

Московская государственная академия ветеринарной медицины и
биотехнологии - МВА им. К.И. Скрябина

«УТВЕРЖДАЮ»

Ректор ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА им. К.И. Скрябина, д.в.н., профессор

Полябин С.В.



«22» декабря 2021 г.

ОТЧЕТ

по исследованию биосовместимости и способности к интеграции с
роговицей реципиента материала для кератопластики «Корнеопласт».

Исследование относится к оценке эффективности и безопасности
медицинского изделия, представляющего собой девитализированную
фиксированную методом кросслинкинга роговицу. Набор
биотехнологических и физико-химических приемов позволил уменьшить
биологическую реакцию на имплантат до уровня лучших полимерных
образцов с сохранением способности интегрироваться в биологическую
структуру роговицы, практически без потери основных свойств,
позволяющих осуществлять ее основные функции. Соответствует ТУ
32.50.22-001-11480121-2022 МАТЕРИАЛ ДЛЯ КЕРАТОПЛАСТИКИ
«КОРНЕОПЛАСТ».

Эксперименты проводились на базе Московской государственной академии
ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина и Центра
ветеринарной офтальмологии доктора А.Г.Шилкина

Эксперимент строился на основе изучения биомикроскопической картины,
оптической когерентной томографии высокого разрешения и гистологической

картины роговицы экспериментальных кроликов (I - IV группа: всего было исследовано 8 глаз), которым был имплантирован материал Корнеопласт (далее Материал).

Имплантация материала выполнялась в трех хирургических вариантах:

- 1) I группа: сквозная кератопластика (1 глаз);
- 2) II группа: интраламеллярная послойная кератопластика (1 глаз);
- 3) III группа передняя послойная кератопластика (4 глаза).

В качестве контроля использовали интактные кроличьи глаза (IV группа: 2 глаза).

Операции проводили в условиях ветеринарной микрохирургической операционной с использованием внутривенной премедикации и газового масочного наркоза под операционным микроскопом. Во всех случаях начальные этапы вмешательства были одинаковы: после проведения наркоза, накладывалась стерильная офтальмологическая салфетка, блефаростат. На верхнюю прямую мышцу накладывали шов-держалку. Кератопластический материал гидратировали в стерильном сбалансированном физиологическом растворе в течение 15-30 минут. Далее приведены особенности каждого вмешательства

Сквозная кератопластика

В роговице реципиента, в центре, трепаном диаметром 6,0мм формировали сквозное отверстие. Тем же трепаном выкраивали материал в форме диска. Выкроенный диск фиксировали 4-мя швами-держалками с использованием шелка 8-0 (рис.1). По кругу узловыми швами герметизировали имплантированный диск из материала в глазу животного с использованием нейлона 10-0 (рис.2).

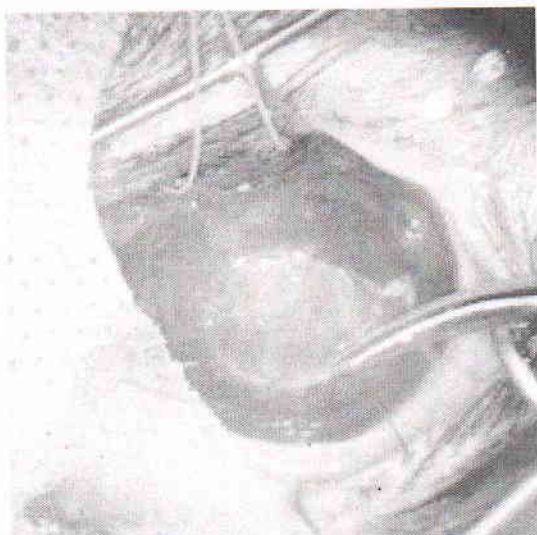


Рис.1. Этап операции сквозной кератопластики материалом Корнеопласт. Наложение швов-держалок

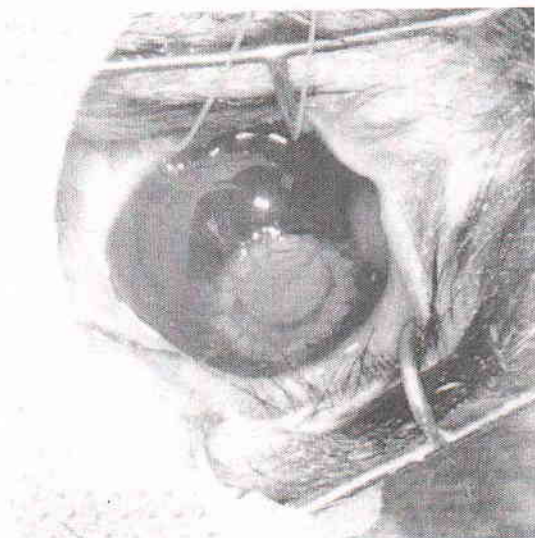


Рис.2. трансплантат из материала загерметизирован 16-ю швами нейлон 10-0.

Послойная интраламеллярная кератопластика

Роговичным расслаивателем в роговице животного формировали туннель на 1/2 глубины по форме выкроенного материала. Трепаном диаметром 6,0 мм выкраивали материал в форме диска. Дыску с помощью ножниц придали овальную форму. Материал помещали в подготовленный туннель, после чего туннель герметизировали двумя швами нейлон 10-0.

Передняя послойная кератопластика

Трепаном диаметром 5,0 мм выкраивали материал в форме диска. Трепаном диаметром 5,0 мм проводили непроникающее круговое пререзание роговицы. Алмазным ножом отсепаровывали передние слои роговицы в несколько приемов, постепенно формируя трансплантационное ложе глубиной 250-300 мкм. Из кератопластического материала выкраивали лоскут диаметром 5,0 мм, укладывали в трансплантационное ложе и фиксировали восемью прерывными узловыми швами нейлон 8-0.

Выведение из наркоза осуществляли в условиях дневного ветеринарного стационара. Во всех случаях послеоперационная реабилитация включала: Энрофлоксацин 2,5% (Байтрил) подкожно, 1 раз в день в течение 7 дней; Мелоксидил перорально в течение 3 дней; Тобрекс, глазные капли, 3 раза в день в течение 14 дней; Корнерегель, глазной гель, 3 раза в день в течение 14 дней.

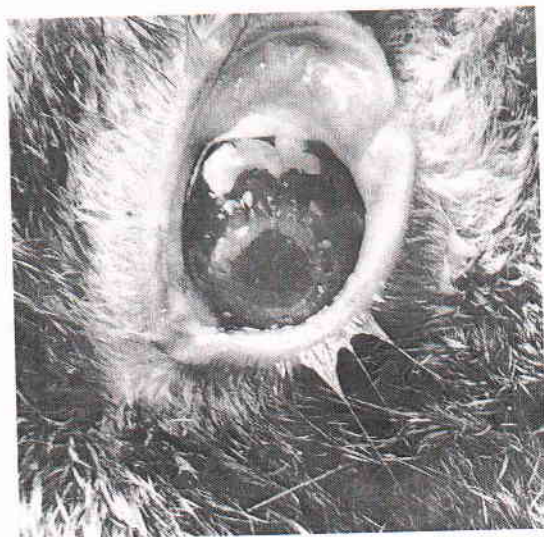


Рис.3. Первые сутки после операции сквозной имплантации материала Корнеопласт

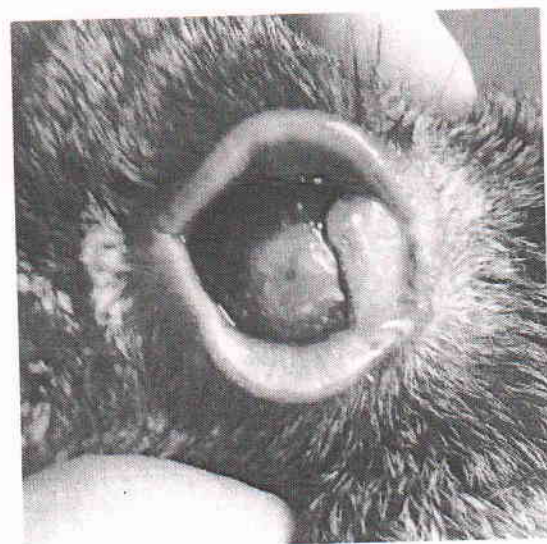


Рис.4. Неделя после операции сквозной имплантации материала Корнеопласт

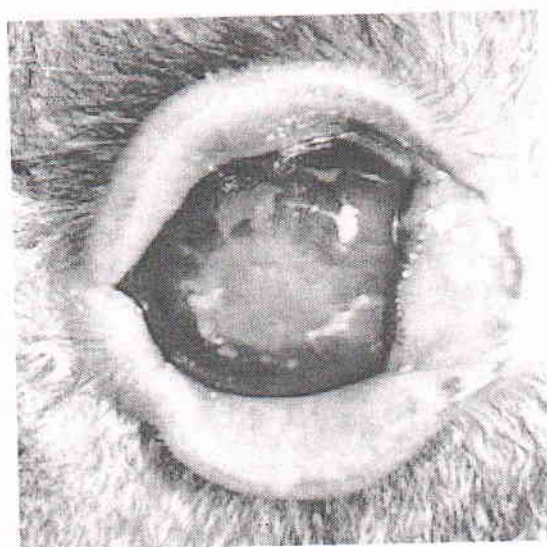


Рис.5. Месяц после сквозной имплантации материала Корнеопласт.

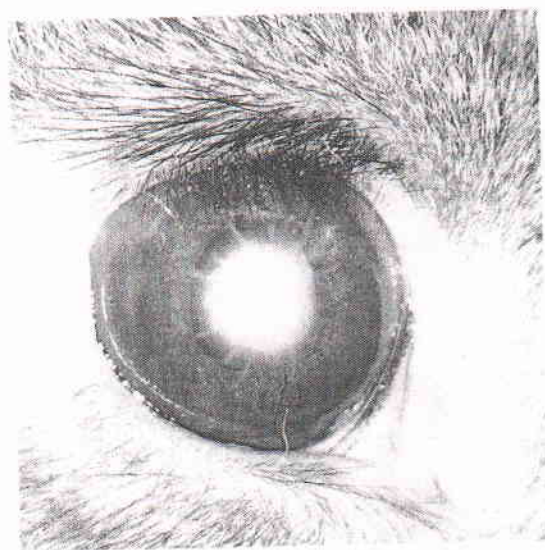


Рис.6. 3 месяца после имплантации материала Корнеопласт.

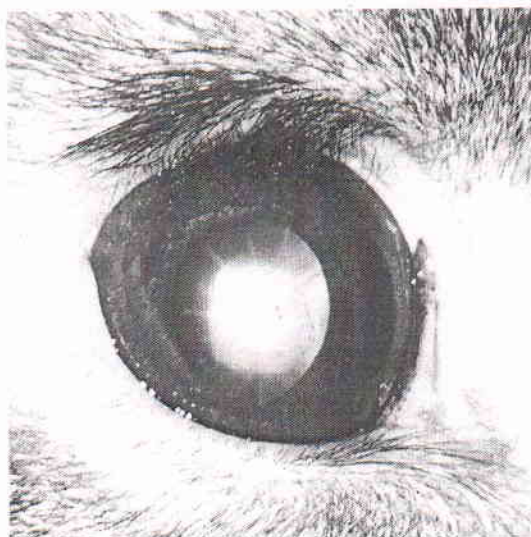


Рис.7. 6 месяцев после имплантации материала Корнеопласт, увеличивается прозрачность имплантата, на периферии его отчетливо просматривается рефлекс с глазного дна, граница с роговицей реципиента не определяется

Данные прижизненной оптической когерентной томографии.

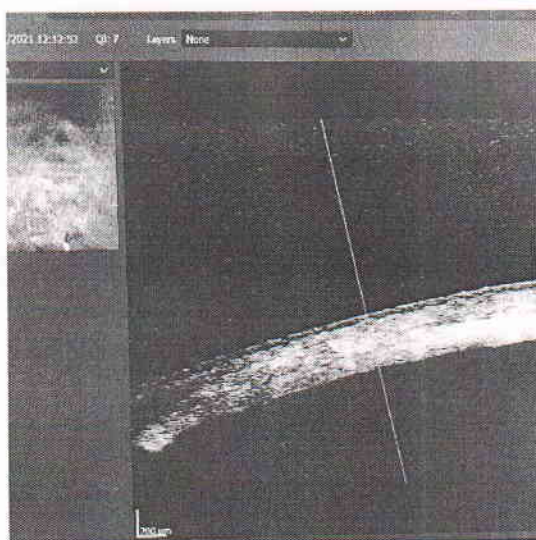


Рис.8. 6 мес. после сквозной имплантации материала. Средняя периферия имплантата. Отсутствует граница перехода слоев волокон имплантата в слои роговицы. (Левый край)

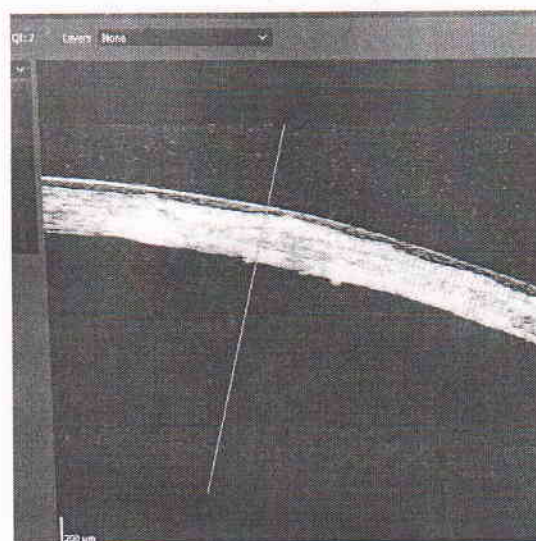


Рис.9. 6 мес. после сквозной имплантации материала. Средняя периферия имплантата. Отсутствует граница перехода слоев волокон имплантата в слои роговицы. (Правый край)

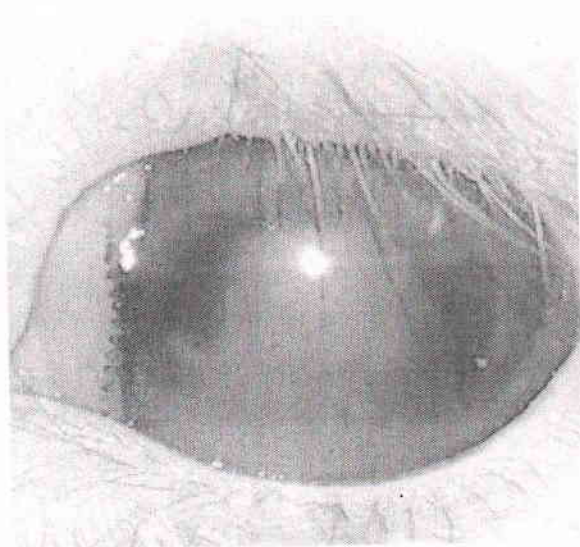


Рис.14. Глаз кролика через 1 месяц после наружной послойной имплантации

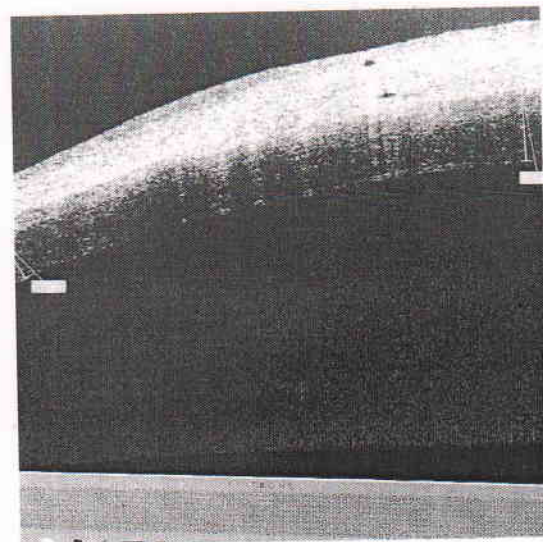


Рис.15.Роговица этого же кролика на ОКТ топограмме

После наружной послойной имплантации материала роговица кролика почти прозрачна, поверхность ровная, границы между здоровой тканью и трансплантатом не определяются (рис.14). На ОКТ (рис.15) также граница между роговицей реципиента и трансплантатом не визуализируется. Слой эпителия имеет нормальную толщину. Роговица сохраняет слоистое строение. Эндотелий сохранен.

Результаты гистологического исследования

В группе сквозной кератопластики по всей поверхности роговицы, включая область трансплантата сформирована равномерная на всем протяжении базальная мембрана. Слой базальных клеток эпителия и более поверхностных слоёв сформирован, равномерен и не имеет видимых отличий над интактной стромой и областью имплантированного материала. Воспалительные клетки во всех слоях интактной роговицы и имплантированного материала отсутствуют. Фибробласты (кератоциты) расположены в строме роговицы и имплантированного материала параллельно. В количественном отношении нет различий в интактной роговице и имплантированном материале. Имплантированный материал имеет слоистое строение подобное строению нормальной роговицы при этом слои роговицы без видимой пограничной зоны переходят в слои имплантированного материала, составляя единое целое образование. Слой эндотелиальных клеток присутствует на всем протяжении препарата, в том

числе равномерно выстилает внутреннюю поверхность имплантированного материала (рис.16,17). В лимбальной зоне отсутствуют воспалительные клетки, отмечается некоторый избыток тканей сосудистых образований, без признаков воспалительной реакции. В ткани радужки и цилиарного тела отсутствуют воспалительные клетки (рис.18,19). Сосуды не увеличены в размерах их количество также не увеличено и соответствует таковому в контрольных глазах.

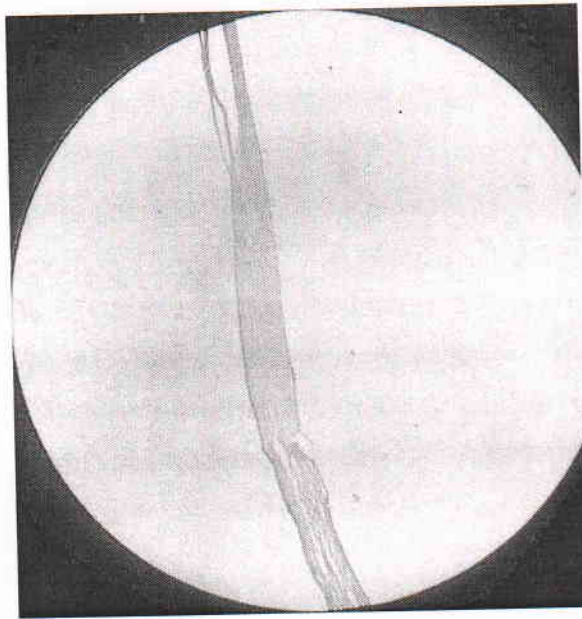


Рис.16. Зона перехода материала в роговицу реципиента. Слои материала без перерыва и разграничительной линии переходят в слои роговицы реципиента. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. X40

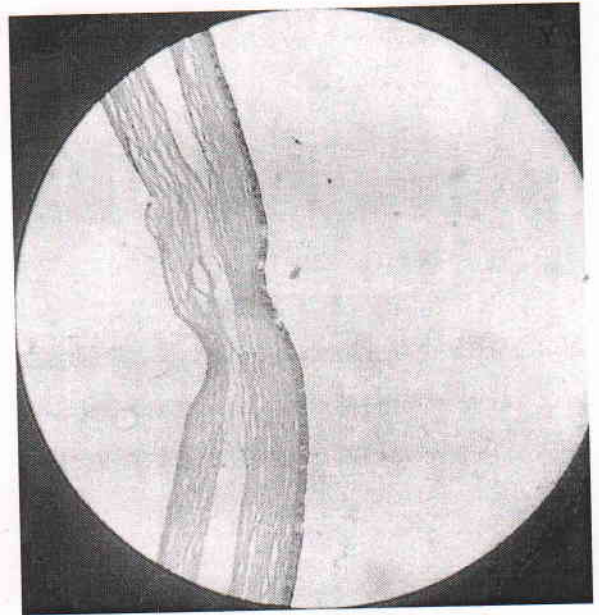


Рис.17. Слои материала подобны слоям роговицы реципиента, заселены кератоцитами. Эндотелиальный и эпителиальные слои в области материала без особенностей, непрерывны. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. X400

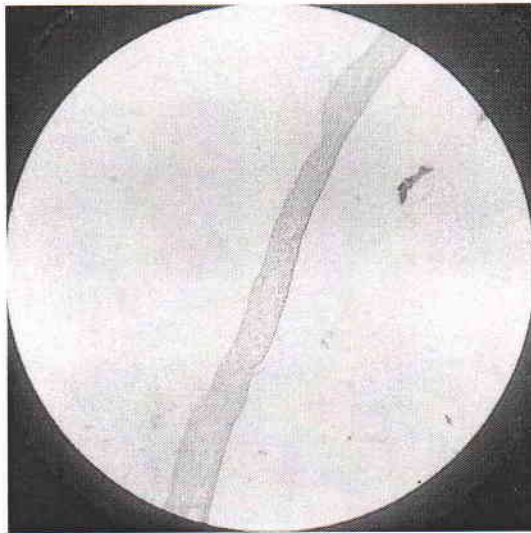


Рис. 26. Радужка контрольного глаза, спокойна, сосуды не увеличены. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. X40

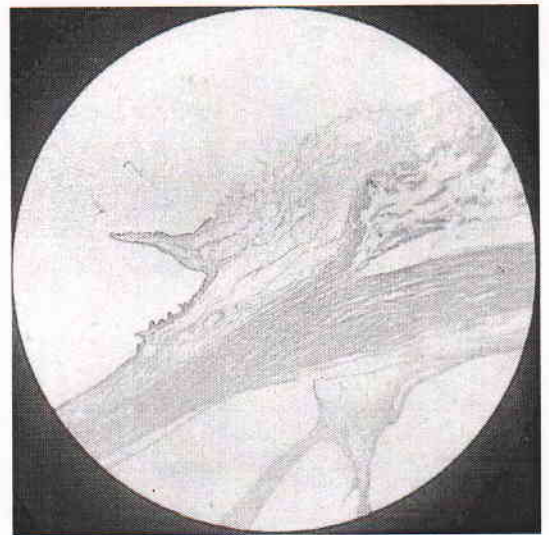


Рис. 27. Цилиарное тело и лимбальная зона контрольного. Сосудистые структуры не расширены, воспалительные клетки отсутствуют. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. X400 глаза.

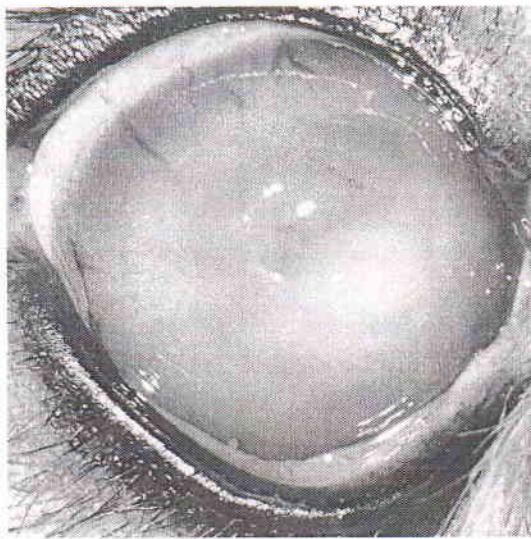


Рис.28. Гнойная язва роговицы с угрозой перфорации и потери глаза.

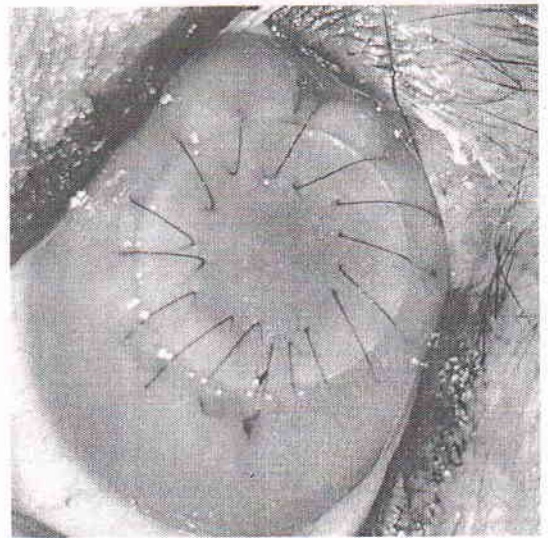


Рис.29. Ход операции: имплантация материала путем наложения узловых швов

Результаты покрытия острых гнойных язв у собак

Все операции выполняли после неудачного применения замороженной свиной роговицы, которая подверглась расплавлению (рис.28). Язва полностью покрывалась в пределах здоровых тканей материалом Корнеопласт с фиксацией узловыми швами (рис.29). Область гнойной язвы

после покрытия материалом Корнеопласт осматривали через 3 недели, после операции при снятии швов тарзорафии с одномоментным удалением фиксирующих трансплантат швов. Отмечали выраженную неоваскуляризацию поверхности материала без признаков расплавления. Через 3 недели отмечалась полная эпителизация поверхности роговицы реципиента и трансплантата. Материал интегрирован с реципиентом (рис.30). Через месяц после снятия швов (рис.31) отмечается полная интеграция материала . неоваскуляризация уменьшилась. Отмечается пигментация трансплантата по периферии. Роговица реципиента спокойна. Визуализируются глубже лежащие отделы глаза: роговица и хрусталик. В группе сравнения определяется выраженная воспалительная реакция роговицы реципиента, донорская свиная роговица отечна, мутная (рис.32).

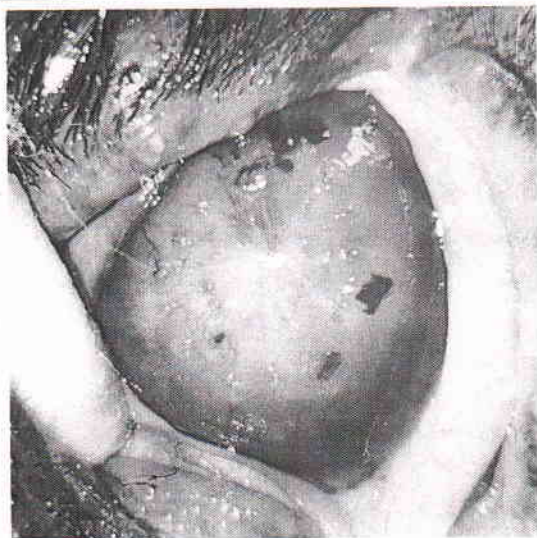


Рис.30. через 2 недели после операции произведено снятие тарзорафии и узловых герметизирующих швов

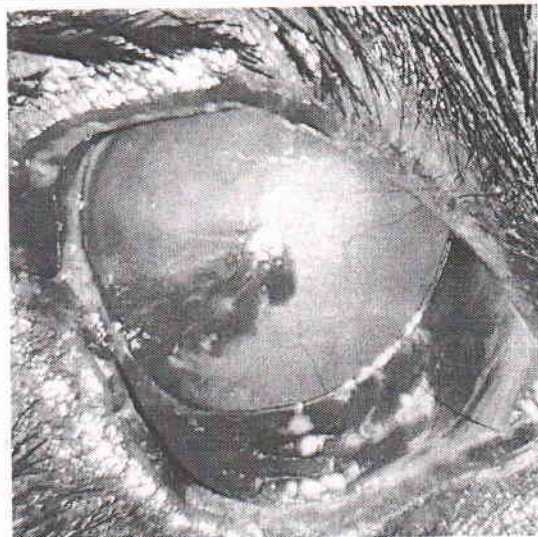


Рис.31. Через месяц после снятия швов, умеренная васкуляризация трансплантата в поверхностных слоях. Роговица реципиента прозрачна.

Через 1 месяц после сквозной имплантации материала Корнеопласт на серии оптических когерентных томограмм слои роговицы переходят на имплантированный материал. В области перехода слои непрерывны и переходная зона не визуализируется. Слои роговицы реципиента переходят в слои материала, составляя с ними единое целое. Материал в некоторых зонах имеет незначительную гиперрефлективность, но сохраняет слоистое строение, характерное для стромы роговицы.

Через 6 месяцев (рис.8.9) после операции на серии оптических когерентных томограмм определяется нормальный по толщине непрерывный слой эпителия, отмечается полная интеграция материала с роговицей реципиента, гиперрефлективность уменьшилась, сохраняется слоистое строение, характерное для роговичной ткани.

Данные биомикроскопии после послойной интраламеллярной имплантации материала.

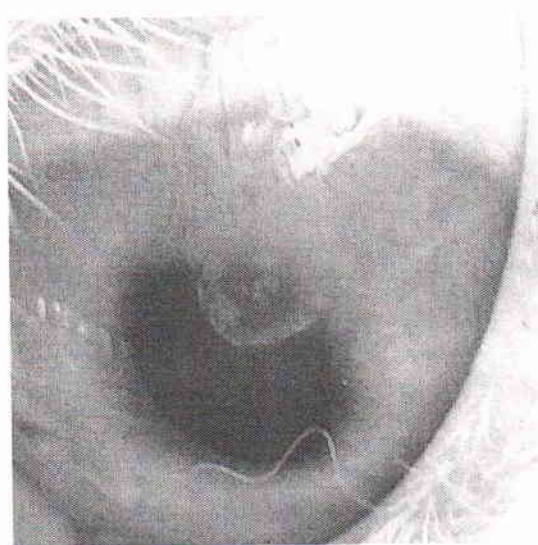


Рис.10. Результаты имплантации материала в слои роговицы. Через 1 мес. п/о отмечается образование легкого паннус в наружных слоях роговичного туннеля, как реакция на хирургическую травму.

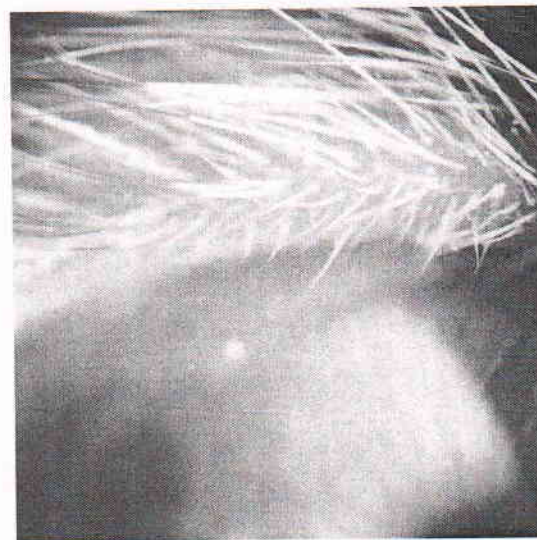


Рис.11. Через 6 мес. имплантат прозрачен, остаточный паннус в области наружных отделов операционного туннеля

В первые недели после операции формируется легкий сосудистый паннус в сторону сформированного туннеля с имплантатом (рис.10), который практически полностью исчезает к срокам в 6 месяцев п/о (рис.11). Роговица

реципиента во все сроки наблюдения прозрачна, признаков воспалительной реакции в ответ на имплантацию материала не отмечено (рис.10,11).

После интраламеллярной послойной кератопластики через 6 месяцев на оптической когерентной томографии определяется трансплантат в виде участка гиперрефлективной ткани (рис.12), слои интегрированы со стромой роговицы реципиента. Роговица экспериментального животного в сравнении с контрольной группой имеет нормальные геометрические параметры (рис. 13).

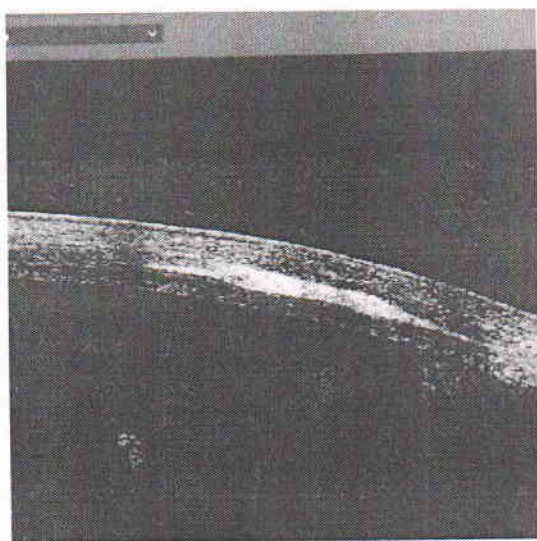


Рис.12. Картина послойной интраламеллярной имплантации материала. Отмечается веретенообразная гиперрефлективная зона, соответствующая положению материала в роговице реципиента. Слои роговицы без переходной зоны переходят в слои материала. Эпителий и эндотелиальный слой сохранены

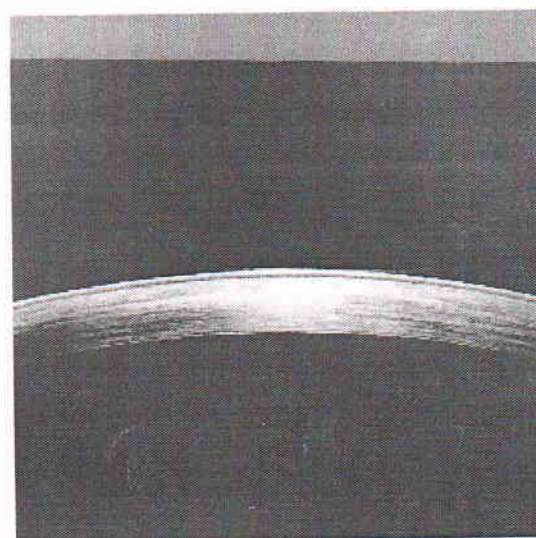


Рис.13. Картина ОКТ контрольной роговицы. Отмечается нативное слоистое строение и определяется слой эпителия и эндотелия. Оба слоя по своим параметрам соответствуют слоям в экспериментальных глазах как при послойной так и при сквозной имплантации материала

Рис.22. 6 месяцев после операции.
Радужная оболочка и цилиарное
тело. Послойная интраламеллярная
имплантация материала.
Воспалительные клетки отсутствуют.
Окраска гематоксилин-эозином. Ув.
X400

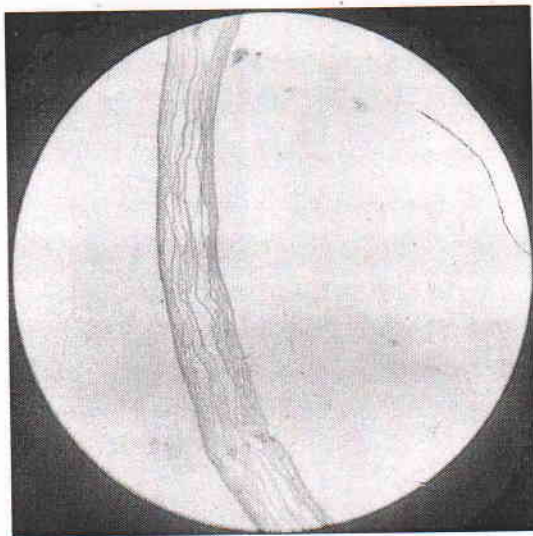


Рис.24. Контрольный глаз.
Роговица имеет слоистое строение,
как и в экспериментальном глазу.
Слои заселены фибробластами
(кератоцитами). Окраска
гематоксилин-эозином. Ув. X40

Рис.23. 6 месяцев после операции.
Лимбальная область. Послойная
интраламеллярная имплантация
материала. Воспалительные клетки
отсутствуют. Окраска гематоксилин-
эозином. Ув. X400

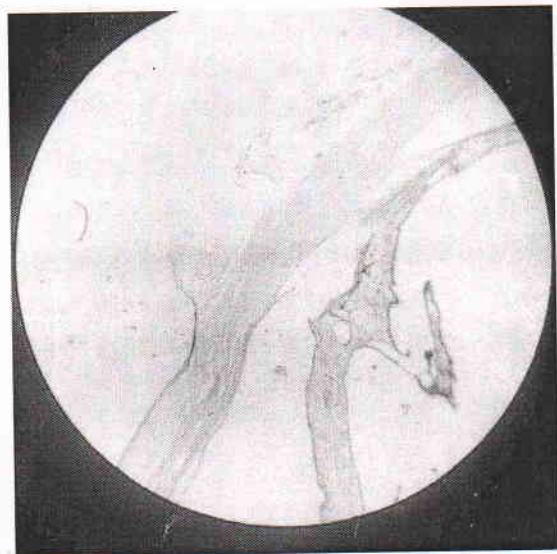


Рис.25. Контрольный глаз. Зона
лимба, цилиарного тела и радужки.
Сосуды не расширены,
воспалительные клетки отсутствуют.
Окраска гематоксилин-эозином. Ув.
X40

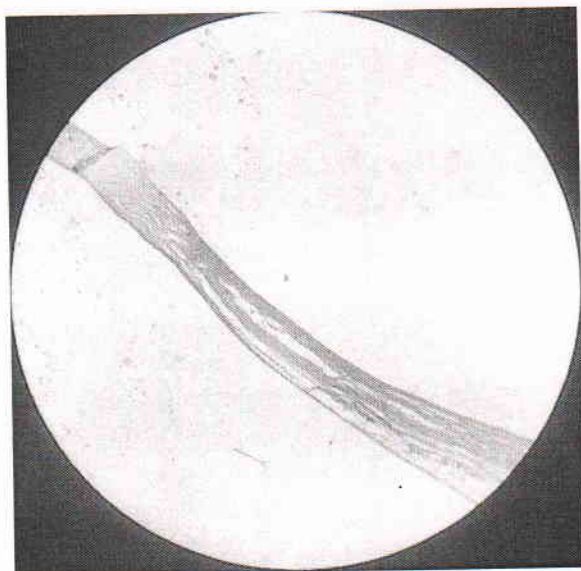


Рис.20. 6 месяцев после операции. Послойная интраламеллярная имплантация материала. Слой эпителиальных клеток и эндотелий сохранены на всем протяжении препарата. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. X40

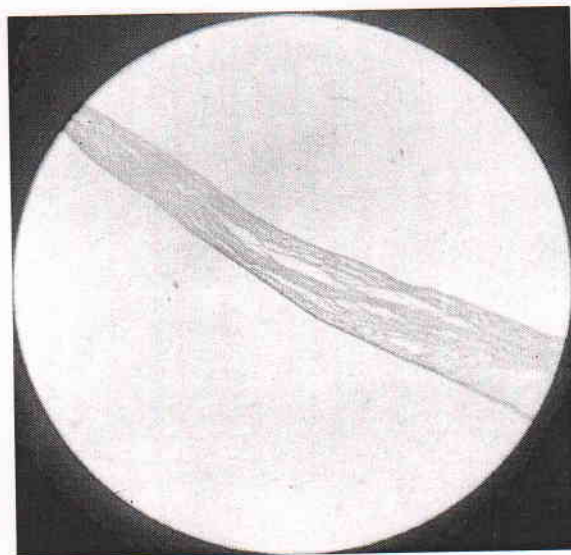
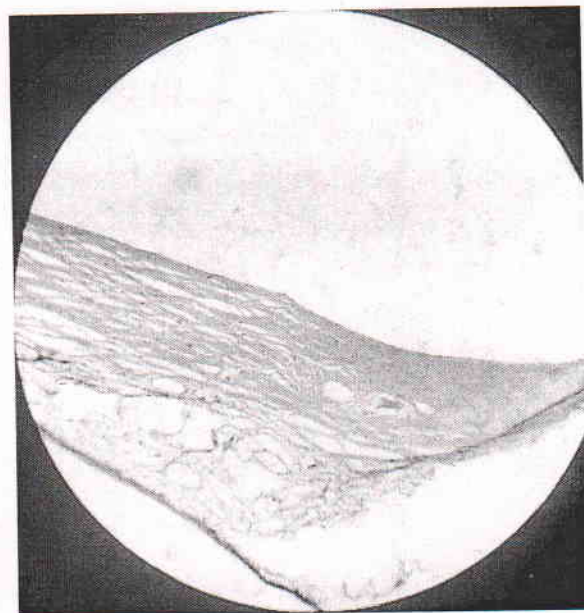
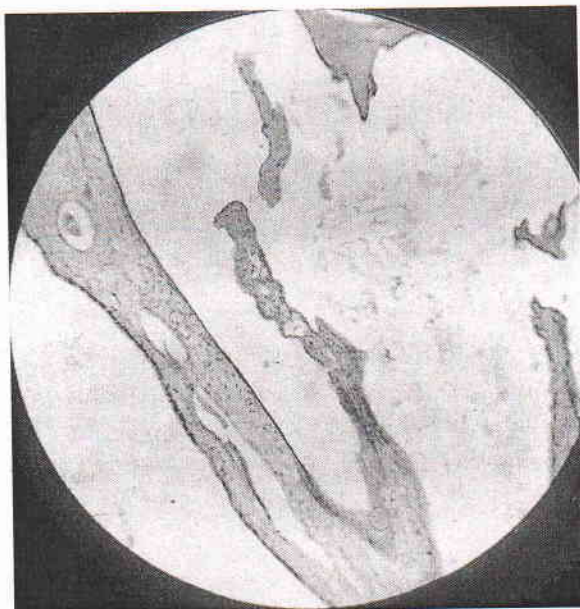


Рис.21. 6 месяцев после операции. Послойная интраламеллярная имплантация материала. Слои материала интегрированы со слоями роговицы реципиента. Область перехода не определяется. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. X40



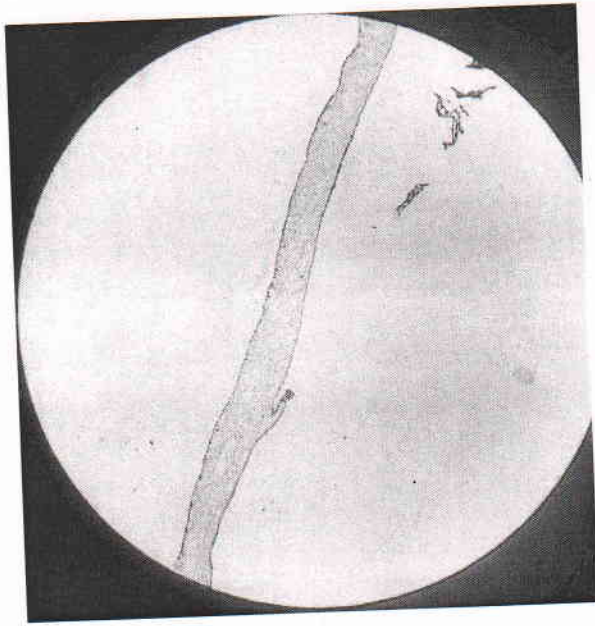


Рис.18. 6 месяцев после операции. Радужная оболочка экспериментального кролика, сосуды не расширены, воспалительные клетки отсутствуют. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. X40

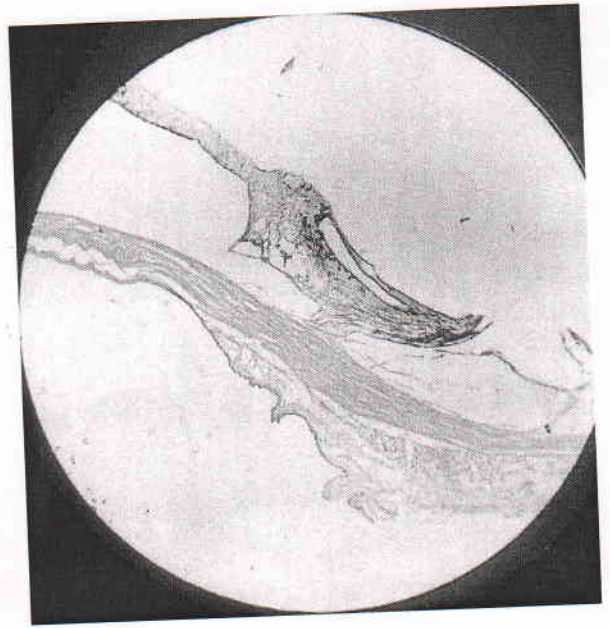


Рис.19. 6 месяцев после операции. Цилиарное тело и лимбальная область. Воспалительные клетки отсутствуют. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. X400

Через 6 месяцев после операции в группе послойной интраламеллярной кератопластики также по всей поверхности роговицы, включая область трансплантата, сформирована равномерная на всем протяжении базальная мембрана. Слой базальных клеток эпителия и более поверхностных слоев сформирован, равномерен и не имеет видимых отличий над интактной стромой и областью имплантированного материала. Воспалительные клетки во всех слоях интактной роговицы и имплантированного материала отсутствуют. Фибробласты (кератоциты) расположены в строме роговицы и имплантированного материала параллельно. В количественном отношении нет различий в интактной роговице и имплантированном материале (рис. 20,21). Отмечается большая плотность слоев в имплантированном материале, что определяется по более интенсивной окраске материала. Имплантированный материал имеет слоистое строение подобное строению нормальной роговицы при этом слои роговицы без видимо пограничной зоны переходят в слои имплантированного материала, составляя единое целое образование. Эндотелиальный слой определяется на всем протяжении препарата. Радужная оболочка и цилиарное тело без признаков инфильтрации воспалительными клетками (рис.22,23) и практически, эти структуры не отличаются от этих же структур контрольного глаза (рис.24 - 27).

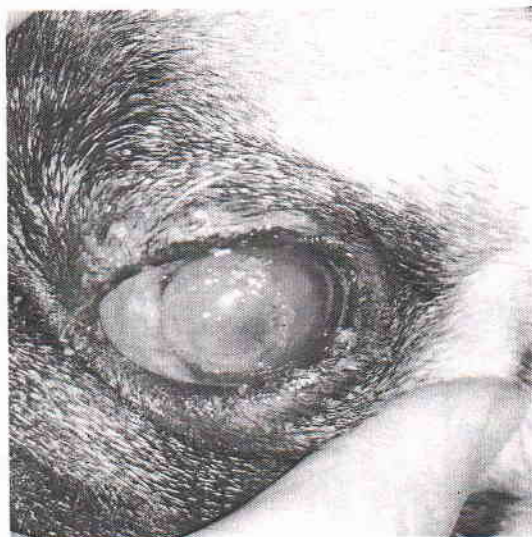


Рис.32.Имплантация замороженной роговицы. Роговица реципиента отечна, ее эпителий утолщен, глубжележащие отделы не просматриваются

Результаты гистологического исследования подтверждаются протоколом-заключением б/н ООО Аптос (прилагается), из которого следует, что материал Корнеопласт обладает высокой биосовместимостью с тканями роговицы и не вызывает реакции отторжения.

Заключение. Материал «Корнеопласт» позволяет использовать его для замещения роговичной ткани при сквозных, интраламеллярных послойных, наружных послойных имплантациях и послойных покрытиях гнойных язв роговицы.

Ректор, д.в.н., профессор

Позябин С.В.

Аспирант кафедры ветеринарной хирургии

Орлова М.Н.

Научный сотрудник, к.м.н.

Попов И.А.

Офтальмохирург, к.м.н.

Анисимова Н.С.

Научный консультант, д.м.н., профессор

Анисимов С.И.