

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

*На правах рукописи*

**МАКСИМОВА ОЛЬГА ЮРЬЕВНА**

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

3.1.5. - Офтальмология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание учёной степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук  
Измайлова Светлана Борисовна

Научный консультант:  
доктор биологических наук  
Перова Надежда Викторовна

Москва – 2023

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>5</b>
<b>Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>12</b>
1.1. Исторические аспекты хирургической коррекции дефектов радужки у пациентов с аниридией.....	12
1.1.1. Экстраокулярные и внутрироговичные методы.....	12
1.1.2. Интраокулярные методы.....	18
1.1.3. Современный этап развития внутрироговичной хирургии с целью коррекции дефектов радужки у пациентов с аниридией.....	27
1.2. Материалы, потенциально пригодные для внутрироговичного введения и модели для определения их биосовместимости.....	30
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	<b>37</b>
2.1. Изучение светопропускаемости гелевых окрашенных имплантатов с помощью спектрофотометрического анализа.....	40
2.2 Исследование реакции культуры клеток стромы роговицы и кадаверной роговицы человека на введение экспериментальных образцов.....	41
2.2.1. 2D культивирование клеток стромы роговицы человека в присутствии гелевых окрашенных имплантатов.....	41
2.2.2. Экспериментально-морфологическое исследование влияния разработанных гелевых окрашенных имплантатов на роговицу человека (органотипическое культивирование).....	45

2.3. Экспериментально-морфологическое исследование влияния разработанных гелевых окрашенных имплантатов на ткани глаза экспериментального животного (in vivo)..... 49

2.4. Оценка стабильности положения гелевого окрашенного имплантата в роговичном туннеле, сформированном фемтосекундным лазером, в эксперименте на кадаверных глазах (ex vivo).....51

### **ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ РАЗРАБОТАННЫХ ГЕЛЕВЫХ ОКРАШЕННЫХ ИМПЛАНТАТОВ... 53**

3.1. Результаты спектрофотометрического анализа гелевых окрашенных имплантатов..... 54

3.2. Результаты оценки реакции культуры клеток стромы роговицы и кадаверной роговицы человека на введение экспериментальных образцов... 57

3.2.1. Результаты 2D культивирования клеток стромы роговицы человека в присутствии гелевых окрашенных имплантатов.....57

3.2.2 Результаты экспериментально-морфологического исследования влияния разработанных гелевых окрашенных имплантатов на роговицу человека..... 61

3.3. Результаты исследования влияния разработанных гелевых окрашенных имплантатов на ткани глаза экспериментального животного..... 69

3.3.1. Результаты биомикроскопического исследования..... 70

3.3.2. Результаты световой микроскопии ..... 73

3.4. Результаты оценки стабильности положения гелевого окрашенного имплантата в роговичном туннеле, сформированном фемтосекундным лазером, в эксперименте на кадаверных глазах (ex vivo).....	78
---	----

<b>ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ХИРУРГИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ ВНУТРИРОГОВИЧНОГО ИСКУССТВЕННОГО ДИАФРАГМИРОВАНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРА .....</b>	<b>81</b>
--	-----------

<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>89</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>96</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>	<b>98</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>99</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>100</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Обширные дефекты радужки, вплоть до полной аниридии, могут быть результатом аномалии развития (врожденная патология), могут возникнуть 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 соавт., 2014). Социальную значимость проблемы трудно переоценить. Она обусловлена тем, что наиболее часто отмечается у лиц молодого, наиболее трудоспособного возраста. Жалобы на низкую остроту зрения в связи с засветами и аберрациями снижают качество жизни. Частота повреждений радужки в ходе возникновения травмы колеблется от 33,3 до 84,77% (Поздеева Н.А., Паштаев Н.П., 2012). В исследованиях Егоровой Э.В. (1979) показано, что у 55% больных травматическим катарактам сопутствовали дефекты радужки (отрывы, разрывы, колобомы, мидриаз), из них у 0,7 - аниридия или большие дефекты более 1/2 площади. Венгер Г.Е. (1984) наблюдала среди травматических повреждений радужки иридодиализ и мидриаз в 8,6 и 14,6% случаев соответственно. С проблемой больших дефектов радужной оболочки приходится встречаться у пациентов после проведения иридоциклэктомий 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. Необратимое расширение зрачка ведет к монокулярной диплопии, выраженной фотофобии и является серьезным косметическим недостатком (Венгер Г.Е., 1977; Егорова Э.В., 1978). Поражения радужки значительно отягощают течение

посттравматического процесса в глазу, снижают зрительные функции из-за светорассеяния, способствуют развитию дистрофии роговицы, вторичной глаукомы и других осложнений (Федоров С.Н., 1992).

С течением времени формировались разные подходы к решению этой проблемы, что отражено в опыте отечественных и зарубежных авторов. Описано проведение одномоментных реконструктивных вмешательств при посттравматических повреждениях переднего сегмента глаза: от пупилло- и иридопластики, применения аутоканей или аллотрансплантатов для замещения дефектов радужной оболочки в комплексе с одновременным использованием некоторых моделей интраокулярных линз (ИОЛ) до создания искусственной радужки и ИХД. 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; Июшин 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 диафрагмирующего 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. В связи с этим актуальным вопросом является разработка интракорнеального окрашенного имплантата, удобного для введения с минимальной интраоперационной травматизацией,

для решения функциональных и косметических аспектов проблемы аниридии и изучение его биосовместимости с тканями роговицы.

### **Цель исследования**

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

### **Задачи исследования**

1. На основании проведения спектрофотометрии определить светопропускаемость образцов гелевых окрашенных имплантатов для оценки их функционального диафрагмирующего эффекта.
2. На основании методов двумерного 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 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 методике кератопигментации.
2. Выстроена система изучения и оценено влияние гелевых окрашенных имплантатов 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 Фемто Визум 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.

### **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 РФ для публикации основных результатов диссертационных исследований. Получено 2 патента РФ на изобретение.

## **Внедрение результатов работы**

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.

## **Структура и объём работы**

Текст диссертации изложен на 113 страницах машинописного 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, включающих 54 отечественных и 65 иностранных публикаций.

Экспериментальные образцы и изделия на основе гиалуроновой кислоты и метилцеллюлозы были изготовлены ООО «НЭП МГ» г. Москва, при непосредственном участии зам. ген. директора по производству Новикова С.В., на основе гидролизата коллагена – АО «БИОМИР сервис» г.Краснознаменск, Московская область, при непосредственном участии д.б.н. Перовой Н.В.

Изделие медицинского назначения на основе гидролизата коллагена «Протектор эпителия роговицы гелевый» изготовлено и предоставлено для

экспериментальных и клинических исследований производителем - АО «БИОМИР сервис» г.Краснознаменск, Московская область.

Экспериментальные исследования *in vitro*, а также сканирующая электронная микроскопия выполнены на базе лаборатории Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем (зав. центром – д.м.н. С.А. Борзенок) ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Гистологические исследования выполнены на базе лаборатории патологической анатомии и гистологии глаза ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России под руководством заведующей лабораторией – к.м.н. Шацких А.В.

Экспериментальные исследования *in vivo* выполнены на испытательной базе АНО «ИМБИИТ» - обособленном подразделении "Центр перспективных исследований" под руководством д.б.н. Перовой Н.В., Московская обл., г. Краснознаменск.

Спектрофотометрический анализ образцов проведен на базе ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» при непосредственном участии сотрудника института Сухоженко А., г. Москва.

Разработка оригинального программного обеспечения и эксперименты *ex vivo* с использованием отечественного фемтосекундного лазера осуществлялись на базе Центра физического приборостроения института общей физики РАН при непосредственном участии сотрудника ООО «Оптосистемы» Завьялова А.С. и под руководством директора ООО «Оптосистемы» Вартапетова С.К., г. Москва, г.о. Троицк.

## **Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1. Исторические аспекты хирургии с целью коррекции дефектов радужки у пациентов с аниридиями**

Развитие в последние десятилетия технологий хирургического лечения аниридий и применение различных методик оперативного вмешательства требуют четкого определения рекомендаций и показаний к тому или иному вмешательству в зависимости от характера несостоятельности радужки и состояния прилегающих тканей поверхности глазного яблока, учитывая их возможные посттравматические изменения.

В современной офтальмологии с целью искусственного диафрагмирования и восстановления нарушенной функции радужной оболочки используются различные методы искусственного диафрагмирования:

- 1) экстраокулярные – окрашенные контактные линзы;
- 2) роговичные – кератопигментация, интрастромальные имплантаты;
- 3) интраокулярные – искусственная радужка, интраокулярная линза (ИОЛ) с окрашенной гаптикой, внутрикапсульные кольца с окрашенными «плавниками» [31].

#### **1.1.1. Экстраокулярные и внутривогазовые методы**

Говоря об экстраокулярных методах коррекции аниридии следует отметить, что к наиболее доступному методу относится использование окрашенных контактных линз с диафрагмой. Это позволяет не только компенсировать косметический дефект, но и улучшить зрительные функции за счет устранения монокулярной диплопии, сферических и хроматических

аббераций, фотофобии. Однако применение данного метода ограничено для пациентов, отмечающих непереносимость контактной коррекции, а также при тяжелых посттравматических изменениях роговицы и окружающих тканей. [31]

В литературе описано применение экстраокулярного одностенного протеза – диафрагмы [6]. Данное приспособление изготавливалось по позитивному слепку глаза. Протез имел склеральную часть, диафрагмальную часть и область зрачка. Склеральная часть могла быть как прозрачной, так и окрашенной. Роль диафрагмы выполнял светонепроницаемый рисунок радужки, в котором формировали отверстие соответственно положению зрачка. Благодаря плотному прилеганию к склере снаружи, протез-диафрагма удерживался при движении глаз и не смещался при поворотах глазного яблока. Полное соответствие внутренней поверхности протеза-диафрагмы форме глаза способствовало хорошей его фиксации без давления на роговицу и без какого-либо контакта с ней. При необходимости в отверстие протеза, выполняющее роль зрачка, могла быть вмонтирована пластмассовая линза нужной оптической силы. Описанные протезы были применены у 9 больных с аниридией и обширными дефектами радужки после травмы. Острота зрения у этих больных не превышала 0,01-0,05, при использовании протеза-диафрагмы острота зрения повышалась до 0,2-0,6. Так же данные протезы обладали достаточно хорошим косметическим показателем [6].

Интрастромальные имплантаты впервые были предложены Р. Чоусе в 1987 году и представляли собой окрашенные в голубой цвет перфорированные кольцевидные пластины из полиметилметакрилата (ПММА) [66]. В дальнейшем форма и размеры имплантатов модифицировались, в качестве исходного материала использовались также ауто- и гетерологичная склера и гидрогели. При этом, несмотря на техническую простоту манипуляции, метод имеет ряд ограничивающих его применение недостатков: низкую диафрагмирующую способность, несоответствие профиля имплантата профилю роговицы, протрузию швов [66].

В 1987 году опубликован патент US 4655774 A «Intra-corneal implant for correction of aniridia», автор изобретения D. Peter Choyse. Отмечено, что изобретение относится к имплантатам, предназначенным выполнять функцию радужки, имплантат содержит непрозрачную часть - сферичное кольцо из автоклавируемого пластмассового материала. Центральная прозрачная часть имплантата может быть открытой диафрагмой или может включать в себя линзу для коррекции аметропии.

Интрастромальные имплантаты, изобретенные D. Peter Choyse, наряду с очевидными достоинствами, имеют ряд недостатков. В ходе формирования роговичного кармана и имплантации сферичного кольца, имитирующего радужку, затрагивается центральная оптическая зона, что повышает шанс развития вторичной дистрофии роговицы с ее последующим помутнением.

Особый интерес представляет возможность коррекции дефектов радужки после иридэктомии по поводу новообразования, т.к. для таких пациентов интраокулярная хирургия, в частности, имплантация искусственной радужки, не является методом выбора в связи с возможностью травмирования послеоперационной зоны, угла передней камеры, длительностью операции.

Экранирование дефекта колобомы радужной оболочки после иридоциклэктомии не было освещено в литературе до того, как профессор Линник Л.Ф. совместно с Салок И.Л. в 1975 году в эксперименте разработали метод интракорнеальной имплантации непрозрачных мембран для закрытия (экранирования) дефектов радужной оболочки [23]. Авторы описали метод закрытия дефекта радужки (после резекции ее опухоли) дубликатурой хрусталиковой сумки и метод интракорнеальной имплантации непрозрачных биологических мембран (аутосклера, гомосклера) [23].

В секторе необходимости закрытия дефекта радужки производился лимбальный разрез на  $2/3$  глубины, роговица расслаивалась в секторе операции и в образованный карман вводилась непрозрачная ткань в виде пластины. Позднее эта методика была внедрена авторами в клинику. В

зависимости от точности оптического расчета, свойств имплантируемой мембраны острота зрения повышалась в значительной степени. При этом достигался и косметический эффект. Так, исследования отразили перспективы возможной полной реабилитации данной группы пациентов [23].

Венгер Г.Е. (1984) в эксперименте разработала способ экранирования обширных дефектов радужки путем интракорнеальной аллотрансплантации радужной оболочки [9]. Из донорского консервированного глаза выкраивали трансплантат радужки и с помощью шпателя имплантировали пигментным листком вниз в образованный между слоями роговицы реципиента карман. При необходимости на роговицу накладывали 1-2 узловых шва. Трансплантат ткани радужки подбирался по цвету для достижения косметического эффекта. Исследования, проведенные в эксперименте на 12 кроликах показали, что трансплантат радужки хорошо переносится роговичной тканью, не оказывая отрицательного влияния на прозрачность окружающей роговицы, сохраняя свой первоначальный вид на протяжении всего срока наблюдения (до 6 мес), отмечалось лишь небольшое побледнение трансплантата за счет частичного рассасывания пигмента радужки в ранние сроки после операции – 1-1,5 недель. В дальнейшем вид трансплантата стабилизировался и не менялся до конца срока наблюдений.

Следует отметить разработки Фёдорова С. Н. с соавторами (1986 г.), которые предложили метод интракорнеальной коррекции аниридии и дефектов радужки с применением нового модифицированного гидрогеля, непрозрачного в видимой и ультрафиолетовой части спектра [48,47,46]. Окраска материала имитировала рисунок естественной радужной оболочки. За 2 года интрастромальная имплантация искусственной диафрагмы была выполнена на 6 глазах у 5 больных с врождённой и посттравматической аниридией. Преимуществом данного метода являлся тот факт, что все манипуляции происходили в роговице и не затрагивали интраокулярное пространство. К недостаткам можно отнести плохую проницаемость имплантата, что нарушало трофические процессы в роговице, слабую

диафрагмирующую способность, невозможность подбора цвета радужки, совпадающего с парным глазом, протрузию швов, несоответствие профиля имплантата профилю роговицы. [48] Спустя несколько месяцев у 3 пациентов произошло прорезывание периферического края диафрагмы через роговичный разрез наружу, что привело к выраженному раздражению глазного яблока, ухудшению зрения и косметики глаза, вследствие чего имплантаты пришлось удалить. Авторы отказались от предложенной методики и вскоре стали использовать интраокулярные коллагеновые иридопротезы.

В 1998 году Мороз З.И., Калинин Ю.Ю. и соавторами получен патент на способ хирургического лечения аниридии. Способ включал в себя проведение несквозных разрезов роговицы на половину ее толщины, расслаивание по этой толщине по кольцу до центральной оптической зоны. Затем в роговичный карман имплантировали разомкнутую интракорнеальную диафрагму. Были отмечены следующие недостатки – достаточно высокая травматичность и инвазивность в связи с расслаиванием стромы по всему диаметру роговицы, техническая сложность выполнения имплантации данной интракорнеальной диафрагмы (патент на изобретение РФ, № 2129851, 1999).

Кератопигментацию (татуаж) роговицы применяли в основном для окрашивания глазных белым. Различные красители вводили в роговицу инъекционной иглой либо с помощью узкого копьевидного ножа. [10]

Два различных метода (по типу красителей) кератопигментации были описаны в течение прошлого столетия (одни из первых упоминаний датируются 1936 годом). Один из способов - с применением химических красителей с золотом или хлоридом платины, в основном используется в центральной части Европы [88,87]. Другой метод заключается в импрегнации (пропитке) соединениями углерода (non-metallic, неметаллический татуаж). Химический татуаж выполняется легче и быстрее, чем пропитка углеродом, но цвет гораздо быстрее подвергается вымыванию, нежели неметаллический татуаж. [55,72]



Канцельсон А.Б. (1964) с целью татуажа применил переднюю послойную кератопластику с окрашиванием раневого ложа под трансплантатом [10].

Хатминский Ю.Ф. (1964) усовершенствовал его методику, разбавляя краски (охру, ультрамарин, сажу свечи) перед введением жидкой основой – клеем. Были выявлены существенные недостатки вышеперечисленных способов, такие как нестойкость цвета татуажа, необходимость подбирать цвет во время операции, послеоперационные воспалительные явления переднего отрезка глаза. [10]

В соответствии с литературными материалами, выполнение роговичного тоннеля для кератопигментации может производиться механически или с помощью фемтосекундного лазера, аналогично формированию тоннеля в случае имплантации роговичных сегментов.

В литературе описано два способа формирования роговичных тоннелей для имплантации сегментов: механический и при помощи фемтосекундного лазера [74].

Использование фемтосекундного лазера для создания роговичного тоннеля стало возможным после его одобрения FDA в 2002 году [108]. Этот тип лазеров не содержит инфракрасный компонент (длина волны 1053 нм) и его действие может быть сосредоточено на определенной глубине от поверхности роговицы, не оказывая при этом теплового или ударно-взрывного действия на окружающие ткани. За счет кавитаций происходит формирование микропузырьков углекислого газа и водяного пара в результате фоторазрушения, дальнейшее слияние этих пузырьков приводит к расслаиванию тканей. Этот тип лазера позволяет выполнять создание роговичного тоннеля определенного профиля и на заданной глубине с высокой точностью. Во время операций используют местное обезболивание. После обозначения «ориентира» на поверхности роговицы (центр зрачка или рефлекс Пуркинье) и 5 - 7 миллиметровой зоны на поверхность глаза производят аппланацию вакуумного кольца лазерной установки, при этом на роговицу

помещают стеклянную линзу для четкой фиксации глаза и поддержания необходимого фокусного расстояния во время всей процедуры выполнения роговичных тоннелей. Формирование роговичного тоннеля производится на глубине 70-80% от толщины роговицы и занимает около 15 секунд [18,68,73,75,106].

С учетом имеющихся данных, фемтосекундное сопровождение должно нести за собой лучшие показатели зрительных функций и значений преломления. Механическое выполнение тоннеля определяется навыками хирурга и связано со сложностями выполнения расслаивания стромы роговицы в одной плоскости. Подобные данные были озвучены в исследовании, сравнивающем данные методики при выполнении интрастромальной кератопластики [1].

### **1.1.2. Интраокулярные методы**

Вопрос о зрительной реабилитации больных с обширными дефектами радужки или полным её отсутствием (частичная или полная аниридия) до недавнего времени оставался нерешённым. Такие нарушения структуры глазного яблока отрицательно сказываются на остроте зрения травмированного глаза, ухудшают его косметический вид, ограничивают возможности интраокулярной коррекции, а также способствуют развитию ряда осложнений [45,4]. Необходимость хирургического восстановления целостности ирис-диафрагмы в настоящее время не вызывает сомнений. Во многих случаях сложности восстановительного лечения таких пациентов связаны с невозможностью закрытия дефекта собственной тканью радужки, т.е. необходимо замещение повреждённой ткани трансплантатом.

Возможность трансплантации радужки была впервые продемонстрирована экспериментальными исследованиями Кокряцкой В. И. (1967) [20]. Трансплантатом послужила радужка кролика, консервированная во влажной камере в течении суток при 3-4 °С. Полное приживание

трансплантата с сохранением функций произошло у трёх подопытных животных, на 20 глазах отмечалась частичная фиксация трансплантата, в 13 случаях эффект замещения травматической колобомы не был достигнут. Опираясь на полученные данные, автор заключила, что трансплантация радужки может быть применена для закрытия травматических коллобом в клинике.

Экспериментальными исследованиями, проведенными Венгер Г. Е., Думбровой Н. Е. (1973) и Андриановым В. А. (1984) на модели частичной ауто- и аллопересадки радужки у кроликов была доказана возможность приживания трансплантата радужки (при создании для него оптимальных условий), а также изучен характер приживания [5,8]. О первой попытке пересадки радужной оболочки в клинике имеется сообщение Фёдорова С. Н. и Иоффе Д. И. (1976) [44]. Авторы отметили, что пересадка радужной оболочки, произведенная обычным способом, не обеспечивает высокого оптического и косметического эффекта в связи с последующей атрофией ткани в месте повреждения, деформацией зрачка, сморщиванием трансплантата и втягиванием его в послеоперационный рубец.

Последующие разработки офтальмологов в этом направлении учитывали профилактику сморщивания трансплантата. Впервые успешно аллотрансплантация радужной оболочки на укрепляющей основе была произведена Венгер Г. Е. в 1977 г. [6]. Укрепляющей основой являлся послойный трансплантат роговицы человека, взятый из того же консервированного глаза, что и трансплантат радужки. Был получен стойкий хороший оптический и косметический эффект. Срок наблюдения за больным составил 6 лет.

Контридзе В. С. (1979) несколько усовершенствовал методику аллотрансплантации. С целью уменьшения травмирования радужки и повреждения хрусталика в момент пересадки, автор предложил в качестве трансплантата использовать дубликатуру из донорской радужки и биологического материала – коллагеновой пленки.

Оригинальный способ устранения обширных колобом радужки предложили Азнабаев М. Т. с соавторами в 1997 г. Метод заключается в подготовке своеобразного каркаса для трансплантата в радужке реципиента. В дальнейшем для замещения отсутствующей части радужной оболочки рядом офтальмологов были предложены и другие биологические ткани: ауто трансплантаты склеры [12], конъюнктивы [39,38], радужки [3] и аллотрансплантаты консервированная радужка на укрепляющей основе [7], кадаверная силиковысушенная радужка [39,41,25], коллагеново-эластичный каркас трупной стенки аорты [39,40,15], твёрдая мозговая оболочка [25,15,14].

Бобровой Н. Ф. в 1991 году [3] была предложена операция свободная аутоиридопластика. В меридиане, противоположном дефекту, производят выкраивание ауто трансплантата радужки в виде треугольника, основание которого обращено к зрачковому краю, а вершина – к корню радужной оболочки. Ауто трансплантат фиксируется к краям дефекта так, чтобы зрачковая часть аутоиридотрансплантата, наиболее эластичная и способная к растяжению, оказалась в самой большой – прикорневой зоне дефекта, а прикорневая – в зрачковой. Область дефекта, образовавшегося при выкраивании ауто трансплантата, закрывается путём фиксации его краёв швами, таким способом формируя круглый зрачок. Однако разработанные операции с использованием биотрансплантатов не нашли широкого применения в клинике. Биологические ауто трансплантаты не обеспечивали хорошего косметического эффекта [12,39,85]. Имплантация биологических аллотрансплантатов связана с трудностями подбора материала, технологической сложностью его имплантации, развитием в послеоперационном периоде иммунологических реакций со стороны тканей глаза. Следует отметить, что использование свежего донорского материала связано с определёнными ограничениями и трудностями. При этом важны сроки, прошедшие с момента смерти донора до момента имплантации ткани реципиенту [11,44]. Кроме того, выполнение подобных трансплантаций требует чёткой организации и становится порой невозможным в условиях

ургентной хирургии. Сопряжено это и с рядом правовых и морально-этических аспектов [2].

За последние десятилетия прогресс в офтальмохирургии, внедрение новых микрохирургических методов, создание специального инструментария, шовного материала, мощной медикаментозной терапии против инфекции способствовали расширению возможностей интраокулярной хирургии.

С 1977 года Копаевой В. Г. начата имплантация искусственного силиконового блока “радужка+хрусталик” [22]. Иридопротез подбирался индивидуально для каждого пациента с учётом необходимой оптики, цвета радужки парного глаза и диаметра гаптической части. Оптический эффект чаще был лучше косметического. Главная трудность при выполнении таких операций это фиксация блока при полном отсутствии радужки и хрусталика. Груша О. В. с соавторами (1983) с целью уменьшения послеоперационных осложнений и сохранения диафрагмальной функции радужки использовали пленку на основе полипропилена, окрашенную фталоцианиновым голубым. В конце 80-х годов идея использования синтетических полимеров для создания искусственной интраокулярной диафрагмы нашла практическое осуществление в исследованиях целого ряда офтальмологов.

Rainer Sundmacher в 1994 г. с соавторами использовали интраокулярную линзу из ПММА с окрашенной периферической частью для хирургической коррекции аниридии с афакией и получили удовлетворительные функциональные результаты [101,100]. Значительные трудности были отмечены в процессе имплантации этого иридофакопротеза в связи с его большими размерами и слабой гаптикой. Его дизайн был модифицирован в нескольких моделях, наиболее современной из которых является модель Morcher 67 G, имеющая меньший общий диаметр и более сильные и с лучшей позицией петли диафрагмы. Модель Morcher 67 G - это двояковыпуклая ИОЛ из ПММА с диаметром гаптики 12,5 мм и диаметром ирис-диафрагмы 10 мм. Периферия диафрагмы обработана чёрным сополимером, оставляя 5 мм в центре прозрачным.

Об использовании чёрной иридо-хрусталиковой диафрагмы для имплантации при аниридии с фиксацией в цилиарную борозду или с шовной фиксацией к склере сообщали Tompson C. G. с соавт. (1999) [114], Tanzer D. J. и Smith R. E. (1999) [112], Osher R. H. и Burk S. E. (1999) [95], Reinhard T. с соавт. (2000) [100], Burk S. E. с соавт. (2001) [63], Поздеева Н. А. с соавт. (2005) [97], Sheth H. G. и Laidlaw A. H. (2006) [107], Karatza E. C. с соавт. (2007) [83], Olson M. D. с соавт. (2008) [94], Sminia M. L. с соавт. (2008) [110] и Chung M. Y. с соавт. (2009) [67]. Авторы наблюдали разной степени выраженности воспаление и глаукому в послеоперационном периоде. В своём исследовании Reinhard T. с соавторами (2000) [100] подтверждают тот факт, что у больных с аниридией повышен риск развития глаукомы, возможно в связи с нарушением гематофтальмического барьера, чему способствует размещение чёрной диафрагмы перед капсульным мешком. Возможными причинами хронического повреждения гематофтальмического барьера могут быть прямой контакт ИОЛ с остатками сосудистой оболочки, смещение гаптики в угол передней камеры и большая чувствительность гематофтальмического барьера к любым видам травмы на глазах с аниридией [93,104].

Однако, все эти факторы риска могут быть значительно снижены, если имплантировать ИОЛ в капсульный мешок. Mavrikakis Joannis и Nickman Casey J. M. (2002) [89] первыми сообщили об имплантации модели Morcher 67 G в капсульный мешок для достижения максимально возможной стабильности. Авторы отмечают значительные трудности при введении иридохрусталиковой диафрагмы (для чего потребовался разрез 11 мм), а также при размещении линзы в капсульном мешке, в связи с её хрупкостью. По мнению авторов, имплантация такого приспособления в капсульный мешок является трудной, но интересной и технически возможной задачей.

В сообщении Burk Scott E. с соавторами (2001) [63] представлены данные об имплантации искусственной радужки у 28 больных с травматическими дефектами радужки, врождённой аниридией и другими видами недостаточности радужки (герпетическая атрофия, хирургические

повреждения, глазной альбинизм). Авторы применяли разные модели искусственной радужки: чёрную иридохрусталиковую диафрагму модели Morcher 67 F и 67 G, отличающиеся только по общему диаметру (67 F = 13,5 мм; 67 G = 12,5 мм), а также цветные ИХД модели Morcher 30 В (диаметр 12,5 мм), что создавало необходимость большого разреза для имплантации, не менее 10 мм длиной. Кроме этого, у 19 больных были имплантированы кольцевые эндокапсулярные искусственные радужки. Трудности имплантации данной модели состоят в том, что 2 капсульных кольца с чёрными «плавниками» должны быть введены в капсульный мешок и соединены там в единую диафрагму, что очень сложно в связи с хрупкостью модели и необходимостью последующего дополнительного введения в капсульный мешок искусственного хрусталика. Даже если соединение колец во время операции достигнуто, в послеоперационном периоде, возможно, их рассоединение в глазу с аниридией в связи с контрактурой капсульного мешка.

Оригинальная технология хирургического лечения тяжёлой сочетанной патологии роговой оболочки, радужки и хрусталика разработана в МНТК «Микрохирургия глаза». Искусственная радужка была изготовлена из сополимер-коллагена [46] – это животный коллаген, сродненный с мономерами акрилового ряда. Этот новый материал близок к тканям глаза человека, характеризуется высокой гидролитической, химической, механической и ферментативной стабильностью, эластичен и нетоксичен. Технология изготовления искусственной радужки предусматривает моделирование её по цвету и рисунку парного глаза и позволяет замещать любые обширные посттравматические дефекты радужной оболочки вплоть до полной замены при аниридии. В течение 1990-1991 гг. было выполнено 27 коллагеноиридопластик. Трансплантат, форма и размер которого соответствовали дефекту радужной оболочки, подшивали узловыми швами к оставшейся части собственной радужки, а при её отсутствии к склеральной губе. Одномоментно проводили интраокулярную коррекцию путем имплантации ИОЛ моделей Т-26 и Т-28 с интракапсулярной фиксацией. В

послеоперационном периоде положение иридопротеза было стабильным. Однако, в ранние и поздние сроки отмечалась гипертензия (у 6 из 27 пациентов), которую не удалось купировать медикаментозной терапией. В 4 случаях на фоне деколорации искусственной радужки развилась эпителиально-эндотелиальная дистрофия роговицы, потребовавшая дополнительного хирургического вмешательства. Анализ полученных осложнений показал, что стойкое повышение внутриглазного давления может быть связано с механическим раздражением структур угла передней камеры и отростков цилиарного тела краем трансплантата при экскурсиях глазного яблока. Изменение окраски материала и возникновение эпителиально-эндотелиальной дистрофии роговицы у таких пациентов может быть следствием нарушения связей между молекулами полимера и красителя, с выходом частиц последнего во влагу передней камеры и оказания токсичного воздействия на эндотелий роговицы [21]. В дальнейшем эти недостатки были исправлены, и технологически улучшенная модель искусственной радужки из сополимер-коллагена была использована Фёдоровым С. Н. с соавторами у 6 человек после тяжелой травмы глаза [46].

В последние годы в МНТК «Микрохирургия глаза» проведена успешная апробация в клинике нового иридопротеза из полигидроксиэтилметакрилата, для окраски которого используется органический, нерастворимый в воде пигмент коричневого цвета. Проведено шесть имплантаций с использованием этого материала и получен максимально возможный функциональный и хороший косметический эффект. Кроме этого, проводятся экспериментальные исследования принципиально нового иридотрансплантата, который представляет собой выполненную с помощью цифровой фотокамеры и цветного лазерного принтера точную копию радужной оболочки парного глаза, нанесённую на полупрозрачную полимерную плёнку [9,33].

В Чебоксарском филиале МНТК «Микрохирургия глаза» с 2003 года применялись различные модели искусственных иридохрусталиковых диафрагм, разработанных совместно с НПП «Репер-НН» (Н. Новгород) и затем



производимых данным предприятием [28,32]. Вначале это была обычная дисковидная конструкция, затем модели А, В и С [31]. Последняя модель С предусматривает возможность подгибания во фронтальной плоскости опорных элементов (ОЭ) для адаптации под индивидуальный диаметр цилиарной борозды в пределах окружности диаметром 11,0—13,0 мм, увеличенный до 10,5 мм внешний диаметр окрашенной дисковидной гаптической части, создание рисунка внутри объема диафрагмальной части, имитирующего по форме и цвету сетчато-радиальный рисунок радужной оболочки парного глаза человека. Три дополнительных ОЭ на гаптической дисковидной части позволяют удерживать диафрагму в проекции иридоцилиарной борозды без дополнительной шовной фиксации, они не замкнуты с целью их более свободного подгибания, а на краю диска в проекции ОЭ от его основания выполнен паз, в который входит ОЭ в максимально согнутом состоянии. Концами ОЭ в статическом состоянии ИХД упирается в окружность диаметром 13,0 мм. На периферии окрашенного кольца имеются отверстия для подшивания. Количество ОЭ обеспечивает хорошую самоцентрацию ИХД и равномерно распределяет на три кончика механическое давление на цилиарную зону глаза и соответственно уменьшает это давление в каждой имеющейся точке. Кончики ОЭ ограничивают контакт ИХД с реактивными структурами глаза [31]. Толщина гаптической части ИХД модели С равна 200—300 мкм в зависимости от рисунка протеза радужки в отличие от модели А, в которой она составляла 400 мкм.

Индивидуальный подбор модели ИХД, ее цветовой гаммы и рисунка радужной оболочки осуществляется по специально разработанному вееру-каталогу [31]. Оптическая сила ИХД рассчитывается с учетом ранее определенной для искусственной диафрагмы константы А [27]. В ИХД модели А было пять ОЭ, которые обеспечивали прекрасную центрацию диафрагмы и хорошую устойчивость в глазном яблоке без какой бы то ни было шовной фиксации, даже при отсутствии в передней камере любых поддерживающих структур, таких как остатки капсулы хрусталика. Однако при шовной

фиксации наличие пяти ОЭ иногда затрудняло ее выполнение, так как нитки, цепляясь за ОЭ, могли перепутаться. В новой модели С три ОЭ, однако они (так же, как и в предыдущей модели) позволяют имплантировать ИХД на капсульный мешок или уплотненную переднюю гиалоидную, или «аниридическую», мембрану при полной аниридии без дополнительной шовной фиксации, надежно удерживая искусственную диафрагму в правильном центральном положении.

В Чебоксарском филиале МНТК «Микрохирургия глаза» было имплантировано 207 ИХД моделей А и С. Обе конструкции завоевали признание практикующих офтальмологов. Опыт показал, что во второй модели удалось избежать некоторых недостатков, имевшихся в предыдущей модели. Авторы пришли к заключению, что за счет наличия пазов в основании ОЭ и изменения конструкции самих элементов ИХД модели С обеспечивает лучшую адаптацию диафрагмы к индивидуальным размерам глазного яблока и уменьшает ее воздействие на реактивные структуры глаза, обладает хорошей самоцентрацией, позволяет проводить бесшовную имплантацию при наличии капсулы хрусталика либо других поддерживающих структур в передней камере при аниридии. Пазы выполняют роль своеобразных базальных колобом, способствующих свободному току внутриглазной жидкости (ВГЖ) между передней и задней камерами и улучшающими гидродинамику глаза. Благодаря изменениям конструкции, а также уменьшению толщины искусственной диафрагмы стала возможной инъекторная имплантация на капсулу хрусталика, что привело к уменьшению интра- и послеоперационных осложнений. Так же был создан веерный каталог с образцами вариантов цветов и рисунков радужной оболочки. Наличие выбора моделей ИХД и ее сегментов позволили значительно улучшить косметический результат имплантаций и использовать индивидуальный подход в хирургическом лечении дефектов радужной оболочки [30].

Реабилитация пациентов с сочетанными посттравматическими изменениями глаза с помощью оптико-реконструктивных операций с

имплантацией гибких иридохрусталиковых диафрагм на сегодняшний день активно проводится офтальмохирургами [114,105,111,113,96].

Однако вышеуказанная методика оперативного вмешательства требует четкого определения показаний к вмешательству в зависимости от характера дефекта радужки и состояния прилегающих тканей поверхности глазного яблока.

### **1.1.3. Современный этап развития внутрироговичной хирургии с целью коррекции дефектов радужки у пациентов с аниридиями**

Кератопигментацию (татуаж роговицы) как косметическую процедуру выполняют в течение продолжительного времени, но лишь совсем недавно в литературе появились сообщения об успешно проведенных операциях с использованием минеральных пигментов в виде микрочастиц с лечебной целью [55,59,79,84,119].

Кератопигментация (КТП) может осуществляться как на видящих, так и на слепых глазах, в каждом конкретном случае оперативное вмешательство имеет определенное назначение. Хирургия на видящих глазах подразумевает лечебную или косметическую цель, например, выполнение кератопигментации для имитации диафрагмальной функции радужки при ее колобомах [59,98]. В некоторых случаях введение краски в строму роговицы видящего глаза осуществляется с косметической целью для «смены цвета глаз» по желанию пациента [57]. Кератопигментация на слепых глазах выполняется лишь с косметической целью, чаще всего в случае сформировавшегося тотального бельма роговицы. С помощью локального введения красящего вещества черного цвета в толщу бельма в центральной оптической зоне создается видимость круглого темного зрачка. Вокруг «зрачка» в параоптической зоне формируют кольцевидную зону, выполненную цветом, соответствующим цвету радужки парного глаза.

Невидящий глаз приобретает более оптимальный вид с косметической точки зрения, что облегчает психологическое состояние пациента.

Существуют следующие техники выполнения кератопигментации:

1. Поверхностная

- поверхностное окрашивание
- поверхностная автоматизированная кератопигментация

2. Интрастромальная

- мануальная техника
- с фемтолазерным сопровождением

Эффект от процедуры кератопигментации достигается с помощью нескольких механизмов. Поверхностное окрашивание может быть основано на химической реакции (химическое окрашивание) с растворами металлов, таких как хлорид золота, хлорид платины, нитрат серебра. Соответствующее количество краски помещалось на поверхность роговицы и доставлялась в ее поверхностные слои с помощью микропроколов. Использовались различные инструменты, начиная от простых игл, а также подобные инструментам для проведения дермопигментации. В большинстве случаев представленная техника не имела успеха в связи с быстрым обесцвечиванием и частым возникновением воспалительного процесса переднего отрезка глаза [103].

В зарубежной печати имеются сведения о проведении поверхностной автоматизированной кератопигментации с помощью специального устройства (Vissum Eye MP System, Испания). Микропроколы проводились на глубину до 120 микрон. Глубина проникновения иглы контролировалась длиной продольной осевой вибрации наконечника.

Интрастромальная мануальная техника кератопигментации заключается в использовании специального расслаивателя роговицы (Helicoidal Tunnel Corneal Dissector). Существуют два вида инструмента: для проведения расслоения на 180 градусов по часовой стрелке и на 180 градусов против

часовой стрелки. Пигмент вводится в роговичный туннель с помощью канюли 30 G [103].

Анализируя иностранные источники следует отметить, что кератопигментация с фемтолазерным сопровождением возможна с формированием одного или двух (поверхностного и глубокого) роговичных тоннелей [56].

Доктором Alio с соавт. представлен случай хирургического лечения пациента с синдромом Urrets-Zavalía с помощью кератопигментации с фемтолазерным сопровождением и техники формирования двух тоннелей. Хирургическое вмешательство проводилось на фемтосекундном лазере (IntraLase AMO, Irvine, США). Были сформированы два роговичных тоннеля (поверхностный и глубокий). В первую очередь был выполнен туннель на глубине 400  $\mu\text{m}$ , внешний диаметр составил 9,5 мм, внутренний – 6 мм, энергия 2  $\mu\text{J}$ , вертикальный разрез на 6 часах. Вторым (поверхностным) туннель был выполнен на глубине 200  $\mu\text{m}$ , внешний диаметр составил 9,5 мм, внутренний – 6 мм, энергия 2  $\mu\text{J}$ , вертикальный разрез на 12 часах. Специальный роговичный расслаиватель (КТР corneal dissector, Epsilon, Irvine, США) был использован для открытия разрезов и проникновения в туннель. Пигмент вводился в роговичный туннель с помощью канюли 30 G. В глубокий туннель вводится темный пигмент для более эффективного экранирующего эффекта. В поверхностный туннель вводится светлый пигмент, соответствующий цвету радужной оболочки пациента [56].

Анализируя вышесказанное можно отметить, что кератопигментация в современной офтальмологии широко применяется зарубежными специалистами и является безопасным и малоинвазивным методом лечения дефектов радужной оболочки. Дальнейшее развитие технологии, поиск, исследование и разработка новых композиций химических веществ для создания внутрироговичных окрашенных имплантатов актуальны и необходимы для более широкого внедрения кератопигментации в клиническую практику.

## **1.2. Материалы, потенциально пригодные для внутрироговичного введения и модели для определения их биосовместимости**

Полимерные материалы и изделия из них нашли широкое применение в современной офтальмологии. Многие офтальмологические операции проводятся с их использованием. Впервые применять полимерные материалы для изготовления интраокулярных линз было предложено Ridley H. в 1949 году. По мере развития технологий и совершенствования хирургической техники, полимеры стали использовать в хирургии патологий всех отделов глазного яблока (интрастромальные имплантаты, иридохрусталиковые диафрагмы и т.д.) [16,17].

Одной из причин большой распространенности различных полимерных материалов в медицине является их относительная простота и доступность для производства. Способы получения изделий из полимеров можно разделить на две большие группы: изделия, производимые по двух- и одностадийной технологиям [43]. Двухстадийная методика представляет собой отдельное производство полимера и дальнейшее получение из него нужного продукта. Процесс может происходить в разных местах и быть разделен по времени. При этом типе производства используют различные способы обработки исходной полимерной заготовки: вакуумное и компрессионное формование, экструзии, формование в пресс-формах, точение. В случае одностадийной технологии эти процессы идут параллельно, т.е. этап полимеризации смеси мономеров в итоге заканчивается получением готового изделия [54]. Одностадийная методика упрощает процесс, не разделяя его по временному и территориальному признакам, что значительно снижает риск дополнительного инфицирования имплантатов в процессе их транспортировки [43,34].

Многие исследователи XX века в своих работах изучали возможности использования различных материалов для изготовления интрастромальных

имплантатов. Доктором Barraquer J. (1949) для имплантата, предназначенного для выполнения рефракционной функции, был предложен материал «Flit glass» (стекло), который впоследствии был заменен на «Plexiglass» (ПММА), но исследовательские работы *in vitro* на кроликах показали развитие асептического некроза в передних слоях роговицы [60]. Проводимые далее эксперименты помогли сделать заключение о необходимости поиска такого биополимера, который бы не нарушал трофические процессы в строме роговицы [34,42,51]. В 70 - 80 гг. прошлого века Морхат И.В. с соавторами провели серию опытов по использованию интрастромальных имплантов из пластмассы АКР-7, являющейся метиловым эфиром метакриловой кислоты. В результате исследования учеными было выявлено значительное снижение процента развивающихся асептических некрозов и отторжений имплантата при увеличении глубины его расположения в строме роговицы [26]. В трудах McCarey B. (1988) эти данные получили подтверждение, где было показано, что диффузия питательных веществ из передней камеры имеет большее значение для центральных отделов роговицы, в отличие от периферии, где питание тканей осуществляется так же за счет кровеносных сосудов краевой петливой сети [90].

В 1970-е годы Животовский Д.С. занимался имплантацией замкнутых колец в строму роговицы для ослабления рефракции. В ходе исследования отмечено, что у пациентов на всем сроке наблюдения помутнений роговицы или каких-либо воспалительных явлений не выявлено [16,17].

В 1965 году был синтезирован полисульфон, который в скором времени начал широко использоваться в различных сферах медицины. Но в экспериментах *in vivo* на животных (кошки и приматы) при проведении гистологических исследований было выявлено образование капсулы вокруг импланта и эпителиальных кист, истончение эпителия над ним [61,90,86]. Появление капсулы снижало прозрачность роговицы и изменяло ее оптические свойства. Данный факт привел к тому, что от использования этого материала в хирургии роговицы пришлось отказаться.

Известно, что поводом к проведению исследований, посвященных потенциальной пригодности силикона для хирургии роговицы послужило его успешное применение в качестве материала для изготовления интраокулярных линз. [13,71]. Его использование было ограничено сложностью технологического процесса производства, нарушение которого приводит к токсическому перерождению материала и его патологическому действию на ткани организма [69]. Для снижения токсичного влияния силикона были предложены разные способы поверхностной обработки готового изделия, в результате которых изменяются адгезивные свойства поверхности имплантата [80,116,118].

Внутрироговичное введение интракорнеальных линз (ИКЛ) возможно для лечения буллезной кератопатии. Важным этапом развития полимерных материалов для интрастромального введения явилось появление водосодержащих и водопроницаемых гидрогелей (Wichterle,1960), которые хорошо переносятся стромой роговицы (McCarey B.,1990; Werblin T. et al.,1992; Barraquer J., Gomes M.,1997). Но данные морфологических исследований выявили образование вокруг ИКЛ соединительнотканной капсулы, т.е. скопления вдоль поверхности линзы фибробластов, вновь образованных коллагеновых волокон и аморфного вещества (Binder P., 1989). Клинически это проявлялось в виде так называемого interface haze (Steinert R. et al.,1996) - помутнения стромы роговицы у края линзы и вдоль ее передней и задней поверхности, и снижения оптических свойств роговицы. В связи с этим для улучшения взаимодействия гидрогеля с тканями предпринимались попытки оптимизировать его свойства - обработка в низкотемпературной газоразрядной плазме (Шустеров Ю.А.,1998), а так же синтез биополимера - сополимера коллагена (СК) (Федоров С.Н. с соавт., 1992).

О применении гидрогеля для лечебной интраламеллярной кератопластики при буллезной кератопатии имеются единичные работы (Чеглаков Ю.А.,1983; Мороз З.И., Чеглаков Ю.А.,1984; Sendele D.,1983). При этом некоторые



ученые считают гидрогель непригодным к применению в клинике в качестве роговичного интраламеллярного имплантата, так как, по мнению авторов, он или выталкивается роговицей наружу или токсичен (Двали М.Л. с соавт., 1986; Джавришвили Г.В., 1991).

В 2002 г. Верзиным А.А. разработан биополимер фиброгель (сополимер гидрогеля и фибронектина) с повышенным содержанием воды (48%), который продемонстрировал биосовместимость с тканями роговицы и был рекомендован к интраламеллярной кератопластике при буллезной кератопатии.

При выборе материала для создания внутрироговичного имплантата важное значение имеет его высокая биосовместимость с тканями человеческого глаза. В зависимости от типа взаимодействия с окружающими тканями выделяют материалы: токсичные (материал вызывает гибель клеток в зоне имплантации), инертные (вокруг материала возникает волокнистая непрлегающая ткань), биоактивные (появляется прилегающая межповерхностная связь материала и ткани, инкапсуляция минимальна), биорезорбируемые (материал по мере растворения замещается тканью организма хозяина, продукты растворения должны быть нетоксичны). Все перечисленные типы материалов, кроме токсичных, считаются биосовместимыми. Материал считается токсичным, если его химический состав или производные данного вещества, которые вымываются из имплантата, при его нахождении в организме вызывают токсическое воздействие на клетки и ткани. Такие материалы являются непригодными для создания биологических имплантатов [52].

Токсичность – это комплекс явлений, среди которых могут быть: прямое повреждение клеток и физиологические эффекты (воспалительные и аллергические реакции и пр.). Изучение этих явлений достаточно сложный процесс, поэтому большинство ученых проводят определение токсичности на примере клеточных культур [50].

Также для изучения биологического действия материалов используют модели экспериментальных животных. В научных исследованиях по офтальмологии такими животными являются кролики определенных пород, но в мировой литературе встречаются работы, в которых в качестве объекта исследования используют человекообразных обезьян, кошек, собак, птиц, морских свинок [62,76,77,78,81]. Такое разнообразие связано с особенностями строения различных отделов глазного яблока. Негативное влияние импланта на ткани роговицы определяют в соответствии с появлением признаков воспалительной и структурно-пластической реакций [19,53]. Важно четко дифференцировать изменения, вызванные хирургическим вмешательством, и реакции, возникающие в ответ на наличие введенного имплантата, учитывая дополнительное воздействие на ткани роговицы в ходе нанесения механической травмы при проведении эксперимента. Исследования *in vivo* на модели животных являются удобными и показательными, так как при их проведении есть возможность четко имитировать течение раннего и позднего послеоперационного периодов с учетом их стадийности [115,117].

На сегодняшний день для выявления токсичности все чаще проводятся исследования на клеточных культурах [70,99]. Изначально культура клеток эпителия роговицы человека была выбрана, так как эти клетки первыми контактируют с окружающей средой и вступают в активацию раневого процесса [70,65]. Очевидно, что использование этой культуры не является оптимальным для определения биосовместимости материалов, имплантируемых в строму роговицы. Современные исследования посвящены выделению первичной культуры клеток кератоцитов стромы роговицы, которые используют для изучения фундаментальных биологических вопросов, а также в практических целях, в качестве тест-объектов при оценке биосовместимости новых материалов и лекарственных веществ [91,92]. Реакцией на действие какого-либо токсина в эксперименте *in vitro* может быть изменение метаболизма или выживание клеток, в то время как главную проблему *in vivo* могут составлять локальный тканевой или системный ответ.

Для получения таких реакций используют модели органотипических культур [50,82]. Основным преимуществом перед клеточными культурами является сохранение структурного единства и поддержание клеточной связи, присутствующей в ткани. Из особенностей использования данной модели можно выделить сложности в проведении биохимического и молекулярного анализов изменений, происходящих в процессе культивирования, которые связаны с более сложной организацией таких экспериментальных моделей, в сравнении с клеточными культурами. При проведении органотипического культивирования процент реагирующих клеток или клеток, дающих ответ на действие определенного стимула (реакция с материалом имплантата) значительно меньше, чем в случае выделенных клеточных культур. Важно понимать, что размножение органотипических культур невозможно, что влечет увеличение количества необходимого для работы материала.

В настоящее время наблюдается тенденция к увеличению количества исследований в условиях *in vitro* и *ex vivo* [50,64,82]. Данное явление можно связать с тем, что клеточные и органные культуры представляются более стандартизованными, т.е. обладающими значительно меньшей вариабельностью параметров между отдельными изучаемыми объектами, нежели глаза экспериментальных животных [102].

Учитывая вышесказанное, материал внутрироговичного окрашенного имплантата для кератопигментации не должен быть токсичным и не должен инкапсулироваться. Он должен располагаться в строме роговицы, не вызывая ее помутнения, а также сохраняя изначально заданную форму.

Проанализировав данные литературы выявлено, что существует достаточное количество жестких полимерных материалов для интрастромального введения, однако информации о внутрироговичных имплантатах, не имеющих жесткой структуры, немного. В связи с этим принято решение идти по пути разработки имплантата гелевой структуры с целью обеспечить минимально травматичную операцию и избежать

осложнений, присущих введению жесткого широкого имплантата (например, протрузии в послеоперационном периоде).

Таким образом можно заключить, что процедура внутрироговичного искусственного диафрагмирования может быть косметической, или выполняться с лечебной целью. В настоящий момент внутрироговичному искусственному диафрагмированию с лечебной целью посвящено сравнительно малое количество публикаций, нежели выполнению процедуры для достижения косметического эффекта. Данным фактом обусловлена актуальность настоящей диссертационной работы: вопрос создания оптимальной технологии лечебной кератопигментации с использованием композиции химических веществ, пригодных для введения в строму роговицы.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе для решения поставленных задач была проведена серия экспериментально-морфологических исследований, включающих эксперименты *ex vivo*, *in vitro*, *in vivo*. При этом биосовместимость исследуемых образцов изучена на экспериментальных моделях: культура клеток стромы роговицы *in vitro*, кадаверной роговице человека *ex vivo* и на глазах экспериментальных животных (кроликов) *in vivo*, а показатели светопропускаемости образцов изучали путем спектрофотометрического анализа.

В качестве материалов (основы, носителя) для нового внутрироговичного гелевого окрашенного имплантата были выбраны:

1. Гиалуронат натрия в концентрации 1,0%, молекулярная масса 4000 кДа.

Натрия гиалуронат - это полисахарид с большим молекулярным весом, состоящий из N-ацетилглюкозамина и натрия глюкуроната. Натрия гиалуронат распределяется убикивитарно (повсеместно) по тканям организма и присутствует в наибольших концентрациях в стекловидном теле, синовиальной жидкости и пуповине. Натрия гиалуронат выполняет функцию тканевой смазки и призван играть главную роль в модулировании взаимосвязей между примыкающими тканями. Он также может служить вязкоупругой субстанцией, облегчающей разделение тканей. Натрия гиалуронат, изготовленный из разных материалов, может различаться по молекулярному весу, но иметь одинаковое химическое строение. Натрия гиалуронат с защитными свойствами можно получить из бактерий определенного вида. Натрия гиалуронат представляет собой высокоочищенный продукт ферментации бактерий. Его средний молекулярный вес составляет более 1 000 000 дальтон, он не является антигеном, апирогенен, не вызывает побочных реакций на чужеродные тела и не раздражает слизистую оболочку глаза. Натрия гиалуронат входит в состав вискоэластиков, применяемых в офтальмохирургии.

2. Протектор эпителия роговицы гелевый, созданный на основе гидролизата коллагена

Протектор эпителия роговицы гелевый «СФЕРОоко®» предназначен для восстановления хронических и рецидивирующих дефектов эпителия роговицы глаза при использовании с лечебными контактными линзами для пациентов, страдающих поверхностными поражениями роговицы. Протектор обладает ранозаживляющим свойством, т.к. относится к классу биополимерных гидрогелей, обладающих регенераторными свойствами. Создан на основе медицинского изделия СфероГЕЛЬ (ЗАО «Биомир Сервис»), гетерогенного биополимерного геля, получаемого из гидролизата коллагена коллагенсодержащих тканей животного происхождения. Гидролиз тканей делает протектор слабо иммуногенным [36,29]. В состав препарата входят все компоненты внеклеточного матрикса: как основные (коллаген, протеогликаны и гликопротеины), так и множество других биологически активных веществ, включая пептиды, аминокислоты и факторы роста. С 2006 года медицинское изделие успешно используют в ортопедии [35,37], нейрохирургии [36,49], пластической хирургии и косметологии [29], трансплантологии [29,24] и других областях медицины. Выраженный регенерирующий эффект на клеточном и молекулярном уровне, высокие биостимулирующие свойства, гипоаллергенность, низкая иммуногенность и медленная биodeградация дали возможность разработки препарата для использования в офтальмологии. Компоненты внеклеточного матрикса, биологически активные вещества в составе, а также низкая иммуногенность препарата предполагают возможность его нахождения в составе внутрироговичного окрашенного имплантата для кератопигментации.

3. Гидроксипропилметилцеллюлоза в концентрации 2%, молекулярная масса от 80 до 100 кДа.

Гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ) — химически инертный полимер, состоящий из мономеров глюкозы, безвредный для тканей глаза.

Благодаря своим вискоэластичным свойствам, гидроксипропилметилцеллюлоза показана для использования в офтальмохирургии с целью защиты эндотелия роговицы от возможных повреждений в ходе хирургического вмешательства.

В качестве красителей для введения в состав образцов были выбраны:

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. Эти пигменты 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 которых разрешено в косметической промышленности в качестве красителей для микропигментации кожи лица и тела (производитель Goochie, КНР).

Были сформированы 3 образца гелевых 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 осуществлялось 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  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  для удаления пузырьков воздуха. По истечении 1 суток контролировали визуально дисперсивность системы (отсутствие расслаивания и выпадения осадка пигмента).

## 2.1. Изучение светопропускаемости гелевых окрашенных имплантатов с помощью спектрофотометрического анализа

На анализ были предоставлены 3 образца исследуемых гелеобразных окрашенных имплантатов.

Спектрофотометрический анализ проводился на приборе NanoVue Plus (GE Healthcare, США). Данный капельный (плёночный) спектрофотометр имеет однолучевую оптическую схему и работает в режиме пропускания (Рис. 1).

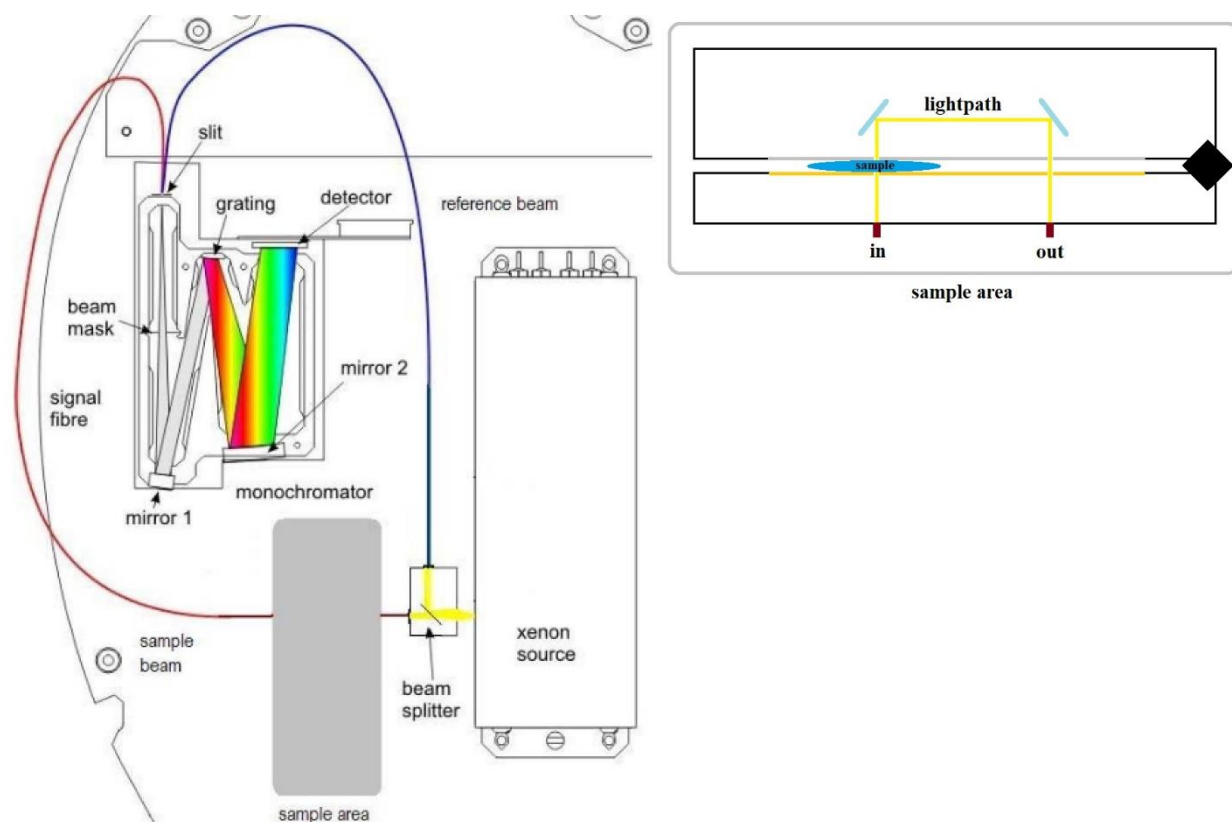


Рисунок 1 – Оптическая схема спектрофотометра



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).

## **2.2. Исследование реакции культуры клеток стромы роговицы и кадаверной роговицы человека на введение экспериментальных образцов**

### **2.2.1. 2D культивирование клеток стромы роговицы человека в присутствии изучаемых образцов гелевых окрашенных имплантатов (in vitro)**

#### **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, время от момента смерти до ввода в эксперимент не превышало 18 часов, возраст доноров не превышал 70 лет, показатель трансплантабельности по С.А. Борзенку 2А.

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 (Termo fisher scientific, США) до получения фрагментов не более 1мм<sup>2</sup>, далее полученную массу переносили в коническую пробирку типа Эппендорф (Genn Follower, США) с добавлением раствора коллагеназы II (Termo fisher scientific, США) типа 10 нг/мл в DMEM/F12 (Termo fisher scientific, США). Пробирку помещали в термошейкер (Biosan, Латвия) 800 rpm, 37 °С, 25 мин. Далее образец 3-хкратно промывали раствором фосфатно-солевого буфера (Termo fisher scientific, США) и переносили в чашки Петри (SPL Lifesciences, Корея) диаметром 35мм для дальнейшего культивирования [50].

Для 2D культивирования кератоцитов использовали полную питательную среду на основе DMEM/F12 (Termo fisher scientific, США) с добавлением 10% бычьей фетальной сыворотки (Termo fisher scientific, США), 1% раствора антибиотиков (Termo fisher scientific, США), 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия). Культивирование проводили при стандартных условиях 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>. Смену культуральной среды осуществляли каждые 3 суток. Пассирование клеточной культуры производили по достижению 80% конфлюэнции с использованием 1,5 мл TrypLE (Termo fisher scientific, США), экспозиция 10 мин при 37<sup>0</sup>С, полученную клеточную суспензию переносили в 15мл центрифужную пробирку (SPL Lifesciences, Корея) с добавлением 3 мл полной питательной среды. Образцы центрифугировали (Termo fisher scientific, США) при 1200 rpm, 37<sup>0</sup>С в течение 5 мин. Далее супернатант удаляли вакуумным насосом (Biosan, Латвия), 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> (SPL Lifesciences, Корея) с добавлением 5 мл полной питательной среды. По достижению культурой 3 пассажа изучали

фенотип полученной клеточной культуры методом иммуоцитохимического анализа с последующим проведением эксперимента с формированием контрольной и опытной групп.

### **Иммуоцитохимический анализ**

Для определения фенотипа культуры клеток проводили иммуоцитохимическое исследование. Для этого полученную клеточную культуру 3 пассажа переносили в концентрации  $1 \times 10^4$  клеток/мл в лунку слайд флакона (SPL Lifesciences, Корея) с добавлением 0,5 мл полной питательной среды. Культивирование производили в течение 4 дней при стандартных условиях, смену питательной среды осуществляли на 2-ой день культивирования. По достижению 85-90% конfluenceции клеточная культура 3-хкратно промывалась стерильным раствором фосфатно-солевого буфера (Termo fisher scientific, США) в течение 5 мин с последующей фиксацией в нейтральном (pH=7.0) 10% растворе формалина (ПанЭко, Россия) в течение 10 мин. Пермобилизацию клеток проводили раствором PBST (0,3% Triton X100 (Диаэм, Россия) + фосфатно-солевой буфер (Termo fisher scientific, США)) в течение 15 мин. Для определения характерного фенотипа кератоцитов использовали следующие первичные антитела: Кератокан (SantaCruzBiotechnology, США), Кератан сульфат (SantaCruzBiotechnology, США), Люмикан (Abcam, Великобритания),  $\alpha$ -гладкомышечный актин (Abcam, Великобритания). Инкубирование с первичными антителами производили при комнатной температуре в течение 60 мин с последующим 3-хкратным отмыванием раствором фосфатно-солевого буфера (Termo fisher scientific, США) в течение 5 мин. Для детекции первичных антител использовали вторичные антитела Alexa Fluor (AF) 488 (Abcam, Великобритания) и Alexa Fluor 594 (Abcam, Великобритания), инкубацию с которыми проводили в темноте при комнатной температуре в течение 60 мин с последующим 3-хкратным промыванием раствором фосфатно-солевого

буфера (Termo fisher scientific, США) в течение 5 мин. Контрастирование ядер производили красителем Hoechst 33258 (Abcam, Великобритания), инкубирование с красителем составило 15 мин при комнатной температуре в темноте. Анализ образцов проводили на лазерно-сканирующим конфокальном микроскопе Olympus FV 10i (Olympus, Япония).

### **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 пассажа культивировалась в 24 луночных планшетах (SPL Lifesciences, Корея) 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 7 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. Начальный этап включал в себя подготовку предметных стекол с нанесением слоя агарозы (Диаэм, Россия). Полученную суспензию центрифугировали (Termo fisher scientific, США) 1100 об/мин, 5 мин, осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (Termo fisher scientific, США) (pH-7.4), забирали пробу объемом 10 мкл (концентрация клеток  $1 \times 10^4$ ) и переносили в пробирки типа Эппендорф (Genn Follower, США) с 1% раствором легкоплавкой агарозы (Диаэм, Россия) объемом 75 мкл. Полученную суспензию помещали на предметные стекла (Termo fisher

scientific, США) с агарозным покрытием и охлаждали в течение 10 мин при  $t+4$  °С. Далее переносили в лизирующий раствор (10мМ Триса (Диаэм, Россия), 2,5 М NaCl (Диаэм, Россия), 100мМ ЭДТА (Диаэм, Россия)), инкубация составила 1 час при  $t+4$  °С. Полученные препараты переносили в щелочной раствор ( $pH>13$ ) (Termo fisher scientific, США) для проведения электрофореза 1В на 1 см, 20 мин, нейтрализацию проводили, используя фосфатно-солевой буфер ( $pH=7.4$ ) (Termo fisher scientific, США). Для окрашивания использовали раствор этидиума бромид (Диаэм, Россия) в дистиллированной воде, экспозиция составила 2 часа при  $t+4$  °С, в темноте. В качестве положительного контроля была использована клеточная культура после воздействия UV-облучения (Biosan, Латвия) в течение 15 мин. Анализ препаратов проводили, используя лазерно-сканирующий конфокальный микроскоп Olympus FV 10i (Olympus, Япония).

### **2.2.2. Экспериментально-морфологическое исследование влияния разработанных гелевых окрашенных имплантатов на роговицу человека (органотипическое культивирование *in vitro*)**

Исследования на модели органотипического культивирования были направлены на изучение особенности взаимодействия ткани роговицы человека с созданными гелевыми окрашенными имплантатами на основе различных материалов.

Для эксперимента было использовано 12 роговиц, полученных из Глазного тканевого банка МНТК «Микрохирургии глаза» и не пригодных для трансплантации. Характеристики полученных роговиц: средний возраст донора  $58 \pm 16$  лет, 8 мужчин и 4 женщины, среднее время от момента смерти  $18 \pm 5$  часов, показатель трансплантабельности по С.А. Борзенку 2В. Во всех роговицах был сформирован интрастромальный туннель механическим способом с последующим введением в него образца гелевого имплантата,

контрольную группу составили роговицы без введения имплантата. Распределение роговиц по группам представлено в таблице (Табл. 1).

Таблица 1 - Распределение роговиц по группам

№ группы	Количество роговиц
Контрольная группа	3 шт.
Образец № 1	3 шт.
Образец № 2	3 шт.
Образец № 3	3 шт.

### **Метод органотипического культивирования роговиц**

Органотипическое культивирование роговиц в ходе исследования проводилось при стандартных условиях:  $t +37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ; (инкубатор NuAire, США), в питательной среде: DMEM/F12 (Sigma, США) с добавлением 2% эмбриональной бычьей сыворотки (Thermo Fisher, США), 1% раствора антибиотиков (Thermo Fisher, США) и 1% раствора глутамакса (Thermo Fisher, США). Визуальный контроль осуществлялся при помощи инвертированного светового фазово-контрастного микроскопа Olympus IX- 81 (Olympus, Япония). Через 7 суток культивирования роговицы доставали из питательной среды и промывали 3-хратно фосфатно-солевым буфером (ПанЭко, Россия) для дальнейшего исследования на апоптоз.

### **Метод исследования раннего апоптоза**

Для определения токсичности изучаемых образцов определяли апоптоз кератоцитов в криостатных срезах роговицы. Для этого роговицу заливали

гелем для заморозки (Thermo Fisher, США) и производили заморозку материала в течение 20 минут при  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , с последующим проведением криостатных срезов с толщиной 5 мкм (рис. 2). Роговицу фиксировали горизонтально, срез проводился вертикально под углом  $90^{\circ}$  ( $65^{\circ}$  угол отклонения столика,  $25^{\circ}$  угол кривизны лезвия,  $10^{\circ}$  отклонение приводящей головы). Полученные срезы приклеивали к полилизиновым стеклам (Thermo Fisher, США).

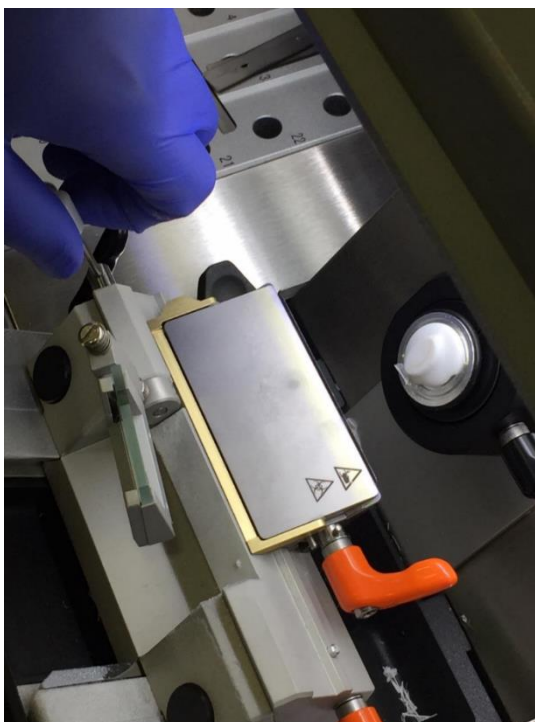


Рисунок 2 – Формирование криостатного среза роговицы

Изучение апоптоза проводили методом иммуногистохимии. Срезы обрабатывали раствором Тритон X-100 (Thermo Fisher, США) в течение 10 минут. Для изучения каспазного пути апоптоза использовали первичные антитела к Caspasa 8 (Abcam, Великобритания), Caspasa 3/7 (Abcam, Великобритания), а для изучения митохондриального пути апоптоза – BAX (Abcam, Великобритания), Сyt C (Abcam, Великобритания), культивирование с антителами производили в течение 60 мин. при комнатной температуре.

Далее 3-х кратно промывали срезы раствором фосфатно-солевого буфера (ПанЭко, Россия). Для детекции первичных антител использовали флуоресцентные краситель Alexa Fluor 488 (Ex. 495; Em. 519) (Abcam, Великобритания) и Alexa Fluor 594 (Ex. 590; Em. 617) (Abcam, Великобритания) культивирование производили в течение 60 мин., при комнатной температуре. Визуализацию клеточного ядра производили ядерным красителем Hoechst (Abcam, Великобритания). Для детекции антител использовали конфокальный сканирующий микроскоп Olympus IF-10i (Olympus, Япония).

Анализ полученных снимков проводили с помощью программного обеспечения «Cell Profiler», которое позволяет выделять необходимые для анализа клеточные компоненты, а именно ядро, цитоплазму или клетку (ядро + цитоплазма), и рассчитать интенсивность свечения каждой клетки, используя встроенные инструменты программного обеспечения.

### **Метод сканирующей электронной микроскопии**

В качестве фиксатора для роговиц использовался 10%-ый раствор формалина (ДиаЭм, Россия). Для проведения оптимальной дегидратации применялся раствор ацетона (ДиаЭм, Россия) в восходящих концентрациях: 10, 20, 30, 50, 70, 90, 100 x3 % по 30 минут в каждом с последующей вакуумной сушкой в критической точке. После сушки образцы монтировались на алюминиевом столике с помощью карбонового клея, напылялись золотом с толщиной слоя 5 нм для обеспечения электронно-проходящего слоя на поверхности образца. Далее образцы помещались в камеру сканирующего электронного микроскопа (Jeol, Япония) и исследовались 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.

### **2.3. Экспериментально-морфологическое исследование влияния разработанных гелеобразных окрашенных имплантатов на ткани глаза экспериментальных животных (*in vivo*)**

Материалом для исследования *in vivo* послужили кролики-альбиносы ( $n=20$ ). Для проведения эксперимента в соответствии с составом вводимых имплантатов 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 роговичный туннель вводили 0,5 мл вискоэластика (1% гиалуронат натрия). В ходе проведения эксперимента на животных учитывали факт наличия больших в диаметре (15 мм) и тонких роговиц (от 350 мкм в центральной области и до 400 мкм на периферии) у кролика, что подчеркивало техническую сложность хирургического вмешательства в связи с высоким риском перфорации роговицы. В соответствии с биоэтическими нормами и правилами гуманного

обращения с животными, операции выполняли под общей анестезией с иммобилизацией животных пеленанием.

После обработки операционного поля и установки векорасширителя с помощью кератотомического ножа с микроподачей в 5-7 мм зоне роговицы выполняли насечку на 2/3 глубины роговицы с последующим механическим расслаиванием средних слоев стромы роговицы круговым ножом, используемым для хирургии с имплантацией роговичных сегментов. В сформированный роговичный туннель вводили 0,5 мл соответствующего гелевого имплантата. В контрольной группе аналогичным способом формировался роговичный туннель с введением в качестве контроля вискоэластика (гиалуронат натрия 1%). Поверхность роговицы разглаживалась тупфером, швы не накладывались. В послеоперационном периоде проводили антибактериальное и противовоспалительное лечение (моксифлоксацин 0,5%, дексаметазон 0,1%) 2 раза в день в течение 7 дней. В каждой группе экспериментальных животных наблюдали с выполнением биомикроскопии и фотофиксации в сроки 1, 3, 7, 14, 30 и 90 суток. Биомикроскопически оценивали состояние переднего отрезка глазного яблока, прозрачность роговицы, наличие гелевого окрашенного импланта и его положение, стабильность фиксации в роговичном тоннеле, отсутствие красящего элемента в передней камере глаза, отсутствие инфильтрации красящим веществом стромы роговицы, состоятельность краев сформированного роговичного тоннеля. 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.

## 2.5. Оценка стабильности положения гелевого окрашенного имплантата в роговичном туннеле, сформированном фемтосекундным лазером, в эксперименте на кадаверных глазах (ex vivo)

Целью данного эксперимента на кадаверных глазах являлась оценка стабильности положения гелевого окрашенного имплантата в роговичном туннеле, оценка наличия или отсутствия миграции имплантата в эксперименте ex vivo.

На 7 донорских глазах, не прошедших отбор для кератопластики с показателем трансплантатбельности 2С, 3С, в глазном тканевом банке МНТК «Микрохирургия глаза» предварительно был удален эпителий для улучшения визуализации. При помощи фемтосекундного лазера «Фемто Визум» (Оптосистемы, г. Москва, г. 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. при следующих параметрах (табл. 2): длина волны 1030 – 1040 нм, длительность импульса 300 - 400 фс, частота повторения импульсов 1 МГц, энергия в импульсе 0,75 мДж, размер пятна фокусировки < 2 мкм. Длина насечки для входа в туннель составляла 3,5 мм.

Таблица 2 – Основные технические параметры фемтосекундного лазера

Технические параметры	Значение
Длина волны, нм	1030 – 1040
Длительность импульса, фс	300 - 400
Частота повторения импульсов, МГц	1
Энергия в импульсе, мДж	0,75
Размер пятна фокусировки, мкм	< 2

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 выполнялась оптическая когерентная томография роговицы кадаверного глаза на приборе OCT Visante (Carl Zeiss, Германия) и фоторегистрация с помощью фотощелевой лампы (Haag-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 фоторегистратцией.

### **ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ РАЗРАБОТАННЫХ ГЕЛЕВЫХ ОКРАШЕННЫХ ИМПЛАНТАТОВ**

Целью данной главы является изучение биологического действия экспериментальных образцов внутрироговичных гелевых окрашенных имплантатов и исследование их светопропускаемости для оценки возможности выполнения диафрагмирующей функции, а также изучение технических особенностей введения гелевого окрашенного имплантата.

Для этого были сформулированы и решены следующие задачи:

- оценить диафрагмирующие свойства образцов путем выявления их спектров пропускания и поглощения света в ходе проведения спектрофотометрического анализа.
- качественно оценить биосовместимость образцов в культуре клеток стромы роговицы человека (КСР) и количественно сравнить между собой биосовместимость материалов в культуре КСР человека, а также определить тканевую реактивность кадаверной роговицы человека на введение образцов в условиях органотипического культивирования.
- оценить биосовместимость образцов в ходе работы с экспериментальными животными клиническими методами исследования: биомикроскопия в динамике послеоперационного периода, а также при помощи световой микроскопии.
- оценить возможность стабильного положения гелевого окрашенного имплантата в роговичном туннеле в эксперименте на кадаверных глазах, изучить технические особенности введения изделия.

### 3.1. Результаты спектрофотометрического анализа гелевых окрашенных имплантатов на основе различных материалов

В результате спектрофотометрического анализа были получены спектры пропускания и поглощения образцов 1 и 3 (рис. 3 — рис. 4).

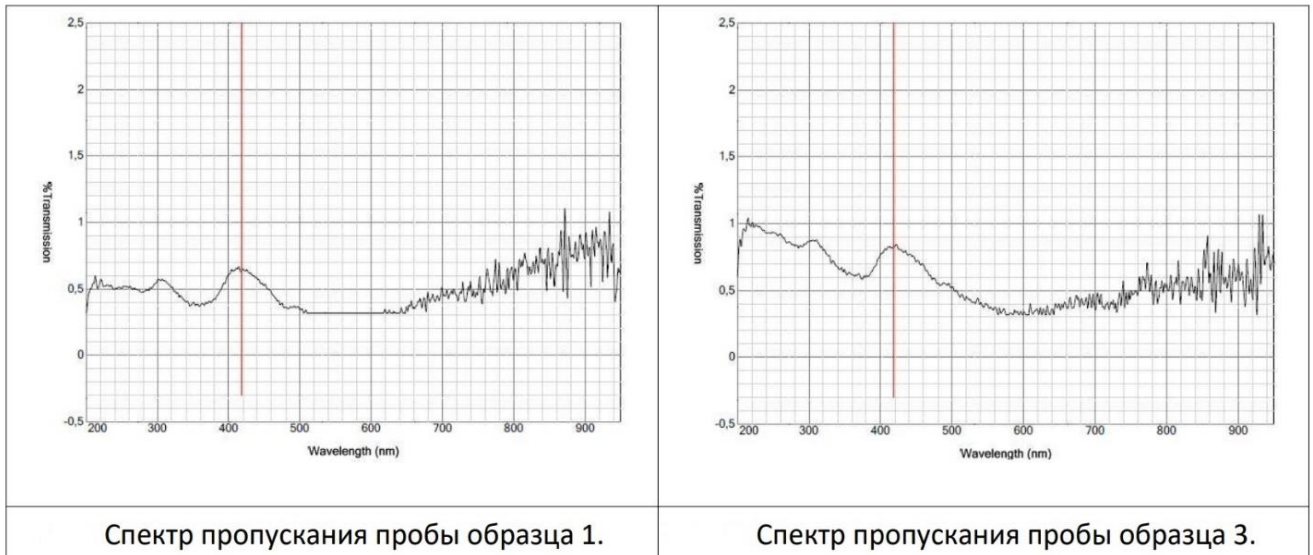


Рисунок 3 – Спектр пропускания пробы образцов 1 и 3

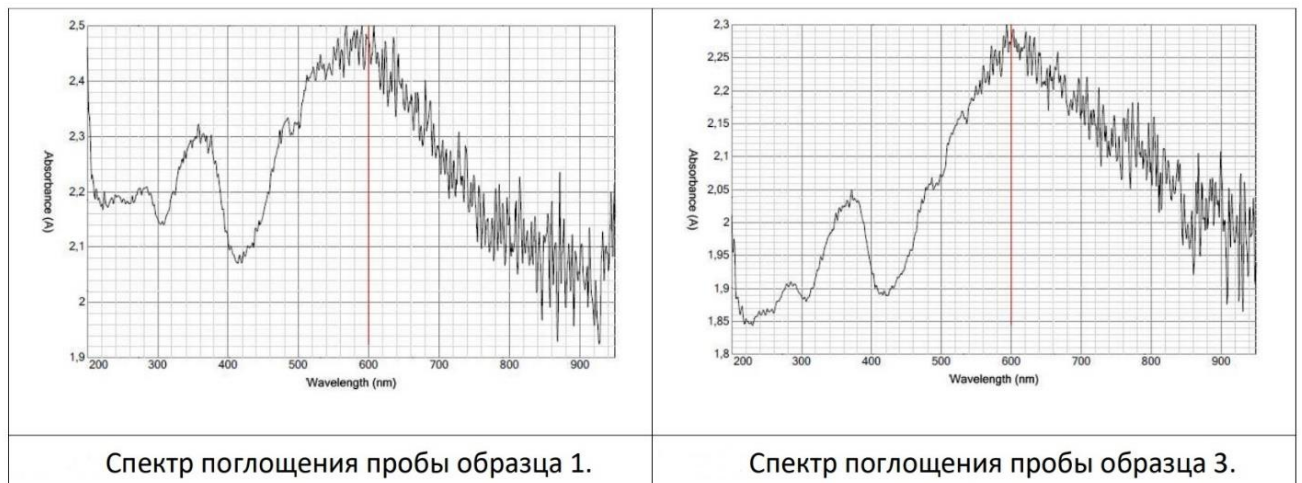


Рисунок 4 - Спектр поглощения пробы образцов 1 и 3

Повторяемость результатов измерения продемонстрирована на примере спектров поглощения двух проб каждого образца (рис. 5 и рис. 6).

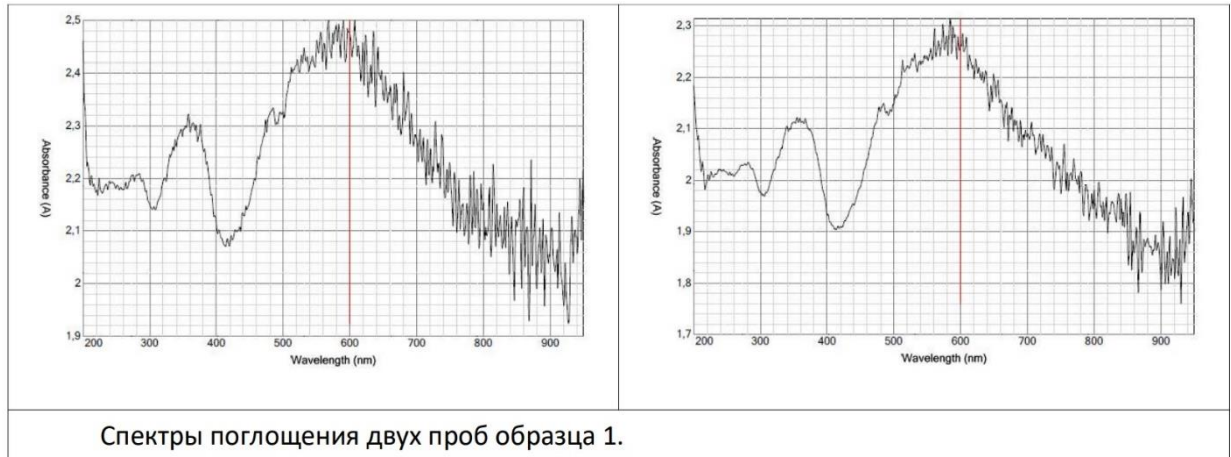


Рисунок 5 – Спектры поглощения двух проб образца 1

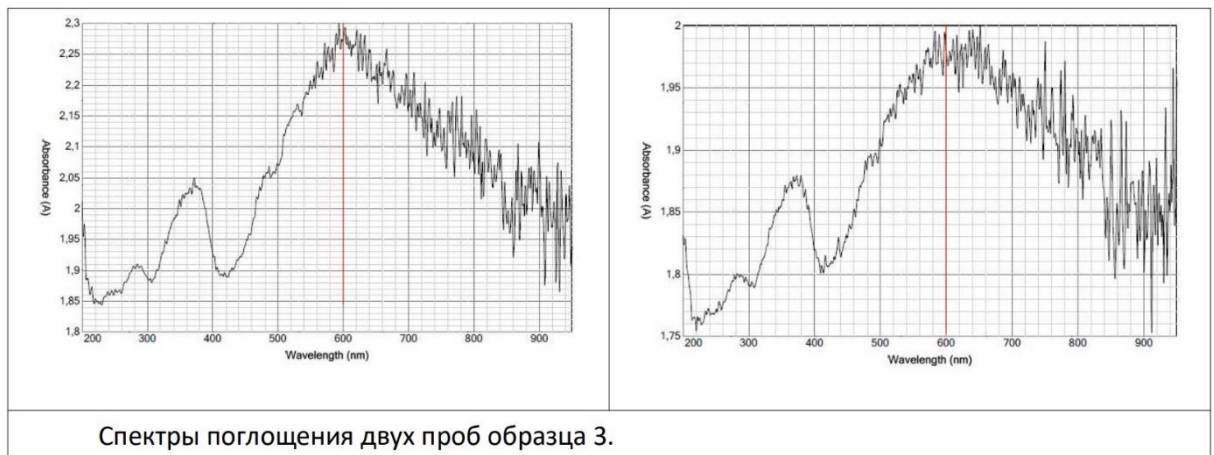


Рисунок 6 - Спектры поглощения двух проб образца 3

Коэффициент пропускания образцов 1 и 3 не превышал 1.2 %Т 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. Так как энергия излучения обратно пропорциональна длине волны, то, с точки зрения протекторных свойств образцов, наиболее критичным является ультрафиолетовый диапазон спектра (200 – 400 нм). 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 (соотв. 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 (так как не удалось провести измерения ни в режиме сканирования, ни в одноволновом режиме), а значит, о хороших дифрагмирующих 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. Кератопигментация с гелевым окрашенным имплантатом, обладающим высокими дифрагмирующими свойствами, является вариантом решения проблемы засветов и снижения остроты зрения и представляет собой перспективную для дальнейших исследований и разработок методику. Для кератопигментации с косметической целью на невидящих глазах возможно использование окрашенного имплантата с большим светопропусканием. В связи с этим перспективным является изучение биосовместимости каждого экспериментального образца.



### **3.2. Результаты оценки реакции культуры клеток стромы роговицы и кадаверной роговицы человека на введение экспериментальных образцов**

Исследования проходили в следующих направлениях: изучали биологическую совместимость образцов на модели культуры клеток стромы роговицы человека и определяли тканевую реактивность донорской роговицы человека на интеграцию образцов в условиях органного культивирования путем иммуногистохимического исследования на апоптоз и методом сканирующей электронной микроскопии.

#### **3.2.1 Результаты 2D культивирования клеток стромы роговицы человека в присутствии гелевых окрашенных имплантатов (in vitro)**

В работе была использована модель 2D клеточной культуры кератоцитов 3 пассажа (Рис. 7).

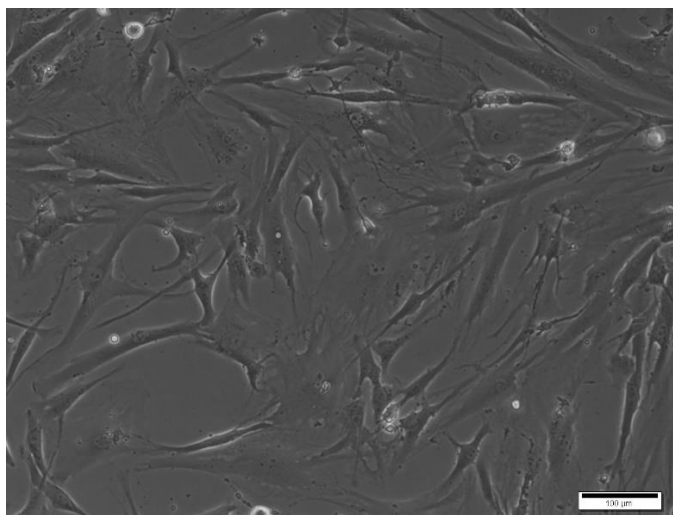


Рисунок 7 - 2D клеточная культура кератоцитов, 3 пассаж.

*Световая фазовая-контрастная микроскопия ув. 100x*

Для подтверждения фенотипа полученной клеточной культуры было проведено иммуноцитохимическое исследование на характерные маркеры кератоцитов Кератокан, Кератан сульфат, Люмикан, а также неспецифический маркер -  $\alpha$ -гладкомышечный актин. Полученные результаты показали, что исследуемая клеточная культура 3 пассажа экспрессирует характерные маркеры кератоцитов и неэкспрессирует  $\alpha$ -гладкомышечный актин (Рис.8).

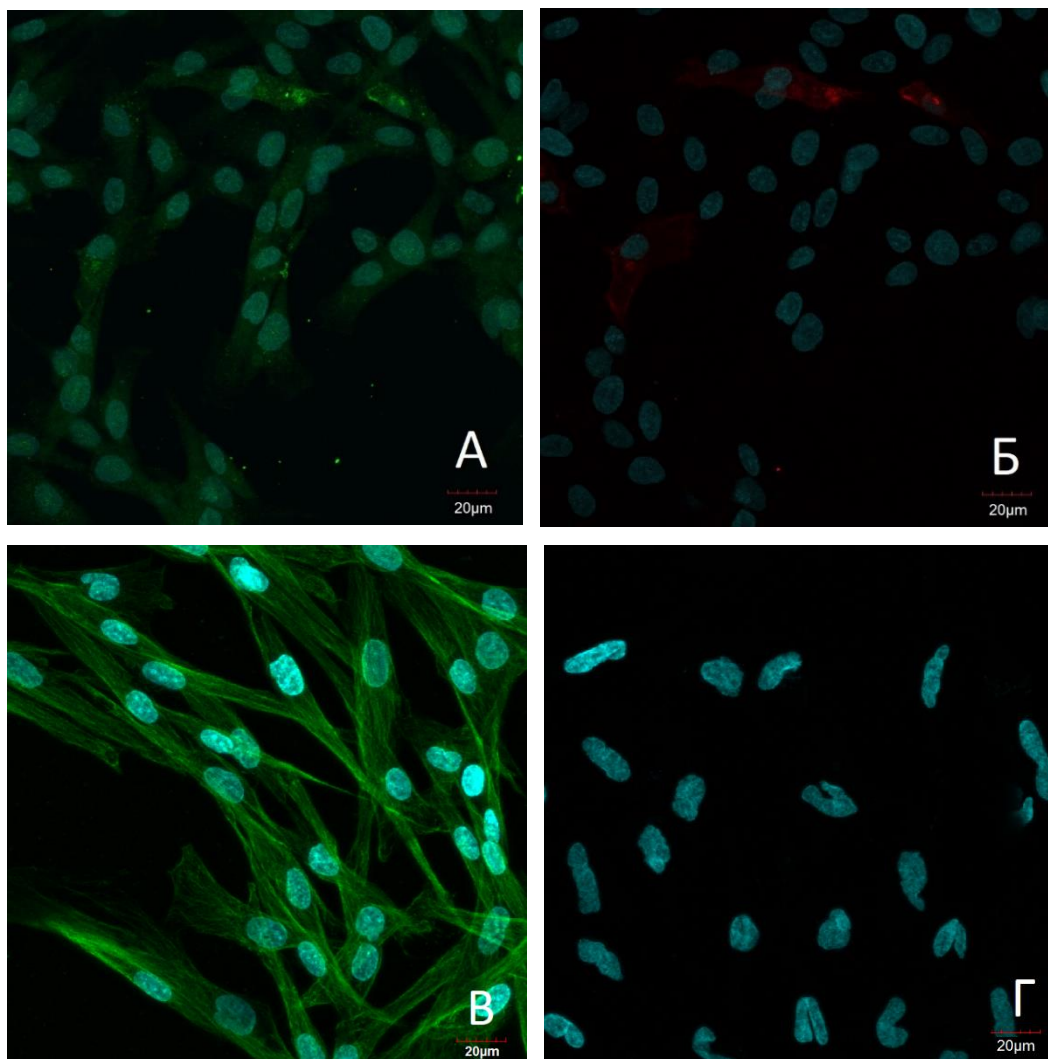


Рисунок 8 – Иммуноцитохимический анализ культуры кератоцитов 3 пассажа. А- экспрессия Кератокана (Alexa Fluor 488, зеленый), Б-экспрессия Кератан сульфата (Alexa Fluor 488, красный), В-экспрессия Люмикана, Г – отсутствие экспрессии  $\alpha$ -гладкомышечного актина. Иммуноцитохимическое

окрашивание, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, ядра контрастированы бис-бензими́д (Hoechst 33258) ув. х600

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 (Рис. 9).

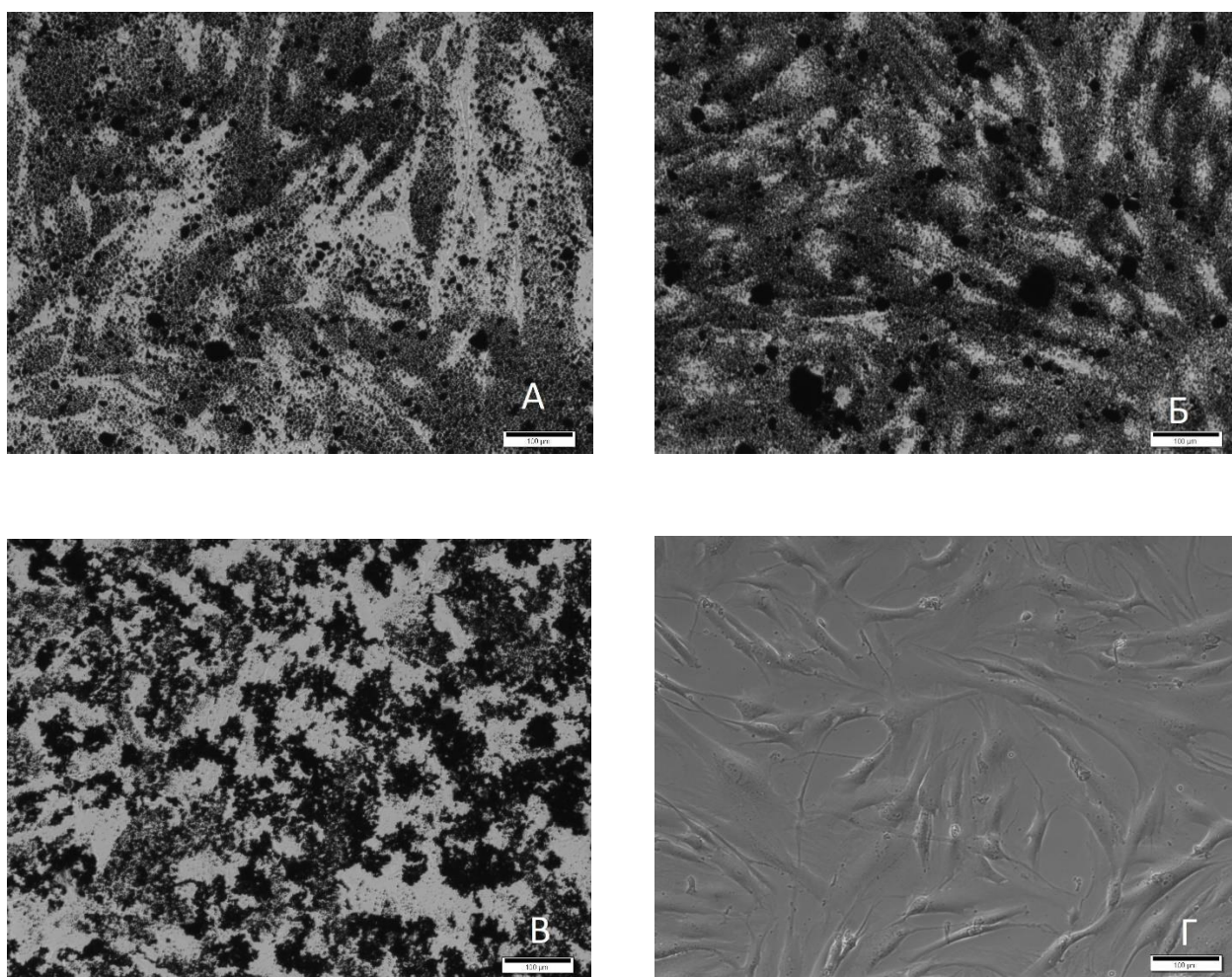


Рисунок 9 - 2D культура кератоцитов 3 пассажа, 7 сутки культивирования.

А – Образец 1; Б – Образец 2; В – Образец 3; Г – контрольная группа.

Световая фазовая-контрастная микроскопия ув. х100

Пролиферативная активность клеточной культуры кератоцитов не отличалась между контрольной и опытными группами на всем протяжении эксперимента (Таблица 3).

Таблица 3 - Пролиферативная активность кератоцитов

	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, на графике приведен индекс ДНК-комет. Статистической разницы между группами выявлено не было (Рис. 10)

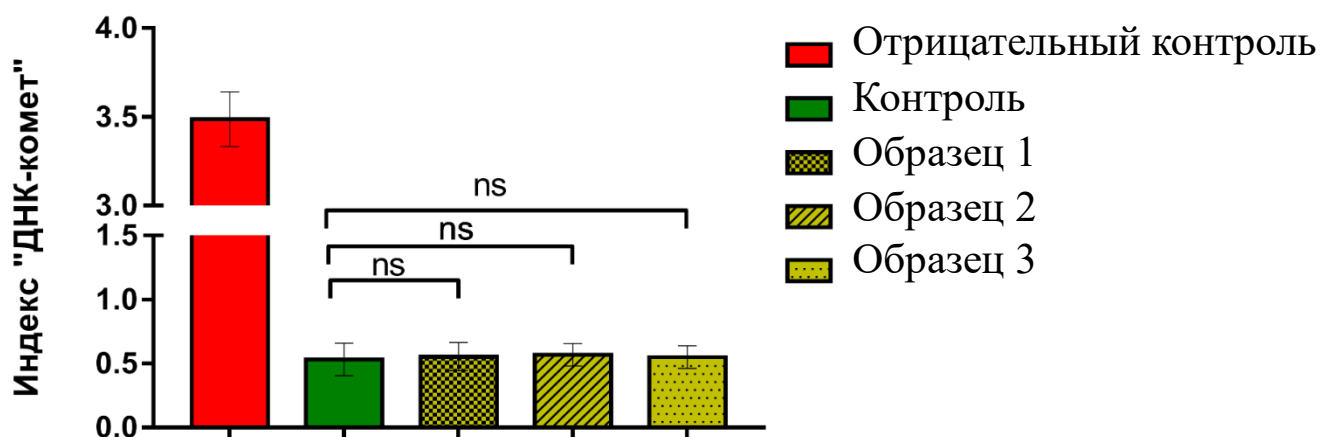


Рисунок 10 - Сравнение индекса «ДНК-комет» в 2D клеточной культуре кератоцитов опытных и контрольной групп

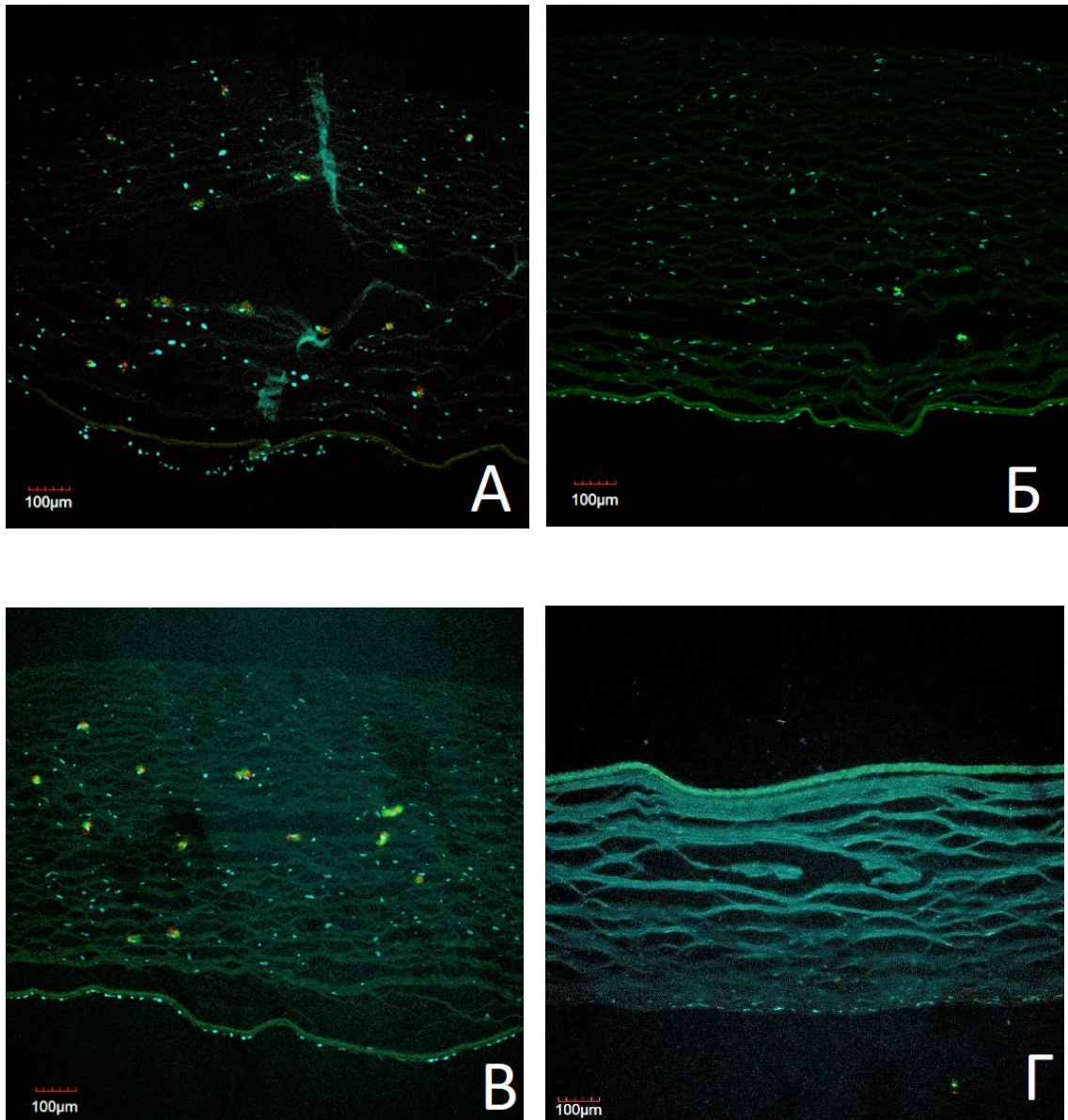
По итогам проведения эксперимента установлено, что ни один из образцов не оказывает воздействия на пролиферативную активность культуры клеток, а также не приводит к повреждению ДНК клеток.

### **3.2.2. Результаты экспериментально-морфологического исследования влияния разработанных гелевых окрашенных имплантатов на роговицу человека**

Были исследованы инициаторные маркеры апоптоза каспазного пути - Caspasa 8 и митохондриального пути - ВАХ и Цитохром С. Данные белки относятся к начальным этапам апоптоза, когда процесс программируемой клеточной гибели носит обратимый характер. Для определения эффекторных белков апоптоза (необратимый этап) обоих путей были исследованы Caspasa 3/7.

Показано, 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 ( $p > 0,05$ ) (рис. 11). В исследуемых образцах экспрессия инициаторного маркера митохондриального пути апоптоза ВАХ отсутствовала. Изучение экспрессии эффекторных маркеров Caspasa 3/7 показало отсутствие статистически значимых различий (рис. 14, табл 3-4).

Данные представлены в формате  $M \pm \sigma$ , где  $M$  – среднее арифметическое,  $\sigma$  – стандартное отклонение (табл. 4-5).



А – Роговица с образцом №1 экспрессия Caspasa 8 (AF 488 зеленый); Цитохром С (AF 594 красный); Б - Роговица с образцом №2 экспрессия Caspasa 8 (AF 488 зеленый); Цитохром С (AF 594 красный); В - Роговица с образцом №3 экспрессия Caspasa 8 (AF 488 зеленый); Цитохром С (AF 594 красный); Г – Контроль

Рисунок 11 - Иммуногистохимическое исследование роговиц после культивирования с образцами. Ядра контрастированы красителем Hoechst.

Иммуногистохимическое исследование ув. х600

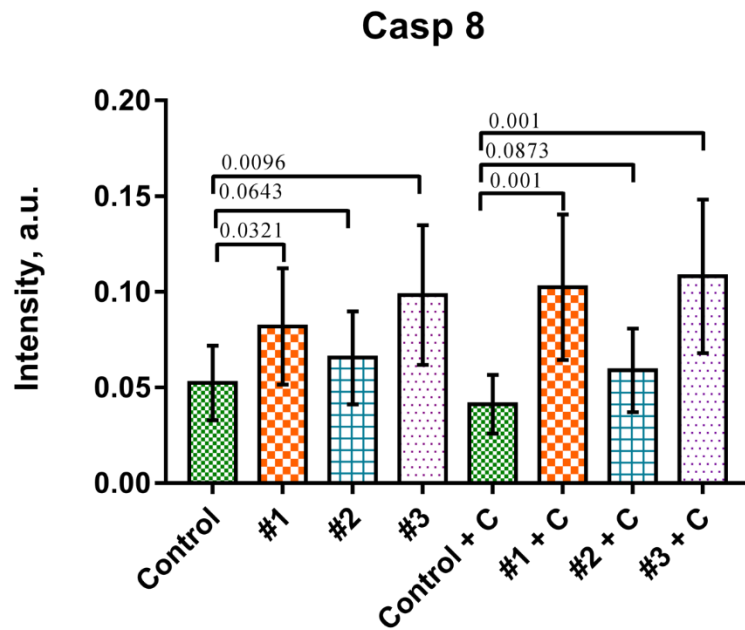


Рисунок 12 - Изменение экспрессии маркеров апоптоза Caspasa 8 в роговицах с образцами в сравнении с контрольной роговицей до и после культивирования

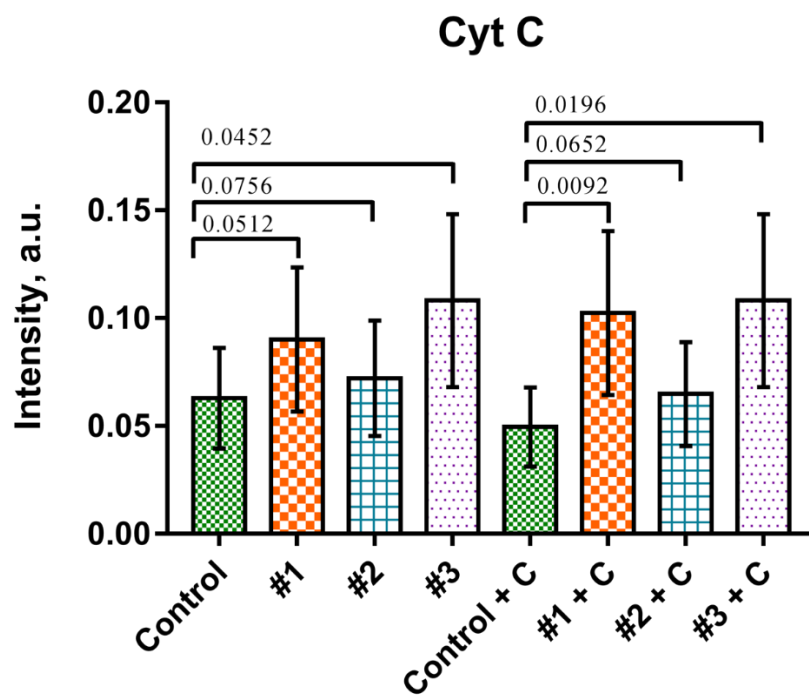
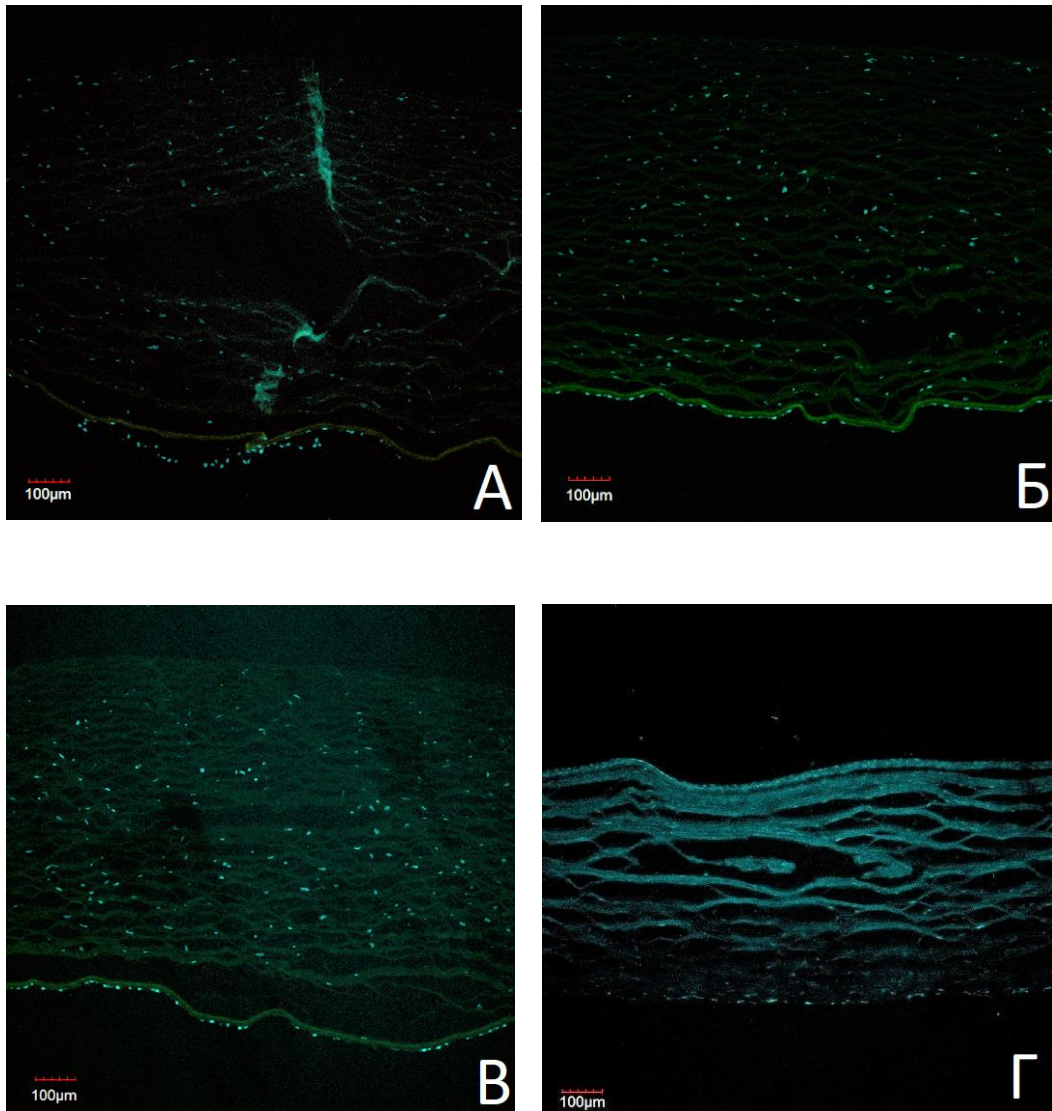


Рисунок 13 - Изменение экспрессии маркера апоптоза Цитохрома С в роговицах с исследуемыми образцами в сравнении с контрольной группой до и после культивирования.



А – Роговица с образцом №1 экспрессия Caspasa 3/7 (AF 488); BAX (AF 594)

Б - Роговица с образцом №2 экспрессия Caspasa 3/7 (AF 488); BAX (AF 594)

В - Роговица с образцом №3 экспрессия Caspasa 3/7 (AF 488); BAX (AF 594)

Г - Контроль

Рисунок 14 - Иммуногистохимическое исследование роговиц после культивирования с образцами. Ядра контрастированы красителем Hoechst.

Иммуногистохимическое исследование ув. х600



Таблица 4 – 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 5 – 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

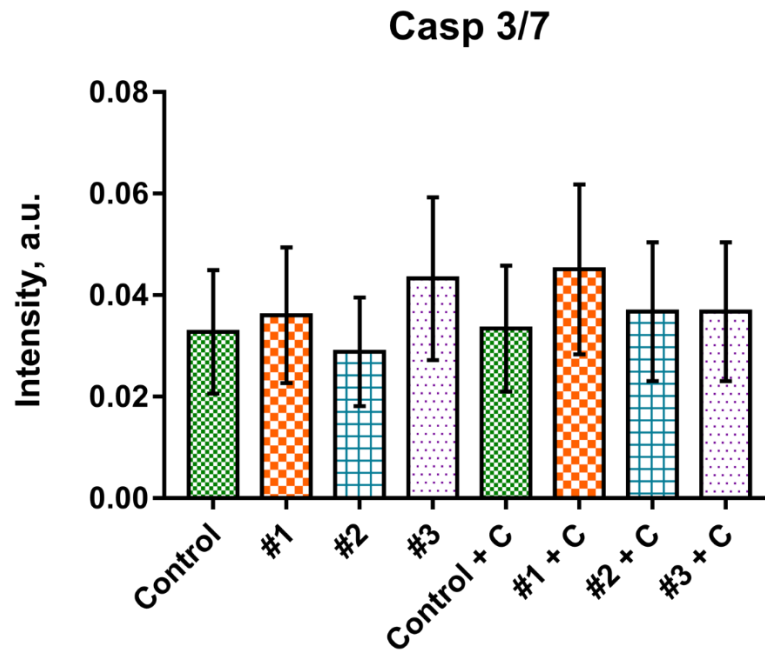


Рисунок 15 - Изменение экспрессии маркера апоптоза Caspasa 3/7 в роговицах с исследуемыми образцами в сравнении с контрольной группой до и после культивирования

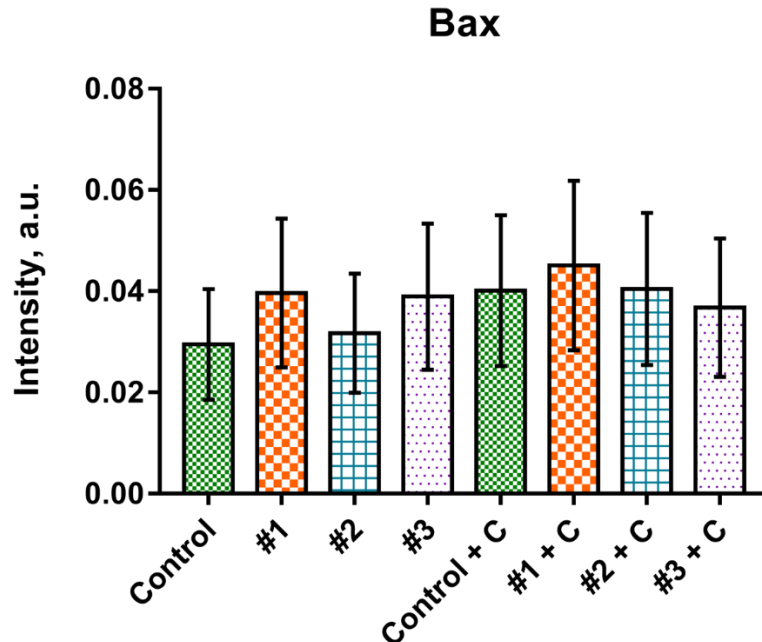


Рисунок 16 - Изменение экспрессии маркера апоптоза ВАХ в роговицах с исследуемыми образцами в сравнении с контрольной группой до и после культивирования

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 (Рис. 17).

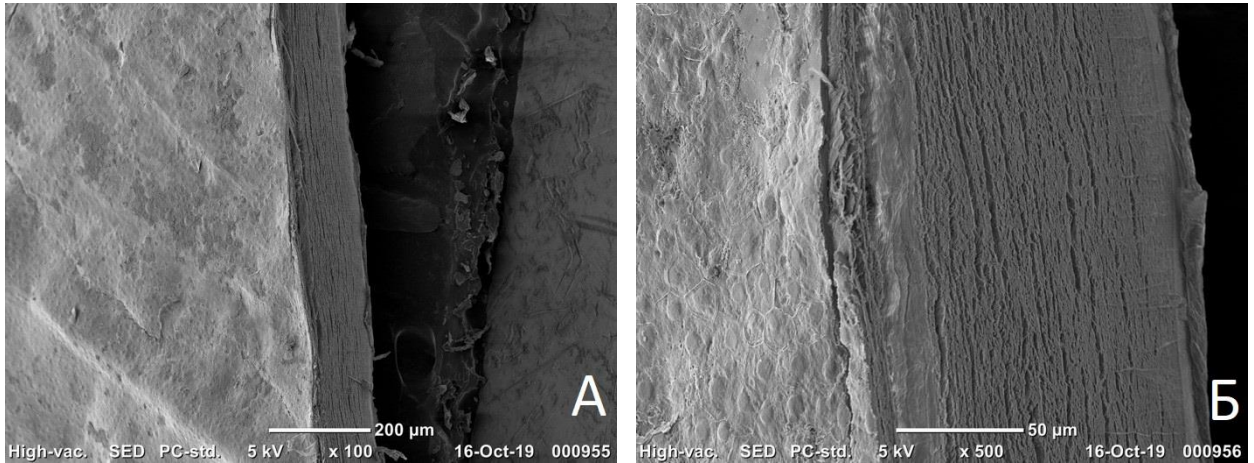


Рисунок 17 - Фрагмент роговицы с интрастромальным карманом, контрольный образец. *Электронно-сканирующая микроскопия, А - ув. x100; Б – ув. x500*

Исследование образца №1 показало, что после культивирования детектируется частичное вымывание имплантата и образование волокнистой структуры в профиле сформированного кармана (Рис. 18)

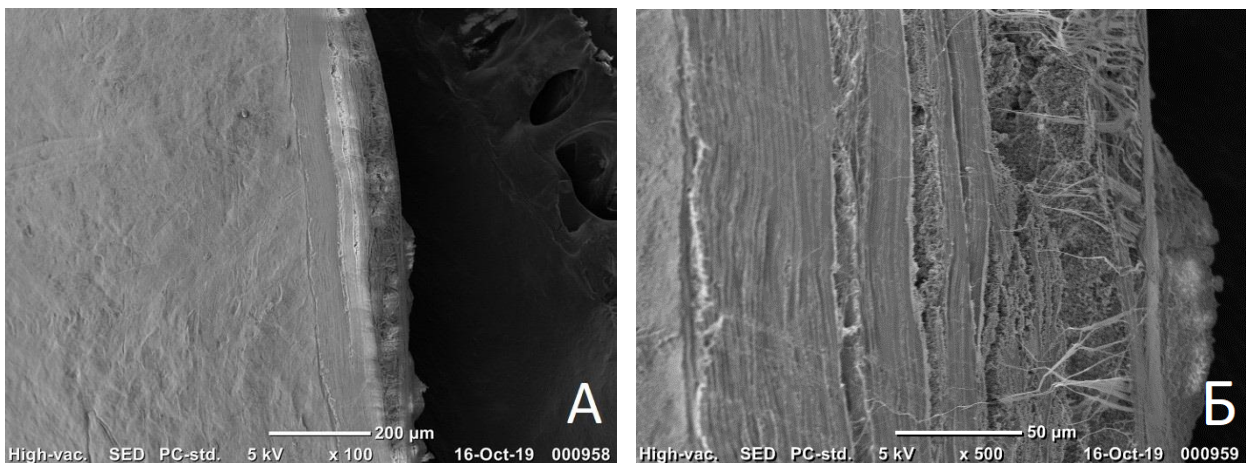


Рисунок 18 - Фрагмент роговицы с интрастромальным карманом, образец №1  
*Электронно-сканирующая микроскопия, А - ув. x100; Б – ув. x500*

В роговицах с образцом №2 изменение толщины волокон не отмечалось, краситель полностью заполнял весь объём сформированного канала, новообразованных волокон обнаружено не было (Рис. 19).

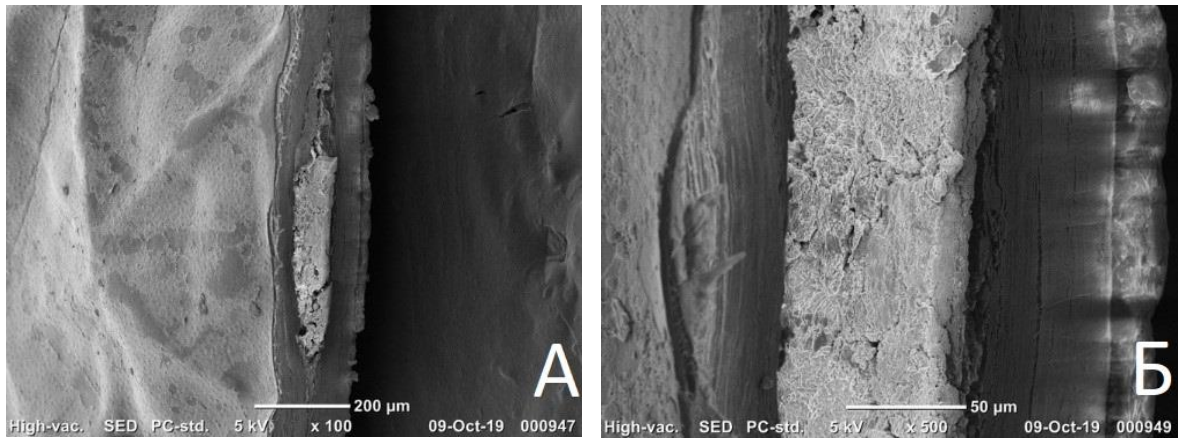


Рисунок 19 - Фрагмент роговицы с интрастромальным карманом, образец №2  
*Электронно-сканирующая микроскопия, А - ув. x100; Б – ув. x500*

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 (Рис. 20).

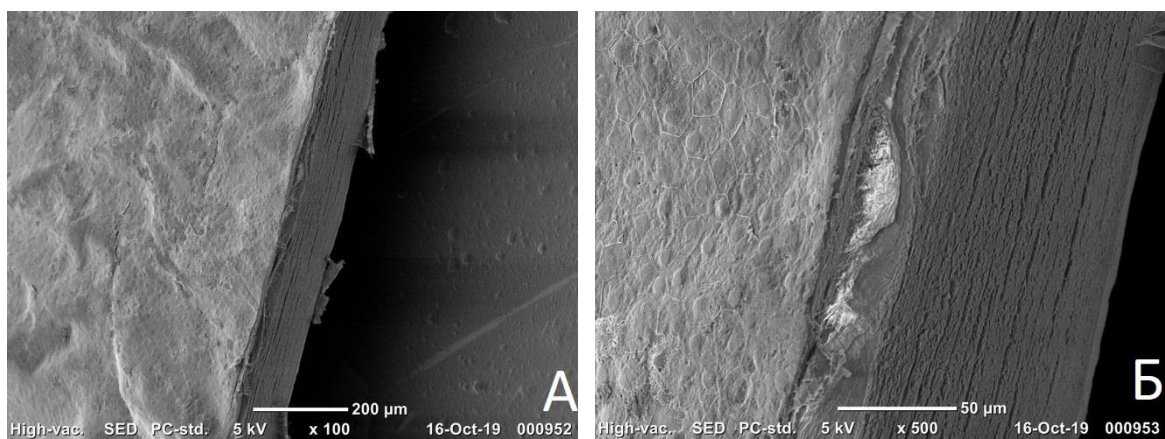


Рисунок 20 - Фрагмент роговицы с интрастромальным карманом, образец №3  
*Электронно-сканирующая микроскопия, А - ув. x100; Б – ув. x500*

Таким образом, проведенное исследование показало, что ни один из образцов не оказывает воздействия на пролиферативную активность культуры клеток, а также не приводит к повреждению ДНК клеток.

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, 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.

### **3.3. Результаты исследования влияния разработанных гелеобразных окрашенных имплантатов на ткани глаза экспериментального животного**

Исследования проходили в следующих направлениях: изучали биомикроскопически воздействие разработанных гелеобразных окрашенных имплантатов на структуры переднего отрезка глаза экспериментального животного, а также проводили световую микроскопию роговиц кролика с введенными образцами путем оценки равномерности роговичного канала, интенсивности пигмента и компактности его укладки, а также реактивность тканей на присутствие образцов.

### 3.3.1. Результаты биомикроскопического исследования

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 сутки в этой же группе наблюдалась локальная отечность и полупрозрачное помутнение роговицы в проекции роговичного разреза (табл. 6).

Таблица 6 - Результаты биомикроскопии переднего сегмента глаза экспериментальных животных

<b>Образец</b> <b>Сроки</b> <b>наблюдения</b>	<b>Образец 1</b>	<b>Образец 2</b>	<b>Образец 3</b>	<b>Контроль</b>
7 сутки (n=5)	инъекция сосудов конъюнктивы 0-1 степени, незначительная отечность роговицы в проекции операционного разреза (5)	инъекция сосудов конъюнктивы 0-1 степени, незначительная отечность роговицы в проекции операционного разреза (5)	инъекция сосудов конъюнктивы 0-1 степени, незначительная отечность роговицы в проекции операционного разреза (5)	инъекция сосудов конъюнктивы 0-1 степени, незначительная отечность роговицы в проекции операционного разреза (5)
14 сутки (n=5)	инъекция сосудов конъюнктивы 0-1 степени (5), роговица прозрачна (4), полупрозрачное помутнение роговицы (1)	инъекция сосудов конъюнктивы 0-1 степени (1), инъекция сосудов конъюнктивы отсутствует (4)	инъекция сосудов конъюнктивы 0-1 степени (3), инъекция сосудов конъюнктивы отсутствует (2)	Инъекция сосудов конъюнктивы отсутствует (5)

30 сутки (n=5)	полупрозрачное помутнение роговицы (1), инъекция сосудов конъюнктивы отсутствует (4)	роговица прозрачная, инъекция сосудов конъюнктивы отсутствует (5)	роговица прозрачная, инъекция сосудов конъюнктивы отсутствует (5)	роговица прозрачная, инъекция сосудов конъюнктивы отсутствует (5)
90 сутки (n=5)	роговица прозрачная, инъекция сосудов конъюнктивы отсутствует (4), полупрозрачное помутнение роговицы (1)	роговица прозрачная, инъекция сосудов конъюнктивы отсутствует (5)	роговица прозрачная, инъекция сосудов конъюнктивы отсутствует (5), неравномерное распределение цвета (2 из 5)	роговица прозрачная, инъекция сосудов конъюнктивы отсутствует (5)



Рисунок 21 - Биомикроскопия глаза кролика через 3 суток после введения образца №3. Отек в области роговичного разреза.



Рисунок 22 - Биомикроскопия глаза кролика через 30 суток после введения образца №1. Полупрозрачное помутнение роговицы.



Рисунок 23 - Биомикроскопия глаза кролика через 90 суток после введения образца №3. Глаз спокоен. Неравномерное распределение цвета.





Рисунок 24 - Биомикроскопия глаза кролика через 90 суток после введения образца №2.

В опытных группах визуализировали роговицу без признаков воспалительной реакции, окрашенные имплантаты сохраняли правильное положение в роговичном туннеле. На остальном протяжении роговица сохраняла интактность, видимых дефектов передних и задних отделах стромы не наблюдали. В контрольной группе роговицы сохраняли свою прозрачность.

### 3.3.2. Результаты световой микроскопии

При сводной оценке результатов эксперимента путем проведения световой микроскопии различия между экспериментальными группами можно было разделить на несколько признаков:

- 1) Канал (его равномерность, линейность, прерывистость)
- 2) Краска (интенсивность пигмента, компактность укладки, распыление и инфильтрация стромы)

### 3) Реактивность тканей на присутствие краски.

#### 1. Гелевый окрашенный имплантат на основе гиалуроната натрия с органическим пигментом (12 недель)

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, пигмент красителя компактен, пропитывание прилегающей зоны стромы пигментом не наблюдается, по краю канала легкое уплотнение волокон стромы, нельзя исключить инкапсуляцию пигмента. Задний эпителий роговицы (эндотелий) – без особенностей.

Обращает на себя внимание неравномерность толщины роговицы и волнистость переднего профиля на обзорном снимке с возможным нарушением стратификации слоев в этой зоне в отличие от линейности канала с краской и заднего профиля. Складчатость гистологического препарата носит искусственный характер, которая не влияет на истинный результат эксперимента.

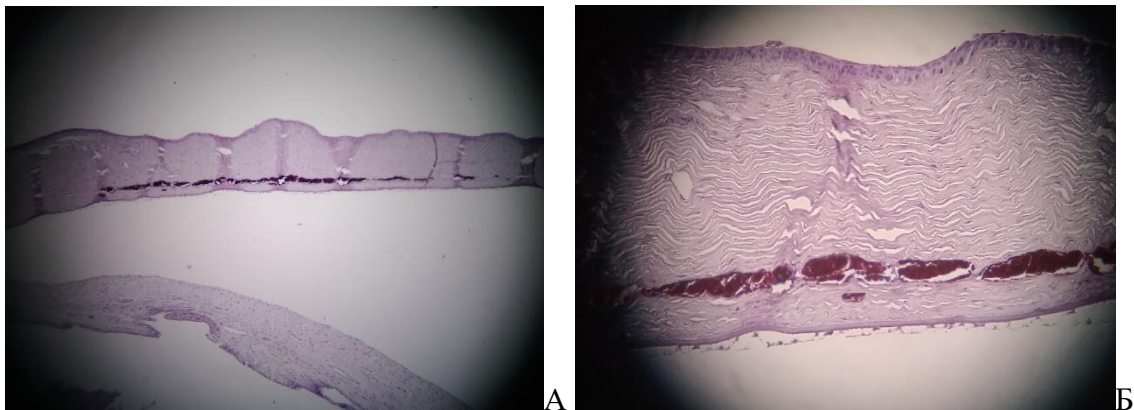


Рис. 25. Гистологический препарат роговицы кролика группы 1.

Окраска гематоксилин-эозин, ув. А – х50, Б - х200

#### 2. Гелевый окрашенный имплантат на основе гидролизата коллагена с неорганическим пигментом (12 недель)

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. Общий вид стромы роговицы без признаков отека и без нарушения стратификации слоев. Задний эпителий роговицы (эндотелий) – без особенностей.

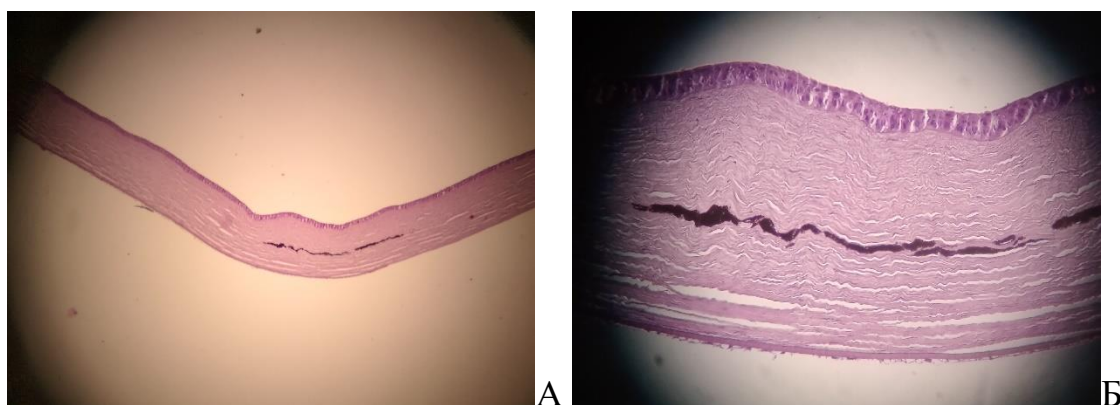


Рис. 26. Гистологический препарат роговицы кролика группы 2.

Окраска гематоксилин-эозин, ув. А – x50, Б - x200

### 3. Гелевый окрашенный имплантат на основе метилцеллюлозы с органическим пигментом (12 недель)

В задних слоях стромы роговицы определяется наличие коричневого пигмента. Канал залегания краски линейный, не прерывается, пигмент красителя преимущественно рыхлый, пропитывание прилегающей зоны стромы пигментом по типу легкого «флёра». Общий вид стромы роговицы без признаков отека и без нарушения стратификации слоев. Задний эпителий роговицы (эндотелий) – без особенностей.

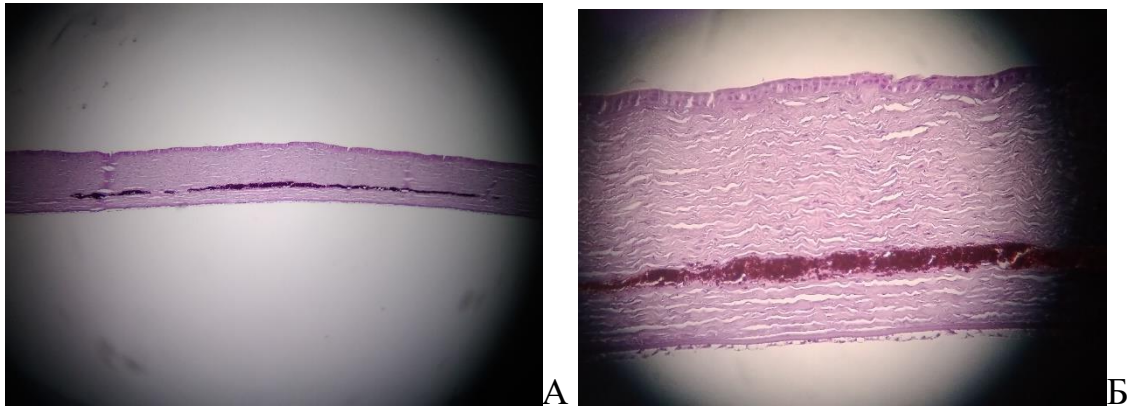


Рис. 27. Гистологический препарат роговицы кролика группы 3.

Окраска гематоксилин-эозин, ув. А – x50, Б - x200

Структура канала прослеживается во всех случаях, что свидетельствует о сохранении местоположения краски в первоначальной локации после введения.

Линейность канала сохранена во всех случаях, что позволяет предположить статичность положения краски в строме в этих случаях, что косвенно подтверждает возможность управления процессом пигментирования стромы (выбор заданной глубины залегания, расчет количества вводимого вещества).

Прерывистость канала – можно отнести к условно неблагоприятным результатам. Этот признак необходимо сопоставлять с клинической картиной равномерности пигментации или депигментации стромы, чтобы определить уровень демаскировки.

Длительность пребывания имплантата в строме роговицы на протяжении 12 недель сопровождалась в экспериментальных группах следующими эффектами:

Во всех группах наблюдали сохранение первоначальной интенсивности краски, что сопоставимо с наблюдениями в эксперименте *in vivo*.

Была выявлена компактность укладки – признак, который может свидетельствовать о конденсации образца с течением времени. Возможными причинами могли служить следующие факторы:

- потеря жидкой составляющей самого образца;

- постепенно нарастающий и проходящий отек стромы роговицы, сдавливающий зону пигментации;
- аспетическое воспаление, различной степени выраженности, приведшее к отграничению образца от окружающей стромы

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, экспериментальное-морфологическое исследование *in vivo* гелевых окрашенных имплантатов, изготовленных из различных материалов, показало, что при максимальном сроке наблюдения (до 3 месяцев) не было отмечено случаев атипичной реакции. По данным световой микроскопии установлено, что в большинстве случаев пребывание разработанных имплантатов в роговице кролика в изученные сроки не вызывало видимых структурных изменений слоев роговицы, сохранялось равномерное распределение волокон стромы и компактность укладки гелевого окрашенного имплантата. Выраженной инфильтрации окружающих тканей пигментом и токсических проявлений действия изучаемых образцов на ткани глаза не было выявлено ни в одной группе. Распыление пигмента с легким «флёром» наблюдали в случае образца № 3 на основе метилцеллюлозы и органического пигмента, что сопоставимо с результатом исследования на глазах экспериментального животного, где биомикроскопически на 2 из 5 глазах зафиксировано неравномерное распределение цвета (рис. 23).

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 внутрироговичного окрашенного имплантата.

### **3.4. 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 предопределяет 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.

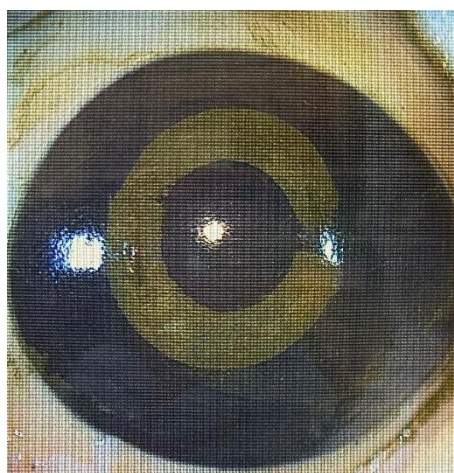


Рисунок 28 – Гелевый окрашенный имплантат в роговичном туннеле кадаверного глаза, макрофотография

Гелевый имплантат распределен в роговичном тоннеле равномерно. По результатам гистологического исследования гелевый краситель введен в интрастромально выполненный туннель роговицы, визуализируется краевая пигментация.

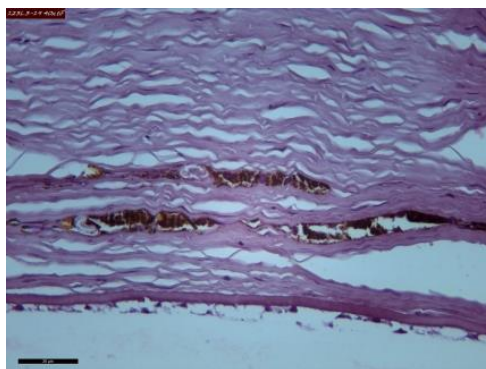


Рисунок 29 - Гистологический препарат деэпителизированной донорской роговицы с интрастромальным туннелем, выполненным фемтолазером с краевой пигментацией. Окраска гематоксилин-эозин, ув. x200

Результаты введения гелевого окрашенного имплантата оценивали по следующим критериям: визуальное фиксированное прокрашивание пространства внутри заданного роговичного тоннеля, равномерность распределение гелевого имплантата, наличие экранирующего эффекта, адгезия пигмента к стенкам роговичного тоннеля.

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 тоннеля, что позволяет думать о несовершенстве стандартной форма 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 (рис. 30).

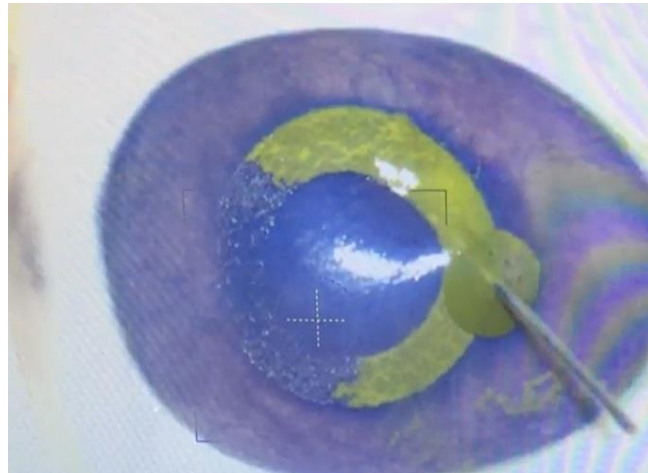


Рисунок 30 – Гелевый окрашенный имплантат в роговичном туннеле кадаверного глаза, макрофотография процесса введения имплантата

Таким образом, результаты данного эксперимента продемонстрировали, что формирование роговичного туннеля с помощью фемтосекундного лазера для последующего выполнения процедуры кератопигментации является прецизионным, прогнозируемым и безопасным процессом. Гелевая структура вводимого вещества способна обеспечить стабильную компактную фиксацию в пространстве роговичного туннеля. Результаты проведения фемтолазерной кератопигментации с использованием гелевого имплантата и техническая возможность осуществления данной процедуры подтверждены данными эксперимента *ex vivo* и гистологического исследования.

Но 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. Предварительные результаты указывают на целесообразность дальнейшего исследования и оптимизации технологии.



## **ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ХИРУРГИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ ВНУТРИРОГОВИЧНОГО ИСКУССТВЕННОГО ДИАФРАГМИРОВАНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРА**

Переходя к заключительному этапу работы следует подчеркнуть, что в ходе исследования при выполнении эксперимента на кадаверных глазах был сделан вывод 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. В этой связи, целью данной главы является разработка способа хирургической коррекции дефектов радужной оболочки, включающего в себя проведение фемтолазерного формирования интрастромального туннеля с выполнением самогерметизирующегося роговичного реза для входа в туннель.

Для этого необходимо было разработать программное обеспечение для отечественного фемтосекундного лазера с целью выполнения самогерметизирующегося роговичного реза для входа в туннель и его применение в эксперименте *ex vivo*.

Технический результат достигается тем, что 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 изломом, как показано на рис.32, или с двумя изломами в форме «зигзага» или «ступеньки», или двумя пересекающимися надрезами, как показано на рис. 33-36.

Самогерметизирующийся роговичный рез может быть выполнен радиально-ориентированным двумя пересекающимися надрезами, как показано на рис. 38-39.

С помощью фемтосекундного лазера проводится расслаивание роговицы по кольцу на глубине 80% от толщины роговицы, также лазером формируется самогерметизирующийся роговичный рез для входа в туннель. Затем 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.

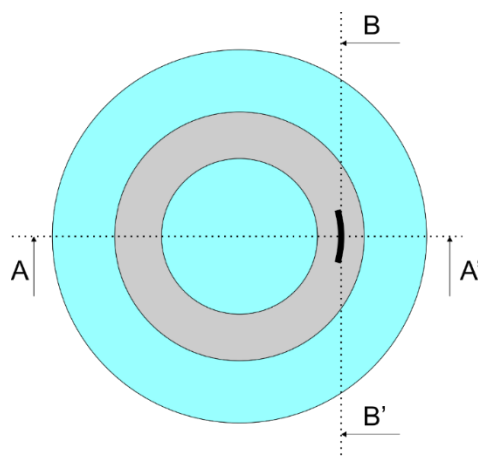


Рис. 31. Схема операции с тангенциально-ориентированным входом в интрастромальный туннель. Туннель показан серым цветом, вход в него — черным, интактная часть роговицы — голубым.

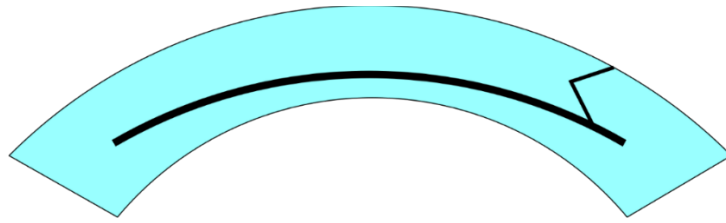


Рис. 32. Схема операции с тангенциально-ориентированным двунаправленным входом в интрастромальный туннель. Вход с одним изломом. Сечение А-А' с Рис.31.

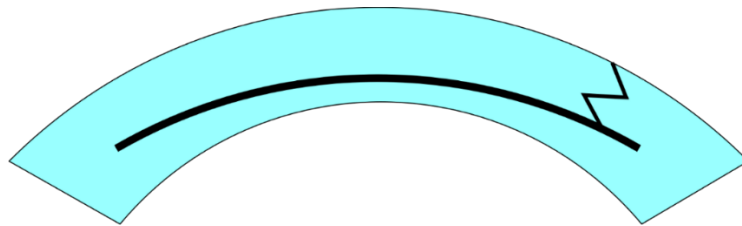


Рис. 33. Схема операции с тангенциально-ориентированным двунаправленным входом в интрастромальный туннель. Вход зигзагообразный, с двумя изломами. Сечение А-А' с Рис.31.

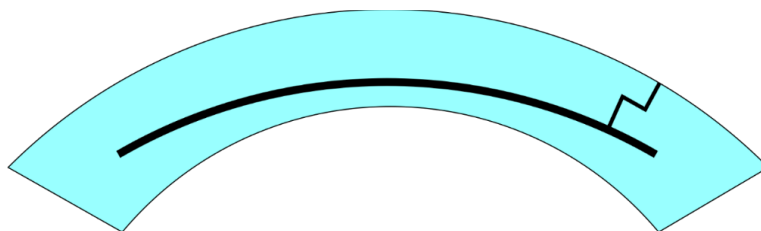


Рис. 34. Схема операции с тангенциально-ориентированным двунаправленным входом в интрастромальный туннель. Вход ступенькой, с двумя изломами. Сечение А-А' с Рис.31.

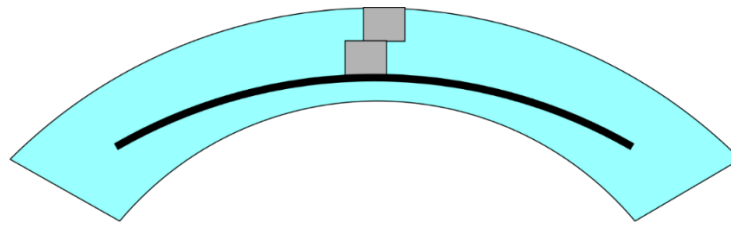


Рис. 35. Схема операции с тангенциально-ориентированным однонаправленным входом в интрастромальный туннель. Вход двумя пересекающимися надрезами. Сечение В-В' с Рис.31.

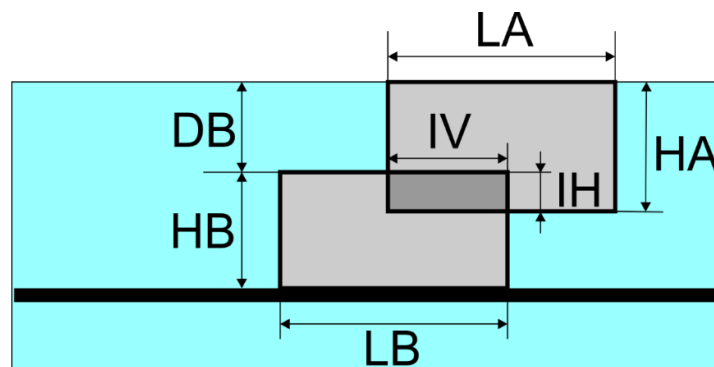


Рис. 36. Схема операции с тангенциально-ориентированным однонаправленным входом в интрастромальный туннель. Вход двумя пересекающимися надрезами. Сечение В-В' с Рис.31.

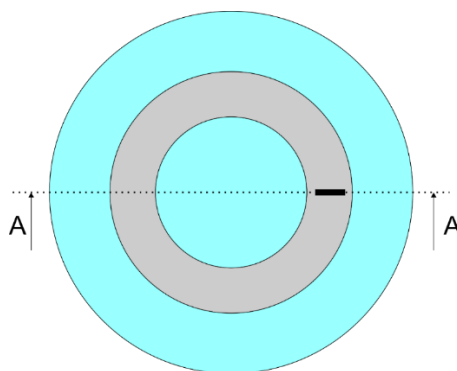


Рис. 37. Схема операции с радиально-ориентированным входом в интрастромальный туннель. Туннель показан серым цветом, вход в него – черным, интактная часть роговицы – голубым.

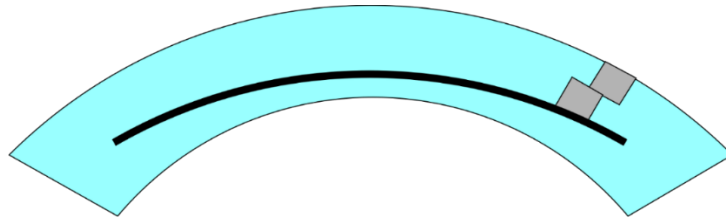


Рис. 38. Схема операции с радиально-ориентированным однонаправленным входом в интрастромальный туннель. Вход двумя пересекающимися надрезами. Сечение А-А' с Рис.37.

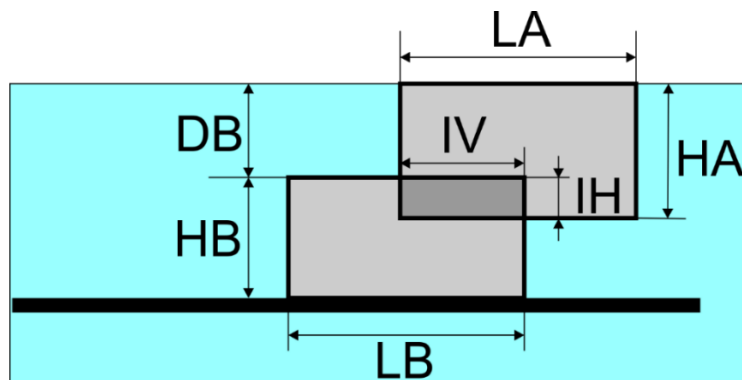


Рис. 39. Схема операции с радиально-ориентированным однонаправленным входом в интрастромальный туннель. Вход двумя пересекающимися надрезами. Сечение А-А' с Рис.37.

Для подтверждения эффективности разработанного программного обеспечения был проведен эксперимент на кадаверных глазах. Учитывая полученные в предыдущих главах положительные результаты оценки диафрагмирующих свойств и биосовместимости, для интрастромального введения использовался образец №2 на основе гидролизата коллагена и неорганического пигмента.

На 10 донорских глазах, не прошедших отбор для кератопластики в глазном тканевом банке МНТК «Микрохирургия глаза» предварительно был удален эпителий для улучшения визуализации. На каждой роговице проводилось формирование 2-х полукольцевых замкнутых туннелей с разной формой реза для входа в туннель. При помощи фемтосекундного лазера «ФемтоВизум» (программа «Роговичный туннель») на глубине 400 мкм был сформирован

кольцевидный замкнутый роговичный туннель с внешним диаметром 8 мм и внутренним диаметром 4 мм. Используются 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 тоннеля. 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 (рис. 40).

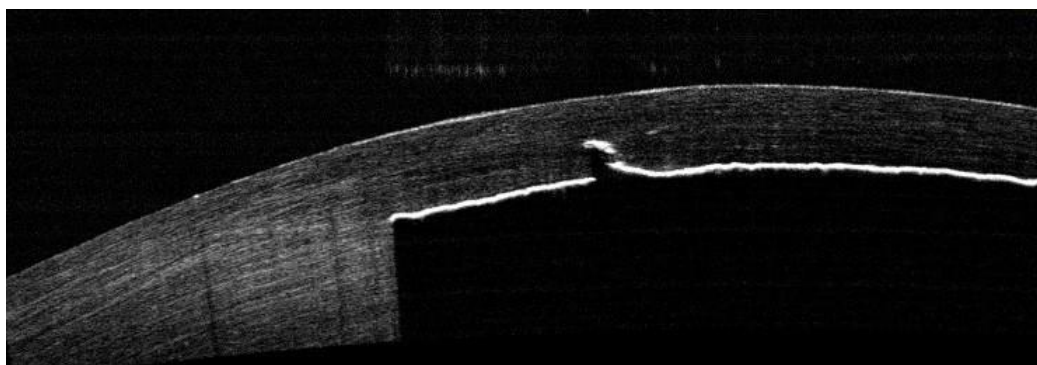


Рис. 40 - Оптическая когерентная томография роговицы кадаверного глаза с выполненным тангенциально-ориентированным входом в интрастромальный туннель с одним изломом

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 из 4 случаях (рис. 41).

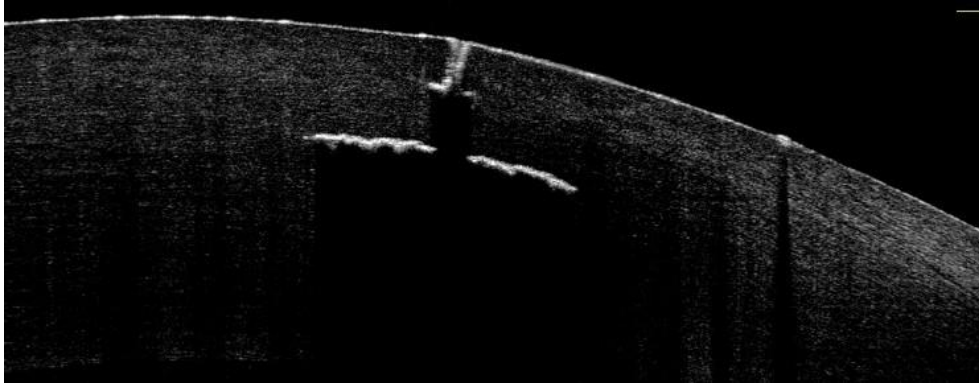


Рис. 41 - Оптическая когерентная томография роговицы кадаверного глаза с выполненным тангенциально-ориентированным входом в интрастромальный туннель «ступенькой» с двумя изломом

При формировании других возможных форм реза в большинстве случаев наблюдалось 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 случаях. 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 наблюдалось 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, что доказано в эксперименте на кадаверных глазах. Можно предположить, что при использовании данной формы реза для входа в туннель и введении внутрироговичного гелевого окрашенного имплантата на основе гидролизата коллагена и неорганического пигмента, достаточный

диафрагмирующий эффект будет обеспечен. В связи с этим, дальнейшее исследование предложенной технологии коррекции дефектов радужной оболочки методом внутрироговичного искусственного диафрагмирования является перспективным для выполнения в клинических условиях.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В связи с необходимостью создания оптимального способа внутрироговичной коррекции дефектов радужной оболочки была сформулирована цель настоящего исследования – разработка и обоснование в эксперименте технологии коррекции дефектов радужной оболочки методом внутрироговичного искусственного диафрагмирования с применением нового гелевого окрашенного имплантата.

Для достижения поставленной цели работа была разделена на 5 этапов, соответствующих задачам исследования, которые включали в себя:

определение светопропускаемости новых гелевых окрашенных имплантатов для оценки их функционального диафрагмирующего эффекта на основании проведения спектрофотометрии;

изучение реакции культуры кератоцитов и стромы роговицы в эксперименте *in vitro* на образцы новых гелевых окрашенных имплантатов на основании методов двухмерного клеточного культивирования и органотипического культивирования;

изучение реакции стромы роговицы экспериментального животного на имплантацию предложенных образцов гелевых окрашенных имплантатов на основании биомикроскопии и световой микроскопии;

определение возможности стабильного положения гелевого окрашенного имплантата в роговичном туннеле на основании эксперимента на кадаверных глазах (*ex vivo*);

разработку оптимизированной хирургической методики внутрироговичного искусственного диафрагмирования с фемтосекундным лазерным сопровождением с использованием программного обеспечения для формирования новой формы реза для входа в роговичный туннель в эксперименте *ex vivo*;

Первым этапом работы являлось проведение спектрофотометрии для оценки светопропускаемости образцов гелевых окрашенных имплантатов и определения их функционального диафрагмирующего эффекта.

На анализ были предоставлены 3 образца исследуемых 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.

Спектрофотометрический анализ проводился на приборе NanoVue Plus (GE Healthcare, США). Данный капельный (плёночный) спектрофотометр имеет однолучевую оптическую схему и работает в режиме пропускания.

Для образцов на основе метилцеллюлозы и гиалуроновой кислоты с органическим пигментом было характерно наименьшее пропускание (соотв. и наибольшее поглощение) излучения в диапазоне 500 — 700 нм, т. е. видимой части спектра.

Для образца на основе гидролизата коллагена с неорганическим пигментом 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). В литературных источниках подобная информация не была обнаружена в связи с тем, что углубленное изучение физических свойств внурироговичного гелевого окрашенного имплантата на основе гидролизата коллагена и неорганического пигмента производится впервые в рамках данного диссертационного исследования.

Полученный результат говорит о полном отсутствии пропускания света, а значит, о хороших диафрагмирующих свойствах гелевого окрашенного имплантата на основе гидролизата коллагена и неорганического пигмента, что является важным для оценки пригодности окрашенного имплантата к

использованию в клинической практике. Гелевые окрашенные имплантаты с большей светопропускаемостью могут быть рассмотрены для проведения кератопигментации с косметической целью. Результаты проведения спектрофотометрического анализа и сформированные выводы предопределили дальнейшую актуальность изучения биологического действия каждого образца разработанных имплантатов.

Была проведена серия экспериментально-морфологических исследований, при этом биологическое действие образцов на основе гиалуроната натрия, гидролизата коллагена и метилцеллюлозы была изучена на клеточной культуре (*in vitro*), на глазах экспериментальных животных (*in vivo*), и кадаверных глазных яблоках (*ex vivo*).

Второй этап – органотипическое и двухмерное клеточное культивирование (экспериментально-морфологическое исследование *in vitro*).

Эксперимент проводился на 12 роговицах, полученных из Глазного тканевого банка и непригодных для трансплантации. В 9 из них были имплантированы разработанные гелеобразные окрашенные имплантаты (разный состав), а 3 роговицы составили контрольную группу. Роговицы культивировали в течение 7 суток, затем оценивали выраженность тканевой реакции по степени покрытия поверхностей клеточными элементами методами флуоресцентной микроскопии и сканирующей электронной микроскопии. По окончании исследования было отмечено, что оптимальные результаты показал образец №2 по следующим критериям: слабая экспрессия инициаторных белков апоптоза Caspasa 8 и Цитохром С, отсутствие экспрессии ВАХ и эффекторных белков Caspasa 3/7. По данным электронно-сканирующей микроскопии было выявлено, что образцы №1 и №3 подвергаются частичному растворению и вымыванию из интрастромального кармана, образец №2 имеет плотную структуру и сохраняется в роговичном кармане на всем протяжении культивирования, как минимум 7 суток.

Согласно результатам проведенных исследований *in vitro*, биосовместимость разработанного имплантата на основе гидролизата

коллагена и неорганического пигмента была выше, чем у имплантатов на основе метилцеллюлозы и гиалуроновой кислоты. Полученные результаты сопоставимы с литературными данными [59].

Третий этап работы – экспериментально-морфологическое исследование *in vivo*. Экспериментально-морфологическое исследование *in vivo* включало 20 животных, которых после хирургического вмешательства наблюдали в течение 3 месяцев.

В ходе проведенного исследования было показано, что разработанные имплантаты при введении не вызвали выраженной воспалительной реакции глаза кролика, визуализируемой биомикроскопически, и имели стабильное положение в сформированном внутрироговичном тоннеле. Наблюдали распыление пигмента с легким «флёром» в случае образца № 3 на основе метилцеллюлозы и органического пигмента, что сопоставимо с результатом исследования на глазах экспериментального животного, где биомикроскопически на 2 из 5 глазах 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, что позволяет считать его наиболее перспективным для применения в клинических условиях.

Полученные в ходе работы результаты не противоречили литературным данным [59]. В современной офтальмологии при проведении кератопигментации чаще всего используются пигменты на органической и неорганической основе (оксиды металлов) [55,109].

По данным литературы, зарубежные офтальмологи использовали при проведении кератопигментации как органический, так и неорганический пигмент. При использовании органического пигмента в клинической практике у пациентов осложнений отмечено не было, но через 3-6 месяцев отмечалось побледнение и частичное вымывание пигмента [119]. При использовании неорганического пигмента (в составе 50% оксида железа) на

экспериментальных животных было отмечено 2 случая воспаления и минимального отека, который разрешился в течение 2 недель после операции. Ни одного случая изменения цвета пигмента обнаружено не было [109].

Полученные результаты и возможность определения образца, обладающего оптимальными свойствами, предопределили необходимость дальнейшего исследования и создания хирургической методики проведения фемтолазерной кератопигментации.

Четвертый этап работы – эксперимент на кадаверных глазах, по результатам которого было выявлено, что образец №2 продемонстрировал стабильность нахождения в строме роговицы и четкую фиксацию пигмента, но некоторое количество гелевого имплантата вытекало интраоперационно в процессе введения его в роговичный туннель, что обосновало необходимость дальнейшего изучения технических особенностей операции и решения последующих задач диссертационной работы.

Завершающим пятым этапом диссертационной работы явилась оптимизация технологии внутрироговичного искусственного диафрагмирования с использованием гелевого окрашенного имплантата и фемтосекундного лазера.

На сегодняшний день в офтальмохирургии для проведения оперативных вмешательств на роговице и для формирования роговичного тоннеля существуют различные фемтолазеры и их программы.

При выполнении четвертого (предыдущего) этапа работы стало очевидно, что стандартная форма реза (прямой вертикальный рез) для входа в роговичный туннель является несовершенной 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. Именно поэтому оптимизация способа хирургической коррекции дефектов радужной оболочки, отличающегося проведением внутрироговичной фемтолазерной

кератопигментации с формированием одного интрастромального туннеля и выполнением самогерметизирующегося роговичного реза для входа в туннель, представлялась актуальным вопросом заключительного этапа диссертационной работы.

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 работы параметры фемтосекундного лазера: частота лазера 100 кГц-10 МГц; скорость перемещения пучка 5-200 мм/с; энергия в импульсе 0.1 – 3 мкДж.

Самогерметизирующийся роговичный рез для входа в интрастромальный туннель выполняется тангенциально-ориентированным и может быть выполнен как с одним изломом, так и с двумя, а также двумя пересекающимися надрезами, или он выполняется радиально-ориентированным - двумя пересекающимися надрезами.

Для подтверждения эффективности разработанного программного обеспечения был проведен эксперимент на кадаверных глазах (n=10). Учитывая полученные в предыдущих главах положительные результаты оценки диафрагмирующих свойств и биосовместимости, для интрастромального введения использовался образец №2 на основе гидролизата коллагена и неорганического пигмента.

В ходе 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 из 4 случаях.

При формировании других возможных форм реза в большинстве случаев наблюдалось 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 случаях. 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 наблюдалось во всех случаях.

Заявленный технический результат достигается за счет того, что сформированный самогерметизирующийся роговичный рез для входа в интрастромальный туннель препятствует миграции, выходу и потере красящего вещества, тем самым обеспечивая стабильную фиксацию краски в туннеле, и, как следствие, достаточный диафрагирующий эффект. В открытых литературных источниках аналогичная информация не была обнаружена в связи с тем, что создание специального программного обеспечения с формированием оригинальной формы реза для входа в роговичный туннель с целью выполнения кератопигментации произведено впервые в рамках данного диссертационного исследования.

Таким образом, проведенное доклиническое исследование разработанного внутрироговичного гелеобразного окрашенного имплантата на основе гидролизата коллагена и неорганического пигмента подтверждает его высокую биосовместимость, разработанная композиция может быть рекомендована к дальнейшему изучению. Учитывая социальную значимость проблемы и большое количество пациентов, нуждающихся в малоинвазивной хирургической помощи при аниридии, представленная технология коррекции дефектов радужной оболочки методом внутрироговичного искусственного диафрагмирования является перспективной для дальнейшего изучения безопасности и эффективности ее применения в клинических условиях.

## ВЫВОДЫ

1. На основании спектрофотометрического анализа определен образец, проявивший максимальную диафрагмирующую способность (образец №2 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 ВАХ 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 № 2 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 тоннеля. 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 СОКРАЩЕНИЙ**

ВГЖ – внутриглазная жидкость

ГПМЦ - гидроксипропилметилцеллюлоза

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИКЛ – интракорнеальная линза

ИОЛ – интраокулярная линза

ИХД – иридохрусталиковая диафрагма

КСР – клетки стромы роговицы

КТП - кератопигментация

ОКТ – оптическая когерентная томография

ОЭ – опорный элемент

ПММА – полиметилметакрилат

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ФСЛ – фемтосекундный лазер

2D – (англ. two-dimensional) двумерный

AF – антитела «Alexa Fluor»

FDA - Food and Drug Administration

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:**

1. Аветисов С.Э. Диагностика кератоконуса / С.Э. Аветисов, К.Б. Першин, Н.Ф. Пашинова // Глаз. - 1999. – Т.1. — С. 12-15
2. Азнабаев М.Т., Суркова В.К., Лобанов С.А. Новый трансплантат в хирургии радужной оболочки / М.Т. Азнабаев, В.К. Суркова, С.А. Лобанов // Актуальные проблемы патологии сосудистого тракта глаза при различных заболеваниях и повреждениях органа зрения: 8–я междунар. конф. офтальмологов городов–побратимов Одесса и Генуя: тез. докл. – Одесса, 1993. – С. 4–5.
3. Боброва Н. Ф. Реконструктивная микрохирургия при сочетанных травмах переднего отдела глаза и их последствиях у детей: автореф. дис. на соискание учёной степени доктора мед. наук : спец. 14.00.08 «Глазные болезни» / Н. Ф. Боброва - Одесский НИИ ГБ и ТТ им. акад. В. П. Филатова. – Одесса, 1991. – С. 34.
4. Боброва Н. Ф. Травмы глаз у детей / Н. Ф. Боброва. – М. : Медицина, 2003. – С. 192
5. Венгер Г. Е. Гистологические и электронно-микроскопические исследования заживления радужной оболочки при иридопластике / Г.Е. Венгер, В.М. Андрианов // Офтальмологический журнал. – 1984. – № 4. – С. 226–229.
6. Венгер Г. Е. Реконструктивная хирургия радужной оболочки / Г. Е. Венгер, С. А. Рыков, Л. В. Венгер. – К. : Логос, 2006. – 255 с.
7. Венгер Г. Е. Реконструктивное замещение обширных дефектов радужки при исходах травм глаз / Г. Е. Венгер // Офтальмологический журнал. – 1984. – № 6. – С. 383–384.
8. Венгер Г. Е. Трансплантация радужной оболочки в эксперименте / Г. Е. Венгер, Н. Е. Думброва // Офтальмологический журнал. – 1973. – № 3. – С. 202–205

9. Венгер Г. Е. Аниридия: хирургический подход к лечению (круглый стол) / Г.Е. Венгер, В.Г. Копаева, В.К. Зуев, С.Ю. Копаев // «Новое в офтальмологии». – М. : Издательский центр «Фёдоров», 2001. – № 1. – С. 32–35.
10. Венгер Г.Е. Реконструктивная хирургия радужной оболочки / Г.Е. Венгер, С.А. Рыков, Л.В. Венгер – Киев: Логос, 2006, - стр 256
11. Венгер Г.Е. Восстановительная хирургия радужной оболочки при травмах глаза и их исходах: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Венгер Г.Е. - Одесса, 1984. — 33 с.
12. Груша О. В. К вопросу о пластике радужной оболочки / О. В. Груша, Э. С. Попова, Э. В. Фетисова // VII съезд офтальмологов Укр. ССР : тез. докл. – Одесса, 1984. – С. 202–203.
13. Джавришвилли Г.В. Несквозное кератопротезирование в хирургическом лечении дистрофических бельм: дис... канд. мед. наук / Джавришвилли Г.В. – Москва, 1991. – с.
14. Еникеев Д. А. Иридоаллопластика / Д. А. Еникеев, С. А. Лобанов // Уфа, 1996. – 120 с.
15. Еникеев Д. А. Иридопластика (атлас) / Д. А. Еникеев, С. А. Лобанов // Уфа, 1997. – 264 с.
16. Животовский Д.С. Изменение рефракции глаза в результате имплантации внутрироговичных пластмассовых линз в эксперименте / Д.С. Животовский // Вестник офтальмологии. - 1970. - №. 2. — С. 34-38
17. Животовский Д.С. Применение внутрироговичных пластмассовых линз в эксперименте и в клинике / Д.С. Животовский // Вестник офтальмологии. - 1972. -№. 2. — С. 38- 45
18. Измайлова С.Б. Медико-технологическая система лечения прогрессирующих кератэктазий различного генеза: дисс... док. мед. наук / Измайлова С.Б. – Москва, 2014. – 267 с.

- 19.Капитонов А.Ю. Экспериментальная разработка метода энзимотерапии ожоговой болезни глаз / А.Ю. Капитонов, Е.В. Ченцова, Н.Б. Чеснокова, И.Ю. Сахаров // Вестник офтальмологии. - 1996. - № 112(5). — С. 11-13
- 20.Кокряцкая В. И. Пересадка радужной оболочки в условиях эксперимента / В. И. Кокряцкая // Актуальные вопросы офтальмологии. – К., 1967. – С. 69.
- 21.Копаев С. Ю. Оптимизация поверхности интраокулярных линз : автореф. дис. на соискание учёной степени канд. мед. наук : спец. 14.00.08 «Глазные болезни» / С. Ю. Копаев ; МНТК «Микрохирургия глаза». – М., 1991. – 22 с
- 22.Копаева В. Г. Аниридия: хирургический подход к лечению / В. Г. Копаева // Новое в офтальмологии. – 2001. – № 1. – С. 32–33.
- 23.Линник Л.Ф. Хирургическая тактика удаления опухолей сосудистого тракта / Л.Ф. Линник // Офтальмохирургия. 2006. - №4. - С. 17-23.
- 24.Литвак Г.Ю. Трансплантация первичной культуры островковой ткани ксеногенной поджелудочной железы больным сахарным диабетом / Г.Ю. Литвак, А.В. Баринов, В.В. Комаров, Г.К. Тюнина // Технологии живых систем. - 2010. - Т. 7. - № 1. - С. 19-27
- 25.Лобанов С. А. Выбор оптимального трансплантата для иридопластики и обоснование применения в клинике : автореф. дис. на соискание учёной степени доктора мед. наук : 14.00.16 «Патологическая физиология» (мед. науки) / С. А. Лобанов ; Башкир. гос. мед. ун т. – Челябинск, 1998. – С.18
- 26.Морхат И.В. Интраламеллярная кератопластика / И.В. Морхат. - Минск, 1980. — С. 110
- 27.Пантелеев Е.Н. Расчет константы А для искусственной иридохрусталиковой диафрагмы / Е.Н, Пантелеев, А.Н. Бессарабов, Н.А. Поздеева // Офтальмохирургия. – 2006. – № 1. – С. 42—44.

28. Паштаев Н.П. Имплантация комбинированной ИОЛ «радужка-хрусталик» при аниридии с афакией / Н.П. Паштаев, Н.А. Петрова // Офтальмохирургия. – 1998. - № 3. - С. 11—16
29. Перова Н.В. Биodeградируемый коллагенсодержащий матрикс СферогельТМ для клеточной трансплантации / Н.В. Перова, Ю.В. Порунова, В.Ф. Урьяш, Л.А. Фаминская // Перспективные материалы. – 2004. – № 2. – С. 52-59
30. Поздеева Н.А. Новая модель искусственной иридохрусталиковой диафрагмы для коррекции больших дефектов радужной оболочки (клинико-функциональные результаты имплантации) / Н.А. Поздеева // Вестник офтальмологии. – 2013. - №6. - С.38-44
31. Поздеева Н.А. Искусственная иридохрусталиковая диафрагма в хирургическом лечении аниридии / Н.А. Поздеева, Н.П. Паштаев // Монография. — Чебоксарский филиал ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза», 2012
32. Поздеева Н.А. Реконструктивная хирургия аниридии и афакии / Н.А. Поздеева, Н.П. Паштаев, В.П. Лукин // Бюллетень Восточно-сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2004. - № 2. – С. 128—131.
33. Поздеева Н.А. Экспериментальное обоснование применения новой модели искусственной иридохрусталиковой диафрагмы для реконструктивной хирургии / Н.А. Поздеева, Н.П. Паштаев, В.М. Треушников // Вестник офтальмологии. – 2006. – № 3. – С. 30–33.
34. Поздеева Н.А. Новая модель искусственной иридохрусталиковой диафрагмы для коррекции больших дефектов радужной оболочки (экспериментальное обоснование) / Н.А. Поздеева, Н.П. Паштаев, В.М. Треушников // Вестник офтальмологии. - 2013. - №129 (3). — С. 48-53
35. Сайковский Р.С. Эффективность применения препарата Сферогель для лечения гонартроза / Р.С. Сайковский, Н.А. Савенкова, А.В.

- Аверьянов, А.В. Лисица // Клиническая практика. - 2013. - № 3. - С. 4-10
36. Севастьянов В.И. Биополимерные матрицы в тканевой инженерии / В.И. Севастьянов, Н.В. Перова, Е.А. Немец // Сборник тезисов V Всероссийского симпозиума с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии, Изд-во «Башкортостан», Уфа. - 2012. – С.198 - 199.
37. Севастьянов В.И. Применение инъекционных форм биополимерных гетерогенных гидрогелей при дегенеративно-дистрофических поражениях суставов // В.И. Севастьянов, Н.В. Перова, Р.С. Сайковский, И.В. Соловьева // Практическое пособие для врачей. - Москва: Триада, 2012. – С. 27
38. Суркова В.К. Экспериментальное обоснование применения аутоконъюнктивы для иридопластики / В. К. Суркова, Т. С. Иванова // Офтальмологический журнал. – 1987. – № 2. – С. 113–115.
39. Суркова В.К. Иридопластические операции трансплантационными материалами / В. К. Суркова, Г. А. Никова // Актуальные проблемы офтальмологии: сб. науч. трудов. – Уфа : Гилем, 1999. – С. 444–448.
40. Суркова В.К. Новые трансплантаты в хирургии радужной оболочки глаза : Метод. рекомендации / В. К. Суркова, Г. А. Никова, С. А. Лобанов. – Уфа, 1994. – 10 с.
41. Суркова В.К. Применение силиконовысушенной радужной оболочки для иридопластики / В. К. Суркова, Г. А. Никова // Вестник офтальмологии. – 1996. – № 4. – С. 8–10.
42. Темиров Н.Э. Рефракционная кольцевая тоннельная кератопластика в коррекции миопии высокой степени / Н.Э. Темиров, А.П. Корхов // Вестник офтальмологии. - 1991. - № 3 – С. 23-31
43. Треушников В.М. Основы создания биосовместимых и биостойких полимерных имплантатов (обзор) / В.М. Треушников, Е.А. Викторова // Современные технологии в медицине. - 2015. № 7(3). — С. 149 – 171



- 44.Фёдоров С. Н. Случай свободной гомопластики части радужной оболочки / С. Н. Фёдоров, Д. И. Иоффе // Вестник офтальмологии. – 1976. – № 5. – С. 24–27.
- 45.Фёдоров С. Н. Хирургическое лечение травматических катаракт с интраокулярной коррекцией / С. Н. Фёдоров, Э. В. Егорова. – М. : Медицина, 1985. – 328 с
- 46.Фёдоров С.Н. Отдаленные результаты имплантации искусственной радужки из сополимер-коллагена / С.Н. Фёдоров, А.О. Аксенов, Н.А. Струсова, Н.Ф. Буралева // Новые технологии микрохирургии глаза : материалы 5–й науч.–практ. конф. офтальмологов, посвященной 10-летию со дня образования МНТК «Микрохирургия глаза» – Оренбург, 1996. – С. 87–88.
- 47.Фёдоров С.Н. Уникальный случай коллагеноиридопластики при посттравматической аниридии / С.Н. Фёдоров, А.О. Аксенов, Н.А. Струсова // Офтальмохирургия. – 1995. – № 1. – С. 42–44.
- 48.Федоров С.Н. Хирургическая коррекция аниридии и дефектов радужной оболочки глаза / С.Н. Федоров, В.К. Зуев, С.Н. Багров // Офтальмохирургия. — 1990. — №2. — С. 20-22.
- 49.Федяков А.Г. Экспериментальное обоснование применения гелевого имплантата «Сферо®Гель» и пленочного имплантата «ЭластоПОБ®» при травме периферической нервной системы в эксперименте / А.Г. Федяков, О.Н. Древаль, А.В. Кузнецов, Ф.И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. - 2009. - Т. XI. - No 4. - С. 75-80
- 50.Фрешни Р.Я. Культура животных клеток / Р.Я. Фрешни // Практическое руководство: Пер. с англ. - М.: Бином. – 2010. - 691 с.
- 51.Фролов М.А. Межслойная секторальная кератопластика в хирургической коррекции астигматизма / М.А. Фролов, В.С. Беляев, Н.В. Душин // Вестник офтальмологии. - 1996. - № 2. — С. 15-17

- 52.Хенч Л. Биоматериалы, искусственные органы и инжинеринг тканей / Л.Хенч, Д. Джонс // М.: Техносфера, 2007. – С. 304
- 53.Ченцова Е.В. Система патогенетического обоснованного лечения ожоговой травмы глаз. Автореферат дис.... д-ра мед. наук / Ченцова Е.В. – Москва, 1996. — 40 с.
- 54.Чупров А.Д. Результаты имплантации отечественных жестких монолитных интраокулярных линз, изготовленных методом фотополимеризации / А.Д. Чупров, И.А. Плотникова, Е.А. Викторова, В.М. Треушников // Вестник офтальмологии. - 1998. - № 114(4). — С. 10-12
- 55.Alio J. Corneal Tattooing (keratopigmentation) to restore cosmetic appearance in severely impaired eyes with new mineral micronized pigments / J. Alio, B. Sirerol, A. Walewska – Szafran // British Journal of Ophthalmology, BMJ Publishing Group. - 2010. - Vol. 94 (2). - p. 245
- 56.Alio J.L. Femtosecond-assisted keratopigmentation double tunnel technique in the management of a case of Urrets-Zavalía syndrome / J.L. Alio, A.E. Rodriguez // Cornea. – 2012. - Vol. 31 – p. 1071-1074.
- 57.Alio J.L. Keratopigmentation to change the apparent colour of the human eye: a novel indication for corneal tattooing / J.L. Alio, A.E. Rodriguez, M. El Bahrawy // Cornea. – 2016. - Vol. 35.- p. 431–437.
- 58.Alió J.L. Femtosecond-assisted keratopigmentation for functional and cosmetic restoration in essential iris atrophy / J.L. Alio, A.E. Rodriguez, B.T. Toffaha // J Cataract Refract Surg. – 2011. – Vol. 37. – p.1744–1747
- 59.Alio J.L. Keratopigmentation (corneal tattooing) for the management of visual disabilities of the eye related to iris defects / J.L. Alio, A.E. Rodriguez, B.T. Toffaha // Br J Ophthalmol. – 2011. – Vol. 95. – p.1397–1401
- 60.Bedi R. Refractive and topographic stability of Intacs in eyes with progressive keratoconus: five-year follow-up / R. Bedi, D. Touboul, L. Pinsard, J. Colin // J Refract Surg. – 2012. – Vol. 28(6). – p. 392-396

61. Binder P.S. Barraquer lecture. What we have learned about corneal wound healing from refractive surgery / P.S. Binder // *Refract Corneal Surg.* – 1989. – Vol. 5(2). – p. 98-120
62. Brunette I. Comparison of the pig and feline models for full thickness corneal transplantation / I. Brunette, S.G. Rosolen, M. Carrier // *Vet Ophthalmol.* – 2011. – Vol. 14(6). – p. 365-77
63. Burk S. E. Prosthetic iris implantation for congenital, traumatic or functional iris deficiencies / S. E. Burk, A.P. Da Mata, M.E. Snuder // *Journal of Cataract & Refractive Surgery.* – 2001. – Vol. 27. – P. 1732–1740.
64. Callina T. Traditional methods for the treatment of presbyopia: spectacles, contact lenses, bifocal contact lenses / T. Callina, T.P. Reynolds // *Ophthalmol Clin North Am.* – 2006. – Vol. 19(1). – p. 25-33
65. Castro-Munozledo F. Corneal epithelial cell cultures as a tool for research, drug screening and testing / F. Castro-Munozledo // *Exp Eye Res.* – 2008. – Vol. 86(3). -p. 459-69
66. Choyce P.D. Патент US 4655774 A «Intra-corneal implant for correction of aniridia»: автор изобретения D. Peter Choyce.
67. Chung M. Y. Morcher iris reconstruction lens and rigid contact lens for traumatic aniridia / M. Y. Chung, K. M. Miller, B. A. Weissman // *Eye Contact Lens.* – 2009. – Vol. 35. – № 2. – P. 108–110. PubMed PMID: 19265334.
68. Coskunseven E., Kymionis G.D., Talu H. Intrastromal corneal ring segment implantation with the femtosecond laser in a post-keratoplasty patient with recurrent keratoconus / E. Coskunseven, G. D. Kymionis, H. Talu // *J Cataract Refract Surg.* – 2007. – Vol. 33(10). -p. 1808-10
69. Crawford J.B. Pathology report on the foldable silicone posterior chamber lens / J.B. Crawford, G.D. Faulkner // *J Cataract Refract Surg.* – 1986.- Vol. 12(3). – p. 297-300

70. Dart J. Corneal toxicity: the epithelium and stroma in iatrogenic and factitious disease / J. Dart // *Eye (Lond)*. – 2003. – Vol. 17(8). – p. 886-92
71. Dohlman C.H. Treatment of corneal edema with a buried implant / C.H. Dohlman, S.I. Brown // *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*. – 1966. – Vol. 70(2). -p. 267-80
72. Duggan J.N. Tattooing of corneal opacity with gold and platinum chloride / J.N. Duggan, B.P. Nanavati // *Br J Ophthalmol*. – 1936. – Vol. 20 (4). -p. 19-25.
73. Ertan A. Intrastromal ring segment insertion using a femtosecond laser to correct pellucid marginal corneal degeneration / A. Ertan, M. Bahadir // *J Cataract Refract Surg*. – 2006. – Vol. 32(10). – p. 1710-1716
74. Ertan A. Intracorneal rings for keratoconus and keratectasia / A. Ertan, J. Colin // *J Cataract Refract Surg*. – 2007. – Vol. 33(7). -p. 1303-1314
75. Ertan A. Intacs implantation using a femtosecond laser for management of keratoconus: Comparison of 306 cases in different stages / A. Ertan, G. Kamburoglu // *J Cataract Refract Surg*. – 2008. - Vol 34(9). – p.1521-1526
76. Fan T. Transplantation of tissue-engineered human corneal endothelium in cat models / T. Fan, X. Ma, J. Zhao // *Mol Vis*. – 2013. -Vol 19. – p 400-407
77. Goncalves G.C. Comparison of the characteristics in hen and quail corneas as experimental models of refractive surgery/ G.C. Goncalves, P. Perez-Merino, M.C. Martinez-Garcia // *Arch Soc Esp Oftalmol*. - 2016. – Vol. 91(7). – p. 310-315
78. Guo P. Implantation of modified polyhydroxyethyl methacrylate-polymethyl methacrylate keratoprostheses in rabbit and monkey corneas / P. Guo, J.Q. Chen, B.H. Tan, Z.C. Wang // *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. – 2007. - Vol 43(7). – p. 602-607
79. Hasani H. Keratopigmentation: a comprehensive review / H. Hasani, A. Es'haghi, S. Rafatnia, S. Alilou, M. Abolmaali // *Eye (Lond)*. – 2020. – Vol. 34(6). – p. 1039-1046.

80. Hettlich H.J. In vitro and in vivo evaluation of a hydrophilized silicone intraocular lens / H.J. Hettlich, R. Kaufmann, H. Harmeyer // *J Cataract Refract Surg.* – 1992. - Vol 18(2). – p. 140- 146
81. Ibares-Frias L. Tissue reaction after intrastromal corneal ring implantation in an experimental animal model / L. Ibares-Frias, P. Gallego, R. Cantalapiedra-Rodriguez // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* – 2015. – Vol 253(7). – p. 1071-1083
82. Janin-Manificat H. Development of ex vivo organ culture models to mimic human corneal scarring / H. Janin-Manificat, M.R. Rovere, S.D. Galiacy // *Mol Vis.* – 2012, - Vol 18 (2). – p. 896-908
83. Karatza E.C. Outcomes of prosthetic iris implantation in patients with albinism / E.C. Karatza, S.E. Burk, M.E. Snyder, R.H. Osher // *Journal of Cataract & Refractive Surgery.* – 2007. – Vol. 33. – № 10. – P. 1763–1769. PubMed PMID: 17889774.
84. Karslioglu M. Z. et al. Keratopigmentation: Is it a Miracle or an Adventure? / M.Z. Karslioglu // *Beyoglu Eye J.* – 2020. – Vol. 19;5(1). -p. 32-37
85. Kirber M.W. Response to experimental implantation of autologous iris tissue and to iris injuries / M.W. Kirber, I.N. Dubin // *Ophthalmologyca, (Basel).* – 1977. – Vol. 174. – № 5. – P. 158–166.
86. Lane S.L. Polysulfone corneal lenses / S.L. Lane, R.L. Lindstrom, J.D. Cameron // *J Cataract Refract Surg.* – 1986. – Vol 12(1). – p. 50-60
87. Leigh AG. Tattooing of the cornea / A.G. Leigh // In: Duke-Elder S, ed. *System of ophthalmology.* - Vol VIII, Part 2. - London: Henry Kimpton, 1965
88. Mannis M. J. Keratopigmentation: a review of corneal tattooing / M.J. Mannis, K. Eghbali, I.R. Schwab // *Cornea.* – 1999. – Vol. 18. - p. 633
89. Mavrikakis J. Phakoemulsification and endocapsular implantation of an artificial iris intraocular lens in traumatic cataract and aniridia / J.

- Mavrikakis, J. M. Hickman Casey // *Journal of Cataract and Refractive Surgery*. – 2002. – Vol. 28. – № 7. – P. 1088–1091.
90. McCarey B.E. Alloplastic corneal lenses / B.E. McCarey, S.S. Lane, R.L. Lindstrom // *Int Ophthalmol Clin*. – 1988. - Vol 28(2). – p. 155-64
91. McLeod S.D., Alvi N.P., Zhou L. et al. The effect of minoxidil on keratocyte proliferation in cell culture. *Ophthalmic Res* 1998; 30(4): 263-70
92. Moreira L.B. Toxicity of topical anesthetic agents to human keratocytes in vivo / L.B. Moreira, N. Kasetsuwan, D. Sanchez // *J Cataract Refract Surg*. – 1999. – Vol. 25(7). – p. 975-980
93. Ndoye Roth P. A. Aniridia: five case studies / P.A. Ndoye Roth, M. E. de Medeiros Quenum, A.M. Wane Khouma // *Journal Français d'Ophthalmologie*. – 2005. – Vol. 28. – № 8. – P. 845–849. French. PubMed PMID: 16249764
94. Olson M. D. Interim results of a compassionate-use clinical trial of Morcher iris diaphragm implantation: report 1 / M. D. Olson, S. Masket, K. M. Miller // *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. – 2008. – Vol. 34. – № 10. – P. 1674– 1680. PubMed PMID: 18812117.
95. Osher R. H. Cataract surgery combined with implantation of an artificial iris / R. H. Osher, S. E. Burk // *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. – 1999. – Vol. 25. – № 11. – P. 1540–1547
96. Pisella P.J. Post-operative residual astigmatism after cataract surgery: Current surgical methods of treatment / P.J. Pisella // *J. Fr. Ophthalmol*. – 2012. – Vol. 35, № 3. – P. 226-228.
97. Pozdeyeva N. A. Artificial iris-lens diaphragm in reconstructive surgery for aniridia and aphakia / N.A. Pozdeyeva, N.P. Pashtayev, V.P. Lukin, Y.N. Batkov // *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. – 2005. – Vol. 31. – № 9. – P. 1750–1759. PubMed PMID: 16246779.
98. Reed J.W. Corneal tattooing to reduce glare in cases of traumatic iris loss / J.W. Reed // *Cornea*. – 1994. – Vol. 13. – p. 401–405.

99. Reichl S. In vitro cell culture models to study the corneal drug absorption / S. Reichl, C. Kolln, M. Hahne, J. Verstraelen // *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* – 2011. - Vol 7(5). – p. 559- 578
100. Reinhard T. Black diaphragm aniridia intraocular lens for congenital aniridia: long-term follow-up / T. Reinhard, S. Engelhardt, R. Sundmacher // *Journal of Cataract & Refractive Surgery.* – 2000. – Vol. 26. – P. 375–381
101. Reinhard T. Iris black-diaphragm intraocular lenses for correction of aniridia / T. Reinhard, R. Sundmacher, C. Althaus // *Ophthalmic Surgery.* – 1994. – Vol. 25. – № 4. – P. 196–200.
102. Richard N.R. Air/liquid corneal organ culture: a light microscopic study / N.R. Richard, J.A. Anderson, J.L. Weiss, P.S. Binder // *Curr Eye Res.* – 1991. – Vol. 10. – p. 739–749
103. Rodriguez A.E. Superficial Automated Keratopigmentation for Iris and Pupil Simulation Using Micronized Mineral Pigments and a New Puncturing Device / A.E. Rodriguez A.E., J.L. Alio // *Cornea.* – 2017. – Volume 36 (9). – p. 1069-1075
104. Roman S. Artificial iris intraocular lenses in aniridia or iris deficiencies / S. Roman, H. Cherrate, J.P. Trouvet // *Journal Français d'Ophtalmologie.* – 2009. – Vol. 32. – № 5. – P. 320–325. French. PubMed PMID: 19769868.
105. Schmitz K. Aniridia intraocular lenses in eyes with traumatic iris defects / K. Schmitz, A. Viestenz, D. Meller // *Ophthalmologie.* – 2008. – Vol. 105, № 8. – P. 744-752.
106. Shabayek M.H. Intrastromal corneal ring segment implantation by femtosecond laser for keratoconus correction / M.H. Shabayek, J.L. Alio // *Ophthalmology.* – 2007. - Vol 114(9). – p. 1643-52
107. Sheth H. G. Traumatic aniridia after small incision cataract extraction / H. G. Sheth, A. H. Laidlaw // *Contact Lens & Anterior Eye.* – 2006. – Vol. 29. – № 4. – P. 163–164. PubMed PMID: 16945571.

108. Siganos C.S. Management of keratokonus with Intacs / C.S. Siganos, G.D. Kymionis, N. Kartakis // *Am J Ophthalmol.* – 2003. – Vol. 13(4). – p. 246-249
109. Sirerol B. Tolerance and Biocompatibility of Micronized Black Pigment for Keratopigmentation Simulated Pupil Reconstruction / B. Sirerol, A. Walewska-Szafran, J.L. Alio, P. Klonowski, A.E. Rodriguez // *Cornea.* – 2011. - Vol 30. - p. 344–350.
110. Sminia M. L. Implantation of the Artisan iris reconstruction intraocular lens in 5 children with aphakia and partial aniridia caused by perforating ocular trauma / M.L. Sminia, M.T. Odenthal, N. Gortzak-Moorstein [et al.] // *Journal of AAPOS.* – 2008. – Vol. 12. – № 3. – P. 268–272. PubMed PMID: 18329923.
111. Srinivasan S. Prosthetic iris devices / S. Srinivasan, D.S.Ting, M.E. Snyder [et al.] // *Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 49, № 1. – P. 6-17
112. Tanzer D. J. Black iris-diaphragm intraocular lens for aniridia / D. J. Tanzer, R. E. Smith // *Journal of Cataract & Refractive Surgery.* – 1999. – Vol. 25. – № 11. – P. 1548–1551.
113. Thomas B.C. Aniridia-IOL and artificial iris reconstruction / B.C. Thomas, T.M. Rabsilber, G.U. Auffarth // *Klin. Monbl Augenheilkd.* – 2013. – Vol. 230, № 8. – P. 786-790
114. Thompson C. G. Implantation of a black diaphragm intraocular lens for traumatic aniridia / C. G. Thompson, K. Fawzy, I. G. Bryce // *Journal of Cataract & Refractive Surgery.* – 1999. – Vol. 25. – № 6. – P. 808–813.
115. Torricelli A.A. The corneal fibrosis response to epithelial-stromal injury // A.A. Torricelli, A. Santhanam, J. Wu [et al.] // *Exp Eye Res.* - 2016. – Vol. 142. – p. 110-8
116. Wang G.Q. Study on the surface properties of surface modified silicone intraocular lenses / G.Q. Wang, H.Q. Gu, X.J. Peng // *Int J Ophthalmol.* – 2012. - Vol 5(1). – p. 84-87



117. Wilson S.L. Control of scar tissue formation in the cornea: strategies in clinical and corneal tissue engineering / S.L. Wilson, A.J. El Haj, Y. Yang // *J Funct Biomater.* - 2012. - Vol 3(3). – p. 642-87
118. Yao K. Improvement of the surface biocompatibility of silicone intraocular lens by the plasma-induced tethering of phospholipid moieties / K. Yao, X.D. Huang, X.J. Huang, Z.K. Xu // *J Biomed Mater Res A.* -2006. - Vol 78(4). – p. 684-92
119. Žiak P. Keratopigmentation (corneal tattoo) – our first experience / P. Žiak, K. Kapitánová, J. Halička, P. Mojžiš // *Čes. a slov. Oftal.* – 2018. - No. 4. - p. 140-144