

ОРИГИНАЛЬНЫЙ ДВУХКОМПОНЕНТНЫЙ АУТОФИБРИНОВЫЙ КЛЕЙ ДЛЯ ФИКСАЦИИ АМНИОТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ К СТРОМЕ РОГОВИЦЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Малафеева А.Ю.*¹, Гаврилюк И.О.¹, Самусенко И.А.²,
Куликов А.Н.¹

¹ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова»,
Санкт-Петербург

² ФГБУ ВЦЭИРМ им. А.Н. Никифорова, Санкт-Петербург

DOI: 10.25881/BPNMSC.2021.10.55.019

Резюме. В современной офтальмохирургии наиболее часто фиксация тканей и трансплантатов на глазной поверхности осуществляется с помощью швов, но в связи с развитием клеточно-тканевых технологий актуальными являются альтернативные бесшовные методы фиксации. Развитие этого направления не менее важно, чем поиск новых способов лечения заболеваний. Перспективным вариантом бесшовной фиксации тканей и трансплантатов в офтальмологии является применение синтетических и биологических клеевых композиций. Например, использование фибринового клея в зарубежной офтальмохирургии широко описано в литературе, но его применение отечественными хирургами ограничено высокой стоимостью готового продукта, а также малым опытом использования. В России зарегистрирован медицинский цианоакрилатный клей «Сульфакрилат», который применяется некоторыми офтальмохирургами для экстренной герметизации ранений склеры и роговицы, а также при операциях на экстраокулярных мышцах. В 2019 г. специалистами кафедры офтальмологии ВМедА им. С.М. Кирова был разработан способ приготовления аутологичного двухкомпонентного фибринового клея (патент на изобретения RU № 2704256). Представляются перспективными экспериментально-клинические исследования для внедрения разработанной клеевой композиции в хирургическую практику врачей-офтальмологов.

Цель: экспериментально обосновать возможность применения оригинального двухкомпонентного аутологичного фибринового клея для фиксации амниотической мембраны к строме роговицы.

Материалы и методы: исследование проводилось на 15 кроликах породы Шиншилла (30 глаз). Всем животным выполнялась поверхностная кератэктомия, не затрагивая область лимба. Затем заранее подготовленная нативная амниотическая мембрана накладывалась на строму роговицы и фиксировалась 3 способами. В зависимости от способа фиксации амниотической мембраны животные были разделены на 3 экспериментальные группы. Группа А (10 глаз) – фиксация узловыми швами, Б (10 глаз) – фиксация синтетическим клеем «Сульфакрилат», В (10 глаз) – фиксация разработанным двухкомпонентным аутофибриновым клеем. Всем животным на контрольные сроки после проведения операции (1-е, 3-и, 5-е, 7-е, 10-е, 14-е, 21-е и 30-е сутки) выполнялось биомикроскопическое исследование глазной поверхности, фоторегистрация, а также оптическая когерентная томография. Проводилась оценка состоятельности швов, степени прилегания амниотической мембраны к глазной поверхности, прозрачности роговицы (по шкале Ф.С. Войно-Ясенецкого), а также контроль процессов эпителизации (по проекционной сетке) и неоваскуляризации (по шкале Т. Inatomi). На 30-е сутки выполнялось гистологическое исследование роговиц.

Ключевые слова: фибриновый клей, амниотическая мембрана, клеевая фиксация, аутологичность, роговичная поверхность.

Введение

Наиболее часто фиксация тканей и трансплантатов на глазной поверхности осуществляется с помощью швов. Несмотря на развитие хирургических техник и технологий изготовления шовного материала, этот метод связан с повышенным послеоперационным дискомфортом, а также с увеличенной длительностью хирургического вмешательства и требует определенного уровня

ORIGINAL TWO-COMPONENT AUTOFIBRINE GLUE FOR FIXING THE AMNIOTIC MEMBRANE TO THE CORNEAL STROMA IN THE EXPERIMENT

Malafeeva A.Yu.*¹, Gavrilyuk I.O.¹, Samusenko I.A.²,
Kulikov A.N.¹

¹ S.M. Kirov Military medical academy, St. Petersburg

² The Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St Petersburg

Abstract. In modern ophthalmic surgery, the fixation of tissues and grafts on the ocular surface is most often carried out with the help of sutures, but in connection with the development of cell-tissue technologies, alternative seamless fixation methods are relevant. The development of this area is no less important than the search for new methods of treating diseases. A promising option for seamless fixation of tissues and grafts in ophthalmology is the use of synthetic and biological adhesive compositions. For example, the use of fibrin glue in foreign ophthalmic surgery is widely described in the literature, but its use by domestic surgeons is limited by the high cost of the finished product, as well as by little experience of use. In Russia, a medical cyanoacrylate glue «Sulfacrylate» is registered, which is used by some ophthalmic surgeons for urgent sealing of sclera and cornea wounds, as well as during operations on extraocular muscles. In 2019, the specialists of the Military medical academy of S.M. Kirov developed a method for preparing an autologous two-component fibrin glue (patent for invention RU № 2704256). It is required to conduct experimental clinical studies to introduce the developed adhesive composition into the surgical practice of ophthalmologists.

Aim: to substantiate experimentally the possibility of using an original two-component autologous fibrin glue for fixing the amniotic membrane to the corneal stroma.

Materials and methods: the study was carried out on 15 Chinchilla rabbits (30 eyes). All animals underwent superficial keratectomy without affecting the limbus. After that, a previously prepared native amniotic membrane was applied to the corneal stroma and fixed in 3 ways. The animals were divided into 3 experimental groups depending on the method of fixation of the amniotic membrane. Group A (10 eyes) — fixation with interrupted sutures, B (10 eyes) — fixation with synthetic glue «Sulfacrylate», C (10 eyes) — fixation with a developed two-component autofibrin glue. All animals underwent biomicroscopic examination of the ocular surface, photographic registration, for control periods after the operation (1st, 3rd, 5th, 7th, 10th, 14th, 21st and 30th days) as well as optical coherence tomography. The assessment of the consistency of the sutures, the degree of adherence of the amniotic membrane to the ocular surface, the transparency of the cornea. On the 30th day, histological examination of the corneas was performed.

Keywords: fibrin glue, amniotic membrane, adhesive fixation, autologous, corneal surface.

мастерства у исполнителя [1]. Именно поэтому ведется непрерывный поиск альтернативных бесшовных методов фиксации тканей [2; 3]. Развитие этого направления не менее важно, чем поиск новых способов лечения заболеваний. Перспективным вариантом бесшовной фиксации тканей и трансплантатов в офтальмологии является применение синтетических и биологических клеевых композиций [4; 5]. Например, использование фибринового клея в

* e-mail: Anna.Malafeeva.BMA@yandex.ru

зарубежной офтальмохирургии широко описано в литературе, но его применение отечественными хирургами ограничено высокой стоимостью и малодоступностью готового продукта [6; 7].

В России зарегистрирован медицинский цианакрилатный клей «Сульфакрилат», который применяется некоторыми офтальмохирургами для экстренной герметизации ранений склеры и роговицы, а также при операциях на экстраокулярных мышцах. В 2019 г. специалистами кафедры офтальмологии ВМедА им. С.М. Кирова был разработан способ приготовления двухкомпонентного аутологичного фибринового клея (ДАФК) (патент на изобретения RU № 2704256) [8]. Проведение экспериментально-клинических исследований позволит быстро внедрить разработанную клеевую композицию в хирургическую практику врачей-офтальмологов.

Цель исследования. Экспериментально обосновать возможность применения оригинального ДАФК для фиксации амниотической мембраны (АМ) к строме роговицы.

Материалы и методы исследования

Исследование проводилось на 15 кроликах породы Шиншилла (30 глаз). На реализацию эксперимента получено разрешение Комитета по вопросам этики при Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (протокол №215 от 05 ноября 2018 года). Все хирургические манипуляции выполнялись под местной инстилляционной (проксиметакан 0,5%) и ретробульбарной анестезией (лидокаин 2,0%). Кроликов фиксировали методом тугого пеленания тканью. Глазное яблоко выводили и фиксировали с помощью перчаточной резинки. Ножом-кератомом 2,2 мм выполняли расслоение роговицы и отсечение поверхностных слоев стромы микрохирургическими ножницами по кругу, не затрагивая область лимба. Затем заранее подготовленная и фиксированная на специальном держателе (патент на изобретение RU № 2680471) нативная АМ накладывалась на строму роговицы и фиксировалась 3 способами [9]. В зависимости от способа фиксации АМ животные были разделены на 3 экспериментальные группы. Группа А (10 глаз) — 1-я контрольная — фиксация узловыми швами, Б (10 глаз) — 2-я контрольная — фиксация синтетическим клеем «Сульфакрилат», В (10 глаз) — основная — фиксация разработанным ДАФК. Клеевые композиций в обеих группах наносились капельно, как на строму роговицы, так и поверх АМ.

Для фиксации и анализа полученных результатов на контрольные сроки после проведения операции (1-е, 3-е, 5-е, 7-е, 10-е, 14-е, 21-е и 30-е сутки) всем животным выполняли биомикроскопическое исследование глазной поверхности, фоторегистрацию, а также оптическая когерентная томографию роговиц. Проводилась оценка состоятельности швов, степени прилегания АМ к глазной поверхности. Для количественной оценки площади деэпителизации роговицы, хода ее регенерации исполь-

зовали методику, предложенную М.В. Сухининым [10]. Проекционную циркулярную сетку, в которой площадь каждой ячейки составляла 0,3%. Сетку помещали на цифровой фотоснимок фронтальной проекции роговицы и по сумме площади ячеек, прокрашиваемых флуоресцеином, судили о площади деэпителизации роговицы. Интенсивность помутнения роговицы оценивали по 10-балльной шкале: 1–2 балла — прозрачная, 3 — почти прозрачная, 4–5 — полупрозрачная, 6–10 — мутная [11]. Степень неоваскуляризации роговицы оценивали по 4-балльной шкале в зависимости от длины новообразованных сосудов: 0 баллов — отсутствие сосудов, 1 — до 2 мм, 2 — до 4 мм, 3 — до 6 мм [12]. На 30-е сутки выполнялось гистологическое исследование роговиц. Роговицу глаза фиксировали в 10% растворе забуференного формалина в течение 24 часов, после чего материал проходил стандартную обработку в изопропиловом спирте и парафине для изготовления гистологических препаратов с толщиной серийных парафиновых срезов 3–5 мкм. Для микроскопического исследования срезы окрашивались гематоксилином и эозином.

Полученные результаты. Более раннее начало эпителизации роговицы отмечено в группе В уже на 1-е сутки (в группе А на 7-е сутки, в группе Б на 21-е сутки). Полная эпителизация роговицы наступила раньше также в группе В — на 10-е сутки (против 30-х суток в группе А и Б). По данным биомикроскопии роговиц на 30-е сутки прозрачность роговицы в группе В была значительно выше (1 балл), чем в группе А (3 балла) и Б (8 баллов). Наличие неоваскуляризации было выявлено в группах А и Б (3 балла). В группе Б на 21-е сутки клеевая пленка оставалась только в нижне-внутренних квадрантах, в центральных отделах визуализировался дефект роговицы до десцеметовой мембраны диаметром 4 мм, к краям которого подходили новообразованные сосуды, к 30-м суткам биомикроскопическая картина была без изменений, дефект роговицы сохранялся (Рис. 1).

По данным сравнительной оптической когерентной томографии на 30-е сутки в группе А эпителий в центральных отделах неадгезирован, визуализируются субэпителиальные кисты, АМ присутствует только в параоптической области и постепенно истончается до полного исчезновения в оптической зоне. В группе Б АМ не визуализируется, в связи с постепенным отторжением АМ вместе с клеевой композицией. В группе В АМ визуализируется на всем протяжении, эпителий полностью адгезирован.

При проведении морфологического исследования роговиц на 30-е сутки было установлено, что заживление сопровождалось типовыми репаративными процессами: эпителизацией многослойным плоским эпителием. Полная репарация эпителия роговиц с восстановлением его анатомического расположения наблюдалась только в группе В. В группах А и Б наблюдалась регенерация и инклюзии эпителия в толщу собственного вещества роговицы (Рис. 2 и 3). Воспалительная инфильтрация в

Малафеева А.Ю., Гаврилюк И.О., Самусенко И.А. и др.
ОРИГИНАЛЬНЫЙ ДВУХКОМПОНЕНТНЫЙ АУТОФИБРИНОВЫЙ КЛЕЙ ДЛЯ ФИКСАЦИИ
АМНИОТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ К СТРОМЕ РОГОВИЦЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

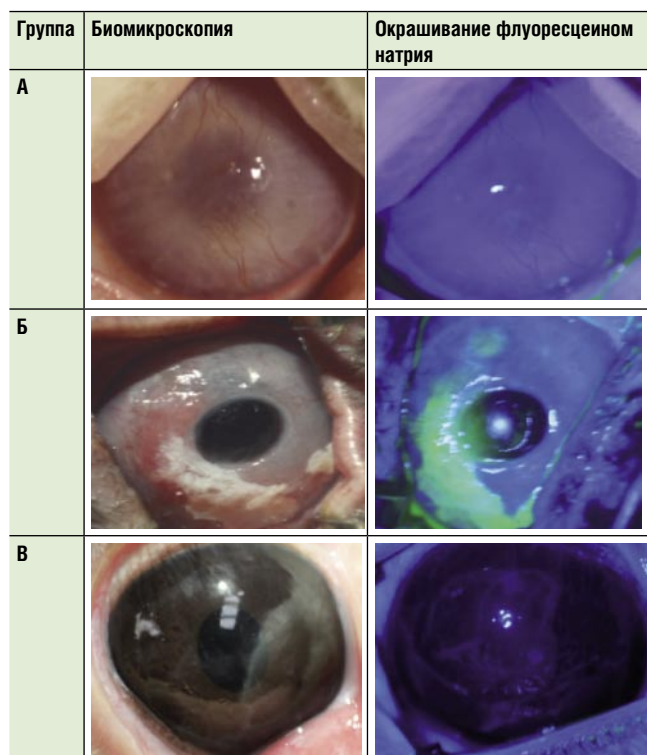


Рис. 1. Биомикроскопическое исследование роговиц, в том числе при окрашивании флуоресцеином натрия на 30-е сутки после проведения операции.

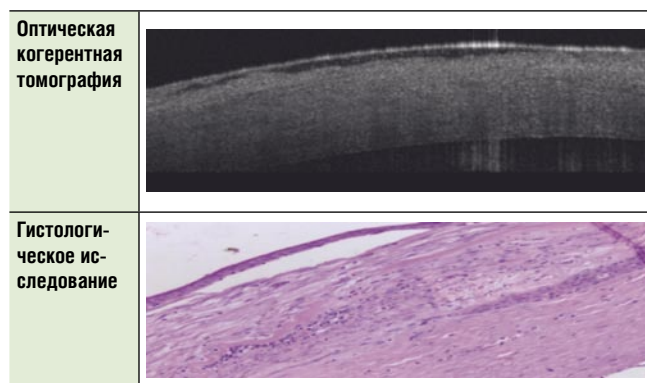


Рис. 2. Роговица глаза кролика с фиксацией амниотической мембраны хирургическими швами, 30-е сутки. Полная эпителизация раны с остатками АМ, субэпителиальными кистами, воспалительной инфильтрацией, васкуляризацией. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 200.

ткани роговицы отсутствовала только в группе В, в группе А она была незначительной. Васкуляризация роговицы отсутствовала только в группе В (Рис. 4).

Выводы

1. Фиксация АМ, разработанным ДАФК, обеспечивает более раннее начало эпителизации роговицы (в группе В на 1-е сутки, против 7-х и 21-х суток в группах А и Б, соответственно).

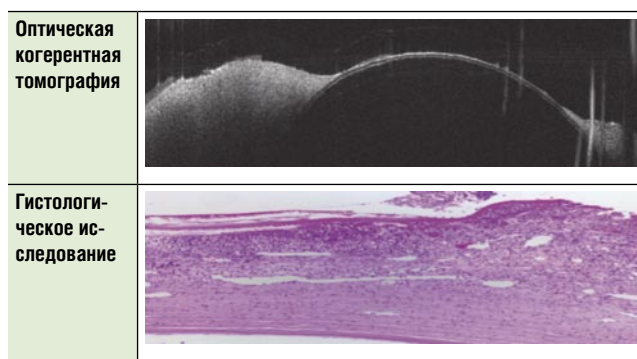


Рис. 3. Роговица глаза кролика с фиксацией АМ синтетическим клеем «Сульфакрилат», 30-е сутки. Отсутствие эпителизации раны, АМ разрушена, выраженная воспалительная инфильтрация, васкуляризация. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 200.

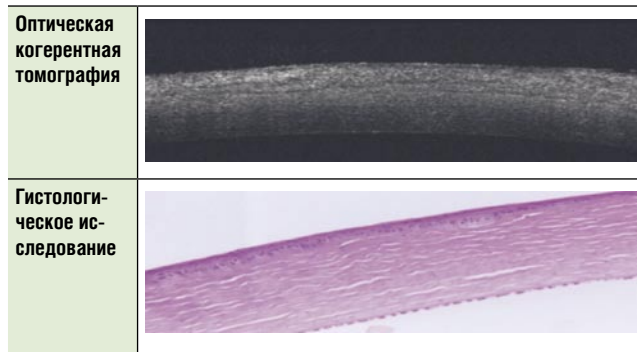


Рис. 4. Роговица глаза кролика с фиксацией АМ разработанным ДАФК, 30-е сутки. Полная эпителизация раны поверх АМ. Воспалительная инфильтрация и васкуляризация отсутствуют. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 200.

2. Фиксация АМ, разработанным ДАФК, обеспечивает сохранение АМ в течение всего срока наблюдения (в группе А с 10-х суток отмечен лизис АМ в центральных отделах, в группе Б на 30-е сутки АМ не визуализировалась).
3. ДАФК, приготовленный по разработанному нами способу, может быть использован в офтальмохирургии для фиксации АМ к строме роговицы.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов (The authors declare no conflict of interest).

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Hersh PS, Zigelbaum BM, Cremers SL. Ophthalmic Surgical Procedures Thieme; 2009.
2. Szurman P, Warga M, Grisanti S, et al. Sutureless amniotic membrane fixation using fibrin glue for ocular surface reconstruction in a rabbit model. *Cornea*. 2006; 25: 460–466.
3. Romano V, Cruciani M, Conti L, Fontana L. Fibrin glue versus sutures for conjunctival autografting in primary pterygium surgery. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016; 12(12): CD011308. doi: 10.1002/14651858.CD011308.pub2.
4. Мальцев Д.С., Рудько А.С., Куликов А.Н., и др. Влияние экстракта амниотической мембраны на эпителизацию и неоваскуляризацию в моделях повреждения роговицы // Тихоокеанский медицинский журнал. — 2018. — №2. — С. 46–49. [Maltsev DS, Rudko AS, Kulikov AN, et al.

- The effect of amniotic membrane extract on epithelialization and neovascularization in models of corneal damage. *PMJ*. 2018; 2: 46–49. (In Russ.) doi: 10.17238/PMJ1609-1175.2018.2.46–49.
5. Ушаков Р.В., Локтев Д.А. Повышение эффективности операции синус-лифтинга с использованием фибрин-тромбинового герметика «Криофит» // Главный врач Юга России. — 2018. — Т. 61. — №5. — С. 37–40. [Ushakov R., Loktev D. Increase of efficiency of sinus lifting operation with using fibrin-thrombin sealant «cryophyte». *Glavnyi vrach yuga Rossii*. 2018; 5(61): 37–40. (In Russ).]
 6. Choudhari NS, Neog A, Sharma A, et al. Our experience of fibrin sealant-assisted implantation of Ahmed glaucoma valve. *Indian J Ophthalmol*. 2013; 61(1): 23–7. doi: 10.4103/0301-4738.99976.
 7. Zloto O, Greenbaum E, Fabian ID, Ben Simon GJ. EviceL versus Tisseel versus Sutures for Attaching Conjunctival Autograft in Pterygium Surgery: A Prospective Comparative Clinical Study. *Ophthalmology*. 2017; 124(1): 61–65. doi: 10.1016/j.ophtha.2016.09.010.
 8. Патент РФ на изобретение №2704256 / 25.10.2019. Бюл. №30. Гаврилюк И.О., Куликов А.Н., Кузнецова А.Ю., Гаврилюк В.Н., Чурашов С.В., Черныш В.Ф. Способ приготовления аутологичного двухкомпонентного фибринового клея. [Patent RUS №2704256/25.10.2019. *Byul*. №30. Gavriilyuk IO, Kulikov AN, Kuznetsova AYU, Gavriilyuk VN, Churashov SV, Chernysh VF. Sposob prigotovleniya autologichnogo dvuhkomponentnogo fibrinovogo kleya. (In Russ).] Доступно по: <https://findpatent.ru/patent/270/2704256.html>. Ссылка активна на 24.12.2020.
 9. Патент РФ на изобретение №2680471 / 21.02.2019. Бюл. №6. Дубовиков А.С., Гаврилюк И.О., Куликов А.Н., Чурашов С.В., Черныш В.Ф., Безушко А.В., Александрова О.И., Блинова М.И. Способ иммобилизации нативной амниотической мембраны для транспортировки, консервации и применения ее в качестве носителя культивированных клеток. [Patent RUS №2680471 / 21.02.2019. *Byul*. №6. Dubovikov AS, Gavriilyuk IO, Kulikov AN, Churashov SV, Chernysh VF, Bezushko AV, Aleksandrova OI, Blinova MI. Sposob immobilizacii nativnoi amnioticheskoi membrane dlya transportirovki, konservacii i primeneniya ee v kachestve nosatelya kultivirovannih kletok. Accessed. (In Russ).] Доступно по: <https://findpatent.ru/patent/268/2680471.html>. Ссылка активна на 24.12.2020.
 10. Гололобов В.Г., Гайворонский И.В., Деев Р.В., и др. Репаративная регенерация многослойного эпителия роговицы: биотехнологический потенциал // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2008. — Т.4. — №3. — С. 55–59. [Gololobov VG, Gaivoronsky IV, Deev RV, et al. Reparative regeneration of multilayered corneal epithelium: biotechnological potential. *Cell transplantation and tissue engineering. Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2008; 3(4): 55–59 (In Russ).]
 11. Войно-Ясенецкий В.В. Разрастание и изменчивость тканей глаза при его заболеваниях и травмах. Киев: Вища школа, 1979. — 224 с. [Voyno-Yasenetsky VV. Expansion and variability of eye tissue during in its diseases and injuries. *Kiev: Vyssha Shcola*; 1979: 224 p. (In Russ).]
 12. Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N. Midterm results on ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation. *American Journal of Ophthalmology*. 2006; 141(2): 267–275. doi: 10.1016/j.ajo.2005.09.003.