

На правах рукописи

Фисенко Наталья Владимировна

**БИОРЕЗОРБИРУЕМЫЙ МАТРИКС НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА
ДЛЯ СУБКОНЪЮНКТИВАЛЬНОГО И ИНТРАСКЛЕРАЛЬНОГО
ВВЕДЕНИЯ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

14.01.07 - глазные болезни

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2018

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт глазных болезней».

Научные руководители:

академик РАН, доктор медицинских наук,

профессор

Аветисов Сергей Эдуардович

доктор медицинских наук

Демура Татьяна Александровна

Официальные оппоненты:

Алексеев Игорь Борисович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, профессор кафедры офтальмологии

Лоскутов Игорь Анатольевич, доктор медицинских наук, Научный клинический центр ОАО «Российские железные дороги», заведующий офтальмологическим отделением

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки РФ.

Защита состоится 11 февраля 2019 г. в 14-00 на заседании диссертационного совета Д 001.040.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт глазных болезней» по адресу: 119021, Москва, ул. Россолимо, д. 11, корп. А, Б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.niigb.ru.
Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт глазных болезней»

Автореферат диссертации разослан « ____ » _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук

Иванов М.Н.

Общая характеристика работы

Актуальность темы и степень ее разработанности.

Биорезорбируемые матриксы на основе коллагена успешно применяют в различных областях клинической практики. Они обладают пористой структурой, обеспечивающей направленный рост клеток и сосудов реципиента, высокой биосовместимостью и способностью к постепенной резорбции в тканях (Yannas I.V., 1989, 2010; O'Brien F.J., 2011; Atala A., 2012). В настоящее время основным биологическим матриксом, используемым в тканевой инженерии, является коллаген. Данный материал обладает термической и химической стабильностью, слабыми антигенными свойствами, полностью резорбируется в срок от нескольких недель до года после имплантации в ткани реципиента (Истранов Л.П., 1984, 2007, 2011; Chan V.P., 2007; Karsdal M.A., 2016). В офтальмологии коллагеновые матриксы используют для стимуляции репаративной регенерации тканей при тяжелых травмах глазного яблока и орбиты, в качестве носителей лекарственных препаратов, для создания «искусственной» роговицы, а также в хирургическом лечении глаукомы.

Глаукома – заболевание, сопровождающееся периодическим или постоянным повышением ВГД, выходящим за пределы толерантного, атрофией зрительного нерва, характерными изменениями поля зрения (Егоров Е.А., 2013; Еричев В.П., 2014; Blanco A.A., 2014). Хирургическое лечение глаукомы является наиболее эффективным способом снижения ВГД до целевого уровня, при котором отсутствует прогрессирование атрофии зрительного нерва, сопровождающееся снижением зрительных функций (Краснов М.М., 1980; Shaarawy T.M., 2015). В большинстве случаев уменьшение гипотензивного эффекта в отдаленные сроки после операции связано с избыточным рубцеванием сформированного пространства между конъюнктивой, теноновой капсулой, эписклерой и склерой. Перспективным направлением профилактики избыточного рубцевания является использование биорезорбируемых матриксов, в том числе гемостатической коллагеновой губки и дренажа iGen. В экспериментальных и клинических исследованиях были показаны

эффективность и безопасность применения iGen в качестве субконъюнктивального имплантата в хирургическом лечении глаукомы (Асратян Г.К., 2015; Chen H.S., 2006; Cillino S., 2011, 2016; Hsu W., 2000, 2008). При этом данные о комбинированном интрасклеральном и субконъюнктивальном введении дренажа iGen отсутствуют. Кроме того, сведения об эффективности одномоментной интрасклеральной и субконъюнктивальной имплантации гемостатической коллагеновой губки в качестве биорезорбируемого матрикса при антиглаукомных операциях весьма ограничены (Бакунина Н.А., 2006; Баранов И.Я., 1991; Mulberger R.D, 1962), а о сравнении с iGen - отсутствуют.

Цель: экспериментально-клиническое изучение возможности и эффективности применения биорезорбируемого матрикса на основе коллагена в качестве субконъюнктивального и интрасклерального имплантата.

Задачи:

1. Оценить биосовместимость матриксов на основе коллагена (гемостатической коллагеновой губки и офтальмологического дренажа iGen) *in vitro*.
2. Изучить морфологические и иммуногистохимические особенности (с определением антител к VEGF, α -SMA, TGF- β) репарации тканей для определения регенеративного потенциала матрикса на основе коллагена (гемостатической коллагеновой губки) на модели полнослойного дефекта конъюнктивы глаза кролика.
3. Исследовать биосовместимость и динамику биодеградации матриксов на основе коллагена, а также морфологические особенности процесса репарации тканей при одномоментной субконъюнктивальной и интрасклеральной имплантации указанных материалов в эксперименте на кроликах.
4. Разработать на основе гемостатической коллагеновой губки биорезорбируемый антиглаукомный дренаж для транслимбального микродренирования передней камеры глаза.

5. Осуществить предварительную оценку эффективности биорезорбируемого антиглаукомного дренажа при транслимбальном микродренировании передней камеры у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой.

Научная новизна

Впервые проведен сравнительный анализ биосовместимости и цитотоксичности матриксов на основе коллагена – гемостатической коллагеновой губки и офтальмологического дренажа iGen in vitro. Оценена биосовместимость и биодеградация гемостатической коллагеновой губки в сравнении с офтальмологическим дренажом iGen при субконъюнктивальной и интрасклеральной имплантации в эксперименте in vivo. На основании данных гистологического и ИГХ, с определением антител к VEGF, α -SMA, TGF- β , исследований впервые изучен регенеративный потенциал гемостатической коллагеновой губки на модели полнослойного дефекта конъюнктивы глаза кролика. Исследован процесс репарации конъюнктивы и склеры при имплантации биорезорбируемых матриксов на основе коллагена (гемостатической коллагеновой губки и офтальмологического дренажа iGen) в эксперименте in vivo. Разработан биорезорбируемый антиглаукомный дренаж на основе гемостатической коллагеновой губки и проведена предварительная клиническая оценка эффективности его применения при транслимбальном микродренировании передней камеры глаза у пациентов с ПОУГ.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведенное экспериментально-морфологическое исследование свидетельствует о высокой биосовместимости матриксов на основе коллагена (гемостатической коллагеновой губки и дренажа iGen) in vitro, а также при субконъюнктивальной и интрасклеральной имплантации. Показан высокий регенеративный потенциал гемостатической коллагеновой губки, позволяющий использовать ее для восстановления фильтрующих дефектов конъюнктивы. На основе гемостатической коллагеновой губки разработан биорезорбируемый антиглаукомный дренаж для транслимбального микродренирования передней

камеры глаза. Предварительная клиническая оценка применения дренажа при транслимбальном микродренировании свидетельствует о его высокой эффективности и низком риске развития послеоперационных осложнений.

Методология и методы диссертационного исследования

Методологической основой диссертационной работы явилось применение комплекса методов научного познания. Работа выполнена в дизайне проспективного открытого исследования с использованием клинических, инструментальных, морфологических, иммуногистохимического, аналитических и статистических методов.

Положения, выносимые на защиту

1. Биорезорбируемые матрицы на основе коллагена – гемостатическая коллагеновая губка и офтальмологический дренаж iGen - характеризуются высокой биосовместимостью, низкой цитотоксичностью, постепенной биодеградацией и являются основой для адгезии, пролиферации и миграции клеток.
2. Гемостатическая коллагеновая губка обладает высоким регенеративным потенциалом и может быть использована для закрытия дефектов конъюнктивы.
3. Разработанный на основе гемостатической коллагеновой губки биорезорбируемый антиглаукомный дренаж эффективен при транслимбальном микродренировании передней камеры глаза у пациентов с ПОУГ.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности результатов проведенной работы определяется количеством экспериментальных и клинических наблюдений с использованием арсенала современных методов исследования и подтверждена в процессе статистической обработки материала. Значимость различий количественных показателей оценивалась с помощью непараметрических методов статистики. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в

диссертации, строго аргументированы и логически вытекают из системного анализа результатов клинических и инструментальных исследований.

Основные положения диссертации были представлены в ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) на заседаниях кафедры глазных болезней и кафедры патологической анатомии имени академика А.И.Струкова, а также на заседании проблемной комиссии ФГБНУ «НИИ глазных болезней» (17.09.2018).

Личный вклад автора в проведенное исследование

Личный вклад автора состоит в самостоятельном проведении экспериментального этапа исследования, участии в операциях и послеоперационном ведении пациентов в течение 12 месяцев. Автором проведена статистическая обработка полученных данных и анализ результатов, осуществлена подготовка публикаций и докладов и по теме диссертации.

Внедрение результатов работы

Результаты настоящего исследования внедрены в клиническую практику ФГБНУ «НИИ глазных болезней».

Публикации

По теме диссертации опубликовано 4 научные работы, 3 из них – в журналах, входящих в перечень рецензируемых журналов и изданий, рекомендованных ВАК. Получен патент на полезную модель RU 179971 от 29.05.2018 «Биорезорбируемый антиглаукомный дренаж».

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 114 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 39 отечественных и 94 иностранных источников. Диссертация иллюстрирована 13 таблицами и 48 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В качестве биорезорбируемого матрикса на основе коллагена выбраны губка гемостатическая коллагеновая (Р N001656 от 08.08.2008 ОАО «Лужский завод Белкозин», Россия) и офтальмологический дренаж iGen (Biomedical Inc. Taipei, Taiwan). В состав гемостатической губки входит коллаген (98%), борная кислота (1,25%), фурациллин (0,75%). Офтальмологический дренаж iGen представляет собой гликозаминогликановый матрикс, состоящий из коллагена (90%) и хондроитин-6-сульфата (10%).

Материалы и методы экспериментального исследования

Исследование биосовместимости матриксов на основе коллагена in vitro.

Фрагменты гемостатической коллагеновой губки и дренажа iGen размерами 2x2x2 мм заселяли клетками стромы роговицы 4-5 пассажа. Кератоциты получали методом ферментативной диссоциации (коллагеназой 1 типа) центральной зоны кадаверной роговицы человека, не востребованной в ходе кератопластики и консервированной в среде Борзенка-Мороз. Суспензию клеток (30 тыс/мл) наносили капельно на поверхность гемостатической губки и дренажа iGen, погруженных в чашки Петри с культуральной средой. Визуализацию осуществляли через 1 и 7 суток после засева. Для этого коллагеновые матриксы с адгезированными на них клетками инкубировали в растворе Calcein AM (5мкМ), ядра клеток докрашивали раствором Hoechst 33342 (1мкг/мл). Использовали инвертированный микроскоп Zeiss AxiovertA1 в режиме детекции флуоресценции. Фотофиксацию выполняли фотоаппаратом Canon700d. Для обработки изображений использовали программные продукты CorelDRAW 2017 и ImageJ. Оценивали морфологические особенности клеток, их количество и адгезию на поверхности биорезорбируемого матрикса. Исследование было выполнено в лаборатории фундаментальных исследований в офтальмологии ФГБНУ «НИИ глазных болезней».

Исследование биосовместимости и биодegradации матриксов на основе коллагена in vivo.

В пилотное проспективное сравнительное исследование были включены 27 половозрелых кроликов-самцов породы шиншилла (54 глаза) массой 3,5-4 кг. Экспериментальные животные находились в стандартных условиях содержания в виварии Первого МГМУ им. И.М.Сеченова. Проведение исследования было разрешено локальным биомедицинским этическим комитетом ФГБНУ «НИИ глазных болезней» (протокол №36/1 от 23.05.2016). Содержание животных соответствовало правилам надлежащей лабораторной практики, утвержденной приказом № 199н от 01.04.2016 Минздрава России. Предоперационную подготовку животных осуществляли внутримышечным введением раствора препарата Золетил 100 (Virbac Sante Animale, Франция) в объеме 0,6 мл. Дополнительно проводили инстилляционную анестезию 0,5% раствором проксиметакаина.

Все животные были разделены на три группы (табл.1). Животным I группы (10 кроликов, 20 глаз) удаляли участок конъюнктивы диаметром 6 мм в верхне-наружном квадранте глазного яблока. По периметру образованного дефекта производили отслоение конъюнктивы от склеры с формированием кольцевидного кармана шириной 2 мм. В зону дефекта на правых глазах (группа IA) укладывали гемостатическую коллагеновую губку размером 7x7 мм, края которой помещали в сформированный карман. Полнослойный дефект конъюнктивы левых глаз (группа IB) оставляли открытым. У всех кроликов I группы края конъюнктивы сопоставлены не были, швы не накладывали.

Экспериментальным животным II (8 кроликов, 16 глаз) и III группы (8 кроликов, 16 глаз) была выполнена интрасклеральная и субконъюнктивальная имплантация биорезорбируемых коллагеновых матриксов одинаковой конфигурации. Кроликам II и III групп в верхнем квадранте глазного яблока формировали конъюнктивальный лоскут основанием к лимбу. Через горизонтальный разрез склеры в 2 мм от лимба выполняли склеральный тоннель шириной 2,5 мм с выходом в угол передней камеры. Гемостатическую

коллагеновую губку (II группа) или офтальмологический дренаж iGen (III группа) имплантировали таким образом, что прямоугольная часть (длиной 3 мм и шириной 2 мм) была расположена в интрасклеральном канале, а кольцевая (с внутренним диаметром 6 мм и наружным - 10 мм) - под конъюнктивальным лоскутом. На конъюнктиву накладывали непрерывный шов (пролен 8/0). В качестве антибактериального средства всем кроликам до операции, а также в течение 7 суток после операции инстиллировали 0.25% раствор левомицитина - 1 раз в сутки. Методы морфологического исследования, сроки вывода животных из эксперимента указаны в табл.1.

Таблица 1. Распределение экспериментальных животных (кроликов) по группам, методы исследования, сроки вывода из эксперимента

Группа	Количество кроликов (n)	Количество глаз кроликов (n)	Вид вмешательства	Методы исследования; сроки вывода из эксперимента
IA	10	10	Имплантация гемостатической коллагеновой губки в зону полнослойного дефекта конъюнктивы	<ul style="list-style-type: none"> • Гистологическое и ИГХ исследования (TGF-β, α-SMA, VEGF) парафиновых срезов тканей в области конъюнктивального дефекта, окраска гематоксилином и эозином; 1-7-15-30 сутки; • СЭМ; 21 сутки
IB		10	Открытый полнослойный дефект конъюнктивы	<ul style="list-style-type: none"> • Гистологическое и ИГХ исследования (TGF-β, α-SMA, VEGF) парафиновых срезов тканей в области конъюнктивального дефекта, окраска гематоксилином и эозином; 7-15-30 сутки
II	8	16	Одномоментная субконъюнктивальная и интрасклеральная имплантация гемостатической губки	<ul style="list-style-type: none"> • Гистологическое исследование полутонких срезов конъюнктивы и склеры, окраска метиленовым синим и фуксином; 7-30-60-90 сутки
III	8	16	Одномоментная субконъюнктивальная и интрасклеральная имплантация дренажа iGen	<ul style="list-style-type: none"> • Гистологическое исследование полутонких срезов конъюнктивы и склеры, окраска метиленовым синим и фуксином; 7-30-60-90 сутки
Интакт ный кролик	1	2	-	<ul style="list-style-type: none"> • Гистологическое и ИГХ исследования (VEGF, α-SMA, TGF-β) парафиновых срезов конъюнктивы и склеры, окраска гематоксилином и эозином; 0 суток

Гистологическое и ИГХ исследования, а также СЭМ препаратов проводили в лаборатории фундаментальных исследований в офтальмологии ФГБНУ «НИИ глазных болезней» и на кафедре патологической анатомии имени академика А.И. Струкова Первого МГМУ им. И.М.Сеченова. Морфометрический анализ конъюнктивы, склеры и зоны дренажа осуществляли путем подсчета клеток при большом увеличении (x600).

Выраженность ангиогенеза и фиброза, а также уровень экспрессии VEGF, SMA- α , TGF- β оценивали в баллах (табл. 2).

Таблица 2. Оценка выраженности ангиогенеза, фиброза, ИГХ экспрессии α -SMA, TGF- β , VEGF в баллах

Признак	Степень выраженности признака	Баллы
Ангиогенез	Нет	0
	Слабый	1
	Умеренный	2
	Выраженный	3
	Диффузный	4
Фиброз	до 5% в поле зрения соединительной ткани	1
	от 5 до 10% в поле зрения соединительной ткани	2
	от 10 до 15% в поле зрения соединительной ткани	3
Экспрессия VEGF, α -SMA, TGF- β	менее 5% окрашенных клеток в области полнослойного дефекта конъюнктивы	0,5
	от 5 до 10% окрашенных клеток в области полнослойного дефекта конъюнктивы	1
	от 10 до 20% окрашенных клеток в области полнослойного дефекта конъюнктивы	2
	от 20 до 40% окрашенных клеток в области полнослойного дефекта конъюнктивы	4
	более 40% окрашенных клеток в области полнослойного дефекта конъюнктивы	6

Материалы и методы клинического исследования

В исследование были включены 14 пациентов (15 глаз) с диагнозом ПОУГ. Среди них - 9 мужчин (64%) и 5 женщин (36%). Средний возраст больных составил $69,2 \pm 8,8$ лет. У всех пациентов было отмечено отсутствие компенсации ВГД на максимальном гипотензивном режиме. Число гипотензивных препаратов, применяемых пациентами в дооперационном периоде, в среднем составило $3,2 \pm 0,97$. Критерии включения пациентов в исследование: установленный диагноз ПОУГ II-III стадии, декомпенсация ВГД

с учетом ВГДц на максимальном гипотензивном режиме, возраст: от 50 до 80 лет. Критерии исключения больных из исследования: наличие одного функционирующего глаза, вторичная или врожденная глаукома, другие офтальмологические операции в период участия пациента в исследовании, декомпенсированные сопутствующие заболевания сердечно-сосудистой системы, печени и почек. У всех пациентов было получено информированное добровольное согласие на обследование и лечение, а также на участие в клиническом исследовании. Исследование было разрешено к проведению локальным биомедицинским этическим комитетом ФГБНУ «НИИ глазных болезней» (протокол №36/1 от 23.05.2016).

Всем больным было проведено стандартное офтальмологическое обследование: визометрия, биомикроскопия (BM 900, Haag-Streit, Швейцария), гониоскопия (MaxField Autoclavable 4 Mirror Gonio, Ocular, США), статическая периметрия (Humphrey Field Analyzer II 750i, Zeiss, Германия), КЛСО (Heidelberg Retina Tomograph III, Heidelberg Engineering, Германия), тонометрия (пневмотонометр Reichart 7, США) с определением показателя роговично-компенсированного ВГД (табл. 3). Уровень ВГД оценивали до и через 1, 7 суток и 1, 3, 6, 12 месяцев после хирургического вмешательства. ВГД считали компенсированным при его соответствии усредненным значениям офтальмотонуса - ВГДц: I стадия – 18-20 мм рт.ст., II стадия – 15-17 мм рт.ст., III стадия – 10-14 мм рт.ст. («Глаукома. Национальное руководство», 2013). Отсутствие компенсации офтальмотонуса у пациента в послеоперационном периоде являлось показанием к проведению субконъюнктивального нидлинга или назначению гипотензивной терапии. Эффективность хирургического вмешательства оценивали по стандарту (Guidelines on design and reporting of glaucoma surgical trials. World Glaucoma association, 2009; Петров С.Ю., 2017) с определением полного и частичного успеха и неудачи операции.

Таблица 3. Характеристика предоперационных показателей пациентов, включенных в исследование

Возраст (годы) M±m	69,2±8,8
Пол (муж/жен), количество пациентов (n)	9/5
Стадия нейропатии (II/III), количество глаз (n)	8/7
Артифакция/незрелая катаракта, количество глаз (n)	11/4
Статическая периметрия	
Стандартное отклонение, MD (dB)	-14,55 [-25,87; -2,01]
Паттерн стандартного отклонения, PSD (dB)	7,86 [-1,58; 11,31]
Конфокальная лазерная сканирующая офтальмоскопия	
площадь НРП, rim area (мм ²)	1,11 [0,35; 2,03]
объем НРП, rim volume (мм ³)	0,22 [0,02; 1,05]
CHBC, (мм)	0,15 [0,06; 0,3]
FSM	-0,61[-5,14; 3,25]
RB	0,07 [-1,27; 1,25]
Пневмотонометрия	
Роговично-компенсированное ВГД (мм рт.ст.) M±m	26,3±6,3

Хирургический метод лечения

Показанием к проведению хирургического лечения глаукомы было отсутствие компенсации ВГД или невозможность достижения ВГДц на фоне проводимой гипотензивной терапии («Глаукома. Национальное руководство», 2013). 10 пациентам (11 артифакчных глаз) было выполнено транслимбальное микродренирование передней камеры с имплантацией биорезорбируемого антиглаукомного дренажа. Из них 3 больным (3 глаза) ранее было проведено хирургическое лечение глаукомы (более 5 лет назад); 4 пациентам (4 глаза с незрелой осложненной катарактой) было выполнено комбинированное хирургическое вмешательство: транслимбальное микродренирование и имплантация биорезорбируемого антиглаукомного дренажа в сочетании с факоэмульсификацией и имплантацией ИОЛ. Все операции были выполнены одним хирургом. Срок послеоперационного наблюдения составил 12 месяцев.

В верхнем квадранте глазного яблока, в 7 мм от лимба, выполняли разрез конъюнктивы и формировали конъюнктивальный лоскут. Горизонтальный разрез склеры производили в 2 мм от лимба, затем выполняли склеральный тоннель шириной 2,5 мм с выходом в угол передней камеры. При помощи панча Kelly формировали трабекулярную фистулу. Имплантировали биорезорбируемый антиглаукомный дренаж таким образом, чтобы его

прямоугольная интрасклеральная часть располагалась в сформированном канале и выступала в переднюю камеру глаза на 0,2-0,5 мм, а субконъюнктивальная часть находилась под конъюнктивальным лоскутом. На края конъюнктивального разреза накладывали непрерывный шов (викрил 8/0).

Результаты экспериментального исследования

Исследование биосовместимости и цитотоксичности матриксов на основе коллагена in vitro.

При электронной микроскопии визуализируется ячеистая структура матриксов и единичные округлые клетки, попавшие в поры. Через сутки культивирования единичные фибробласты определяются в глубоких слоях гемостатической губки и дренажа iGen. Клетки имеют характерную веретеновидную форму, распластываются по поверхности матрикса и стремятся к адгезии к коллагеновым волокнам. К 7 суткам культивирования отмечается значительное увеличение количества фибробластов, формирующих сетчатую структуру, выстилающую внутреннюю и наружную поверхности матриксов. Клетки имеют веретеновидное строение и овальное ядро. Во многих клетках можно было отметить наличие двух ядер – признак продолжающегося процесса митоза. На данном сроке на поверхности обоих типов коллагеновых матриксов (гемостатической губки и дренажа iGen) практически отсутствуют погибшие клетки.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой биосовместимости и низкой цитотоксичности гемостатической губки и дренажа iGen. Поверхность данных матриксов служит основой для адгезии и пролиферации фибробластов. Распределение клеток является равномерным и не зависит от типа матрикса.

Морфологическое исследование структур переднего отрезка глаза кролика.

При гистологическом исследовании продольного среза глазного яблока кролика отмечена конъюнктива, представленная рыхлой соединительной тканью с полнокровными сосудами и редкими лимфоидными инфильтратами в подлежащих слоях, покрытая многослойным плоским эпителием. Склера состоит из упорядоченных волокон соединительной ткани, образующих

плотную эластичную оболочку. На всём протяжении обнаруживаются немногочисленные тонкостенные кровеносные сосуды. По данным ИГХ исследования отмечается экспрессия VEGF, α -SMA, TGF- β (0,5 балла) в единичных клетках в зоне конъюнктивы.

Изучение регенеративного потенциала биорезорбируемого коллагенового матрикса (гемостатической губки) на модели полнослойного дефекта конъюнктивы глаза кролика с использованием гистологического и ИГХ исследования

Результаты гистологического исследования и СЭМ свидетельствуют о постепенной резорбции волокон гемостатической коллагеновой губки от периферии к центру в IA группе экспериментальных животных. Через 7 суток после операции волокна наружных слоев гемостатической коллагеновой губки частично деградируют и замещаются грануляционной тканью в области краев конъюнктивального дефекта. По данным ИГХ исследования в группе IA отмечается умеренная экспрессия VEGF (4 балла), α -SMA (4 балла), и TGF- β (4 балла). В группе IB в зоне полнослойного дефекта более интенсивное формирование грануляционной ткани сопровождается высокой экспрессией VEGF (6 баллов), умеренной экспрессией α -SMA (4 балла), и низкой - TGF- β (2 балла). Через 15 суток после операции у экспериментальных животных группы IA грануляционная ткань окружает волокна матрикса и практически полностью закрывает зону конъюнктивального дефекта. При ИГХ исследовании выявлено повышение экспрессии VEGF (6 баллов), α -SMA (6 баллов), уровень TGF- β остается прежним (4 балла). В группе IB на 15 сутки после вмешательства полнослойный дефект конъюнктивы значительно уменьшен в размерах и заполнен грануляционной тканью с участками слабо выраженного фиброза стромы. Отмечено уменьшение экспрессии VEGF (4 балла), повышение экспрессии TGF- β (4 балла), уровень α -SMA остается прежним (4 балла). Через 30 суток наблюдения в IA группе по данным гистологического исследования определяется ремоделирование грануляционной ткани с образованием рыхлой соединительной ткани, аналогичной по своему строению субэпителиальному

слою конъюнктивы. Полнослойный дефект полностью замещается рыхлой стромой конъюнктивы, содержащей единичные волокна коллагенового матрикса и покрытой многослойным плоским эпителием. В эти же сроки в IB группе конъюнктивальный дефект не определяется. Отмечено его полное закрытие новообразованной фиброзированной соединительнотканной стромой конъюнктивы, покрытой многослойным плоским эпителием. При ИГХ исследовании в группе IA сохраняется низкий уровень экспрессии VEGF (2 балла), α -SMA (2 балла), TGF- β (2 балла). В группе IB, признаки экспрессии VEGF и α -SMA обнаруживаются в единичных клетках (0,5 балла), при этом отмечается умеренная экспрессия TGF- β (4 балла).

Полученные данные подтверждают высокий регенеративный потенциал гемостатической коллагеновой губки, способствующий заживлению полнослойного дефекта конъюнктивы за счет формирования рыхлой стромы, покрытой многослойным плоским эпителием.

Изучение биосовместимости и биодegradации матрикса на основе коллагена (гемостатической губки и дренажа iGen) при одномоментном субконъюнктивальном и интрасклеральном введении.

Сравнительный морфометрический анализ состояния конъюнктивы и склеры во II и III группах экспериментальных животных свидетельствует о сходной острой воспалительной реакции на 7 сутки после оперативного вмешательства (табл. 4). Воспаление сопровождается постепенной резорбцией волокон дренажа, более выраженной у кроликов III группы. Отток ВГЖ в обеих группах осуществляется через склеральный канал и субконъюнктивальное пространство. У экспериментальных животных II группы на сроке 30 суток после хирургического вмешательства единичные коллагеновые волокна определяются в интрасклеральном канале, в субконъюнктивальном пространстве отмечается менее выраженный лизис дренажа. В III группе к данному промежутку времени наступает полная резорбция волокон iGen. На сроке в 30, 60, 90 суток у кроликов II группы отмечен достоверно ($p < 0,05$) менее выраженный клеточный ответ в зоне конъюнктивы и склеры (табл. 4). На

60 сутки после операции отмечен полный лизис дренажа у животных обеих групп.

Таблица 4. Морфометрические показатели ($M \pm m$) конъюнктивы и склеры кроликов ($n=32$) II (гемостатическая коллагеновая губка) и III (iGen) групп

Конъюнктива									
Срок	Группа	Макрофаги	p	Лимфоциты	p	Лейкоциты	p	Фибробласты	p
7 сут	II группа	5,5±0,6	0,5	4,5±0,6	0,1	8,75±2,2	0,7	7,0±0,8	0,6
	III группа	5,75±0,5		5,25±0,5		8,25±0,5		7,25±0,5	
30 сут	II группа	2,25±0,5	0,02	2,25±0,5	0,02	2,25±0,5	0,02	9,0±0,8	0,04
	III группа	5,75±0,5		5,0±0,8		8,0±0,8		7,5±1	
60 сут	II группа	2,75±0,5	0,04	2,75±0,5	0,04	1,25±0,5	0,03	4,75±0,9	0,02
	III группа	1,75±0,5		1,75±0,5		2,5±0,6		8,0±0,8	
90 сут	II группа	1,5±1,0	0,02	1,25±0,5	0,02	1,25±0,5	0,02	4,5±1,0	0,03
	III группа	4,5±0,6		4,0±0,8		4,5±0,6		7,0±0,8	
Склера									
Срок	Группа	Макрофаги	p	Лимфоциты	p	Лейкоциты	p	Фибробласты	p
7 сут	II группа	2,75±1,3	0,6	3,0±1,4	0,9	9,5±2,5	0,2	6,5±1,3	0,5
	III группа	3,25±0,5		3,25±0,5		7,75±0,9		6±0,8	
30 сут	II группа	1,5±0,6	0,02	1,5±0,6	0,02	1,5±0,6	0,02	10,25±0,5	0,02
	III группа	4,0±0,8		3,75±0,5		8,75±0,5		8,25±0,5	
60 сут	II группа	1,25±0,5	0,04	1,5±0,6	0,03	0,5±0,6	0,04	5,0±0,8	0,03
	III группа	2,25±0,5		2,75±0,5		2,0±0,8		6,75±0,5	
90 сут	II группа	0,75±0,5	0,02	1,25±0,5	0,03	0,25±0,5	0,02	4,75±0,5	0,02
	III группа	3,0±0,8		3,0±0,8		5,25±0,5		7,0±0,5	

При анализе процесса репарации склеры и конъюнктивы в зоне хирургического вмешательства была произведена оценка в баллах динамики ангиогенеза и фиброза в II и III группах (табл. 2). На всех сроках наблюдения выявлена отрицательная корреляционная связь между ангиогенезом и выраженностью процесса фиброобразования ЭЦМ в конъюнктиве (II группа: $r_7 = -0,973$, $r_{30} = -0,853$, $r_{60} = -0,863$, $r_{90} = -0,911$, $p < 0,05$, III группа: $r_7 = -0,816$, $r_{30} = -0,949$, $r_{60} = -0,839$, $r_{90} = -0,870$, $p < 0,05$) и в склере (II группа: $r_7 = -0,853$, $r_{30} = -0,986$, $r_{60} = -0,816$, $r_{90} = -0,863$, $p < 0,05$, III группа: $r_7 = -0,905$, $r_{30} = -0,872$, $r_{60} = -0,870$, $r_{90} = -0,870$, $p < 0,05$). У животных II группы обнаруживается активный рост новообразованных тонкостенных сосудов конъюнктивы и склеры на 7, 30 и 60 сутки с постепенным его снижением к 90 суткам. При этом к 90 дню наблюдения отмечается частичное фиброзирование ЭЦМ конъюнктивы и склеры. В III группе животных выявлено уменьшение периода активного

ангиогенеза в конъюнктиве и склере до 30 суток. Резкое снижение образования тонкостенных сосудов на 60 сутки сопровождается активным процессом фиброобразования ЭЦМ. Данная тенденция сохраняется к 90 суткам наблюдения.

Таким образом, результаты гистологического исследования конъюнктивы и склеры свидетельствуют о сходном клеточном ответе через 7 суток после имплантации гемостатической коллагеновой губки и дренажа iGen. В более поздние сроки наблюдения после введения гемостатической коллагеновой губки отмечается менее выраженная локальная воспалительная реакция тканей и активный ангиогенез, что способствуют медленному фиброобразованию ЭЦМ конъюнктивы и склеры. Отсутствие признаков выраженного фиброза конъюнктивы и склеры в зоне имплантации гемостатической коллагеновой губки обеспечивает более выраженный отток ВГЖ по новообразованным тонкостенным сосудам в субконъюнктивальное пространство.

Результаты клинического исследования

Биорезорбируемый антиглаукомный дренаж оригинальной конструкции

Разработанный биорезорбируемый антиглаукомный дренаж (патент на полезную модель RU 179971 от 29.05.2018) может быть использован в качестве компонента фистулизирующей операции для формирования дозированного оттока ВГЖ в раннем послеоперационном периоде и с целью пролонгации гипотензивного эффекта вмешательства за счет снижения риска рубцевания зоны хирургического вмешательства. В качестве материала использована гемостатическая коллагеновая губка. Конструкция дренажа обеспечивает возможность его имплантации одновременно в склеральный канал и субконъюнктивальное пространство при транслимбальном микродренировании передней камеры глаза. Прямоугольная интрасклеральная часть имеет длину 3 мм и ширину 2 мм и заполняет склеральный канал на всем его протяжении. Субконъюнктивальная часть имеет кольцевую форму, внутренний диаметр составляет 6 мм, наружный диаметр 10 мм. Конфигурация дренажа обеспечивает фильтрацию ВГЖ из передней камеры под конъюнктиву. Субконъюнктивальная часть дренажа в гидратированном состоянии

увеличивает высоту полости фильтрационной подушки, препятствует склеро-конъюнктивальному рубцеванию по ее периферии и в центральной зоне. Кольцевая форма уменьшает риск прорезывания дренажа через конъюнктиву при его выраженном набухании.

Послеоперационная динамика внутриглазного давления

Уровень офтальмотонуса в предоперационном периоде был равен $26,3 \pm 6,3$ мм рт.ст. с минимальным значением ВГД $16,0$ мм рт.ст. и максимальным - $35,3$ мм рт.ст.. Через сутки после транслимбального микродренирования передней камеры с имплантацией биорезорбируемого антиглаукомного дренажа среднее значение ВГД составило $5,2 \pm 2,5$ мм рт.ст.. К 7 суткам наблюдения было отмечено повышение ВГД до $10,0 \pm 3,6$ мм рт.ст.. Через 1 месяц после хирургического вмешательства уровень офтальмотонуса составил $13,9 \pm 3,3$ мм рт.ст. В более поздние сроки наблюдения динамики ВГД отмечено не было. Через 12 мес. после операции ВГД в среднем было равным $14,8 \pm 1,7$ мм рт.ст.

К 12 месяцам наблюдения после транслимбального микродренирования передней камеры с имплантацией биорезорбируемого антиглаукомного дренажа полный успех вмешательства отмечен у 11 пациентов (12 глаз). Частичный успех операции был достигнут у 2 пациентов (2 глаза), когда нормализация ВГД была отмечена после нидлинга и на фоне назначения гипотензивных препаратов в поздние сроки после вмешательства. Таким образом, общий успех был отмечен у 12 пациентов (13 глаз). У 1 пациента (1 глаз) наблюдали стойкое повышение ВГД, послужившее показанием к проведению повторной операции через 10 месяцев после первого вмешательства.

Интраоперационные осложнения не были отмечены ни в одном случае. В раннем послеоперационном периоде у 2 пациентов (2 глаза) было обнаружено появление мелкой передней камеры, в 1 случае на фоне цилиохориоидальной отслойки. После консервативного лечения было достигнуто восстановление передней камеры и прилегание сосудистой оболочки.

При сравнении показателей статической периметрии было выявлено статистически значимое повышение уровня стандартного отклонения (MD) и паттерна стандартного отклонения (PSD) (табл. 5).

Таблица 5. Динамика показателей статической периметрии в различные сроки наблюдения после транслимбального микродренирования передней камеры с имплантацией биорезорбируемого антиглаукомного дренажа

Показатель	До операции	6 месяцев после операции	12 месяцев после операции
	Медиана [квартили]	Медиана [квартили]	Медиана [квартили]
стандартное отклонение, MD (dB)	-14,55* [-25,87; -2,01]	-14,33 [-26,12; -1,85]	-14,24 [-25,80; -1,90]
паттерн стандартного отклонения, PSD (dB)	7,86* [-1,58; 11,31]	7,93 [-1,30; 11,45]	7,93 [-1,30; 11,39]

* $p < 0,05$ между показателями до операции и через 6 месяцев после операции, до операции и через 12 месяцев после операции

По данным КЛСО отмечено статически значимое увеличение показателей площади и объема НПП, а также толщины СНВС через 6 и 12 месяцев после операции. Показатели дискриминантного анализа FSM и RB достоверно улучшились через 6 и 12 месяцев после операции (табл. 6).

Таблица 6. Динамика показателей КЛСО в различные сроки наблюдения после транслимбального микродренирования передней камеры с имплантацией биорезорбируемого антиглаукомного дренажа

Показатель	До операции	6 месяцев после операции	12 месяцев после операции
	Медиана [квартили]	Медиана [квартили]	Медиана [квартили]
площадь НПП, (мм ²)	1,11 [0,35; 2,03]*	1,14 [0,38; 2,07]**	1,16 [0,38; 2,09]
объем НПП, rim volume (мм ³)	0,22 [0,02; 1,05]*	0,26 [0,05; 1,09]**	0,27 [0,09; 1,12]
СНВС, мм	0,15 [0,06; 0,3]*	0,16 [0,07; 0,32]**	0,17 [0,09; 0,37]
FSM	-0,61 [-5,14; 3,25]*	-0,57 [-5,10; 3,31]**	-0,55 [-5,10; 3,41]
RB	0,07 [-1,27; 1,25]*	0,09 [-1,25; 1,30]**	0,13 [-1,20; 1,38]

* $p < 0,05$ между показателями до операции и через 6 месяцев после операции, до операции и через 12 месяцев после операции; ** $p < 0,05$ между показателями в сроки 6 и 12 месяцев после операции

Таким образом, достоверное улучшение послеоперационных показателей статической периметрии и КЛСО косвенно свидетельствуют об уменьшении компрессии ДЗН на фоне снижения ВГД.

Выводы

1. Впервые на достаточном экспериментальном (27 кроликов, 54 глаза) и клиническом (14 пациентов, 15 глаз) материале изучена возможность применения биорезорбируемого матрикса на основе коллагена в качестве субконъюнктивального и интрасклерального имплантата.
2. Доказано, что структура и состав биорезорбируемых матриксов на основе коллагена – гемостатической коллагеновой губки и офтальмологического дренажа iGen - обеспечивают их оптимальную биосовместимость и биоактивность. Поверхность коллагеновых матриксов является основой для адгезии, пролиферации и миграции клеток.
3. Показан высокий регенеративный потенциал матрикса - гемостатической коллагеновой губки - на модели полнослойного дефекта конъюнктивы глаза кролика. Биорезорбция волокон коллагенового матрикса происходит в направлении от периферии к центру с постепенным замещением полости грануляционной тканью. К 30 суткам наблюдения тканевой дефект замещается полноценной рыхлой соединительнотканной стромой конъюнктивы, покрытой многослойным плоским эпителием, с умеренной экспрессией VEGF, α -SMA, низкой - TGF- β .
4. Сравнительное экспериментально-морфологическое исследование конъюнктивы и склеры выявило высокую биосовместимость гемостатической коллагеновой губки и офтальмологического дренажа iGen при субконъюнктивальной и интрасклеральной имплантации. Более выраженная биодеградация волокон коллагеновых матриксов отмечена в склеральном канале, по сравнению с субконъюнктивальным пространством. Полная резорбция офтальмологического дренажа iGen наступает к 30 суткам после имплантации, гемостатической коллагеновой губки - к 60 суткам после введения.

5. Выявлена достоверная отрицательная корреляционная связь ($p < 0,05$) между выраженностью процессов ангиогенеза и фиброзирования экстрацеллюлярного матрикса конъюнктивы при сроках 7-90 суток после имплантации коллагеновых матриц. Отмечено резкое снижение ангиогенеза в конъюнктиве и склере к 60 суткам после введения офтальмологического дренажа iGen и к 90 суткам после имплантации гемостатической коллагеновой губки.

6. На основе гемостатической коллагеновой губки разработан биорезорбируемый антиглаукомный дренаж для транслимбального микродренирования передней камеры. Проведена предварительная оценка его эффективности на 15 глазах (14 пациентов) с первичной открытоугольной глаукомой при отсутствии компенсации внутриглазного давления на максимальном гипотензивном режиме (срок наблюдения – 12 месяцев).

6.1 Полный успех транслимбального микродренирования передней камеры с применением биорезорбируемого антиглаукомного дренажа отмечен в 12 случаях, частичный успех – в 2 случаях. В 1 случае наблюдалось стойкое повышение ВГД, послужившее показанием к проведению повторной операции.

6.2 Интраоперационные осложнения не были отмечены ни в одном случае. Уменьшение глубины передней камеры обнаружено в 2 случаях, из них у 1 пациента на фоне цилиохориоидальной отслойки.

Практические рекомендации

1. Биорезорбируемый матрикс на основе гемостатической коллагеновой губки может быть использован для закрытия послеоперационных дефектов конъюнктивы, возникающих на фоне прорезания хирургических швов.

2. Биорезорбируемый антиглаукомный дренаж целесообразно использовать при проведении транслимбального микродренирования передней камеры у пациентов с ПОУГ.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Мамиконян В.Р., Фисенко Н.В., Демура Т.А., Коган Е.А., Казарян Э.Э. Особенности биодegradации имплантата коллагена в тканях глаза кролика при моделировании антиглаукомного хирургического вмешательства (экспериментальное исследование) // **Экспериментальная и клиническая фармакология.** – 2018. – Т. 81. - № 4. – С. 21-26.
2. Демура Т.А., Фисенко Н.В., Мамиконян В.Р., Коган Е.А., Аветисов С.Э. Изучение регенеративного потенциала биорезорбируемого коллагенового матрикса на модели полнослойного дефекта конъюнктивы глаза кролика // **Экспериментальная и клиническая фармакология.** – 2018. – Т. 81. - №7. – С. 34-38.
3. Мамиконян В.Р., Фисенко Н.В. Хирургическое лечение глаукомы: от классической проникающей хирургии до применения методов тканевой инженерии // **Вестник офтальмологии.** - 2018. – Т.134. - №5 (Ч.1). – С.111-117.
4. Фисенко Н.В., Мамиконян В.Р. Первые результаты клинического применения транслимбального микродренирования с использованием биорезорбируемого коллагенового дренажа при первичной открытоугольной глаукоме // Сборник научных трудов XI Российского общенационального офтальмологического форума. – Москва. - 2018. - Т. 1. - С. 346-350.

Список изобретений по теме диссертации

Мамиконян В.Р., Фисенко Н.В., Аладинская И.В., Матющенко А.Г., Сафонова Д.М. Биорезорбируемый антиглаукомный дренаж // Патент на полезную модель RU № 179971 от 29.05.2018.

Список сокращений и условных обозначений

ПОУГ – первичная открытоугольная глаукома

ВГД – внутриглазное давление;

ВГДц – целевое внутриглазное давление;

ВГЖ – внутриглазная жидкость;

КЛСО – конфокальная лазерная сканирующая офтальмоскопия

НРП – нейроретинальный поясок

СНВС – слой нервных волокон сетчатки

ИГХ – иммуногистохимическое исследование

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ЭЦМ – экстрацеллюлярный матрикс

VEGF - vascular endothelial growth factor (сосудистый эндотелиальный фактор роста)

α -SMA - α -smooth muscle actin (гладкомышечный актин α)

TGF- β - transforming growth factor- β (трансформирующий фактор роста β)