивность системы (отсутствие расслаивания и выпадения осадка пигмента).

**I. Изучение светопропускаемости гелевых окрашенных имплантатов с помощью спектрофотометрического анализа.** Для анализа были предоставлены три образца исследуемых гелеобразных окрашенных имплантатов. Спектрофотометрический анализ проводили на приборе NanoVue Plus (GE Healthcare, США). Данный капельный (плёночный) спектрофотометр имеет однолучевую оптическую схему и работает в режиме пропускания. Измерения проводили в режиме сканирования в диапазоне 200-950 нм, длина оптического пути составляла 0,2 мм, при максимальной измеряемой величине оптической плотности равной 2,5 (при пересчёте на 10 мм оптический путь – 125), спектральная ширина щели составляла 5 нм, объём образца был равен 2-3 мкл. Все измерения проводили при комнатной температуре. В качестве контрольного образца использовали воду Milli-Q Type 1. Пробоподготовка заключалась в обработке образцов в ультразвуковой ванне «Сапфир» (Сапфир, Россия) в течение 5 минут и последующем тщательном перемешивании на вортексе Biosan FV-2400 (Biosan, Латвия) в течение 30 сек. Отбор аликвоты пробы и её нанесение на подложку ячейки спектрофотометра осуществляли пипеточным дозатором Eppendorf Research plus (Eppendorf, Германия).

**II. Исследование реакции культуры клеток стромы роговицы и кадаверной роговицы человека на введение экспериментальных образцов.** Была изучена биологическая совместимость образцов на модели культуры клеток стромы роговицы человека. Определяли тканевую реактивность донорской

роговицы человека на интеграцию образцов в условиях органного культивирования путем иммуногистохимического исследования на апоптоз и методом сканирующей электронной микроскопии.

### **1. Выделение и культивирование клеточной культуры кератоцитов.**

Для выделения 2D клеточной культуры кератоцитов из Глазного тканевого банка ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России было получено три корнеосклеральных диска, не пригодных для трансплантации. Полученные корнеосклеральные диски механически очищали от эпителия и эндотелия с подлежащими мембранами, далее круглым роговичным трепаном диаметром 8 мм выкраивали центральную стромальную зону. Выделенную зону измельчали гистологическим ножом до получения фрагментов не более 1 мм<sup>2</sup>, далее полученную массу переносили в коническую пробирку типа Эппендорф с добавлением раствора коллагеназы II типа 10 нг/мл в DMEM/F12. Пробирку помещали в термошейкер 800 rpm, 37 °C, 25 мин. Далее образец 3-кратно промывали раствором фосфатно-солевого буфера и переносили в чашки Петри диаметром 35 мм для дальнейшего культивирования. Для 2D культивирования кератоцитов использовали полную питательную среду на основе DMEM/F12 с добавлением 10% бычьей фетальной сыворотки, 1% раствора антибиотиков, 2 mM L-глутамин. Культивирование проводили при стандартных условиях 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Пассирование клеточной культуры производили по достижению 80% конфлюэнции с использованием 1,5 мл TrypLE (Termo fisher scientific, США), экспозиция 10 мин при 37°C, полученную клеточную суспензию переносили в 15 мл центрифужную пробирку с добавлением 3 мл полной питательной среды. Образцы центрифугировали при 1200 rpm, 37°C в течение 5 мин. Далее супернатант удаляли вакуумным насосом, осадок ресуспендировали в 1 мл полной питательной среды. Для подсчета количества клеток использовали автоматический клеточный счетчик Luna II (Logos Biosystems, Южная Корея). Клеточную культуру в концентрации 1,5x10<sup>5</sup> клеток/мл переносили в культуральные матрасы 25 см<sup>2</sup> с добавлением 5 мл полной питательной среды. По достижению культурой 3-го пассажа изучали фенотип полученной клеточной

культуры методом иммуноцитохимического анализа с последующим проведением эксперимента с формированием контрольной и опытной групп.

**2. Анализ воздействия образцов гелевых окрашенных имплантатов на 2D клеточную культуру.** Для оценки воздействия изучаемых имплантатов был проведен анализ «ДНК-комет» и определена пролиферативная активность клеточной культуры кератоцитов. Для этого полученная клеточная культура 3-го пассажа культивировалась в 24-луночных планшетах в концентрации  $1,5 \times 10^4$  с добавлением 2 мл полной питательной среды. Спустя 3 суток культивирования формировали 3 опытные и контрольную группы. В опытные группы вносили по 1 мл изучаемого образца имплантата – образец 1 (на основе гиалуроновой кислоты), образец 2 (на основе гидролизата коллагена), образец 3 (на основе метилцеллюлозы), контрольная группа представляла интактную клеточную культуру кератоцитов. На 3-и и 7-е сутки после внесения образцов формировали клеточную суспензию (по методике, описанной выше), и производили подсчет клеток с дальнейшим анализом активации раннего апоптоза методом «ДНК-комет». Метод «ДНК-комет» позволяет определить повреждение ДНК и изучить репарацию на уровне одиночной клетки.

**3. Экспериментально-морфологическое исследование влияния разработанных гелевых окрашенных имплантатов на роговицу человека (органотипическое культивирование *in vitro*).** Для эксперимента было использовано 12 роговиц, полученных из Глазного тканевого банка МНТК «Микрохирургии глаза», не пригодных для трансплантации. Во всех роговицах был сформирован интрастромальный туннель механическим способом с последующим введением в него образца гелевого имплантата ( $n=3$  для каждого образца), контрольную группу составили роговицы без введения имплантата ( $n=3$ ).

**Метод органотипического культивирования роговиц.** Культивирование роговиц в ходе исследования проводили при стандартных условиях:  $t +37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , в питательной среде DMEM/F12 с добавлением 2% эмбриональной бычьей сыворотки, 1% раствора антибиотиков и 1% раствора глутамакса. Визуальный

контроль осуществляли при помощи инвертированного светового фазово-контрастного микроскопа Olympus IX-81 (Olympus, Япония). Через 7 суток культивирования роговицы доставали из питательной среды и промывали 3-кратно фосфатно-солевым буфером для дальнейшего исследования на апоптоз.

**Метод исследования раннего апоптоза.** Для определения токсичности изучаемых образцов определяли апоптоз кератоцитов в криостатных срезах роговицы.

Для исследования апоптоза использовали метод иммуногистохимии. Для изучения каспазного пути апоптоза использовали первичные антитела к Caspase 8 (Abcam, Великобритания), Caspase 3/7 (Abcam, Великобритания), а для изучения митохондриального пути апоптоза – BAX (Abcam, Великобритания), Cyt C (Abcam, Великобритания), культивирование с антителами производили в течение 60 мин. при комнатной температуре.

**Метод сканирующей электронной микроскопии.** В качестве фиксатора для роговиц использовали 10%-ный раствор формалина. Для проведения оптимальной дегидратации применяли раствор ацетона в восходящих концентрациях по 30 минут в каждом с последующей вакуумной сушкой в критической точке. После сушки образцы монтировались на алюминиевом столике, напылялись золотом с толщиной слоя 5 нм для обеспечения электронно-проходящего слоя на поверхности образца. Далее их помещали в камеру сканирующего электронного микроскопа (Jeol, Япония), исследовали в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 5 кВ.

**Обработка количественных данных.** Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием методов описательной статистики с определением средней арифметической величины ( $M$ ) и стандартного отклонения ( $\pm\sigma$ ) на персональном компьютере с программным обеспечением Graph Pad Software Prisma 8.

**III. Экспериментально-морфологическое исследование влияния разработанных гелеобразных окрашенных имплантатов на ткани глаза экспериментальных животных (in vivo).** Материалом для исследования in vivo

послужили кролики-альбиносы (n=20). Были сформированы 4 группы исследования. Первую составили 5 кроликов (5 глаз), в роговицу которых вводили имплантат на основе гиалуроната натрия с органическим пигментом (образец 1). Во вторую группу вошли 5 кроликов (5 глаз), в роговицу которых вводили имплантат на основе гидролизата коллагена с неорганическим пигментом (образец 2). В третью группу вошли 5 кроликов (5 глаз), в роговицу которых вводили имплантат на основе метилцеллюлозы с органическим пигментом (образец 3). Животным контрольной группы (5 глаз) в сформированный механически роговичный туннель вводили 0,5 мл вискоэластика (1% гиалуронат натрия). В контрольной группе аналогичным способом формировался роговичный туннель с введением в качестве контроля вискоэластика (гиалуронат натрия 1%). В каждой группе экспериментальных животных наблюдали с выполнением биомикроскопии и фотофиксации в сроки 1-, 3-, 7-, 14-, 30- и 90-е сутки. На сроке 3 месяца животных выводили из эксперимента, 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.

**IV. Оценка стабильности положения гелевого окрашенного имплантата в роговичном туннеле, сформированном фемтосекундным лазером, в эксперименте на кадаверных глазах (ex vivo).** На 7 донорских глазах в Глазном тканевом банке МНТК «Микрохирургия глаза» предварительно был удален эпителий для улучшения визуализации. При помощи фемтосекундного лазера «Фемто Визум» (Оптосистемы, Москва, Троицк) и программы «Роговичный туннель» на глубине 400 мкм был сформирован кольцевидный замкнутый роговичный туннель с внешним диаметром 8,5 мм, внутренним – 5,0 мм. Длина насечки для входа в туннель составляла 3,5 мм. Толщина роговицы кадаверных глаз составляла 700-800 мкм. В сформированный роговичный туннель с помощью канюли вводили 0,5 мл гелевого окрашенного имплантата. По окончании эксперимента выполняли оптическую когерентную томографию роговицы

кадаверного глаза на приборе ОСТ Visante (Carl Zeiss, Германия) и фоторегистрацию с помощью фотоцелевой лампы (Naag-Streit, Германия). Образцы зафиксировали в растворе нейтрального формалина для дальнейшего выполнения гистологического исследования роговицы с окраской гематоксилином и эозином, полученные препараты изучали под световым микроскопом фирмы «Leica DM» при x50, x100, x400-кратном увеличении с последующей фоторегистрацией.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

**I. Результаты спектрофотометрического анализа гелевых окрашенных имплантатов на основе различных материалов.** В результате спектрофотометрического анализа были получены спектры пропускания и поглощения образцов 1 и 3. Повторяемость результатов измерения продемонстрирована на примере спектров поглощения двух проб каждого образца. Коэффициент пропускания образцов 1 и 3 не превышал  $1,2\%T$  на всём измеряемом диапазоне длин волн. Для обоих образцов были характерны максимумы пропускания в ближнем инфракрасном диапазоне длин волн (800-950 нм) и, учитывая возрастающую динамику, можно ожидать дальнейшего увеличения пропускания с увеличением длины волны инфракрасного излучения. Образец 3, относительно образца 1, обладал более высоким пропусканием в ультрафиолетовой области (200-400 нм), особенно в диапазоне более коротких длин волн (200-300 нм). Для обоих образцов было характерно наименьшее пропускание (соответственно и наибольшее поглощение) излучения в диапазоне 500-700 нм, т. е. видимой части спектра.

Отдельно стоит отметить образец 2. Для этого образца не удалось провести измерения, ни в режиме сканирования (200-950 нм), ни в одноволновом режиме (200-1100 нм, с шагом 100 нм), т. к. светочувствительный элемент (детектор) спектрофотометра не регистрировал достаточное количество фотонов (т. е. уровень пропускаемого образцом излучения был ниже предела детектирования

прибора). Таким образом, полученный результат говорит о полном отсутствии пропускания света, а значит, о хороших диафрагмирующих свойствах гелевого окрашенного имплантата на основе гидролизата коллагена и неорганического пигмента. Данная особенность является важным критерием для оценки пригодности внутрироговичного гелевого окрашенного имплантата к использованию в клинической практике с целью выполнения кератопигментации у пациентов с жалобами на засветы и снижением зрения.

**II. Результаты 2D культивирования клеток стромы роговицы человека в присутствии гелевых окрашенных имплантатов (in vitro).** Для изучения влияния исследуемых образцов имплантатов на 2D клеточную культуру кератоцитов оценивали два показателя: пролиферативную активность и повреждение ДНК. Морфология клеточной культуры после внесения образцов имплантата была трудно различима. Пролиферативная активность клеточной культуры кератоцитов не отличалась между контрольной и опытными группами на всем протяжении эксперимента (Таблица 1).

Таблица 1 – Пролиферативная активность кератоцитов

Группы	1-е сутки	3-е сутки	7-е сутки
Контрольная группа	$1,5 \times 10^4$	$2,7 \times 10^4$	$5,8 \times 10^4$
Образец 1	$1,5 \times 10^4 *$	$2,5 \times 10^4 *$	$5,7 \times 10^4 *$
Образец 2	$1,5 \times 10^4 *$	$2,3 \times 10^4 *$	$5,4 \times 10^4 *$
Образец 3	$1,5 \times 10^4 *$	$2,2 \times 10^4 *$	$5,2 \times 10^4 *$

\* $p > 0,05$

Повреждение ДНК было определено методом «ДНК-комет». Статистической разницы между группами выявлено не было. По итогам проведения эксперимента установлено, что ни один из образцов не оказывает воздействия на пролиферативную активность культуры клеток, а также не приводит к повреждению ДНК клеток.

**Результаты экспериментально-морфологического исследования влияния разработанных гелевых окрашенных имплантатов на роговицу человека.** Выявлено, что экспрессия Цитохрома С и Caspasa 8 в роговицах с образцами имплантатов 1 и 3 была сопоставимой и статистически выше ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой. При этом статистически значимых различий в роговицах с образцом 2 и контрольной группой выявлено не было ( $p > 0,05$ ). В исследуемых образцах экспрессия инициаторного маркера митохондриального пути апоптоза BAX отсутствовала. Изучение экспрессии эффекторных маркеров Caspasa 3/7 показало отсутствие статистически значимых различий. Данные представлены в формате  $M \pm \sigma$ , где  $M$  – среднее арифметическое,  $\sigma$  – стандартное отклонение (Таблицы 2, 3).

Таблица 2 – Экспрессия инициаторных маркеров апоптоза до культивирования (среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение)

<b>Маркер</b>	<b>Caspasa 8</b>	<b>BAX</b>	<b>Cyt C</b>	<b>Caspasa 3/7</b>
Образец 1	0,08 $\pm$ 0,03	0,03 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,03	0,03 $\pm$ 0,01
Образец 2	0,06 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,01
Образец 3	0,09 $\pm$ 0,03	0,03 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,04	0,04 $\pm$ 0,01
Контроль	0,05 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,01

Таблица 3 – Экспрессия инициаторных маркеров апоптоза после культивирования (среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение)

<b>Маркер</b>	<b>Caspasa 8</b>	<b>BAX</b>	<b>Cyt C</b>	<b>Caspasa 3/7</b>
Образец 1	0,10 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,01
Образец 2	0,05 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,01
Образец 3	0,10 $\pm$ 0,04	0,03 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,04	0,03 $\pm$ 0,01
Контроль	0,04 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01



При сканирующем электронно-микроскопическом исследовании роговиц контрольной группы были выявлены незначительные различия в толщине стромальных коллагеновых волокон до и после культивирования, сформированный карман был слабо выражен. Исследование образца 1 показало, что после культивирования детектируется частичное вымывание имплантата и образование волокнистой структуры в профиле сформированного кармана. В роговицах с образцом 2 изменение толщины волокон не отмечалось, имплантат полностью заполнял весь объём сформированного канала, новообразованных волокон обнаружено не было. В исследуемых роговицах с образцом имплантата 3 было выявлено уменьшение толщины коллагеновых волокон, также отмечалось значительное вымывание образца из интрастромального кармана, новообразованных волокон не отмечалось.

Проведенное иммуногистохимическое исследование кадаверной роговицы, культивируемой с исследуемыми образцами показало, что наилучшие результаты демонстрировал образец 2 по следующим критериям: слабая экспрессия инициаторных белков апоптоза Caspasa 8 и Цитохром С, отсутствие экспрессии ВАХ и эффекторных белков Caspasa 3/7. Согласно результатам электронно-микроскопических исследований, образцы 1 и 3 подвергаются частичному растворению и вымыванию из интрастромального кармана, в то время как образец 2 имеет плотную структуру и сохраняется в роговичном кармане на всем протяжении культивирования, как минимум в течение 7 суток. Ввиду этого, гелевый окрашенный имплантат на основе гидролизата коллагена может являться перспективным в качестве использования при проведении кератопигментации с лечебной диафрагмирующей целью.

**III. Результаты исследования влияния разработанных гелеобразных окрашенных имплантатов на ткани глаза экспериментального животного (*in vivo*).** Биомикроскопически у всех кроликов опытных групп в ранние сроки наблюдения (первые 7 суток) отмечали умеренную поверхностную инъекцию сосудов конъюнктивы и наличие незначительного отека роговицы в зоне операционного доступа, что оценивалось как ответная реакция ткани на

хирургическую травму. Она постепенно исчезала к 7-м суткам после операции. В группе 1 отмечено наличие гиперемии сосудов в течение 21 суток. На 14-е сутки в этой же группе наблюдалась локальная отечность и полупрозрачное помутнение роговицы в проекции роговичного разреза. В опытных группах визуализировали роговицу без признаков воспалительной реакции. В контрольной группе роговицы сохраняли свою прозрачность.

Изучение роговицы методом световой микроскопии с образцом 1 показало, что глубоко в задних слоях стромы роговицы определяется наличие коричневого пигмента. Канал залегания краски преимущественно линейный, прерывается тонкими перемычками со сглаживанием края канала по типу близкорасположенных мелких ячеек, имплантат компактен, пропитывание прилегающей зоны стромы пигментом не наблюдается, по краю канала легкое уплотнение волокон стромы, нельзя исключить инкапсуляцию пигмента. При изучении роговицы с образцом 2 отмечено, что в средних слоях стромы роговицы определяется наличие зелено-коричневого пигмента. Канал залегания краски линейный короткий, практически не прерывается, пигмент красителя преимущественно компактный, пропитывание прилегающей зоны не обнаружено. В роговице с образцом 3 выявлено, что в задних слоях стромы определяется наличие коричневого пигмента. Канал залегания краски линейный, не прерывается, пигмент красителя преимущественно рыхлый, пропитывание прилегающей зоны стромы пигментом по типу легкого «флёра». Эндотелий – без особенностей во всех случаях. Во всех группах наблюдали сохранение первоначальной интенсивности краски, что сопоставимо с наблюдениями в эксперименте *in vivo*. Была отмечена компактность укладки.

Явной инфильтрации окружающих тканей красками выявлено не было ни в одной группе, минимальная инфильтрация косвенно свидетельствовала об отсутствии воспалительных и фибробластических процессов в зоне ее введения. Явных токсических проявлений действия изучаемых образцов на ткани глаза не выявлено ни одном экспериментальном случае. Таким образом, экспериментально-морфологическое исследование *in vivo* гелевых окрашенных

имплантатов, изготовленных из различных материалов, показало, что при максимальном сроке наблюдения (до 3 месяцев) в большинстве случаев пребывание разработанных имплантатов в роговице кролика в изученные сроки не вызывало видимых структурных изменений слоев роговицы. Распыление пигмента с легким «флёр» наблюдали в случае образца 3 на основе метилцеллюлозы и органического пигмента, что сопоставимо с результатом исследования на глазах экспериментального животного, где биомикроскопически на 2 глазах из 5 зафиксировано неравномерное распределение цвета. Образец 2 на основе гидролизата коллагена и неорганического пигмента показал себя оптимальным по состоянию канала и отсутствию инфильтрации краской окружающей стромы, следовательно, перспективны дальнейшие доклинические исследования данного внутривитреального окрашенного имплантата.

**IV. Результаты оценки стабильности положения гелевого окрашенного имплантата в роговичном туннеле, сформированном фемтосекундным лазером, в эксперименте на кадаверных глазах (ex vivo).** Для оценки возможности стабильного нахождения гелевого окрашенного имплантата в роговичном туннеле было принято решение вводить интрастромально 0,5 мл образца 2 на основе гидролизата коллагена и неорганического пигмента, так как в результате предыдущих экспериментов он показал себя оптимальным с точки зрения биосовместимости, что определяет дальнейшее изучение технологии фемтолазерной кератопигментации с его использованием. В результате эксперимента визуально определили успешное фиксирование гелевого окрашенного вещества зелено-коричневого цвета в пространстве сформированного с помощью фемтолазера роговичного туннеля. Остальные зоны роговицы оставались интактными. Гелевый имплантат распределен в роговичном туннеле равномерно. По результатам гистологического исследования гелевый краситель введен в интрастромально выполненный туннель роговицы, визуализируется краевая пигментация. Следует отметить, что при выполнении эксперимента на 7 кадаверных глазах после введения одинакового количества гелевого окрашенного имплантата во всех случаях наблюдалось вытекание

некоторой его части наружу из роговичного туннеля, что позволяет думать о несовершенстве стандартной формы реза (прямой вертикальный рез) для входа в роговичный туннель в случае выполнения кератопигментации, так как рез указанной формы практически не препятствует выходу гелеобразного окрашенного имплантата наружу и не обеспечивает его стабильной фиксации, следовательно, достижение необходимого диафрагмирующего эффекта будет невозможным.

Таким образом, результаты проведения фемтолазерной кератопигментации с использованием гелевого имплантата и техническая возможность осуществления данной процедуры подтверждены данными эксперимента *ex vivo* и гистологического исследования. Однако отмеченная особенность интраоперационного выхода некоторого количества гелевого имплантата наружу указывает на необходимость оптимизации способа формирования интрастромального туннеля и выполнения самогерметизирующегося роговичного реза для входа в туннель для обеспечения стабильной фиксации гелевого имплантата.

**Разработка хирургической методики внутрироговичного искусственного диафрагмирования с применением фемтосекундного лазера.** Было разработано программное обеспечение для отечественного фемтосекундного лазера с целью выполнения самогерметизирующегося роговичного реза для входа в туннель и его применение в эксперименте *ex vivo*. В ходе проведения внутрироговичной фемтолазерной кератопигментации для хирургической коррекции дефектов радужной оболочки с помощью фемтосекундного лазера производят самогерметизирующийся роговичный рез на глубину 80% толщины роговицы для входа в туннель, расслаивают строму роговицы на этой глубине по кольцу с внутренним диаметром 4-5 мм с шагом 0,1 мм и внешним диаметром 6-8 мм с шагом 0,1 мм, затем в сформированный туннель с помощью канюли вводят биосовместимый гелевый окрашенный имплантат до полного заполнения пространства туннеля.

Самогерметизирующийся роговичный рез для входа в интрастромальный

туннель выполняется тангенциально-ориентированным и может быть выполнен с одним или с двумя изломами в форме «зигзага» или «ступеньки», или двумя пересекающимися надрезами. Самогерметизирующийся роговичный рез может быть также выполнен радиально-ориентированным двумя пересекающимися надрезами. В получившийся интрастромальный туннель с помощью канюли 30 G вводится красящее вещество до полного заполнения пространства туннеля. Для создания эффекта самогерметизации входа в роговичный туннель на базе компании ООО «Оптосистемы» разработано программное обеспечение «Фемто Визум: Роговичный туннель» для фемтосекундного лазера «Фемто Визум». Используемые в работе параметры фемтосекундного лазера: частота импульсов лазера – 100 кГц – 10 МГц; скорость перемещения пучка – 5-200 мм/с; энергия в импульсе – 0,1-3 мкДж.

Для подтверждения эффективности разработанного программного обеспечения был проведен эксперимент на кадаверных глазах. На 10 донорских глазах, не прошедших отбор для кератопластики в Глазном тканевом банке МНТК «Микрохирургия глаза», предварительно удаляли эпителий для улучшения визуализации. На каждой роговице проводили формирование двух полукольцевых замкнутых туннелей с разной формой реза для входа в туннель. При помощи фемтосекундного лазера «Фемто Визум» (программа «Роговичный туннель») на глубине 400 мкм был сформирован кольцевидный замкнутый роговичный туннель с внешним диаметром 8 мм и внутренним диаметром 4 мм. Использованы все варианты формирования самогерметизирующегося роговичного реза с вышеописанными параметрами. По окончании эксперимента выполнена оптическая когерентная томография роговицы кадаверного глаза на приборе RTVue-100 (Optovue, США). В результате эксперимента визуально определили успешное фиксирование гелевого окрашенного имплантата в пространстве сформированного с помощью фемтолазера роговичного туннеля. Остальные зоны роговицы оставались интактными.

При выполнении эксперимента с формированием тангенциально-ориентированного входа в интрастромальный туннель с одним изломом (n=4)

вытекание имплантата наружу в процессе его введения не наблюдалось ни в одном случае. При выполнении эксперимента с формированием тангенциально-ориентированного двунаправленного входа в интрастромальный туннель «ступенькой» с двумя изломами (n=4) вытекание имплантата наружу в процессе его введения наблюдалось в 3 случаях из 4. При формировании других возможных форм реза в большинстве случаев зафиксировано вытекание гелевого окрашенного имплантата. При выполнении тангенциально-ориентированного «зигзагообразного» входа в интрастромальный туннель с двумя изломами (n=4) вытекание имплантата наружу в процессе его введения наблюдалось в 3 из 4 случаев. При создании тангенциально-ориентированного (n=4) и радиально-ориентированного (n=4) входов в интрастромальный туннель, выполненных двумя пересекающимися надрезами, вытекание имплантата наружу в процессе его введения отмечено во всех случаях.

Таким образом, использование предложенного программного обеспечения позволяет сформировать самогерметизирующийся тангенциально-ориентированный роговичный рез с одним изломом для входа в интрастромальный туннель, который препятствует миграции, выходу и потере красящего вещества, тем самым обеспечивая стабильную фиксацию имплантата в туннеле.

## **ВЫВОДЫ**

1. На основании спектрофотометрического анализа определен образец имплантата, проявивший максимальную диафрагмирующую способность (на основе гидролизата коллагена с неорганическим пигментом), образцы на основе метилцеллюлозы с органическим пигментом и на основе гиалуроната натрия с органическим пигментом обладают светопропусканием.

2. В результате двухмерного клеточного культивирования и органотипического культивирования в присутствии опытных образцов доказано, что ни один из образцов не оказывает воздействия на пролиферативную

активность культуры клеток, а также не приводит к повреждению ДНК клеток. Проведенное иммуногистохимическое исследование апоптоза показало, что экспрессия Цитохрома С и Caspasa 8 в роговицах с образцами имплантатов 1 и 3 была сопоставимой и статистически выше ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой. При этом статистически значимых различий в роговицах с образцом 2 и контрольной группой выявлено не было ( $p > 0,05$ ). В исследуемых образцах экспрессия инициаторного маркера митохондриального пути апоптоза BAX отсутствовала. Изучение экспрессии эффекторных маркеров Caspasa 3/7 показало отсутствие статистически значимых различий.

3. После введения образцов гелевых окрашенных имплантатов в роговицу экспериментальных животных отмечено, что к третьему месяцу наблюдения образцы занимали стабильное положение в сформированном интрастромальном туннеле, воспалительная реакция глаза кролика в раннем и отдаленном послеоперационном периодах была минимальной или отсутствовала. Образец на основе гидролизата коллагена и неорганического пигмента показал себя оптимальным по состоянию канала и отсутствию инфильтрации краской окружающей стромы, что позволяет считать его наиболее перспективным для применения в клинических условиях.

4. Выполнение фемтосекундной лазерной кератопигментации с гелевым окрашенным имплантатом является прецизионным, прогнозируемым и безопасным процессом. Гелевая структура имплантата играет важную роль в обеспечении стабильной его фиксации в пространстве роговичного туннеля. Интраоперационный выход некоторого количества имплантата наружу позволяет предположить несовершенство стандартной форма реза (прямой вертикальный рез) для входа в роговичный туннель в случае выполнения кератопигментации.

5. В результате проведенного исследования разработана технология внутрироговичного искусственного диафрагмирования с фемтосекундным лазерным сопровождением, разработано программное обеспечение для оптимизации хирургической методики с формированием самогерметизирующегося роговичного реза для входа в роговичный туннель.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В качестве материала для изготовления гелевого окрашенного имплантата для внутрироговичной кератопигментации, пригодного с точки зрения биосовместимости и диафрагмирующих свойств, возможно использовать в качестве основы «Протектор эпителия роговицы гелевый» на основе гидролизата коллагена, в качестве красящего вещества – неорганический пигмент на основе оксида железа.

2. Для обеспечения стабильной фиксации гелевого окрашенного имплантата в роговичном туннеле и, как следствие, достаточного диафрагмирующего эффекта, в ходе фемтолазерной кератопигментации целесообразно выполнять самогерметизирующийся роговичный рез с одним изломом с тангенциально-ориентированным входом в интрастромальный туннель.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Комарова, О.Ю.** Хирургическая коррекция дефектов радужки методом интрастромальной фемтолазерной кератопигментации с использованием нового гелевого имплантата на основе водорастворимого полисахарида и нерастворимых органических пигментов серии CROMOPTAL / О.Ю. Комарова, С.Б. Измайлова, С.В. Новиков, А.С. Завьялов и др. – Текст: непосредственный // Практическая медицина. – 2018. – Т. 16, № 4. – С. 169-175. DOI: 1032000/2072-1757-2018-16-4-169-174

2. **Комарова, О.Ю.** Инновационные технологии в хирургии роговицы глаза в эксперименте *ex vivo*. / О.Ю. Комарова, С.Б. Измайлова, К.Э. Лапшин, А.В. Шацких и др. – Текст: непосредственный // Современные технологии в медицине. – 2018. – Т. 10, № 4. – С. 84-93. DOI: 10.17691/stm2018.10.4.10

3. **Комарова, О.Ю.** Способ хирургического лечения дефектов радужной оболочки с помощью фемтолазерной кератопигментации с использованием нового гелевого имплантата на основе водорастворимого полисахарида и



нерастворимых органических пигментов серии CROMOPHTAL (экспериментальное исследование) / О.Ю. Комарова, С.Б. Измайлова, С.В. Новиков, А.В. Шацких и др. – Текст: непосредственный. // Современные технологии в офтальмологии. – 2018. – № 4. – С. 162-166.

4. Измайлова, С.Б. Изучение разработанных внутрироговичных гелевых окрашенных имплантатов для кератопигментации на основе различных материалов. Экспериментальное исследование. С.Б. Измайлова, С.А. Борзенко, **О.Ю. Комарова**, Д.С. Островский. – Текст: непосредственный // Офтальмохирургия. – 2021. – № 2. – С. 40-47. DOI: <https://doi.org/10.25276/0235-4160-2021-2-40-47>

### **Патенты РФ на изобретение:**

1. Пат. 2672384 РФ, МПК А61F 9/00, А61F 9/007, А61F 2/14. Способ хирургического лечения аниридии с аметропией / С.Б. Измайлова, С.В. Новиков, А.А. Яровой, Н.П. Соболев, **О.Ю. Комарова**; заявитель и патентообладатель ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова». – № 2017135291 заявл. 05.10.2017; опубл. 14.11.2018.

2. Пат. 2741372 РФ, МПК А61F 9/00, А61F 9/008. Способ проведения внутрироговичной фемтолазерной кератопигментации для хирургической коррекции дефектов радужной оболочки / С.Б. Измайлова, **О.Ю. Комарова**, А.С. Завьялов; заявитель и патентообладатель ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова». – № 2020109299 заявл. 03.03.2020; опубл. 25.01.2021.

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ГПМЦ – гидроксипропилметилцеллюлоза

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИХД – иридохрусталиковая диафрагма

ОКТ – оптическая когерентная томография

## Биографические данные

Максимова Ольга Юрьевна, 1991 года рождения, в 2014 г. окончила Воронежскую государственную медицинскую академию имени Н.Н.Бурденко по специальности «Лечебное дело». С 2014 по 2016 гг. проходила обучение в клинической ординатуре по специальности «Офтальмология» в ФГБУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова». С 2016 по 2019 гг. обучалась в очной аспирантуре по специальности «Офтальмология» на базе ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России в отделе трансплантационной и оптико-реконструктивной хирургии переднего отрезка глазного яблока.

С 2021 г. и по настоящее время работает врачом-офтальмологом в Центре офтальмологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Клиническая больница» Управления делами Президента Российской Федерации. Является автором и соавтором 6 научных публикаций. По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы, из них 3 – в периодических изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки для публикации результатов диссертационных исследований. Имеет 2 патента РФ на изобретение. Призер (3-е место) Всероссийской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы офтальмологии» (Москва, 2021).