

Изобретение относится к медицине, конкретно к офтальмологии, и может быть использовано для повышения жизнеспособности и увеличения сроков хранения роговой оболочки в процессе ее консервации.

Известен способ консервации роговой оболочки по методу акад. В.П.Филатова, заключающийся в хранении донорских глаз во влажной камере при температуре ... +2 ... +4°С, который считается наилучшим.

Этот способ консервации роговой оболочки, ставший классическим, является в настоящее время основным "поставщиком" трансплантационного материала для кератопластики, однако, срок хранения роговицы, особенно в целях сквозной кератопластики, ограничен до 2 сут.

При этом установлено, что одним из условий, играющих определяющую роль в исходе кератопластики, является сохранность заднего эпителия роговой оболочки, который в наибольшей мере подвержен структурно-морфологическим изменениям в процессе консервации.

Таким образом, способ консервации роговой оболочки по методу В.П.Филатова обладает существенным недостатком, состоящим в ограничении срока хранения энуклеированных глаз, превышение которого грозит выраженным изменением донорской роговицы, особенно ее эпителиальных элементов, что делает ее непригодной для использования в клинике при кератопластике.

Задачей изобретения является совершенствование способа консервации роговой оболочки глаза путем помещения глазного яблока в холодильную камеру в полом цилиндре из ферромагнитного материала и воздействуют в течение всего времени хранения однородным постоянным магнитным полем индукцией 12-15 мТл при расположении полюсов на его противоположных торцах и направлении вектора магнитного поля параллельно оси цилиндра и перпендикулярно роговой оболочке, в результате чего повышается жизнеспособность и увеличиваются сроки хранения роговой оболочки глаза.

Основанием для предложенной технологии послужили экспериментальные исследования, проведенные в четырех группах опытов. В первой группе изучалось влияние постоянного магнитного поля на митотические процессы в переднем эпителии роговой оболочки с применением напряженности 12-15 мТл. Исследования произведены на глазах 170 лягушек в прижизненных условиях. После воздействия, глаза энуклеировались. роговая оболочка выделялась и исследовалась под микроскопом фирмы "Карл Цейс" на предмет выявления стадий митотического цикла в переднем эпителии роговицы. Исследования показали, что под влиянием данного воздействия происходит достоверное увеличение числа эпителиальных элементов, которое достигает максимума через 7 ч после воздействия, затем наступает постепенное уменьшение их количества с последующей нормализацией к исходу 3-х суток наблюдений. Анализ стадий митотического цикла показал, что стимуляция происходит как за счет увеличения клеток вступающих в митоз на стадиях интерфазы, так и благодаря увеличению общего числа делящихся клеток на всех этапах митотического цикла. Установлено при этом, что в случае ориентации вектора направленности магнитного поля перпендикулярно роговице, число делящихся клеток было на порядок выше, чем при ориентировании его параллельно роговой оболочке.

Во второй группе опытов в аналогичных условиях проводилось изучение влияния постоянного магнитного поля на процесс деления передне-эпителиальных элементов с применением напряженности 36 мТл. Эти исследования показали, что в данных условиях происходит выраженное угнетение процесса митоза клеток переднего эпителия роговицы вплоть до полного подавления, которое наблюдается уже через 3 часа после воздействия. При этом установлено, что восстановление митотической способности клеток переднего эпителия наблюдается лишь спустя 5 суток и является более выраженным в случае ориентирования вектора магнитного поля перпендикулярно к роговой оболочке.

В третьей группе опытов электронно-микроскопически изучалось структурно-функциональное состояние клеточных и субклеточных элементов переднего и заднего эпителия под влиянием постоянного магнитного поля напряженностью 12-15 мТл и 36 мТл при той же экспозиции воздействия. Установлено, что напряженность магнитного поля 12-15 мТл вызывает в изучаемых клеточных элементах усиление внутриклеточных процессов и метаболических превращений, особенно со стороны белкового синтеза. При напряженности поля 36 мТл отмечалось его повреждающее действие, особенно на клеточные элементы заднего эпителия, что сопровождалось разрывом клеточных мембран, разрушением и гомогенизацией клеточных структур.

В четвертой группе опытов проводили исследования по консервации роговой оболочки в условиях по В.П.Филатову с применением постоянного магнитного поля индукцией 12-15 мТл. Данные исследования проведены на энуклеированных глазах кроликов с учетом набухания роговой оболочки и состояния клеток заднего эпителия. При этом глаза во влажной камере размещались в источнике магнитного поля цилиндрической формы с направленностью вектора магнитной индукции перпендикулярно и параллельно плоскости роговой оболочки. Для изучения сохранности и жизнеспособности переднего и заднего эпителия роговицы применялись методы "прижизненного" контроля за набуханием роговицы и состоянием заднего эпителия при помощи эндотелиального микроскопа HS-CEM-3 Фирмы Hoyer-Schulze (США), а также известные гистоморфологические методы приготовления и окрашивания срезов роговицы. Проводился также подсчет клеточных элементов переднего и заднего эпителия в центральном участке роговой оболочки на площади 1 мм² с последующей статистической обработкой полученных цифровых данных и определением достоверности полученных результатов. В общей сумме эта работа выполнена на 42 глазах кроликов с изучением их на протяжении 7 суток консервации.

Результаты исследования показали, что в процессе консервации роговой оболочки отмечается отек роговичной ткани, снижение ее прозрачности, уменьшение ее клеточных элементов, вакуолизация стромы роговицы. При этом, в случае ориентации вектора направленности магнитного поля перпендикулярно роговой оболочке разница в набухании между контролером и опытом была достоверно ниже на 9-2% в пользу постоянного магнитного поля. В случае ориентирования его продольно к роговой оболочке отек был меньше в опыте на 4,7%, но не носил достоверного различия.

Установлено, что в контрольной группе наблюдений передний эпителий роговицы в процессе консервации претерпевает выраженные изменения, заключающиеся в уменьшении способности ядер поглощать краситель, в увеличении межклеточных пространств и резком нарушении архитектоники слоев.

Особенно резкими эти сдвиги были на протяжении первых 1-2 сут наблюдений. В дальнейшем они прогрессировали, выражаясь в нарушении клеток переднего эпителия и уменьшении их количества, достигая максимума к исходу 7 суток наблюдений, по истечении которых наблюдалась дезинтеграция слоев и нарушение переднего эпителия.

Применение постоянного магнитного поля вызывало уменьшение описанных явлений, способствовало хорошей сохранности клеток переднего эпителия и сохранению его жизнеспособности. Об этом свидетельствовали высокие тинкториальные свойства клеток. Они имели хорошую архитектуру, а их количество на протяжении всего срока наблюдений почти на 50% было выше, чем в контроле в случае перпендикулярного ориентирования вектора магнитного поля; продольное его ориентирование обеспечивало сохранность, которая была выше на 36,8% ($P < 0,05$), в том же сравнении.

При изучении состояния заднего эпителия роговицы на контрольных глазах уже в первые сутки консервации резко изменилась обычная полигональная форма клеток, они становились округлыми, с неровными краями, увеличивались межклеточные промежутки, во многих местах задней поверхности роговицы клетки совсем не просматривались, их количество уменьшилось в два раза. К третьим суткам наблюдений отмеченные изменения усугубились, среди оставшихся клеток заднего эпителия невозможно отыскать клетки нормальной конфигурации-они просматривались только в виде "теней" или светлых пятен. Их количество и наличие по истечении 5 суток наблюдений определить было невозможно.

В опытах, где консервация проводилась с применением магнитного поля, клетки заднего эпителия также изменялись количественно и качественно, однако среди них подавляющее большинство сохраняло правильную форму, а их число было достоверно выше, чем в контроле, во все сроки наблюдений. Разница в количестве по истечении первых суток достоверно составила 21,9 % и 15,1% соответственно для перпендикулярного и горизонтального (вдоль роговицы) направления вектора магнитной индукции, а через 3 сут соответственно 42,6 и 36,7 в том же соотношении.

Следует отметить, что если в контроле по истечении 3-5 сут клетки заднего эпителия определялись плохо и их совсем не было видно, то в случае применения для консервации магнитного поля их количество было достаточно высоким (1428 ± 41) для перпендикулярного магнитного поля и (1089 ± 56) для горизонтального. Кроме того, клетки заднего эпителия хорошо просматривались и по истечении 7 сут наблюдений, а в контроле они, начиная с 5 сут наблюдений, не определялись.

Таким образом, проведенные исследования показали, что постоянное магнитное поле напряженностью 12-15 мТл является весьма эффективным фактором, положительно влияющим как на процесс давления клеточных элементов роговицы, на метаболические превращения в ней, особенно со стороны белкового синтеза, так и на сохранность клеточных элементов в процессе консервации. Установлено, что под влиянием данного магнитного поля достоверно менее выражено набухает роговая оболочка, лучше сохраняется форма клеток, пространственные взаимоотношения между ними, жизнеспособность и численные величины, по сравнению с контролем.

Показано, что положительное влияние постоянного магнитного поля на митотические процессы в клетке и сохранность эпителиальных элементов реализуется в большей мере при ориентации вектора магнитного поля перпендикулярно роговой оболочке.

Совокупность полученных данных позволила рекомендовать применение постоянного магнитного поля напряженностью 12-15 мТл в целях улучшения консервации роговой оболочки и подготовке ее для последующей пересадки в клинических условиях.

Пример, Больной С, история бол. № 212568, 43 года, поступил в институт им. акад. В.П. Филатова в клинику пересадки роговой оболочки 10.06.85 г. Диагноз: состояние правого глаза после сквозной кератопластики (мутный трансплантат), тотальное сосудистое бельмо роговицы, афакия, острота зрения - светоощущение с правильной проекцией света. Левый глаз здоров. Внутриглазное давление обоих глаз в норме.

При поступлении в институт правый глаз спокоен, тотальное сосудистое бельмо роговицы, глублежащие отделы не видны. Настоящее состояние правого глаза развилось в 1982 году после гнойной язвы роговицы, развившейся после травмы. Больному дважды проводили тотальную кератопластику, одна из которых была осуществлена одновременно с экстракцией катаракты, однако исход операции был отрицательным вследствие тотального помутнения трансплантата и развития сосудистого бельма. В институте больному была произведена очередная кератопластика с применением роговой оболочки, консервированной по методу В.П.Филатова с применением постоянного магнитного поля. Для этого был использован трупный глаз Бк 1144, взятый 08.06.85 г. от мужчины 61 года.

09.06.85 г. глаз донора для консервации роговой оболочки был помещен в холодильную камеру при температуре 2-4°C. Для повышения жизнеспособности клеточных элементов и увеличения сроков хранения путем дополнительного воздействия однородным постоянным магнитным полем, глазное яблоко поместили в полый цилиндр из ферромагнитного материала с расположением полюсов на его противоположных торцах и направлением вектора индукции магнитного поля напряженностью 12-15 мТл параллельно оси цилиндра и перпендикулярно роговой оболочке. Срок консервации роговой оболочки в описанных условиях, по сравнению с обычными, был увеличен в два раза и продолжился с 09.06.85 г. по 15.06.85 г.

15.06.85 г. больному была произведена частичная сквозная кератопластика диаметром 6 мм на правом глазу. Фиксация трансплантата непрерывным обвивным швом. Послеоперационный период протекал нормально и безреактивно. К моменту выписки 24.06.85 г. на правом глазу - прозрачный трансплантат, острота зрения - счет пальцев у лица, не корректирует. Более высокой остроте зрения препятствует надзрачковая пленка. По истечении 4 мес наблюдений состояние трансплантата не изменилось.

Предложенный способ консервации был апробирован в клинике пересадки роговой оболочки Одесского НИИ глазных болезней и тканевой терапии им. акад. В.П.Филатова на 13 больных.

Роговица, консервированная по предложенной методике, была использована для пересадки больным с разной этиологией и тяжестью помутнения роговой оболочки. Кератопластика была проведена с

использованием роговицы, консервированной в однородном постоянном магнитном поле напряженностью 12-15 мТл; при этом сроки консервации по сравнению с общепринятыми (до 2-х сут) были увеличены в 2-3 раза.

Анализ клинических исходов пересадки роговой оболочки показал, что послеоперационный период у всех прооперированных протекал безреактивно, имели место выраженная активизация репаративных процессов, сокращение сроков приживания донорского материала и его прозрачное приживание.

Наблюдения на протяжении 7 лет за послеоперационными больными показали, что во всех случаях пересадки прозрачность роговой оболочки сохранялась без каких-либо изменений. Таким образом, экспериментальные и предклинические испытания предложенного способа показали его существенные преимущества, заключающиеся в повышении жизнеспособности, увеличении сроков хранения донорских глаз и более высоком клиническом эффекте кератопластики с применением нового метода консервации роговой оболочки.