

Морфологическое исследование биосовместимости интракорнеальных полимерных линз с роговицей человека в эксперименте *in vitro*

Б.Э. Малюгин¹, С.А. Борзенко^{1, 2}, И.А. Мушкова¹, Н.В. Шевлягина³, Ю.В. Шкандина¹, Д.С. Островский^{1, 4}, И.А. Попов¹

¹ ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Москва;

² МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва;

³ ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва;

⁴ ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва

РЕФЕРАТ

Цель. Провести экспериментально-морфологическую оценку тканевой реакции роговицы донора на имплантацию интракорнеальных линз в условиях органотипической культуры.

Материал и методы. В роговицу донора имплантировали интракорнеальные линзы (ИКЛ) по одной из двух различных материалов – гидроксипропилметакрилата (ГЭМА) и олигоуретанметакрилата (ОУМА). Роговицы культивировали в течение 3 мес., затем оценивали выраженность тканевой реакции по степени покрытия поверхностей имплантатов клеточными элементами при помощи методов флуоресцентной световой и сканирующей электронной микроскопии.

Результаты. Установлено, что пребывание в толще стромы роговицы разработанных ИКЛ не вызывало образования грубой волокнистой соединительной ткани в изученные сроки. На поверхности имплантатов определялись клетки, по внешним признакам сходные с фибробластами. На поверхности ИКЛ визуализировались волокнистые мембраны в виде «нежной» или «плотной» сеточки в зависимости от материала ИКЛ – ГЭМА или ОУМА соответственно. В

Офтальмохирургия. – 2016. – № 4. – С. 51–60.

ходе органного культивирования развивалась статистически значимая клеточная реакция стромы в ответ на экспериментальную травму ($p=0,029$). Однако пребывание ИКЛ внутри роговицы и ее химический состав значимого влияния на клеточно-тканевую реакцию не оказали ($p=1,0$).

Заключение. Согласно результатам функционально-морфологических исследований, выраженность клеточно-тканевой реакции опытных роговиц на имплантацию ИКЛ из двух видов материалов соответствовала реакции контрольных роговиц на экспериментальную травму без имплантации ИКЛ. Изделия ИКЛ из двух видов материалов представляются биологически совместимыми с тканями роговицы и могут быть рекомендованы к дальнейшим испытаниям *in vivo*.

Ключевые слова: интракорнеальная линза, органное культивирование, пресбиопия, кератоциты, роговица, олигоуретанметакрилат, гидроксипропилметакрилат, сканирующая электронная микроскопия, флуоресцентная микроскопия. ■

Авторы не имеют финансовых или имущественных интересов в упомянутых материале и методах.

ABSTRACT

Experimental morphological researches in biocompatibility of polymer intra-corneal lenses with the human cornea *ex vivo*

B.E. Malyugin¹, S.A. Borzenok^{1, 2}, I.A. Mushkova¹, N.V. Shevlyagina³, Y.V. Shkandina¹, D.S. Ostrovsky^{1, 4}, I.A. Popov¹

¹ The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow;

² The A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow;

³ The N.F. Gamaleya Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow;

⁴ The Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow

Purpose. To investigate in an experimental and morphological *ex vivo* research a tissue reaction of human cadaver donor cornea to the implantation of intra-corneal lenses (ICL)

Material and methods. Intra-corneal lenses (ICLs) of two different materials hydroxyl ethyl meth-acrylate (HEMA) or oligo-urethane meth-acrylate (OUMA) were implanted inside the cadaver donor corneas, one ICL per cornea. The latter had been cultured during 3 months with a subsequent evaluation of tissue reaction by the methods of the fluorescent light and the scanning electron microscopy, according to a degree of

covering the surfaces with cellular elements. how extensive the covering of the surfaces with cells was.

Results. It was revealed that the presence of the designed ICLs within the corneal stroma did not cause the formation of rough fibrous connective tissue in the course of study. There were detected fibroblast-like cells on the surfaces of the implants. In addition, fibrous membranes in the form of «gentle» or «dense» meshwork were visualized on the ICL surfaces, depending on their material – HEMA or OUMA, respectively. The process of organ culture showed a statistically significant impact on the

stromal cellular reaction in response to experimental injury ($p=0.029$). cellular reaction ($p=0.029$). However, neither the presence of ICL itself inside the cornea, nor the chemical properties of implants had any statistically significant influence on tissue reaction ($p=1.0$).

Conclusion. The obtained results allow us to conclude that the presence of tested ICLs made of two materials in the corneal stroma caused the tissue and cellular reaction of approximately the same extent as a response on the identical surgical procedure but without lens

implantation. The ICLs which have been tested can thus be recommended for further in vivo investigations because they turned to be quite biologically compatible.

Key words: *intra-corneal lens, organ culture, presbyopia, keratocytes, cornea, oligo-urethane meth-acrylate, hydroxyl ethyl meth-acrylate, scanning electron microscopy, fluorescence microscopy.* ■

No author has a financial or proprietary interest in any material or method mentioned.

The Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery.- 2016.- No. 4.- P. 51-60.

Старение человеческой популяции приводит к росту пресбиопии во всем мире [5, 6]. Имплантация интракорнеальных линз (ИКЛ) является динамично развивающимся направлением хирургической коррекции пресбиопии [9]. На сегодня ИКЛ, разрешенных к использованию в клинической практике в Российской Федерации, не существует. Проблема импортозамещающих технологий в части разработки и экспериментальной апробации отечественных ИКЛ представляется социально значимой, своевременной и актуальной.

Все имплантируемые материалы так или иначе воздействуют на ткани. В зависимости от типа воздействия, имплантационные материалы принято делить на следующие виды: токсичные (индуцируют гибель клеток в зоне имплантации); инертные (индуцируют образование волокнистой неприлегающей ткани); биологически активные (индуцируют образование межповерхностных связей между материалом и тканью посредством минимальной инкапсуляции); биорезорбируемые (взаимодействуя с тканью, подвергаются биодеградации и индуцируют неокколлагеногенез).

Очевидно, что в соответствии с вышеизложенным и клиническими требованиями, материал для ИКЛ должен быть нетоксичным, небiorезорбируемым, не подвергаться инкапсуляции, в связи с бесконечно длительным пребыванием в роговице, сохраняя заданную форму, оптические свойства и не вызывая интрастромальных помутнений [2, 8].

Прозрачность роговицы после имплантации ИКЛ может снижаться по разным причинам, наиболее существенной из которых является инкапсуляция ИКЛ [13]. Выраженность инкапсуляции напрямую связана с адгезивными свойствами поверхности имплантата [15]. При этом происходит образование фиброзной капсулы и снижение прозрачности роговицы. Актуальным представляется поиск неадгезивного биологически совместимого материала, инертного к роговице, в присутствии которого пролиферативная реакция клеток стромы была бы минимальной [12].

С учетом личного опыта авторов по конструированию и использованию ИОЛ, интракапсулярных колец, роговичных сегментов из доступных материалов для конструирования ИКЛ были выбраны два полимерных материала, обладающих высокой эластичностью и оптической прозрачностью: гидроксидэтилметакрилат (ГЭМА) и олигоуретанметакрилат (ОУМА) [3, 4].

Длительное время в офтальмологии для изучения биосовместимости полимерных материалов использовали глаза животных в качестве экспериментальной модели [10, 11]. Однако в настоящее время наблюдается тенденция к увеличению количества исследований в условиях *in vitro* [7]. Данное явление можно связать с тем, что клеточные и органические культуры представляются более стандартизованными, т.е. обладающими значительно меньшей вариативностью параметров между отдельными экспериментальными

объектами [14]. Модель органной культуры роговицы человека была выбрана в данной работе для изучения биосовместимости материалов ГЭМА и ОУМА.

ЦЕЛЬ

Провести морфологическое исследование реакции роговицы донора на имплантацию интракорнеальных линз (ИКЛ), изготовленных из полимерных материалов на основе гидроксидэтилметакрилата (ГЭМА) и олигоуретанметакрилата (ОУМА), методами флуоресцентной и сканирующей электронной микроскопии *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для решения поставленной задачи было проведено экспериментальное исследование¹ следующего дизайна:

1. Формирование технического задания и получение имплантатов ИКЛ.
2. Отбор глазных яблок доноров-трупов.
3. Имплантация ИКЛ в строму роговицы глазных яблок доноров-трупов.
4. Выкраивание и органное культивирование роговично-склерального диска.
5. Морфологические исследования.
6. Качественный и количественный анализ результатов.

Для решения поставленной задачи были сформированы четыре экспериментальные группы (табл. 1):

¹ Исследования выполнены на базе Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем (руководитель – докт. мед. наук, профессор С.А. Борзенко) ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России (Москва).

Таблица 1

Основные этапы работы в экспериментальных группах

Экспериментальные группы	Опытные группы		Группы сравнения	
	«ГЭМА»	«ОУМА»	«Хронический контроль»	«Острый контроль»
Формирование внутрироговичного кармана	+	+	+	+
Имплантируемые ИКЛ	Гидроксиэтилметакрилат	Олигоуретанметакрилат	-	-
Выкраивание роговично-склерального диска	+	+	+	+
Органное культивирование	+	+	+	-
Морфологические исследования	+	+	+	+
Количество использованных донорских глаз	3	3	4	3

Таблица 2

Параметры ИКЛ, изготовленных для проведения экспериментально-морфологического исследования *ex vivo*

Технические параметры ИКЛ	ГЭМА	ОУМА
Форма	менискообразная	менискообразная
Диаметр	2,5 мм	2,5 мм
Оптическая сила	3 дптр	3 дптр
Показатель преломления материала	1,430	1,505
Радиус кривизны задней поверхности	7,8 мм	7,8 мм
Радиус кривизны передней поверхности	5,4 мм	6,6 мм
Количество	3	3

1. Опытная группа «ГЭМА» – в строме роговицы формировали внутрироговичный карман, внутрь которого имплантировали ИКЛ из материала ГЭМА. После имплантации выкраивали роговично-стромальные диски и культивировали в стандартных условиях в течение 3 мес. По окончании культивирования проводили морфологические исследования.

2. Опытная группа «ОУМА» – те же этапы, что и в группе «ГЭМА», но имплантировали ИКЛ из материала ОУМА.

3. Группа сравнения «Хронический контроль» – те же этапы, что и в первых двух группах, но без имплантации ИКЛ.

4. Группа сравнения «Острый контроль» – те же этапы, что и в группе «Хронический контроль», но без культивирования.

Имплантируемые интракорнеальные линзы

Производителями были изготовлены экспериментальные изделия из полимерных материалов на основе ГЭМА (ООО «НЭП «Микрохирургия глаза», Москва) и ОУМА (ООО «Ре-

пер-НН», Нижний Новгород) с параметрами, рассчитанными в ходе математического моделирования (табл. 2).

Характеристика донорского материала

Для моделирования процесса интракорнеальной имплантации использовали донорские глазные яблоки.

Для выполнения работы глазные яблоки отбирали по следующим критериям:

Для корреспонденции:

Малюгин Борис Эдуардович, докт. мед. наук, профессор, зам. генерального директора по научной работе ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России.
E-mail: malyugin@mntk.ru



Рис. 1. Донорский глаз, помещенный в зажим-фиксатор: а) этап дезэпителизации роговицы; б) этап формирования внутрироговичного кармана; в) ИКЛ (показана стрелкой) имплантирована в строму донорской роговицы

1. Возраст доноров-трупов – до 55 лет.

2. Время от момента смерти до интракорнеальной имплантации – не более 18 часов.

3. Показатели трансплантателности трупной донорской роговицы по Борзенку С.А.: адреналиновая проба – А и В, морфологический показатель – 1 и 2 [1].

Отбор глазных яблок по перечисленным критериям был обусловлен необходимостью получения для эксперимента жизнеспособных донорских роговиц.

Таким образом, для работы были отобраны 13 донорских глазных яблок и распределены по группам исследования произвольным образом (табл. 1).

Экспериментальная хирургия

В строме роговицы всех глазных яблок формировали внутрироговичный карман, в опытных группах имплантировали ИКЛ согласно Протоколу имплантации ИКЛ:

1. Промывание глазных яблок раствором Повидон-йода (EGIS Pharmaceuticals, Венгрия); механическая фиксация в зажиме-держателе (рис. 1); доведение уровня внутриглазного тургора действием резьбового кольца зажима до уровня, эквивалентного клинической нормотензии (пальпаторно).

2. Удаление переднего эпителия роговицы скарификатором для достижения ее оптической прозрачности (рис. 1а).

3. Выполнение насечки на роговице длиной 2,5 мм параллельно лимбу, отступя 1 мм от него, на глубину 300 мкм кератотомическим ножом с микроподачей.

4. Механическое расслаивание слоев стромы роговицы с формированием слепого внутрироговичного кармана шириной 2,5 мм, достигающего до оптической зоны, прямым ножом-расслаивателем (рис. 1б). Внутрироговичный карман представляет собой щелевидное пространство (интерфейс), ограниченное передней и задней стенками, и имеет вход (основание) в 1 мм от лимба и слепой конец в оптической зоне роговицы. Передняя стенка («крышка») включает в себя боуменову мембрану и переднюю часть стромы роговицы. Задняя стенка («ложе») – заднюю часть стромы, десцеметову мембрану, задний эпителий.

5. Имплантация ИКЛ в оптическую зону роговицы путем введения её прямым пинцетом для завязывания нитей по сформированному внутрироговичному карману вплоть до его слепого конца (рис. 1в).

6. Операцию завершали без наложения швов.

В группах сравнения этап 5 не выполнялся.

Органное культивирование

Сразу после хирургического этапа выкраивали роговично-склеральные диски и инкубировали согласно Протоколу органного культивирования РСК:

1. Выкраивание роговично-склерального диска из глазного яблока склеральным трепаном диаметром 16 мм.

2. Перемещение роговично-склеральных дисков в культуральный флакон с площадью дна 25 см² (Corning, США) в положении мениском вниз.

3. Добавление во флакон 25 мл питательной среды следующего состава:
А. Среда Игла в модификации Дульбекко в смеси со средой Хэма F12 1:1 (DMEM/F12 (ПанЭко, Россия)).

В. Эмбриональная телячья сыворотка 5% (HyClone, США).

С. Смесь антибиотиков 1% (MP Biomedicals, США).

Д. L-глутамин 2 ммоль/л (ПанЭко, Россия).

4. Культивирование в стандартных условиях (37°С; 5% концентрация CO₂; 95% влажность; инкубатор NU-5510 (NuAire, США) в течение 3 мес.

5. Замена питательной среды каждые 3 дня.

6. Химическая фиксация в 10% водном растворе формальдегида по окончании срока культивирования.

В группе «Острый контроль» этапы 2-5 не выполнялись.

Морфологические исследования

Для доступа к зоне интереса все роговично-склеральные диски подготавливали к микроскопическим исследованиям согласно Протоколу вскрытия ВРК:

1. Извлечение роговично-склеральных дисков из фиксирующего раствора; трехкратное промывание фосфатным буфером.

2. Механическая фиксация роговично-склеральных дисков в искусственной передней камере. Симуляция внутриглазного тургора на уровне нормотензии (пальпаторно).

3. Нанесение двух разрезов роговицы по краю сформированного внутрироговичного кармана для вскрытия его полости (рис. 2а).

4. Отворот и отсечение «крышки» с обнажением ложа внутрироговичного кармана (рис. 2б).

5. Извлечение роговично-склерального диска из искусственной передней камеры.

После вскрытия внутрироговичного кармана во всех исследуемых группах изучалась «крышка» и «ложе» роговицы согласно Протоколу флуоресцентно-микроскопического исследования:

1. Выдерживание исследуемых фрагментов в растворе флуоресцентного красителя Hoechst 33258 (0,002 мг/мл) в темноте при комнатной температуре в течение 20 минут; троекратное промывание раствором фосфатно-солевого буфера.

2. Оптическая микроскопия инвертированным световым микроскопом IX-81 (Olympus, Япония) во флуоресцентном режиме: длина волны при возбуждении/эмиссии – 343/483 нм.

3. Фоторегистрация цифровой фотокамерой XC-10, интегрированной с инвертированным микроскопом (Olympus, Япония).

Далее каждая «крышка», «ложе» ВРК и поверхность имплантированной ИКЛ исследовали согласно Протоколу сканирующего электронно-микроскопического исследования (исследования выполнены на базе Лаборатории анатомии микроорганизмов ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (под руководством докт. мед. наук, профессора Л.В. Диденко и канд. мед. наук Н.В. Шевлягиной)):

1. Механическая фиксация исследуемых препаратов к предметному столику с помощью карбонового скотча – по одному столику на каждый объект – «крышку», «ложе», внутрироговичный карман, ИКЛ.

2. Напыление золотом в вакуумной напылительной установке SPI (SPI Supplies, США).

3. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) с помощью электронно-ионного микроскопа «Quanta 200 3D» (FEI Company, США) при увеличениях 50, 200, 800, 1600, 3000.

4. Фоторегистрация изображений.

Обработка данных

По окончании исследования оценивали наличие на изучаемых по-



Рис. 2. Роговично-склеральный диск фиксирован в искусственной передней камере. Вскрытие ВРК: а) выполнены сквозные разрезы «крышки» внутрироговичного кармана; б) «крышка» внутрироговичного кармана (1) отсечена, визуализируется ИКЛ (2), располагающаяся на «ложе» (3)

верхностям клеток, волокнистых соединительнотканых элементов, степень деформации ИКЛ. Качественно сравнивали изображения в опытных и контрольных группах, а также полученных различными методами – флуоресцентной микроскопии (ФМ) и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

Если клетки при ФМ-исследовании занимали более 50% исследуемой поверхности, то клеточную реакцию считали «условно выраженной», если менее 50% – «условно невыраженной». Оценку площади покрытия поверхности проводили при помощи программного обеспечения CellSens (Olympus, Япония).

Для сравнения клеточной реакции в ответ на имплантацию различных ИКЛ (опытные группы) и в ответ на хирургическую травму (контрольные группы) формулировали три нулевые гипотезы:

1. Выраженность клеточной реакции на внутренних поверхностях внутрироговичных карманов не зависит от процесса органного культивирования.

2. Выраженность клеточной реакции на внутренних поверхностях внутрироговичных карманов не зависит от присутствия в них ИКЛ.

3. Выраженность клеточной реакции на поверхностях ИКЛ не зависит от их материала.

Для проверки нулевых гипотез в силу малого объема имеющихся выборок использовали точный критерий Фишера. Пороговый уровень статистической значимости различий принимали равным 0,05. Для вычислений использовали программное обеспечение Statistica 7.0 (Statsoft).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Флуоресцентная микроскопия

При проведении ФМ после окраски Hoechst 33258 в группах ГЭМА, ОУМА и ХК на поверхности «ложа» роговицы и «крышки» определяли скопления стромальных клеточных элементов (рис. 3-5). Наибольшее количество клеток располагалось в проекции основания внутрироговичного кармана. В опытных группах (ГЭМА и ОУМА) скопления стромальных клеточных элементов на поверхности «ложа» визуально были более плотными, чем в контрольной группе («Хронический контроль»). Кроме того, на поверхности имплантированных ИКЛ идентифицировали единичные клеточные элементы, однако определить значимые различия в плотности адгезированных элементов в группах ГЭМА и ОУМА методом ФМ не представлялось возможным. В группе сравнения ОК на поверхности «ложа» и «крышки» ВРК клеточные элементы не визуализировались (рис. 6). Эти обстоятельства послужили поводом для проведения дополнительных морфологических исследований методом сканирующей электронной микроскопии.

Сканирующая электронная микроскопия

При сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) в группах ГЭМА, ОУМА и «Хронического контроля» на поверхности «ложа» роговицы определялись стромальные клеточные элементы в виде скопленных и отдельных элементов, волокнистые мембраны, по форме напоминающие соединительнотканые волокна, и волокнисто-клеточные

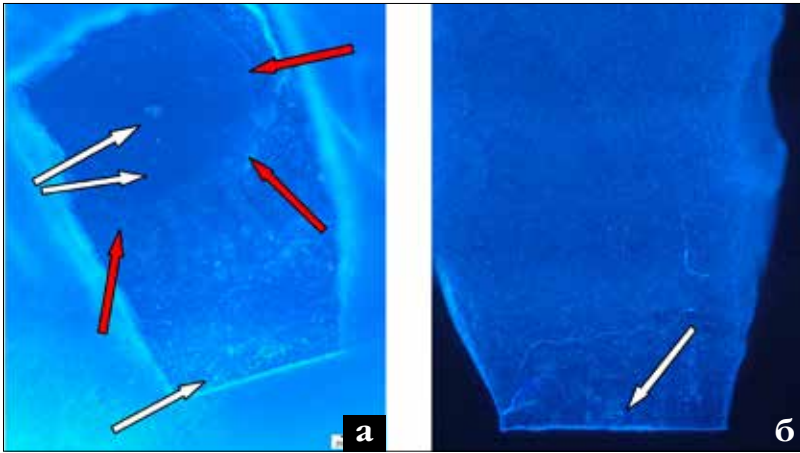


Рис. 3. ФМ. Группа ГЭМА: а) «ложе» роговицы прямоугольной формы. ИКЛ (край отмечен красными стрелками) покоится в «ложе». Скопления клеточных элементов отмечены белыми стрелками; б) скопление клеточных элементов на внутренней поверхности «крышки» (отмечено стрелкой). Ув. х40

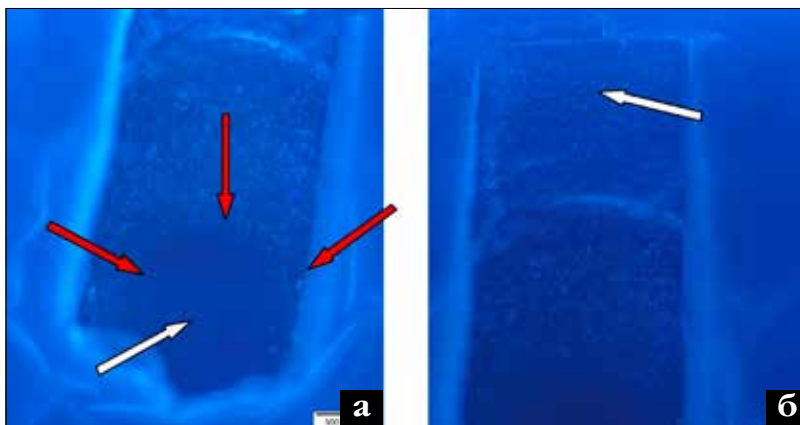


Рис. 4. ФМ. Группа ОУМА. «Ложе» роговицы прямоугольной формы: а) ИКЛ (красные стрелки) в «ложе». Клеточные элементы на поверхности имплантированной ИКЛ (белая стрелка); б) скопления клеточных элементов на поверхности «ложе» роговицы в проекции основания внутрироговичного кармана (отмечено стрелкой). Ув. х40

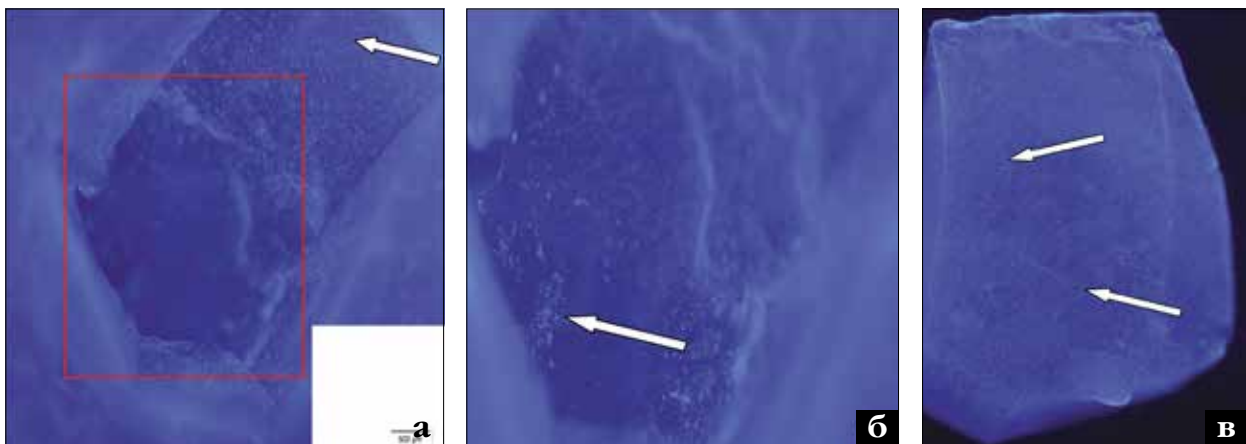


Рис. 5. ФМ. «Ложе» роговицы. Группа «Хронический контроль»: а) слепой конец ВРК (не в фокусе, отмечен красным прямоугольником) сформирован глубже, чем его основание (в фокусе, отмечено белой стрелкой, покрыто многочисленными клетками); б) слепой конец ВРК, отмеченный красным прямоугольником на рис. 5а (теперь в фокусе). Поверхность также покрыта клетками (стрелка); в) скопления клеточных элементов на внутренней поверхности «крышки» (отмечены стрелками). Ув. х40

ассоциаты (рис. 7). На электронограммах «крышки» обнаруживали аналогичные структуры, однако в значительно меньшем количестве, чем на поверхности «ложе» (рис. 8).

Наибольшее количество клеток в группах ГЭМА, ОУМА и «Хронического контроля» было локализовано в проекции основания внутрироговичного кармана в виде выпуклых элементов округлой формы (рис. 9).

На поверхности имплантированных ИКЛ в опытных группах визуализировались клеточные элементы и немногочисленные волокнистые структуры. Клетки отличались по форме от обнаруженных у основания внутрироговичного кармана – выпуклых и округлых. Адгезировавшие к имплантату клетки по форме напоминали фибробласты – уплощенные, с наличием ядер и нескольких отростков (рис. 10, 11). Значимых визуальных отличий в плотности адгезированных клеток в группах ГЭМА и ОУМА методом СЭМ обнаружить не удалось.

В группе ГЭМА на поверхности имплантированной ИКЛ определялись многочисленные волокнистые мембраны в виде «нежной сеточки», имеющие тенденцию к сворачиванию в «трубочку» (рис. 12). В группе ОУМА мембраны визуализировались более «грубыми» и «плотными», однако были не так многочисленны, как в группе ГЭМА (рис. 13). В ходе исследования формирование грубой соединительнотканной капсулы вокруг имплантата в опытных группах отмечено не было.



Рис. 6. ФМ. Группа «Острый контроль». Внутренняя поверхность «крышки» роговицы. Стромальные клетки не визуализируются. Ув. х40

На электронограммах поверхности «ложа» и «крышки» в группе «Острый контроль» клеточно-волоконные структуры не визуализировались (рис. 14).

Сравнение клеточно-тканевых реакций

Условная клеточная реакция на поверхности имплантационного ложа в группе «Хронический контроль» во всех случаях была выраженной, а в группах «Острый контроль», ОУМА и ГЭМА во всех случаях была невыраженной. Напротив, клеточная реакция на поверхности ИКЛ в группах ОУМА и ГЭМА во всех случаях была выраженной.

Выраженность клеточной реакции в группе «Хронический контроль» статистически значимо превышала таковую в группе «Острый контроль» ($p=0,029$, точный критерий Фишера). Однако не было обнаружено статистически значимых различий между клеточной реакцией в опытных группах и в группе сравнения «Хронический контроль» ($p=1,0$, точный критерий Фишера). Также не было обнаружено статистически значимых различий при сравнении групп ГЭМА и ОУМА, в связи с чем можно предположить отсутствие зависимости между активностью клеток и материалом, из которого были изготовлены ИКЛ ($p=1,0$, точный критерий Фишера).

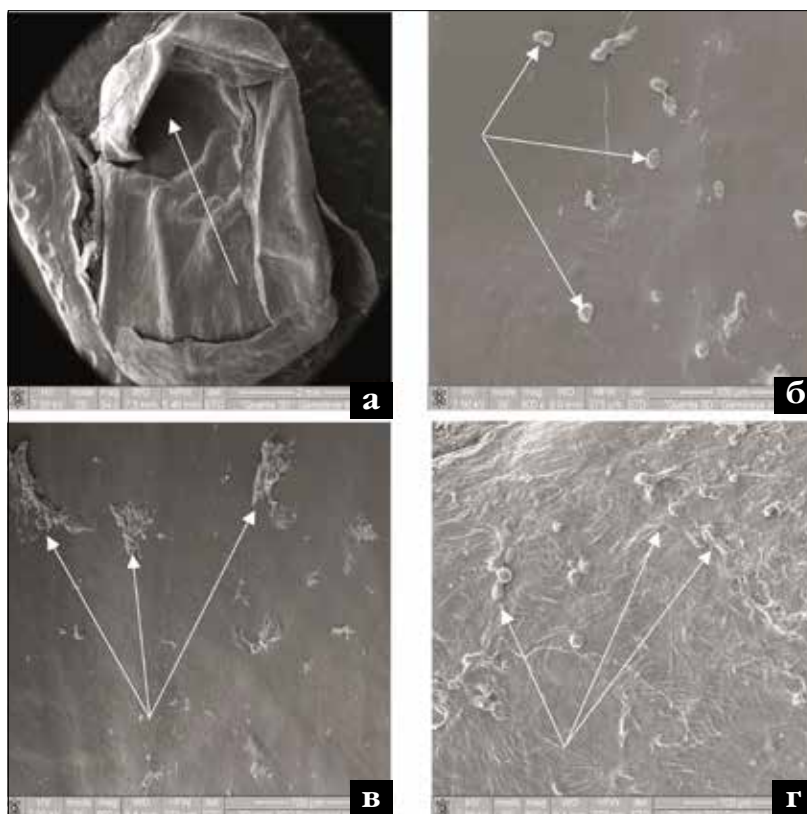


Рис. 7. СЭМ. «Ложа» роговиц: а) группа «Хронический контроль». Общий вид «ложа», ув. х54; б) группа хронического контроля. Клеточные элементы, ув. х800; в) группа ОУМА. Волокнистые мембраны, ув. х800; г) группа ГЭМА. Клеточно-волоконные ассоциаты, ув. х800

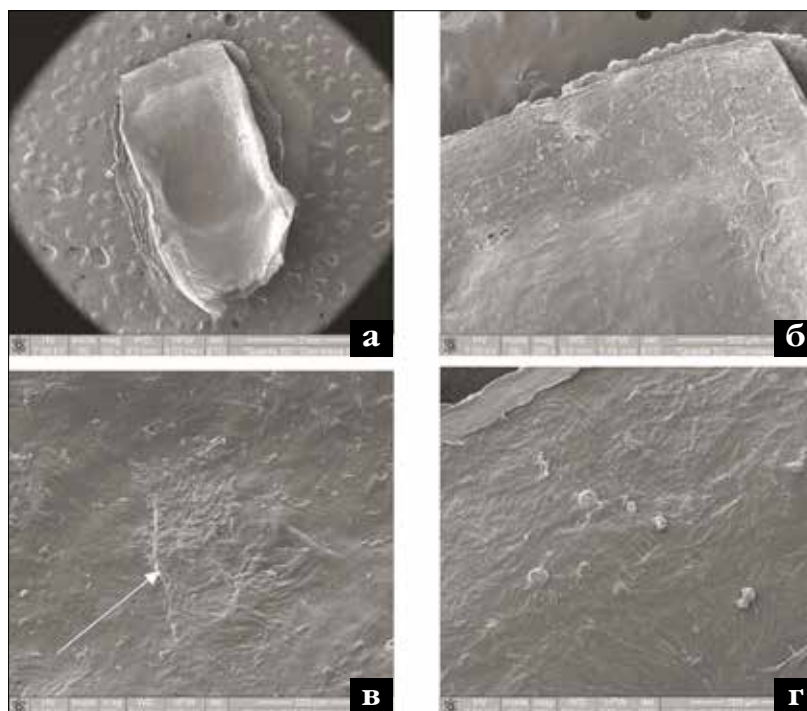


Рис. 8. СЭМ. Поверхности «крышек»: а) группа ГЭМА. Общий вид «крышки», ув. х50; б) группа ОУМА. Клеточно-волоконные ассоциаты у основания ВРК, ув. х200; в) группа «Хронический контроль». Волокнистая мембрана, ув. х800; г) группа ОУМА. Клеточные элементы, ув. х800

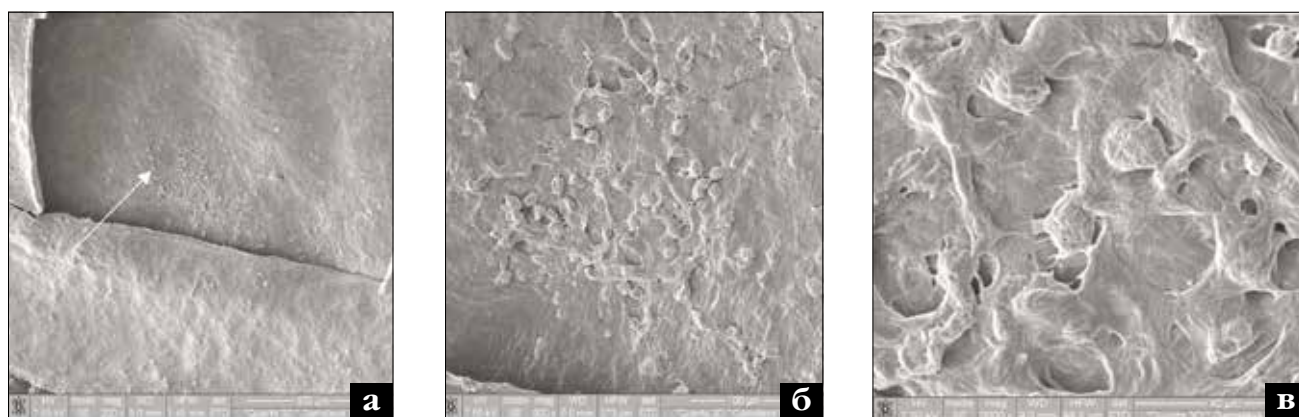


Рис. 9. СЭМ. Группа ГЭМА. Поверхность «ложа» роговицы: а) основание внутрироговичного кармана, ув. $\times 200$; б) волокнисто-клеточные ассоциаты, ув. $\times 800$; в) скопление выпуклых клеток округлой формы, ув. $\times 3000$

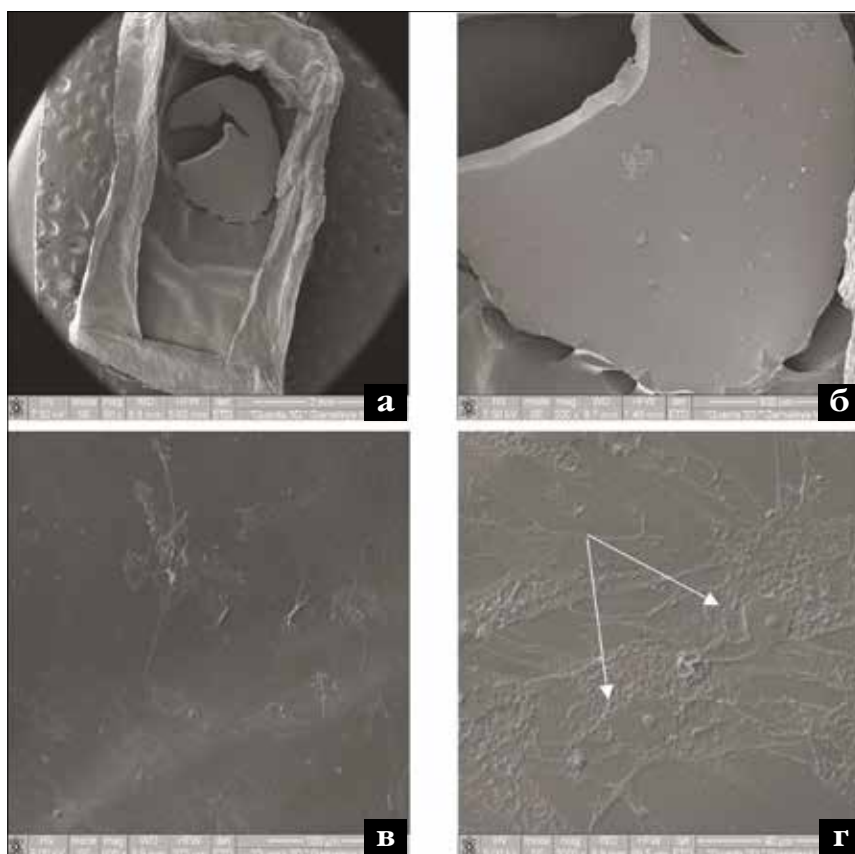


Рис. 10. СЭМ. Группа ГЭМА. Поверхность ИКЛ: а) внутрироговичный карман вскрыт, визуализируется ИКЛ (деформирована при вскрытии внутрироговичного кармана), ув. $\times 50$; б) адгезировавшие волокнисто-клеточные структуры на поверхности ИКЛ, увеличение $\times 200$; в) скопления клеток, ув. $\times 800$; г) уплощенные клетки со множеством отростков, ув. $\times 3000$

ОБСУЖДЕНИЕ

Появление в интерфейсе ВРК клеток после проведения органно-го культивирования в группах ГЭМА,

ОУМА и «Хронический контроль», вероятно, было обусловлено реакцией ткани роговицы на хирургическую (экспериментальную) травму. Наибольшее количество клеток в указанных группах располагалось в

проекции основания ВРК, что, возможно, было обусловлено близостью лимбальной зоны, богатой пулом мезенхимальных клеток. Отсутствие стромальных клеток на поверхности «ложа» и «крышки» в контрольной группе «Острый контроль» было связано с тем, что препараты этой группы фиксировали сразу же по окончании хирургического этапа, исключая возможность клеточной миграции и пролиферации.

Обнаружение клеточных и волокнистых элементов на внутренней поверхности «крышки» в меньшем количестве, чем на «ложе», по всей вероятности, было обусловлено механическим вскрытием ВРК и последующими манипуляциями с тонким слоем ткани в виде передних слоев стромы роговицы.

На поверхности ИКЛ в опытных группах обнаруживались адгезировавшие клеточно-волокнистые элементы, которые, однако, не образовывали единого монослоя ни в группе ГЭМА, ни в группе ОУМА, в связи с чем можно предположить наличие у исследуемых полимерных материалов минимальных адгезивных свойств.

При имплантации полимерной ИКЛ с рефракционной целью не должно происходить образования грубой соединительнотканной капсулы, при этом минимальная адгезия клеточно-волокнистых структур на поверхности имплантата также является необходимым условием для сохранения оптических свойств роговицы. Согласно результатам проведенного исследования разра-

ботанные линзы не имели тенденции к инкапсуляции *in vitro*. В группе ГЭМА волокнистые мембраны визуально были менее плотными, чем в группе ОУМА, что представляется важным для имплантации в оптическую зону. Однако обнаруженные мембраны в виде «нежной сеточки» были многочисленны в группе ГЭМА, в то время как «плотные» волокнистые образования на поверхности ИКЛ из ОУМА были единичны.

Было выявлено статистически значимое влияние процесса органического культивирования на выраженность клеточной реакции на внутренней поверхности ВРК ($p=0,029$). В то же время результаты проведенных экспериментов не дают оснований полагать, что присутствие в строме донорской роговицы ИКЛ оказало статистически значимое влияние на ее реактивность ($p=1,0$). Также не было отмечено значимой зависимости между реактивностью ткани роговицы и типом полимерного материала ($p=1,0$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования позволяют заключить, что пребывание разработанных ИКЛ в строме роговиц вызывало клеточно-тканевую реакцию, по уровню активности сопоставимую с хирургической (экспериментальной) травмой без имплантации ИКЛ. Изделия из обоих материалов представляются подходящими для интракорнеальной имплантации и могут быть рекомендованы к дальнейшим испытаниям на лабораторных животных, поскольку являются биологически совместимыми.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борзенков С.А. Медико-технологические и методологические основы эффективной деятельности глазных тканевых банков России в обеспечении операций по сквозной трансплантации роговицы: Дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2008. – 306 с.

2. Верзин А.А. Интраламеллярная кератопластика биополимерной линзой для лечения буллезной кератопатии и коррекции афакии (клинико-экспериментальное исследование): Дис. ... канд. мед. наук. – М., 2002. – 192 с.

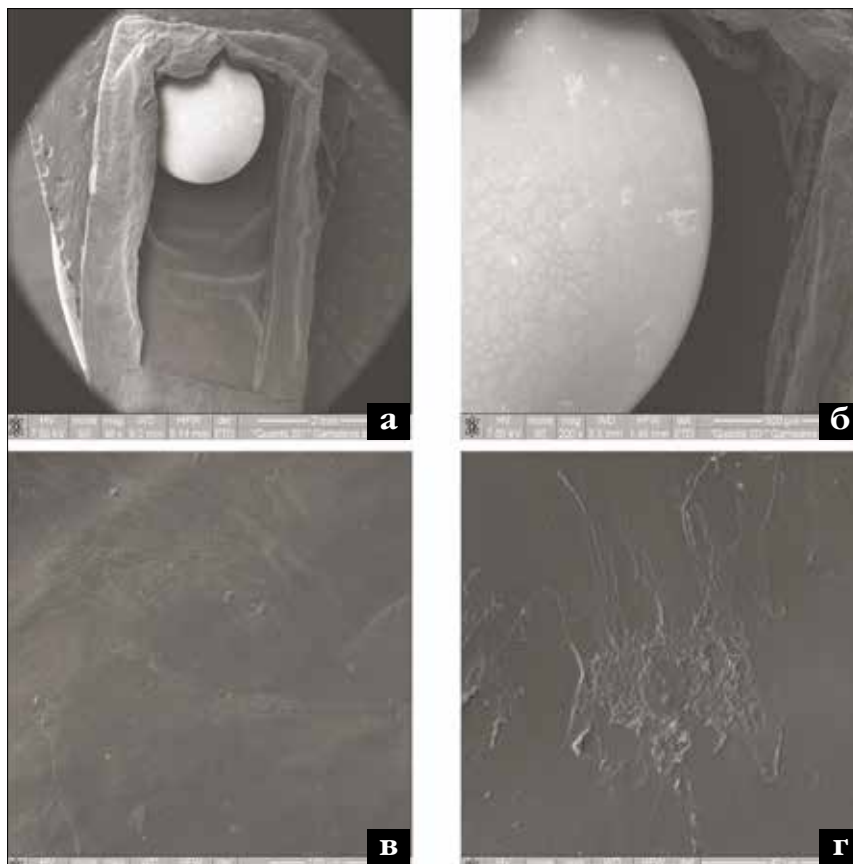


Рис. 11. СЭМ. Группа ОУМА. Поверхность ИКЛ: а) ВРК вскрыт, визуализируется ИКЛ, ув. $\times 49$; б) адгезировавшие волокнисто-клеточные структуры на поверхности ИКЛ, ув. $\times 200$; в) скопления клеток, ув. $\times 800$; г) уплощенная клетка, имеющая ядро и несколько ядрышек с множеством отростков, ув. $\times 3000$



Рис. 12. СЭМ. Группа ГЭМА. Поверхность ИКЛ: а) волокнистая мембрана в виде «нежной сеточки», ув. $\times 1600$; б) сворачивание мембраны в «трубочку», ув. $\times 3000$

3. Мороз З.И., Леонтьева Г.Д., Новиков С.В., Гурбанов Р.С. Рефракционные результаты имплантации интрастромальных роговичных сегментов на основе гидро-

геля у пациентов с кератоконусом // Офтальмохирургия. – 2009. – № 1. – С. 14-17.

4. Морозова Т.А. Интраокулярная коррекция афакии мультифокальной лин-

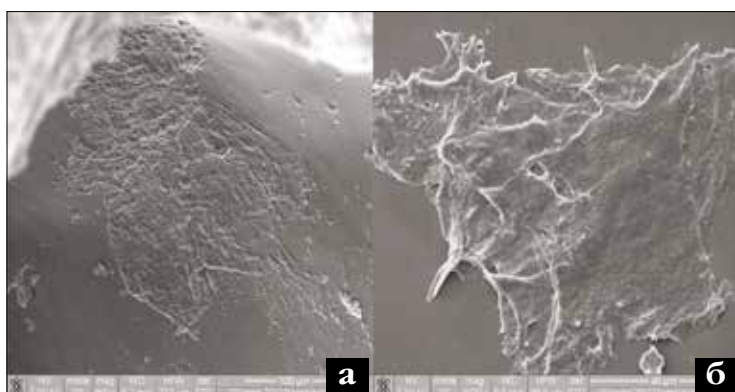


Рис. 13. СЭМ. Поверхность ИКЛ. Группа ОУМА: а) волокнистая структура в виде «плотной сеточки», ув. х800; б) волокнистая мембрана, ув. х3000

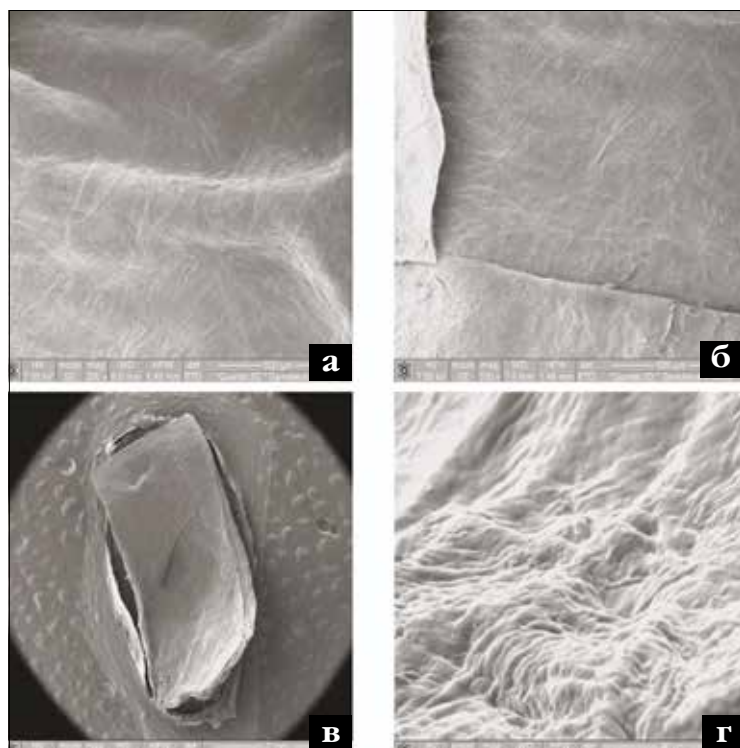


Рис. 14. СЭМ. Поверхность вскрытого внутрироговичного кармана. Группа «Острый контроль»: а) «ложе» роговицы, клеточно-волокнистые структуры не визуализируются, увеличение х200; б) основание внутрироговичного кармана, увеличение х200; в) общий вид «крышки», увеличение х52; г) поверхность «крышки» без видимых клеток и волокнистых мембран, увеличение х3000

зой с градиентной оптикой. Клинико-теоретическое исследование: Дис. ... канд. мед. наук. – М., 2006. – 183 с.

5. Мушкова И.А., Дога А.В., Бессарабов А.Н. Лазерная термокератопластика: рефракционные и функциональные результаты при коррекции гиперметропического и смешанного астигматизма // Современные технологии в медицине. – 2011. – № 2. – С. 47-51.

6. Розанова О.И., Шуко А.Г. Пресбиопия. – М.: Офтальмология, 2015. – 154 с.

7. Фреини Р.Я. Культура животных клеток. Практическое руководство: Пер. с англ. – М.: Бином, 2010. – 691 с.

8. Хенч Л., Джонс Д. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей. – М.: Техносфера, 2007. – 304 с.

9. Charman W.N. Developments in the correction of presbyopia II: surgical approaches // Ophthalmic Physiol. Opt. – 2014. – Vol. 34. – P. 1-30.

10. Чойсе Д.Р. The present status of intracameral and intra-corneal implants // Can. J. Ophthalmol. – 1968. – Vol. 3, № 4. – P. 295-311.

11. D'Hermies F., Hartmann C, von Ey F. et al. Biocompatibility of a refractive intracorneal PMMA ring // Forsch. Ophthalmol. – 1991. – Vol. 88. – P. 790-793.

12. Power W.J., Nevlan D., Collum L.M. Adherence of human lens epithelial cells to conventional polymethyl methacrylate, heparin-surface modified, and polyHema lenses // J. Cataract Refract. Surg. – 1994. – Vol. 20, № 4. – P. 440-445.

13. Samimi S., Leger F., Touboul D., Colin J. Histopathological findings after intracorneal ring segment implantation in keratoconic human corneas // J. Cataract Refract. Surg. – 2007. – Vol. 33, № 2. – P. 247-253.

14. Spink N., Brown D.G., Skelly J.V., Neidle S. Sequence-dependent effects in drug-DNA interaction: the crystal structure of Hoechst 33258 bound to the d(CGCAAATTTGCG)2 duplex // Nucleic Acids Res. – 1994. – Vol. 22, № 9. – P. 1607-1612.

15. Stone W., Herbert E. Experimental study of plastic material as replacement for the cornea // Am. J. Ophthalmol. – 1953. – Vol. 36. – P. 168-173.

Поступила 25.10.2016

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта 15-29-03882 «код офи-м».