

ГИСТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ РОГОВИЦЫ КРОЛИКА ПОСЛЕ ИМПЛАНТАЦИИ ВНУТРИРОГОВИЧНЫХ ЛИНЗ И ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сегодня на международном рынке апробированы и доступны к клиническому применению различные модели внутрироговичных линз для хирургической коррекции пресбиопии. С использованием технических возможностей и производственных мощностей отечественных производителей были смоделированы и изготовлены линзы с геометрическими параметрами, определенными при математическом моделировании с учетом особенностей роговицы, изготовленные из современных полимерных материалов. Для исследования биосовместимости внутрироговичных линз необходимо проведение доклинического исследования реактивности роговицы в ответ на имплантацию разработанных изделий из гидроксиэтилметакрилата (ГЭМА) и олигоуретанметакрилата (ОУМА) в экспериментальном исследовании *in vivo* и проведение электронно-микроскопического исследования интактных «инлаев».

При проведении сканирующей электронной микроскопии поверхности и края интактных линз визуализируется гладкая поверхность без видимых зазубрин. При исследовании краевой поверхности у внутрироговичных линз из ГЭМА визуализировался неровный, зазубренный край, а у линз из ОУМА – ровный, без видимых зазубрин. При проведении прижизненной конфокальной микроскопии в опытных группах визуализировались единичные волокна коллагена, отмечалась активация кератоцитов, определялось нарушение оптической плотности в виде гиперрефлексивности и гипоцеллюлярности в зоне линзы, псевдокератинизация поверхностного эпителия. В группе с использованием линз из ГЭМА отмечалась неполная прозрачность экстрацеллюлярного матрикса вокруг имплантата. При проведении световой микроскопии в опытных группах визуализировалось ложе инлая. Вокруг ложа в обеих группах – выявлялась активация клеток, предположительно собственных кератоцитов. Эпителий и эндотелий – без видимых изменений в зоне расположения инлая и вне этой зоны. В контрольной группе – без значительных изменений во всех слоях роговицы.

Таким образом, в ходе проведенного исследования было выявлено, что разработанные изделия не вызывают выраженного клеточного и тканевого ответа роговицы кролика, визуализируемого методами прижизненной конфокальной микроскопии и световой микроскопии. Однако, неровная, зазубренная форма края изделий, изготовленных из ГЭМА, обусловленная, по-видимому, технически более сложной технологией изготовления («точение»), может вызывать несколько большую активацию клеток вокруг ложа роговицы и умеренное уплотнение стромы вокруг линзы, в сравнении с изделиями, изготовленными из ОУМА.

Ключевые слова: внутрироговичная линза, световая микроскопия, прижизненная конфокальная микроскопия, электронная сканирующая микроскопия, пресбиопия.

Введение

В настоящее время все большую популярность обретает имплантация внутрироговичных линз с целью хирургической коррекции пресбиопии. При детальном ознакомлении с литературой обнаружено, что впервые в 1949 году профессор из Колумбии Jose I. Barraquer, имплантировал внутрироговичную линзу, изготовленную из стекла [10]. В 1995 г. R. H. Keates использовал внутрироговичные имплантаты, изготовленные из гидрогеля при пресбиопии на 5-ти глазах, все пациенты отмечали улучшение зрения вблизи, однако данных об отдаленных послеоперационных результатах в доступной литературе не найдено [12]. В 1996 г. P. Choусе имплантировал ИКЛ из полиметилметакрилата (ПММА) и полисульфона у пациентов с синдромом Фукса и

миопией [11]. Среди отечественных офтальмологов разработке метода интраламеллярной пересадки диска донорской роговицы в коррекции аметропий принадлежат работы В. С. Беляева, Е. Д. Блаватской, Н. В. Краснова, М. М. Душина [2], [5], [6]. Верзин А. А. провел изучение возможностей имплантации внутрироговичных линз для коррекции афакии [3].

Путь развития кераторефракционных операций лежал от биологических гомотрансплантатов [1], [5] к аллотрансплантатам из полимерных материалов, в качестве которых использовались лейкосапфир, различные виды пластмасс, силикон, полиметилметакрилат (ПММА) и др. [4], [7]. Отрицательные результаты экспериментальных исследований биосовместимости интрастромальных линз из непроницаемых материалов

(лейкосапфир, полисульфон и др.) привели к необходимости создания изделий для внутрироговичной имплантации с учетом таких факторов как проницаемость, диаметр, толщина линзы и глубина ее залегания [8], [13]. Сегодня на международном рынке апробированы и доступны к клиническому применению такие модели внутрироговичных линз («инлаев») как InVue (Neoptics AG, Hunenberg, Швейцария), Flexivue Microlens (Presbia, Los Angeles, США; Presbia Cooperatief, U.A., Amsterdam, Нидерланды), Kamra (AcuFocus, Ирвин, США), Raindrop (Revision Optics, Lake Forest, США), сконструированные с учетом перечисленных факторов [9], [14]–[16]. С использованием технических возможностей и производственных мощностей отечественных производителей были смоделированы и изготовлены внутрироговичные линзы выпукло-вогнутой формы диаметром 2 мм толщиной 50 мкм из гидроксиэтилметакрилата (ГЕМА) (ООО «НЭП МГ») и олигоуретанметакрилата (ОУМА) (ООО «Репер-НН»).

Цель работы

Провести доклиническое исследование реактивности роговицы кролика в ответ на имплантацию разработанных внутрироговичных линз из современных полимерных материалов (ГЕМА и ОУМА) в экспериментальном исследовании *in vivo* и электронно-микроскопическое исследование интактных изделий.

Материал и методы

Материалом для проведения электронно-микроскопического исследования послужили интактные внутрироговичные линзы, изготовленные из ГЕМА (1 линза) и ОУМА (1 линза). Разработанные изделия фиксировались к столику с помощью карбонового скотча с последующим напылением золотом. Полученные образцы изучались с помощью электронно-ионного микроскопа “Quanta 200 3D” (FEI Company, США). Сканирующая электронная микроскопия выполнялась на базе лаборатории анатомии микроорганизмов ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи.

Материалом для проведения исследования послужили 3 группы кроликов породы шиншилла. Исследования проводились на базе Калужского филиала МНТК «Микрохирургия

глаза» им. акад. С. Н. Федорова. В 1 группе экспериментальных животных 2 кролика (2 глаза) имплантировались интракорнеальные линзы, изготовленные из ГЕМА. Во 2 группе экспериментальных животных 2 кролика (2 глаза) имплантировались интракорнеальные линзы изготовленные из ОУМА. В 3 группе – контрольной использовались вторые глаза (4 глаза) экспериментальных животных из групп 1 и 2.

При моделировании эксперимента на животных учитывался факт наличия у кроликов тонких (400 мкм) и больших в диаметре (15 мм) роговиц. Операции проводились под общей анестезией с иммобилизацией животных пеленанием. С помощью кератотомического ножа с микроподачей выполняли насечку, отступя 1 мм от лимба, на глубину 200 мкм с последующим механическим расслаиванием средних слоев стромы роговицы прямым ножом-расслаивателем, формируя роговичный карман. Инлаи имплантировались в сформированное роговичное ложе, швы не накладывались. На парном глазу формировался роговичный карман, сравнимый с выполненным в опытной группе, без имплантации линзы.

На сроке наблюдения 3 месяца выполняли прижизненную конфокальную микроскопию на приборе ConfoScan 4 (Nidek, Japan) с последующим выведением животных из эксперимента для исследования энуклеированных глаз с помощью метода световой микроскопии. При этом материал фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина, промывали проточной водой, обезжовивали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Выполняли серии гистологических срезов с применением окраски гематоксилин-эозином. Препараты изучались под микроскопом фирмы Leica DM LB2 с камерой DFC 320 при x50, x100, x200, x400 кратном увеличении с последующим фотографированием. Морфологические исследования выполнены на базе лаборатории патологической анатомии и гистологии глаза (зав. лабораторией – к.м.н. Шацких А.В.).

Результаты

На рисунке 1 (цветная вкладка) и рисунке 2 (цветная вкладка) представлена сканирующая электронная микроскопия поверхности и края интактных линз из ГЕМА и ОУМА, на кото-

Таблица 1. Гистоморфологические параметры роговицы кролика, определяемые методом световой микроскопии

	Ложе роговицы	Активация клеток вокруг ложа	Уплотнение стромы вокруг линзы	Капсула вокруг имплантата	Эпителий и эндотелий
Группа 1	визуализируется	незначительная	незначительное	отсутствует	интактны
Группа 2	визуализируется	умеренная	умеренное	отсутствует	интактны
Группа 3	визуализируется линия вреза	отсутствует	разряжение стромы вокруг линии вреза	отсутствует	Утолщение эпителия над линией вреза

рой визуализируется гладкая поверхность без видимых зазубрин, впадин или, выступающих над остальной поверхностью линзы, участков. Однако, при исследовании в сравнительном аспекте форму края разработанных изделий, у внутрироговичных линз из ГЕМА визуализировался неровный, зазубренный край, что возможно связано с техническими особенностями изготовления разработанных изделий. При этом у линз из ОУМА форма края была ровная, без видимых зазубрин.

У всех экспериментальных животных 4 кролика (8 глаз) на сроке наблюдения 3 месяца в исследуемых группах роговица была прозрачной, случаев васкуляризации или воспалительной реакции обнаружено не было. В опытных группах имплантированные линзы визуализировались в правильном положении в роговичном кармане.

При проведении прижизненной конфокальной микроскопии в группе 1 (2 глаза) и 2 (2 глаза) визуализировались единичные волокна коллагена, активация кератоцитов, определялось нарушение оптической плотности в виде гиперрефлексивности и гипоцеллюлярности в зоне линзы (рис. 3, цветная вкладка). Отмечалась псевдокератинизация поверхностного эпителия. Задний эпителий во всех глазах опытных групп оставался интактным. В 1 группе (2 глаза) отмечалась неполная прозрачность экстрацеллюлярного матрикса вокруг имплантата. В группе 3 (4 глаза) в зоне сформированного роговичного кармана визуализировалась незначительная активация кератоцитов. Другие слои роговицы оставались интактными.

При проведении световой микроскопии, как видно на рисунке 4 (цветная вкладка), в группе 1 (2 глаза) и 2 (2 глаза) визуализирова-

лось ложе инлая. Вокруг ложа в обеих группах – выявлялась активация клеток, предположительно собственных кератоцитов. Эпителий и эндотелий – без видимых изменений в зоне расположения инлая и вне этой зоны. В группе 3 (4 глаза) на всех препаратах – без значительных изменений во всех слоях роговицы.

На рисунке 5 (цветная вкладка) визуализируется линия вреза (ход сформированного роговичного кармана) окруженная разреженной стромой с утолщением эпителия над ним (табл. 1).

Обнаруженная нами при проведении электронной сканирующей микроскопии особенность краевой поверхности разработанных изделий, возможно, является причиной обнаружения в группе 1 неполной прозрачности экстрацеллюлярного матрикса вокруг имплантата при выполнении конфокальной микроскопии и более выраженная активация клеток вокруг ложа и уплотнение стромы вокруг линзы, чем в группе 2, выявленные при проведении световой микроскопии.

Выводы

Таким образом, при проведении доклинического исследования биосовместимости внутрироговичных линз из современных полимерных материалов (ГЕМА и ОУМА) в экспериментальном исследовании *in vivo* и электронно-микроскопическом исследовании, было выявлено, что разработанные изделия не вызывают выраженного клеточного и тканевого ответа роговицы кролика, визуализируемого методами прижизненной конфокальной микроскопии и световой микроскопии.

Однако, неровная, зазубренная форма края изделий, изготовленных из ГЕМА, обусловлен-

ная, по-видимому, технически более сложной технологией изготовления («точение»), может вызывать несколько большую активацию клеток

вокруг ложа роговицы и умеренное уплотнение стромы вокруг линзы, в сравнении с изделиями, изготовленными из ОУМА.

10.09.2015

Список литературы:

1. Блаватская Е. Д. Рефракционная кератопластика. – Ереван: Айастан, 1973. – 190 с.
2. Блаватская Е. Д. Применение интраламеллярной гомокератопластики с целью ослабления рефракции глаза // Труды Ереванского ГИДУВ. – В III, 1967. – С. 423-446.
3. Верзин А. А. Интраламеллярная кератопластика биополимерной линзой для лечения буллезной кератопатии и коррекции афакии: дис. ... канд. мед. наук. – М., 2002. – С. 189
4. Гончар П. А., Беляев В. С., Кравнинина В. В. и др. Межслойная рефракционная тоннельная кератопластика в коррекции близорукости и астигматизма // Вестник офтальмологии. – 1988, 104 (4). – С. 25 – 30.
5. Душин Н. В. Клиническое изучение возможностей межслойной пересадки роговой оболочки: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., 1990. – 33 с.
6. Краснов М. М., Орлова Е. А. Первый опыт имплантации искусственной роговицы (аллопластическое кератопротезирование) // Вестник офтальмологии. – 1967. – № 6. – С.11-16.
7. Фролов М. А. Межслойная кератопластика в коррекции миопии и миопического астигматизма // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 1992. – 25 с.
8. Arlt E, Krall E, Moussa S, Grabner G, Dexl A. Implantable inlay devices for presbyopia: the evidence to date // Clinical ophthalmology. – 2015 Jan 14;9:129-37
9. Baily C, Kohnen T, O'Keefe M. Preloaded refractive-addition corneal inlay to compensate for presbyopia implanted using a femtosecond laser: one-year visual outcomes and safety // Journal of Cataract and Refractive Surgery. – 2014. – Vol. 40 – Issue 8 – P. 1341-1348
10. Barraquer J.I., Gomes M.L. Permalens hydrogel intracorneal lenses for spherical ametropia // J. Refract. Surg. – 1997. – Vol. 13. – P. 342-348
11. Choyce D.P., Horgan S.E., Fraser S.G., Alexander W.L. Twelve year follow-up of unfenestrated polysulfone intracorneal lenses in human sighted eyes. // Journal of Cataract and Refractive Surgery. – 1996. – Vol. 22 – Issue 8 – P. 1045-1051
12. Keates RH, Martines E, Tennen DG, Reich C. Small-diameter corneal inlay in presbyopic or pseudophakic patients // Journal of Cataract and Refractive Surgery. – 1995. – Vol. 21 – Issue 5 – P. 519-521
13. McCarey et. al. Hydrogel implants for refractive keratoplasty: corneal morphology // Cur. Eye Res. – 1982/83. – Vol. 2. – P. 29-38.
14. Lindstrom R.L., Macrae S.M., Pepose J.S., Hoopes P.C. Corneal inlays for presbyopia correction // Curr. Opin. Ophthalmol. – 2013. – Vol. 24. – №4 – P. 281-287
15. Pinsky P.M. Three-dimensional modeling of metabolic species transport in the cornea with a hydrogel intrastromal inlay // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2014. – Vol. 55. – № 5. – P. 3093-3106
16. Seiler T., Colin J., Ferrara P., Alio J. New approaches for corneal remodeling in refractive surgery // Eurotimes. – 2005, Aug. – P. 115-121.

Сведения об авторах:

Мушкова Ирина Альфредовна, доктор медицинских наук, Ученый Секретарь диссертационного совета, заведующая отделом рефракционной лазерной хирургии МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова, врач-офтальмохирург, e-mail: i-a-mushkova@ya.ru

Борзенко Сергей Анатольевич, руководитель центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова, г. Москва, академик РАЕН, врач-офтальмолог высшей категории, член Экспертного совета Минздрава России по проблеме «Трансплантология», член Совета Европейской Ассоциации Глазных банков при Европейском Союзе, доктор медицинских наук, профессор e-mail: mdborzenok@yandex.ru

Каримова Аделя Насибуллаевна, научный сотрудник Центра лазерной хирургии МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова, врач-офтальмохирург, кандидат медицинских наук, e-mail: Adelya.k.n@mail.ru

Шкандина Юлиана Викторовна, очный аспирант МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова, e-mail: lulyak@mail.ru

127486, Москва, ул. Бескудниковский бульвар, 59а