

На правах рукописи



Филиппова Екатерина Олеговна

**РАЗРАБОТКА ПОЛИМЕРНЫХ КЕРАТОИМПЛАНТАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
БУЛЛЁЗНОЙ КЕРАТОПАТИИ**

Специальность: 2.2.12. – Приборы, системы и изделия медицинского назначения

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора технических наук

Томск – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

Научные консультанты: д-р физ.-мат. наук, профессор
Владимир Федорович Пичугин

д-р физ.-мат. наук, профессор
Юрий Юрьевич Крючков

Официальные оппоненты: **Шаркеев Юрий Петрович**
д-р физ.-мат. наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физики прочности и материаловедения Сибирского отделения Российской академии наук, лаборатория физики наноструктурных биокompозитов, заведующий лабораторией;

Новиков Алексей Алексеевич
д-р техн. наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный технический университет», кафедра Машиностроение и материаловедение, профессор;

Фролов Сергей Владимирович
д-р техн. наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Гамбовский государственный технический университет», кафедра Биомедицинская техника, заведующий кафедрой.

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет».

Защита состоится «05» апреля 2022 г. в 14 ч 00 мин на заседании диссертационного совета 24.2.347.02 в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Новосибирский государственный технический университет» по адресу: 630073, Новосибирск, пр-кт К. Маркса, 20, I корпус, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Новосибирского государственного технического университета и на сайте www.nstu.ru

Дата рассылки автореферата диссертации «__» января 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
д-р техн. наук, доцент

Максим Андреевич Степанов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования.

В основе буллёзной кератопатии (БК) лежит развитие хронического отека тканей роговицы, сопровождающееся значительным снижением остроты зрения и выраженным болевым синдромом. БК занимает одну из лидирующих позиций среди причин корнеального слабовидения на территории Российской Федерации. По некоторым данным распространенность БК занимает 2-3% среди всей офтальмопатологии. Несостоятельность барьерной функции эндотелиального слоя роговицы, по мнению ряда авторов, возникает в большинстве случаев вследствие хирургических вмешательств на переднем отрезке глаза: в 11,3% – после экстракции катаракты с имплантацией заднекамерной интраокулярной линзы (ИОЛ); в 14% – при имплантации переднекамерной ИОЛ; в 5,8% – после антиглаукомных операций, а также в результате эндотелиальной дистрофии Фукса. Объем потери эндотелиоцитов коррелирует с размером роговичного разреза, его расположением, степенью плотности катаракты, параметрами используемого ультразвука и объемом ирригационной жидкости, а также зависит от конкретной клинической ситуации.

Повреждение эндотелиального слоя роговицы вследствие непосредственного контакта с хирургическими инструментами, радужкой, хрусталиком является интраоперационной причиной развития БК. В работе З.И. Мороз приводятся данные, что неадекватно охлажденный наконечник факоэмульсификатора способствует разрушению эндотелиоцитов роговицы и денатурации стромальных протеинов, что приводит к локальному «обнажению» десцеметовой мембраны и развитию отека стромы роговицы. Пациенты с исходно низкой плотностью эндотелиальных клеток роговой оболочки и наличием соматических заболеваний (сахарный диабет, гипертоническая болезнь) более подвержены риску возникновения интраоперационных осложнений с последующим развитием БК. Единого мнения относительно механизма, ведущего к понижению плотности эндотелия роговицы вследствие высокого внутриглазного давления, нет, однако существуют гипотезы, указывающие на роль компрессионного механизма воздействия на эндотелиоциты, а также на наследственную предрасположенность и токсическое влияние фармакологических препаратов. Недостаточность знаний о механизмах инициации, развития и прогрессировании БК обуславливает отсутствие единой, патогенетически обоснованной тактики лечения заболевания.

Лечебные мероприятия данного заболевания в настоящее время проводятся в двух направлениях: консервативном и хирургическом. Консервативное лечение БК является недостаточно эффективным, обеспечивая лишь кратковременный положительный результат. Радикальным способом лечения заболевания является кератопластика, позволяющая достичь как лечебного, так и оптического эффекта.

Одним из перспективных направлений в лечении БК является применение кератоимплантатов на основе полупроницаемых мембран, способных к нормализации движения жидкости в роговичной ткани вследствие их избирательной проницаемости и поддержанию роговицы в слабо дегидрированном состоянии. Для достижения ключевых задач лечения (уменьшение отека роговой оболочки, нормализации строения переднего эпителия) необходимо создать пористый имплантат, отвечающий ряду требований: биосовместимость с тканями, клетками, а также жидкостями (в данном случае – с внутриглазной жидкостью) органа зрения; биоинертность; высокие коэффициент пропускания и прозрачность; удовлетворительные механические характеристики (гибкость, эластичность и, в то же время, прочность); контролируемая растворимость и безопасный гидролиз для резорбируемого изделия, а также подходящий под задачи диаметр пор и геометрия сквозного отверстия. В связи с чем, необходим поиск материала и типа мембран, отвечающих указанным условиям будущего кератоимплантата.

Из всех существующих мембран (ионообменные, клеточные матрицы (скаффолды), жидкие) наиболее перспективными в создании кератоимплантата являются трековые, так как они обладают уникальными характеристиками, такими как возможность варьирования размеров пор и их количество на единицу площади в зависимости от функционального назначения, малая дисперсия пор по размерам, низкий уровень дефектности, высокая селективность. На сегодняшний день в качестве полимерной матрицы для создания трековых мембран используют плёнки из поликарбоната, полиэтилентерефталата (ПЭТФ), полиимида, полипропилена, полиэтиленнафталата, фторированных полимеров. Каждый из указанных полимеров имеет свои преимущества и недостатки, а также отработанную методику создания однородной пористой структуры методом ионно-трековой технологии. Стоит указать, что трековые мембраны (ТМ) из ПЭТФ ранее использовались в офтальмологических приложениях как дренажная система в хирургии рефрактерной глаукомы (Л.И. Кравец, Т.В. Рязанцева). Несмотря на перспективные результаты применения ТМ в офтальмологических приложениях, остается неясным возможность использования данного типа мембран в хирургии заболеваний роговицы.

Использование ТМ в качестве кератоимплантатов в лечении буллезной кератопатии позволит решить актуальную проблему корнеального слабовидения среди пациентов с эндотелиальной дисфункцией как на территории РФ, так и за ее пределами. Кроме того, применение полимерного пористого кератоимплантата уменьшит отек роговой оболочки, нормализует строение переднего эпителия, купирует буллы и эрозии на поверхности роговицы, что улучшит качество жизни больного с нарушенной функцией эндотелия.

Степень разработанности темы исследования.

Разработка и создание роговичных имплантатов для применения в кератопластике ведутся на протяжении последних пятидесяти лет. Так, например, Claes H.

Dohlman использовал имплантаты на основе глицерил-метакрилатных дисков, которые при длительном пребывании в роговице снижали способность проходить водянистой влаге в ее слои и, как следствие, нарушали метаболизм роговой оболочки. S.L. Lane и J.B. Crawford провели серию имплантаций полисульфоновых и силиконовых линз в слои роговой оболочки, однако они способствовали образованию капсулы, эпителиальных кист, истончению переднего эпителия, что нарушало оптические свойства роговицы. Ferrara de Chunha P. использовал имплантат на основе полиметилметакрилата, но материал давал высокий процент зрительных аберраций и нарушение сумеречного зрения. З.Н. Джанаева произвела имплантацию пористого тетрафторэтилена для закрытия дефектов роговицы, но спустя некоторое время полимер был отторгнут. К. Tonsomboon разработал мембрану из альгината как имплантат для лечения роговичных заболеваний, однако он не обеспечивал достаточную адгезию материала к тканям глаза. Liqiang Wang предпринял попытки апробировать мембрану из аргинилглициласпарагиновой кислоты в хирургии роговицы, но не получил удовлетворительных результатов.

В последнее время всё больший интерес для офтальмологии вызывают биодеградируемые полимеры, которые имеют огромное преимущество над нерастворимыми материалами – возможность контролировать скорость растворения путём изменения их структуры. Биоразлагаемые полимеры изготавливаются на основе разнообразных материалов: сложные полиэфиры (лактид и гликолид сополимеры, поликапролактоны, поли (-гидроксибутираты)), полиамиды (включая природные полимеры, такие как коллаген, желатин и альбумин), гетерополисахариды (хитозан), полимеры молочной и гликолевой кислот и их сополимеры. Так, например, полиамино-ко-гликолевая кислота из-за своей высокой биосовместимости и прозрачности получила широкое распространение в офтальмологии, однако в кератопластике в качестве роговичного имплантата полимер вызывал умеренную воспалительную реакцию в нижней 1/3 строме роговицы, выраженной в виде макрофагально-лимфоцитарной инфильтрации, и значительную – в передней 1/3 основного вещества роговой оболочки.

Naleh Bakhshandeh совместно с другими учёными разработали имплантат на основе мембраны из поли-ε-капролактона, обработав его предварительно плазмой. Несмотря на ряд достоинств данного изделия материал не получил своего дальнейшего развития в кератопластике из-за высокой себестоимости и сложности изготовления.

Российские ученые М.М. Дронов и В.С. Каранов апробировали желатиновую пленку в качестве имплантата для лечения дистрофий роговицы, однако получили выраженный индуцированный астигматизм.

Привлекательным материалом для разработки внутрироговичных имплантатов оказался гидрогель и различные его модификации. Множество работ по исполь-

зованию имплантата на основе гидрогеля в кератопластике подтверждали факт помутнения материала, его чрезмерную «мягкость» и, как следствие, затрудненную имплантацию.

T. Fuchsluger осуществил имплантацию коллагеновых мембран, которые способствовали клеточной гиперплазии и реорганизации коллагеновых волокон. P. Rama, апробируя имплантацию фибринового матрикса с эпителиальными клетками, получил случаи аллогенного отторжения данного типа полимера и развитие воспалительных реакций.

Таким образом, опыт применения различных имплантатов полимерного происхождения в кератопластике показал отсутствие единого решения в изготовлении изделий для роговицы и необходимость дальнейшей разработки материалов.

Целью диссертационной работы является разработка кератоимплантатов на основе полиэтилентерефталата и полимолочной кислоты для хирургического лечения буллёзной кератопатии.

В соответствии с целью диссертационной работы поставлены следующие **задачи**:

1. Выбор материалов для изготовления кератоимплантатов в лечении буллёзной кератопатии.

2. Определить требования к параметрам кератоимплантатов – из полиэтилентерефталата и полимолочной кислоты – при их хирургическом лечении буллёзной кератопатии.

3. Разработать методику получения кератоимплантата из полимолочной кислоты для хирургического лечения буллёзной кератопатии.

4. Получить прототипы кератоимплантатов из полиэтилентерефталата и полимолочной кислоты с заданными характеристиками.

5. Исследовать влияние модификации прототипов кератоимплантатов в низкотемпературной плазме на топографию их поверхностей, структуру, оптические и механические свойства.

6. Изучить влияние стерилизации на топографию поверхностей, структуру, оптические и механические свойства прототипов кератоимплантатов, а также определить способ и режим стерилизации разработанных изделий офтальмологического назначения.

7. Выявить морфологические особенности роговицы при индуцированном повреждении ее эндотелиального слоя на фоне интрастромальной и внутрикамерной имплантации разработанных кератоимплантатов.

8. Определить рекомендации по применению разработанных кератоимплантатов в хирургическом лечении буллёзной кератопатии.

Научная новизна работы:

1. Определены конструктивы кератоимплантатов, позволяющие нормализовать движение жидкости в роговичных тканях и поддерживать роговицу в слабо дегидрированном состоянии.

2. Разработана методика формирования пор с геометрией сквозного канала, приближенной к цилиндрической, в пленках из полимолочной кислоты, позволяющая получить из них трековые мембраны для последующего использования в качестве кератоимплантатов.

3. Показано, что воздействие низкотемпературной плазмы (температура поверхности 35°C–40°C) при режиме обработки поверхности 30 секунд обладает бактерицидным действием, способствует гидрофилизации поверхности и оказывает наименьшее деструктивное действие на прототипы кератоимплантатов из полиэтилентерефталата и полимолочной кислоты по сравнению с γ -излучением и автоклавированием.

4. Предложены методики кератопластики с использованием кератоимплантатов из полиэтилентерефталата и полимолочной кислоты для хирургического лечения буллезной кератопатии.

5. В работе экспериментально доказано, что имплантация разработанного кератоимплантата из полиэтилентерефталата в слои роговой оболочки животных с индуцированной буллезной кератопатией способствует уменьшению отека стромы на 31,7%, толщины переднего эпителия на 27,5% и нормализации строения клеток переднего эпителия роговицы по сравнению с показателями до имплантации.

6. Получены результаты имплантации кератоимплантата из полимолочной кислоты в переднюю камеру и последующего наслоения аутологичных мононуклеарных лейкоцитов на внутреннюю поверхность роговицы экспериментальных животных с индуцированной буллезной кератопатией, свидетельствующие об купировании воспалительной реакции, эндотелиально–мезенхимальном переходе эндотелия, и, как следствие, уменьшению отека стромы на 40,1%, толщины переднего эпителия на 37,7% и нормализации строения клеток переднего эпителия роговой оболочки по сравнению с показателями до имплантации.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Разработаны и созданы конструктивы кератоимплантатов для последующего их использования в хирургическом лечении буллезной кератопатии.

Разработанная методика создания сквозных пор в пленках из полимолочной кислоты путем ее облучения тяжелыми ионами $^{132}\text{Xe}^{+26}$ и последующего химического травления открывает новые возможности в создании трековых мембран биодеградируемого типа.

Результаты по воздействию низкотемпературной плазмы и последующей стерилизации открывают новые возможности для решения научных задач в области

исследования свойств материалов, в частности – свойств трековых мембран из биодеградируемого и нерастворимого материалов.

Результаты экспериментальных исследований *in vivo* расширяют имеющиеся представления о патогенезе буллёзной кератопатии. Выявлено, что при удалении эндотелия роговой оболочки развивается альтеративная воспалительная реакция с выраженными структурно-функциональными нарушениями роговицы.

Экспериментальные исследования *in vivo* по имплантации трековых мембран из полиэтилентерефталата в слои роговой оболочки экспериментального животного с индуцированной буллёзной кератопатией доказали переход альтеративных изменений в роговице в фазу пролиферативного воспаления, уменьшение отека стромы и нормализацию строения клеток переднего эпителия.

Экспериментальные исследования *in vivo* по имплантации трековых мембран из полимолочной кислоты в переднюю камеру глаза с последующим наслоением аутологичных мононуклеарных лейкоцитов крови на поврежденную поверхность роговицы экспериментального животного с индуцированной буллёзной кератопатией доказали купирование альтеративной реакции, эндотелиально-мезенхимальный переход эндотелия, уменьшение отека стромы, нормализацию строения клеток переднего эпителия.

Разработанные имплантаты и методики по их применению в кератопластике откроют новые возможности в лечении буллёзной кератопатии.

Методология и методы исследования.

Методами исследования физико–химических свойств кератоимплантатов из полиэтилентерефталата и полимолочной кислоты являлись: электронная и атомная силовая микроскопия, порометрия, дифференциальная сканирующая калориметрия, рентгенофазовый анализ для расчета степени кристалличности, измерение контактного угла и поверхностной энергии, ИК–спектроскопия, спектроскопия комбинационного рассеяния света, анализ молекулярно-массовых характеристик, методы оптической спектроскопии, исследования механических и трибологических характеристик.

Исследования по применению прототипов кератоимплантатов из полиэтилентерефталата и полимолочной кислоты в лечении буллёзной кератопатии были проведены на биологических моделях в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Протоколы проведения экспериментальных исследований утверждены локальным этическим комитетом ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (регистрационный номер № 3898 от 24.11.2014 г., №7892 от 27.05.2019 г.) и соответствует руководству ARVO по использованию животных в офтальмологических исследованиях.

Статистическая обработка данных проводилась с применением программы «IMB SPSS Statistics 23».

На защиту выносятся следующие положения:

1. Кератоимплантат из полиэтилентерефталата толщиной 8мкм характеризуется наличием пор с цилиндрической геометрией сквозного канала, средним диаметром 0,5мкм и плотностью $6,2 \times 10^7$ пор/см², шероховатостью R_a 0,57мкм, средним краевым углом смачивания водой 33°, поверхностной энергией 132,7мДж/м², коэффициентом коллимированного пропускания в видимой области (38,5–41)%, не оказывает цитотоксического действия на изолированные клетки костного мозга, обеспечивая их жизнеспособность 95,25%.

2. Технология изготовления мембраны путем облучения тяжелыми ионами $^{132}\text{Xe}^{+26}$ плёнок из полимолочной кислоты с последующим травлением в 1,0М растворе NaOH при температуре травления 44°C в течении 15 минут позволяет создать кератоимплантат со сквозными порами диаметром 0,65мкм и геометрией сквозного канала, приближенной к цилиндрической.

3. Кератоимплантат из полимолочной кислоты толщиной 15мкм характеризуется наличием пор с цилиндрической геометрией сквозного канала, средним диаметром 0,65мкм и плотностью $(3,2 \pm 0,4) \times 10^6$ пор/см², шероховатостью R_a внутренней стороны 9,4нм, внешней – 18,1нм, средним краевым углом смачивания водой 50,3°, поверхностной энергией 52,9мДж/м², коэффициентом пропускания в видимой области (93–96)%, не оказывает цитотоксического действия на изолированные клетки костного мозга, обеспечивая их жизнеспособность 94,83%.

4. Имплантация кератоимплантата из полиэтилентерефталата в слои роговицы экспериментального животного с индуцированной буллезной кератопатией способствует уменьшению отека собственного вещества роговицы на 31,7%, толщины переднего эпителия на 27,5% и нормализации строения клеток переднего эпителия роговой оболочки по сравнению с показателями до имплантации, при этом не вызывая избыточный фиброгенез и формирование соединительно-тканного рубца.

5. Имплантация кератоимплантата из полимолочной кислоты в переднюю камеру глаза с последующим наслоением суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов экспериментального животного с индуцированной буллезной кератопатией способствует уменьшению отеку стромы на 40,1%, толщины переднего эпителия на 37,7% по сравнению с показателями до имплантации, а также купированию альтеративной реакции, эндотелиально–мезенхимальном переходу эндотелия, и, как следствие, стабилизации патологического процесса рассматриваемого заболевания.

6. Стерилизация γ -облучением кератоимплантата из полиэтилентерефталата приводит к образованию поверхностных дефектов неправильной формы средним размером $5 \pm 0,2$ мкм, глубиной $0,5 \pm 0,2$ мкм; стерилизация горячим паром под давлением способствует появлению неравномерно распределенных по всей поверхности

образований овальной формы диаметром 1,5–3 мкм разработанного изделия офтальмологического назначения.

Личный вклад автора.

Все представленные результаты получены при личном участии автора. Кроме того, постановка цели, задач, проведение и анализ экспериментальных данных, определение требований к параметрам кератоимплантатов для лечения буллезной кератопатии и рекомендаций по их применению при хирургическом лечении заболевания, формулировке выводов и положений, выносимых на защиту, подготовке публикаций по теме работы, апробация результатов на конференциях осуществлены непосредственно соискателем.

Связь работы с научными программами, планами, темами.

Диссертационная работа выполнялась в НИ ТПУ в соответствии с программой конкурентоспособности НИ ТПУ (ВИУ-НОЦ Б.Л. Вейнберга-210/2018), грантами РФФИ № 18-315-00048 «Медико–биологическое обоснование применения трековых мембран в лечении буллезной кератопатии», № 19-415-703005 «Влияние имплантации тонких пленок на основе полимолочной кислоты на морфологию роговой оболочки при буллезной кератопатии», № 20-08-00648 «Разработка биodeградируемых полимерных кератоимплантатов для офтальмологии», при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (договор № 2283ГУ1/2014), а также по плану НИР ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России в рамках комплексной темы «Клеточные технологии лечения патологии органа зрения».

Достоверность и апробация результатов.

Достоверность результатов обеспечивается использованием современного стандартизированного оборудования и методов исследования, большим массивом экспериментальных данных и их статистической обработкой, сопоставлением полученных результатов с литературными данными.

Основные результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на международной конференции Second International Conference on Radiation and Dosimetry Fields of Research (Ниш, Сербия, 2014); VII международной научно-практической конференции «Физико-технические проблемы в науке, промышленности и медицине» (г. Томск, 2015); XII международной конференции студентов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (г. Томск, 2015–2020); 10-й международной конференции «Ядерная и радиационная физика» (г. Курчатов, Казахстан, 2015); всероссийской научной конференции с международным участием «Сопряженные задачи механики реагирующих сред, информатики и экологии» (г. Томск, 2016); юбилейной научно-практической конференции, посвященной 20-летию курса офтальмологии ФПК и ППС СибГМУ «Современные технологии диагностики и лечения заболеваний органа зрения» (г. Томск, 2014); V международной научно-практической конференции «Достижения и перспективы

естественных и технических наук: материалы» (г. Ставрополь, 2014); международной конференции «Перспективные материалы с иерархической структурой для новых технологий и надежных конструкций» (г. Томск, 2015); 7-й всероссийской научной конференции с международным участием им. И.Ф. Образцова и Ю.Г. Яновского «Механика композиционных материалов и конструкций, сложных и гетерогенных сред» (г. Москва, 2017); International conference «Materials science of the future: research, development, scientific training» (г. Нижний Новгород, 2019); международных конференциях «Перспективные материалы с иерархической структурой для новых технологий и надежных конструкций» и «Химия нефти и газа» в рамках международного симпозиума «Иерархические материалы: разработка и приложения для новых технологий и надежных конструкций» (г. Томск, 2018); VIII международной молодежной научной школе-конференции «Современные проблемы физики и технологий» (г. Москва, 2019); XXII международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (г. Санкт-Петербург, 2019); международной научно-технической конференции «Наукоемкие технологии функциональных материалов» (г. Санкт-Петербург, 2019); VIII международной молодежной научной школе-конференции «Современные проблемы физики и технологий» (г. Москва, 2019); 14th International Conference "Gas Discharge Plasmas and Their Applications" GDP 2019 (г. Томск, 2019); 7th International Conference «New Functional Materials and High Technology («NFMHT-2019»)» (г. Тиват, Черногория, 2019); XI и XII всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы офтальмологии» (г. Москва, 2016–2017); всероссийской научной конференции офтальмологов «Невские горизонты – 2016» (г. Санкт-Петербург, 2016); IV и V Всероссийской молодежной научно-практической офтальмологической конференции «ОКО-2016» и «ОКО-2017» (г. Уфа, 2016–2017); научно-практической конференции по офтальмохирургии с международным участием «Восток-Запад – 2015» и «Восток-Запад – 2016» (г. Уфа, 2015–2016); XI международной (XX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (г. Москва, 2016); научно-практической конференции, посвященной 85-летию офтальмологической службы Кемеровской области и 30-летию Кемеровской областной клинической больницы (г. Кемерово, 2015); международном конгрессе «Пролиферативный синдром в биологии и медицине» (г. Москва, 2016–2018); XIX международном симпозиуме имени академика М.А. Усова (г. Томск, 2015); всероссийской школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (г. Казань, 2014); VIII съезде научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов (г. Воронеж, 2019); Seventh International Conference on Radiation in Various Fields of Research (RAD 2019 Conference) (г. Херцег-Нови, Черногория, 2019); конференции

молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» (г. Санкт-Петербург, 2019); LXXX ежегодной итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины – 2019» (г. Санкт-Петербург, 2019); III международном молодежном научно-практическом форуме «Медицина будущего: от разработки до внедрения» (г. Оренбург, 2019).

Реализация и внедрение результатов работы.

Результаты работы внедрены в производство мембран резорбируемого типа для систем фильтрации ООО «Аквелит», в учебный процесс кафедры офтальмологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России в тематическом разделе «Патология роговицы» для обучения студентов и клинических ординаторов. Разработанная хирургическая методика имплантации материалов при заболеваниях роговицы использована и внедрена в лечебный процесс офтальмологической клиники профессора Запускалова (ООО «Гранд Ретина»). Метод применения аутологичных мононуклеарных лейкоцитов в лечении буллёзной кератопатии внедрен в клиническую практику офтальмологической клиники ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, г. Томск.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 88 научных работ. Из них 23 статьи в научных журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий ВАК, 17 публикаций в зарубежных изданиях, входящих в базу Scopus и Web of Science. Получено 4 патента РФ на изобретение.

Структура и объем диссертационной работы. Работа состоит из введения, 5 глав, заключения, списка литературы из 470 наименования, списка сокращений и условных обозначений и трех приложений. Всего 339 страниц машинописного текста, включая 201 рисунок и 15 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении изложена актуальность темы, представлено краткое содержание диссертации, сформулированы цель, научная новизна и практическая значимость работы.

В первом разделе представлен обзор литературных источников, посвященный проблемам лечения БК. Показана широкая распространённость и этиопатогенез заболевания, современные принципы терапии БК и недостаточная эффективность традиционных методов консервативного и хирургического лечения, что, в свою очередь, способствует поиску и разработке новых способов лечения данного заболевания, в том числе использованию биосовместимых материалов небиологического типа. Материал для изготовления кератоимплантата должен отвечать ряду требований: биосовместимость с тканями, клетками, а также жидкостями (в данном

случае – с внутриглазной жидкостью) органа зрения; биоинертность; высокие коэффициент пропускания и прозрачность; удовлетворительные механические (гибкость, эластичность и, в то же время, прочность) характеристики; контролируемая растворимость и безопасный гидролиз для резорбируемого изделия. Из всех рассмотренных материалов, используемых в настоящее время в офтальмологии, наиболее перспективными для создания кератоимплантатов представляются полиэтилентерефталат (ПЭТФ) и полимолочная кислота (ПМК). Анализ медицинского применения ПЭТФ и ПМК позволил сделать вывод о возможности использования данного типа полимеров для создания из них трековых мембран (ТМ) с последующим применением как кератоимплантатов в лечении буллёзной кератопатии. Показана обоснованность выбора ТМ в качестве корнеальных имплантатов, а также необходимость модифицирования исходных физико–химических свойств материала из-за ограниченного смачивания его поверхности. Представлены наиболее широко используемые в практическом здравоохранении методы стерилизации медицинских изделий.

Во втором разделе описаны методики получения тонких пленок ПМК, трековых мембран на их основе и на основе ПЭТФ, стерилизации в автоклаве и γ -лучами, воздействия низкотемпературной плазмы атмосферного давления на поверхность пленок и мембран, испытания на стерильность с низкотемпературной плазмой атмосферного давления, эксперименты *in vitro*, *in vivo*.

ТМ из ПЭТФ производства ICI (Швейцария) были получены на циклотроне Томского политехнического университета (ТПУ) путем облучения пленки ПЭТФ пучком ионов $^{40}\text{Ar}^{+8}$ с энергией 41 МэВ, сенсibilизацией ультрафиолетовым светом и последующего селективного щелочного травления в водном растворе 1,5М NaOH при температуре (72 – 82)°С.

Пленки из ПМК были получены из 1%-го раствора полимолочной кислоты с молекулярным весом $M_w=121000$ г/моль (PURASORB® PL 10, Нидерланды), растворенного в трихлорметане (CHCl_3) (Экрос, Россия). Для получения нужной толщины (15–30 мкм) и морфологии пленок, массу раствора подбирали эмпирически, в связи с чем, пленки выливали по (10±1), (20±1), (30±1) грамм и помещали в вытяжной шкаф до полного испарения растворителя. ТМ из ПМК получали путем облучения пленки ПМК на циклотроне ИЦ – 100 Лаборатории ядерных реакций ОИЯИ (г. Дубна) пучком ионов $^{132}\text{Xe}^{+26}$ с энергией 1,2 МэВ/нуклон (150 МэВ) и последующего селективного щелочного травления. В целях получения качественных мембран и геометрии пор близкой к цилиндрической, была проведена серия экспериментов по подбору условий травления необлученных и облученных пленок. В качестве травителя использовались растворы гидроксида натрия (NaOH) различной концентрации: 0,1М, 1,0М, 2,0М. Время травления облученных образцов составляло от 5 до 30 минут, для необлученных – от 5 до 60 минут с шагом 5 минут. Скорость травления необлученных и облученных пленок контролировали

по уменьшению массы образцов. Массу образцов определяли с помощью аналитических весов Acculab ALC-210D4 (SartoRius Group, Германия) с погрешностью 0,1 мг. Толщину плёнок измеряли с помощью оптиметра «ИКВ-3» (Россия).

Модификацию поверхности мембран проводили с использованием установки атмосферной низкотемпературной плазмы (ТПУ): напряжение – 25кВ, частота – 5кГц, плотность мощности – 2Вт/см², температура обрабатываемой плазмой поверхности не превышала 40°C. Время обработки образцов: 30с, 60с и 90 с.

Паровую стерилизацию проводили в соответствии с ГОСТ Р ИСО 13683–2000с помощью автоматического стерилизатора ГПа–10 ПЗ (Россия) в двух режимах: $T = (130–132)^\circ\text{C}$ при давлении 0,2 МПа; $T = (120–121)^\circ\text{C}$ при давлении 0,11 МПа. Для лучевой стерилизации ТМ использовали γ –излучение радионуклида ⁶⁰Со на установке «Исследователь» (НИИ ПП) с цилиндрической рабочей камерой в дозах 1кГр (Si) и 15кГр (Si). Испытания на стерильность полученных мембран со стерилизующим агентом ионизированной плазменной средой были проведены в соответствии с МУ 287–113, ГОСТ ИСО 11737–2–2011, ГОСТ ИСО 11737–1–2012, ГОСТ Р ИСО 14937–2012, ГОСТ Р ИСО 14630–2011 в асептических условиях.

Исследование морфологии поверхности проводили с использованием электронного микроскопа Hitachi S3400N Type II (Hitachi, Япония), а топографии поверхности – на комплексном корреляторе оптических, спектральных и топографических свойств поверхности объектов «Centaur HR» (NT-MDT, Россия) и на атомно-силовом микроскопе «Solver-HV» (NT-MDT, Россия). Размер сквозных пор определяли с использованием порометра капиллярного потока Capillary Flow Porometer 7.0 (PMI, США). Для изучения структурных характеристик материалов, в том числе степени кристалличности полимера, применяли методы дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) на совмещенном ТГА/ДСКА анализаторе SDT Q600 (Thermo Electron Corp, США) и дифрактометрии с использованием дифрактометра Shimadzu XRD 6000S (Shimadzu, Япония). Контактные углы деионизированной воды (θ_w), н-гексана (θ_N) и глицерина (θ_g) измеряли методом сидячей капли при комнатной температуре $(25\pm 2)^\circ\text{C}$ с помощью прибора «KRÜSS Easy Drop DSA 20» (KRÜSS GmbH, Германия). Поверхностную энергию (СЭП) вычисляли по методу Оуэнса–Вендта–Рабел–Кэлби. Химический анализ мембран проводили методом ИК–спектроскопии с помощью ИК–Фурье спектрометра Nicolet 5700 (Agilent, США). Спектры комбинационного рассеяния исследуемых материалов получали на Centaur U HR (NT-MDT, Россия). Проницаемость мембран по H₂O измеряли с помощью Stirred Ultrafiltration Cells (Amicon Model 8010, Millipore, США). Исследование скорости деградации биodeградируемого полимера до и после различных видов обработок (плазменной модификации, стерилизации) проводили согласно ГОСТ Р ИСО 10993-5-2009, ГОСТ Р ИСО 10993-9-2009, ГОСТ Р ИСО 10993-13-2009 в фосфатно-солевом буферном растворе («Росмедбио», pH=7,76±0,10) в соотношении 1:30 (образец: раствор) при постоянной температуре

(70±1)°С в течении 6, 24 и 168 часов. Среднюю молекулярную массу (M_w), среднечисловую молекулярную массу (M_n) и коэффициент полидисперсности (PD) плёнок ПМК определяли методом гель проникающей хроматографии с использованием Agilent 1260 Infinity (Agilent technologies, США).

Спектры пропускания и поглощения образцов были измерены с помощью спектрофотометра СФ–256УВИ (Россия) в диапазоне длин волн (380–1000)нм для получения коллимированного коэффициента пропускания $\tau(\lambda)$ в режиме, приближенного к условиям предполагаемой эксплуатации, а также с помощью флуоресцентного спектрофотометра Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies, США) в том же диапазоне.

Исследования прочностных и механических характеристик ТМ были выполнены согласно ГОСТ 14236–81 и ГОСТ 11262–50 на испытательной установке Instron 3300 (ASTM D882, США). Исследования трения и износа проводили в условиях сухого трения скольжения на машине TRIBO technik (TRIBO technik, Франция) по схеме палец – диск. Анализ топографии износа ТМ выполняли на лазерном сканирующем микроскопе Olympus LEXT OLS4100 (Olympus, Япония).

Жизнеспособность клеток – мононуклеарных лейкоцитов – оценивали методом МТТ-теста с использованием соли тетразолия – 3–[4,5–диметилтиазолил–2–ел]–2,5–дифенилтетразолиум бромида и методом проточной цитофлуориметрии с определением процентного соотношения живых и погибших (апоптотических и некротических) клеток и общего количества клеток на проточном цитофлуориметре Guava EasyCytePlus (Millipore, США) с использованием программы GuavaVia Count (Millipore, США). Исследования биосовместимости разработанных мембран *in vitro* были проведены с использованием культуры пренатальных стромальных клеток, выделенной из легкого 11–недельного эмбриона человека и поддерживаемую *ex vivo* (линия FL–42, ООО «Банк стволовых клеток», г. Томск).

Исследования *in vivo* выполнены на кроликах породы *Sylvilagus bachmani*, которых разделили на пять групп: 1 группа – интактная – 4 здоровых животных (4 глаза); 2 группа – 16 животных (16 глаз) группы модели заболевания; 3 группа – 16 животных (16 глаз), которым выполнена интрастромальная имплантация трековой мембраны из ПЭТФ в слои изменённой в ходе формирования буллезной кератопатии роговицы; 4 группа – 16 животных (16 глаз), которым выполнена внутрикамерная имплантация трековой мембраны из ПМК с наслоением на заднюю поверхность роговой оболочки мононуклеарных лейкоцитов на фоне изменённой в ходе формирования буллезной кератопатии роговицы; 5 группа – 16 животных (16 глаз), которым после индуцирования заболевания проводили традиционную фармакотерапию. В ходе эксперимента всем группам проведены: биомикроскопия (щелевая лампа ЛС-01 Зенит, Россия), оптическая когерентная томография (ОКТ) роговицы

и передней камеры (3D OCT-1 Maestro, США), фоторегистрация глазной поверхности. Выведение животных выполняли на 30-е сутки после имплантации материалов.

Световую микроскопию гистологических срезов, окрашенных гематоксилин и эозином, пикрофуксином по методу Ван-Гизон, альцановым синим, полихромным красителем по Маллори, проводили на аппарате ЛОМО Биолам АУ-12 (Россия). Подсчет удельных объемов эпителия и стромы роговицы, дистрофически измененных эпителиоцитов, сосудов, отека основного вещества, клеточности осуществлено при помощи окулярной сетки Автандилова на 50 точек. Для электронно-микроскопического исследования тканей роговицы как приготавливали ультратонкие срезы толщиной 60-100нм на ультротоме «Ultratome III» (ЛКВ, Швеция).

Результаты экспериментов обрабатывались с использованием программы «IMB SPSS Statistics 23».

Третий раздел посвящен разработке кератоимплантата из ПЭТФ.

В результате облучения пленки ПЭТФ пучком ионов $^{40}\text{Ar}^{+8}$, сенсбилизацией ультрафиолетовым

светом и последующего травления в водном растворе 1,5М NaOH при температуре (72 – 82)°С были получены трековые мембраны толщиной 8мкм со средним диаметром пор 0,5 мкм и цилиндрической геометрии в сечении (рис. 1). Поверхностная плотность составила $6,2 \times 10^7$ пор/см².

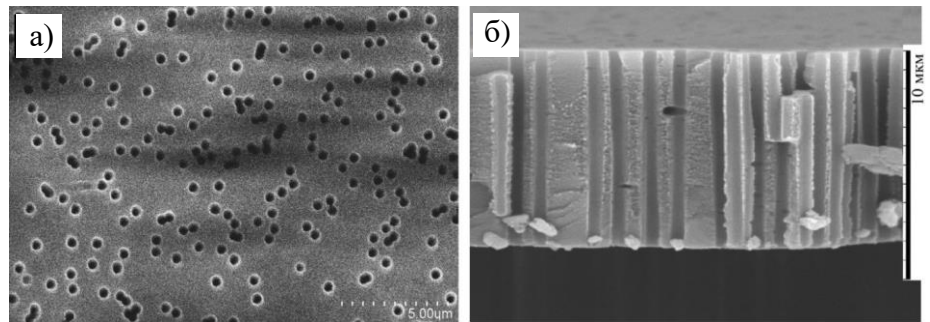


Рисунок 1 – Электронно-микроскопическое изображение ТМ из ПЭТФ: а) поверхность, б) срез

Среднеарифметическая шероховатость R_a полученных мембран составила 0,15 мкм, среднеквадратичная шероховатость R_q – 0,3 мкм, максимальная высота шероховатости R_t – 3,2 мкм, средняя максимальная высота профиля R_z – 4,1 мкм.

Смачиваемость является важным параметром для создания изделия медицинского назначения, в частности – роговичного имплантата. Измерения краевого угла смачивания полученных мембран показало следующие средние значения: $\theta_w = 72,8^\circ \pm 2,2^\circ$, $\theta_N = 5,0^\circ \pm 1,2^\circ$, $\theta_g = 74,8^\circ \pm 3,7^\circ$. Полная энергия поверхности ТМ из ПЭТФ составила $\gamma = 29,95 \pm 2,8$ мДж/м², где вклад поляризационной составляющей значительней дисперсионной.

Воздействие низкотемпературной плазмы на поверхность полученных мембран из ПЭТФ привело к появлению деструктивных областей в виде многочислен-

ных хаотично распределенных мелких неровностей конусообразной формы высотой ~ 100 нм, плотностью 2,43 пиков/ $\mu\text{м}^2$. Модификация в плазме ТМ из ПЭТФ увеличила значения параметров шероховатости: R_a в 3,8 раз, R_q – в 4,2 раза, R_t – в 4 раза, R_z – в 10 раз. С увеличением времени обработки плазмой шероховатость ТМ из ПЭТФ возрастала.

Так как поверхность мембраны из ПЭТФ имела умеренно гидрофобный характер, материал подвергали воздействию низкотемпературной плазмы, которое привело к возрастанию степени гидрофильности поверхности и снижению краевого угла смачивания на $40^\circ - 43^\circ$ (56% – 58%) (рис. 2а).

Расчет свободной энергии поверхности полученных мембран после воздействия на их поверхность плазмы показал среднее значение $\gamma = 135,7 \pm 10,3$ мДж/ м^2 , что больше исходной в 4,5 раз (рис. 2б). Увеличение γ в большей мере связано с увеличением поляризационной составляющей: соотношение $\gamma^P : \gamma^D$ как 1:17.

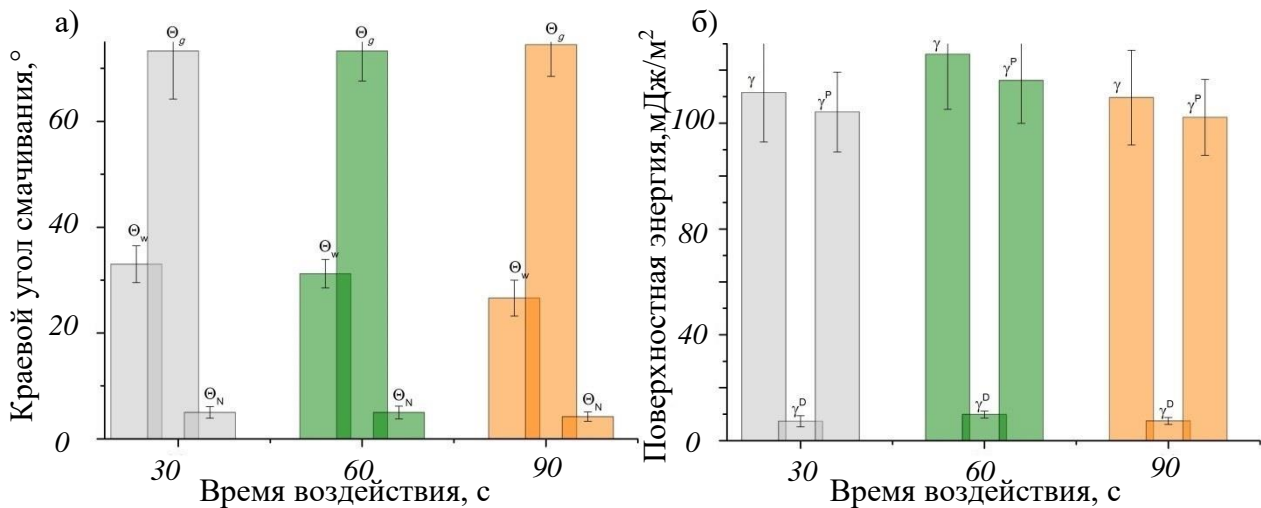


Рисунок 2 – Значения краевых углов (θ_w , θ_g , θ_n) смачивания (а) и поверхностной энергии (б) ТМ из ПЭТФ после воздействия плазмы

При анализе ИК-спектров полученных мембран из ПЭТФ после воздействия плазмы было выявлено уменьшение интенсивности полос поглощения при 1712 см^{-1} , 1241 см^{-1} и 1093 см^{-1} , связанных с колебаниями неполярных ($\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{O}$) функциональных групп ПЭТФ.

Выбор метода стерилизации является важным этапом в создании роговичных имплантатов и определения наиболее подходящих стерилизующих методов и режимов для полученных мембран из ПЭТФ.

Облучение γ -лучами способствовало образованию дефектов средним размером ~ 5 мкм неправильной формы на поверхности как исходной, так и модифицированной в плазме ТМ из ПЭТФ (рис. 3а). Общая площадь полученных дефектов в ходе стерилизации радионуклеидом ^{60}Co мембран из ПЭТФ занимала 9% от всей площади поверхности ТМ.

Паровая стерилизация способствовала появлению неравномерно распределенных по всей поверхности ТМ из ПЭТФ образований овальной формы средним диа-

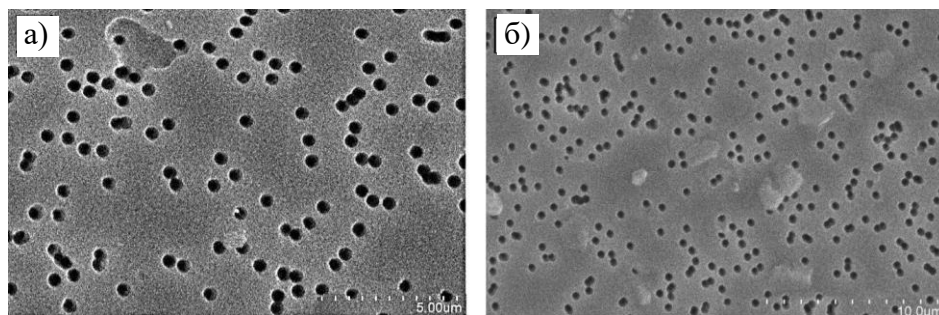


Рисунок 3 – Электронно-микроскопическое изображение ТМ из ПЭТФ: а) после γ -стерилизации, б) после паровой стерилизации

метром 1,5–3мкм (рис. 3б). Подобные поверхностные изменения после процедуры стерилизации наблюдались у исходных мембран и у модифицированных в плазме.

Коэффициент коллимированного пропускания $\tau(\lambda)$ полученных мембран из ПЭТФ находился в пределах 40%–44% (рис. 4). Модификация в плазме привела к уменьшению коэффициента коллимированного пропускания ТМ на 2%–5%. Развитие рельефа поверхности мембраны после плазменной обработки с увеличением ее параметров шероховатости способствует снижению коэффициента коллимированного пропускания ТМ. Степень кристалличности исходной ТМ составила 41,9%, после плазменной обработки в течение 30с – 43,6%. Образование кристаллического состояния полимера зависит от способности полимерных молекул выстраиваться в упорядоченные структуры. При кристаллизации полимера образуются анизотропные структуры – сферолиты, размером более 100нм, вносящие основной вклад в рассеяние света и являющиеся одной из главных причин недостаточности прозрачности материала. Таким образом, образование сферолитов в структуре полимера в результате плазменной обработки также способствует снижению коэффициента пропускания $\tau(\lambda)$.

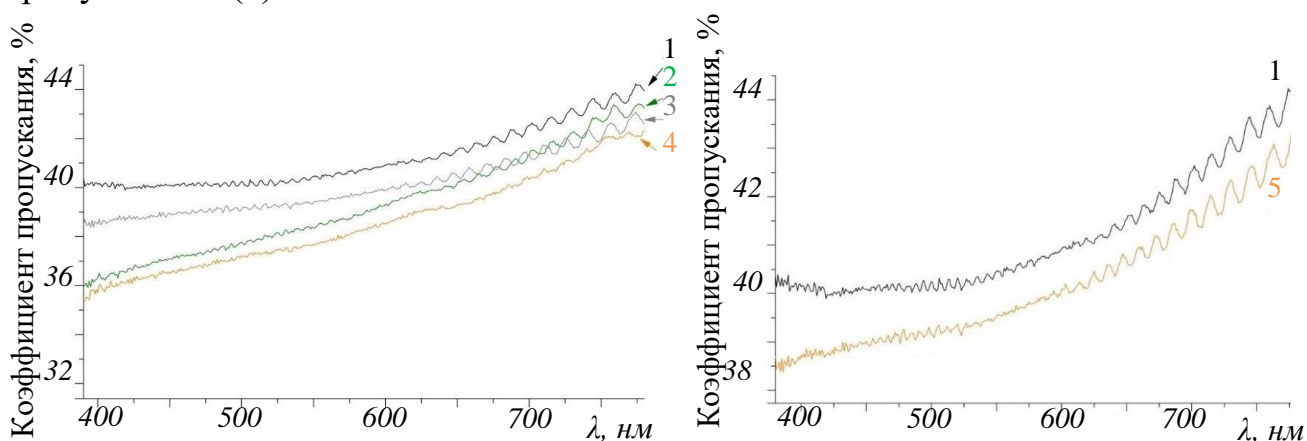


Рисунок 4 – Спектры пропускания полученных мембран из ПЭТФ: 1 – исходные; 2, 3, 4 – после модификации в плазме 30с (2), 60с (3), 90с (4); 5 – после γ -стерилизации

Коэффициент коллимированного пропускания мембран из ПЭТФ после стерилизации γ -квантами ^{60}Co спектра видимого излучения находился в пределах 37%–43%, что в среднем на 3% меньше $t(\lambda)$ исходных. Степень кристалличности

ТМ после гамма-иррадиации составила 43,7%. Механизм подобного γ -воздействия связан с разрывом связей полимера с последующей перестройкой цепей и укладывании их в более упорядоченную кристаллическую структуру, что являлось причиной снижения коэффициента коллимированного пропускания мембран. Коэффициент коллимированного пропускания ТМ после паровой стерилизации находился в пределах 37,5–42% при режиме стерилизации (120°C) и 39,9%–42,5% (130°C). Механизм воздействия паровой стерилизации на оптические свойства ТМ связан в первую очередь с образованием овальных артефактов на поверхности мембраны, являющиеся следствием деформации тонкой пленки под действием горячего пара.

В результате оценки бактерицидного действия низкотемпературной плазмы атмосферного давления было выявлено помутнение сред группы образцов без стерилизации плазмой в первые сутки инкубации. Среды с мембранами из ПЭТФ после воздействия плазмы оставались прозрачными на протяжении всего эксперимента.

Четвертый раздел посвящен разработке кератоимплантата из полимолочной кислоты.

В качестве матрицы трековой мембраны использовали плёнки, полученные из 1%-го раствора полимолочной кислоты (ПМК). Для получения нужной толщины (до 26 мкм) материала масса готового раствора подбиралась эмпирически, в связи с чем, пленки выливались в количестве (10±1)г, (20±1)г, (30±1)г.

Электронно-микроскопическое исследование пленок ПМК показало, что стороны материала имеют различную морфологию поверхности, зависимую от контакта выливаемого раствора с атмосферой или чашкой Петри: при контакте с чашкой Петри – сторона материала более гладкая (рис. 5), при контакте с атмосферой – поверхность более рельефная (рис. 5). Масса раствора 10г и 20г более подходящая под создания ТМ, так как толщина получаемых пленок не превышает 26мкм.

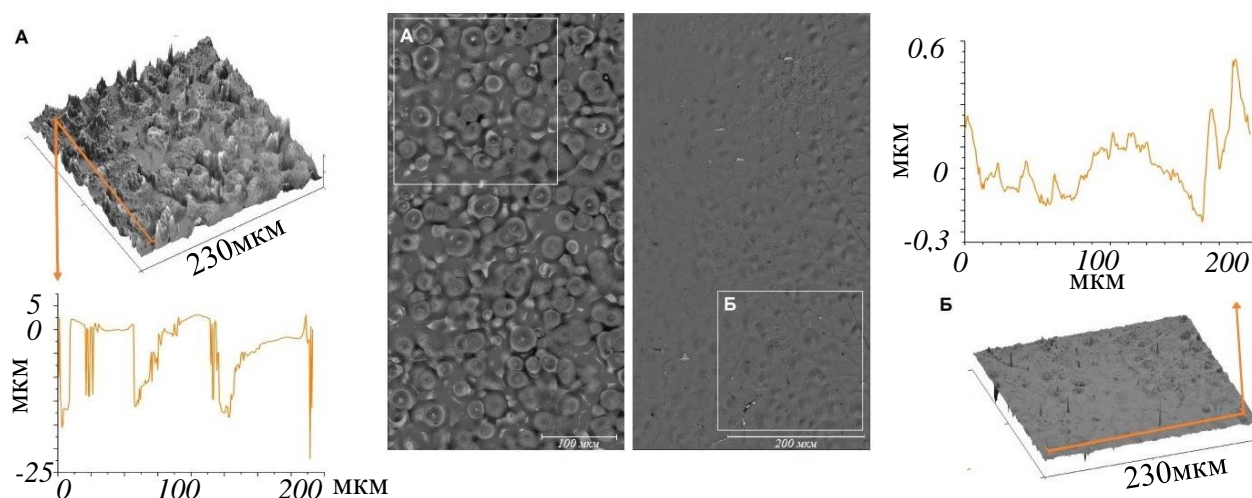


Рисунок 5 – Двух- и трехмерные изображения, профили поверхности внешней (А) и внутренней (Б) сторон пленки ПМК

Анализ шероховатости показал, что среднеарифметическая шероховатость (R_a) внутренней стороны пленки ПМК (10г) составляет $0,01 \pm 0,003$ мкм, внешней – $0,17 \pm 0,06$ мкм, тем самым составляя разницу между величинами в 17 раз ($p < 0,0001$). Известно, что на функцию адгезивной клетки влияют геометрические особенности контактируемой с ней поверхности материала. Поверхности с параметрами шероховатостью порядка микрометра или нанометра сильно влияют на рост и дифференцировку адгезированных клеточных структур, что делает пленки с более рельефной поверхностью наиболее привлекательными для создания будущей подложки для клеточных культур и роговичного имплантата.

Измерения краевого угла смачивания показало среднее значение для пленок, вылитых из раствора разной массы: $\theta_w = 81,1^\circ \pm 1,3^\circ$, $\theta_N = 5,1^\circ \pm 1,7^\circ$, $\theta_G = 72,5^\circ \pm 2^\circ$ для внутренней стороны полимера; $\theta_w = 78,8^\circ \pm 1,5^\circ$, $\theta_N = 5,1^\circ \pm 1,6^\circ$, $\theta_G = 70,4^\circ \pm 2,3^\circ$ для внешней стороны, тем самым приближая свойства материала к гидрофобным. Расчет средней свободной энергии поверхности пленок из ПМК показал значение полной энергии $\gamma = 26,6 \pm 0,7$ мДж/м² для внутренней стороны материала и $\gamma = 28,8 \pm 0,6$ мДж/м² для внешней, причем вклад дисперсионной составляющей для двух сторон значительней поляризационной.

Процесс создания трековых мембран из полимолочной кислоты включал в себя облучение пучком ионов $^{132}\text{Xe}^{+26}$ и последующее химическое травление. Главная цепь макромолекулы ПМК содержит сложноэфирную связь, и поэтому естественно ожидать, что для формирования пористой структуры в облученных ионами пленках ПМК можно использовать реакцию щелочного гидролиза, как в случае ПЭТФ. Вместе с тем известно, что оптимальные условия травления треков (концентрация щелочи, температура) зависят от вида полимера, и могут различаться даже для полимеров, относящихся к одному и тому же классу. В связи с этим разработка методики травления должна проводиться индивидуально для данной полимерной матрицы, и окончательный выбор оптимальных условий осуществляется эмпирически.

Так, тестовое травление необлученных пленок из ПМК проводилось в 0,1М NaOH при температуре травления 18°C. Согласно полученным результатам заметного изменения массы и толщины плёнок при данной концентрации раствора не наблюдалось: потеря массы образцов составила около 3% при времени травления 1 час (рис. 6). При температуре 54°C потеря массы пленки составила 8% (рис. 7). В связи с этим, было принято решение увеличить концентрацию раствора NaOH до 1,0М и 2,0М.

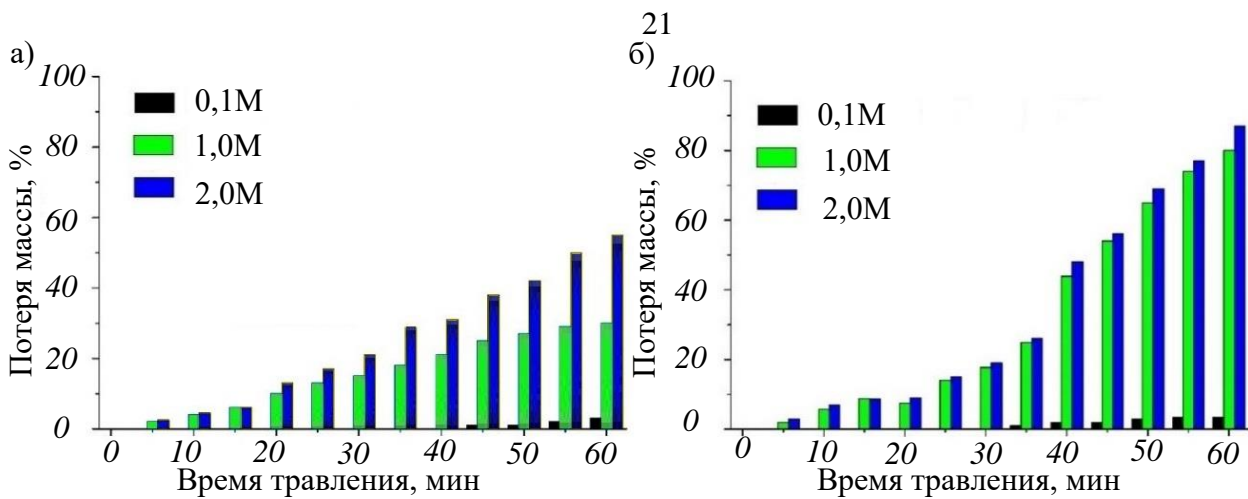


Рисунок 6 – Зависимость потери массы от времени травления исходных плёнок ПМК при температурах: а) 18°C; б) 34°C

Увеличение концентрации раствора NaOH до 2,0М повышало потерю массы плёнок ПМК в среднем на 12 – 13 % по сравнению с концентрацией 1,0М.

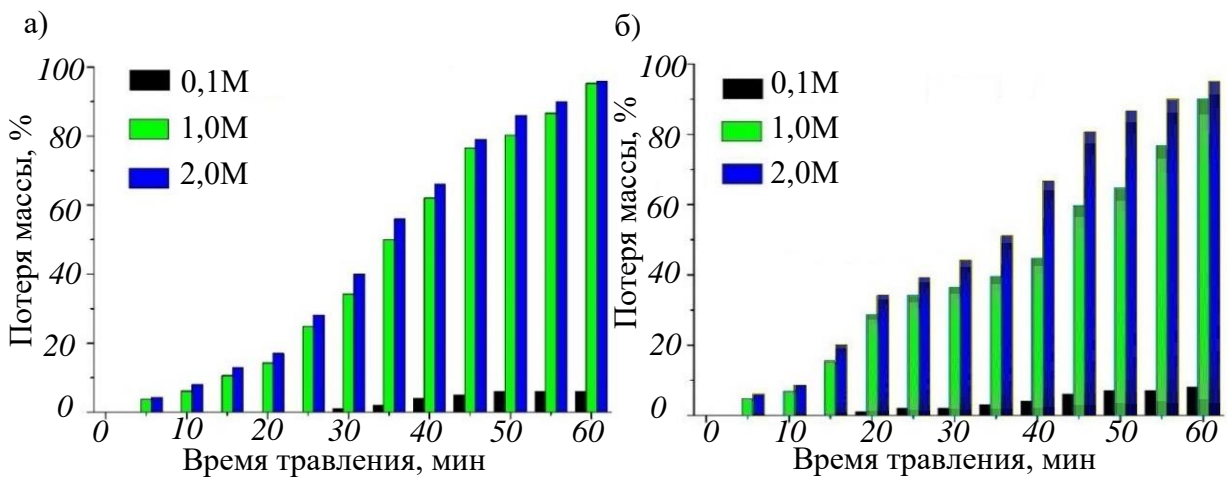


Рисунок 7 – Зависимость потери массы от времени травления исходных плёнок ПМК при температурах: а) 44°C; б) 54°C

Нагрев раствора 1,0М NaOH до 54°C значительно способствовал потере массы пленок – до 85%, в то время как раствор температурой 18°C снижал массу материала до 30% при максимальной выдержке (50 мин). Концентрация раствора в 2,0М усиливала потерю массы плёнок ПМК на 12–13% в каждом температурном режиме по сравнению с 1,0М NaOH. При травлении в растворе температурой 34°C в 1,0М NaOH облученной пленки из ПМК признаки протравливания пор (очертания входных и выходных отверстий, согласно данным электронной микроскопии) появлялись при нахождении материала в растворе более 15 мин. Травление при 54°C в 1,0М растворе NaOH способствовало появлению очертаний входных и выходных отверстий пор при нахождении материала в растворе уже в течение 5 мин. На 20 мин плёнка заметно деформировалась, теряла прочность и разрушалась. Увеличение температуры раствора NaOH выше температуры стеклования полимера (55°C–65°C), а именно до 70 °C, привело к сильной деформации и скручиванию

образцов до 70°C. Таким образом, были определены оптимальные параметры, такие как концентрация раствора NaOH – 1,0М – и температура – 44°C – для травления облучённых плёнок ПМК ионами $^{129}\text{Xe}^{+8}$. Травление при заданных условиях не вызывало разрушения и деформацию пленки и формировало входные и выходные отверстия пор (рис. 8).

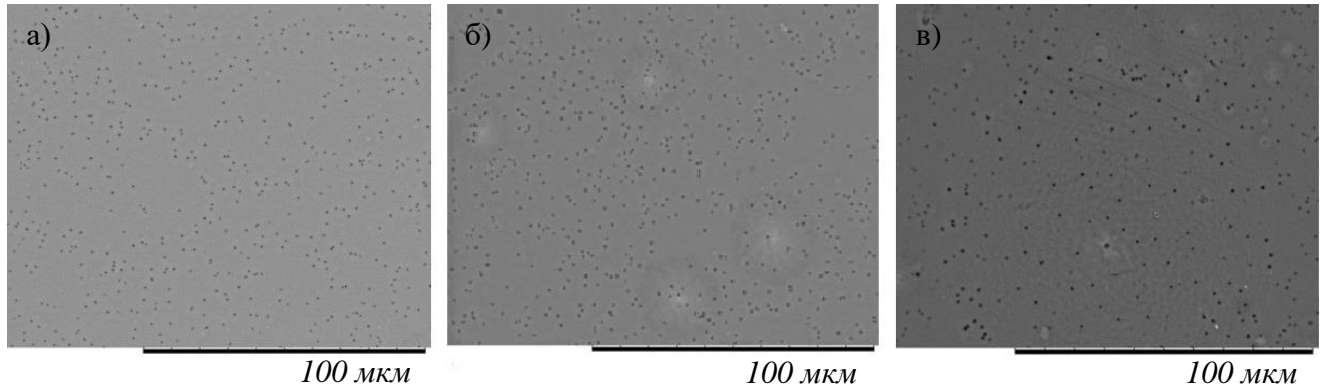


Рисунок 8 – Мембраны на основе ПМК, полученные путем травления в 1,0М NaOH при температуре 44°C в течении: а) 15 мин; б) 20 мин; в) 30 мин

Средний размер пор полученной мембраны на основе ПМК от времени травления при температуре 44°C варьировался от $(0,58 \pm 0,02)$ мкм до $(1,5 \pm 0,02)$ мкм (табл. 1).

Средняя плотность пор составила $(3,2 \pm 0,4) \cdot 10^6$ пор/см².

Продольный разрез поры полученной мембраны из полимолочной кислоты приближен к цилиндрической форме при времени травления 15 минут в указанных условиях (рис. 9).

Анализ шероховатости ТМ из ПМК после травления при температуре 44°C и времени 10 минут показал, что R_a внутренней поверхности материала без пор составила $6,0 \pm 0,3$ нм, внешней – $12,6 \pm 0,3$ нм, $p > 0,05$. Интересен следующий факт: с увеличением времени травления с 10 минут до 15 минут параметр R_a растет с 6,0 нм до 9,3 нм (внутренняя сторона) и с 12,6 нм до 18,2 нм (внешняя), что соответствует увеличению на 35,5% и 30,8%. Однако, начиная с 20 минут

Таблица 1 – Средний диаметр пор по методу «точка пузырька» ТМ, полученных травлением облученных плёнок ПМК в 1,0М растворе NaOH

Время травления, мин	Диаметр пор, мкм
10	0,63
15	0,65
20	1
25	1,52
30	1,75

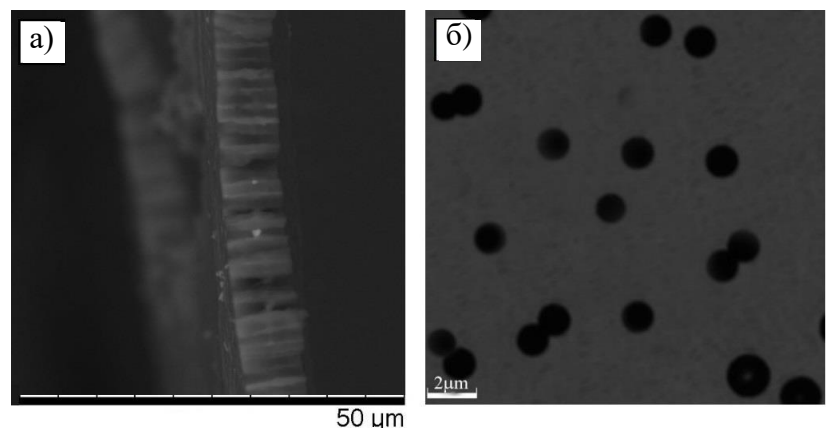


Рисунок 9 – Электронно-микроскопическое изображение ТМ из ПМК: а) скол, б) поверхность

Однако, начиная с 20 минут

и до 30 минут данный показатель падает до 4,1 нм (внутренняя сторона) и 4,5 нм (внешняя), что соответствует уменьшению на 55,9% и 75,3% по сравнению данными 15 минут и на 31,6% и 64,3% по сравнению данными 10 минут, $p < 0,05$.

Измерения краевого угла смачивания полученной мембраны из ПМК показали средние значения при температуре травления 44°C и времени 10 минут: $\theta_w = 75,8^{\circ} \pm 3,7^{\circ}$, $\theta_N = 5,2^{\circ} \pm 1,9^{\circ}$, $\theta_G = 65,9^{\circ} \pm 2,8^{\circ}$ (рис. 10а). Статистический анализ показал отсутствие значимой разницы углов смачивания между мембранами, полученных при экспозиции в травителе 10, 15, 20, 25 и 30 минут ($p > 0,05$). Расчет средней свободной энергии ТМ из ПМК после травления в 1,0М NaOH в температуре 44°C (10 минут), показал значение СЭП = $31,1 \pm 0,6 \text{ Дж/м}^2$ (рис. 10б).

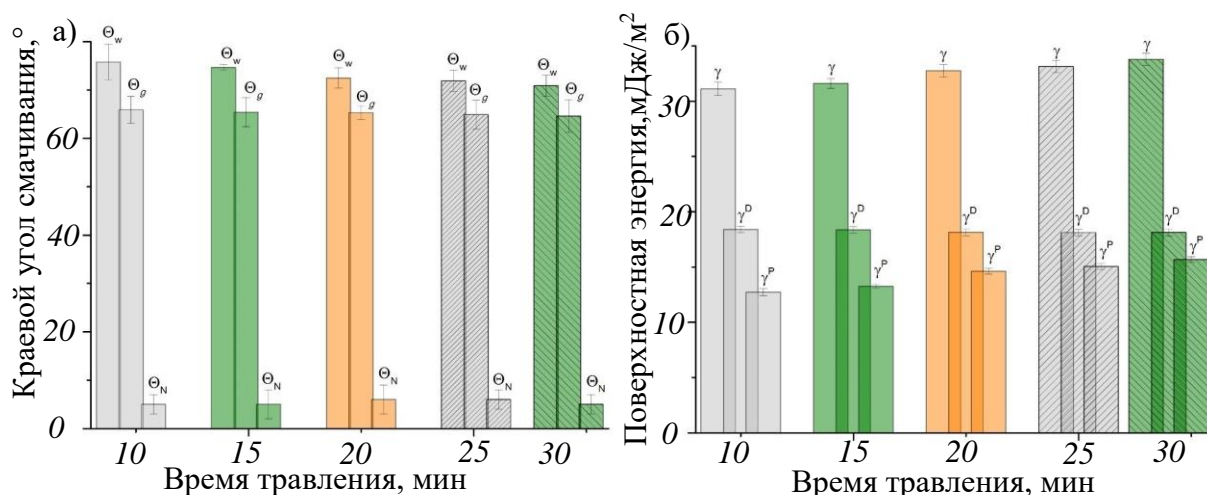


Рисунок 10 – Значения краевых углов (θ_w , θ_g , θ_N) смачивания (а) и поверхностной энергии (б) ТМ из ПМК

Согласно анализу спектров, коэффициент пропускания мембран из ПМК в области видимого излучения лежит в пределах 95% – 98%, что характеризует материал как изделие с высокой пропускной способностью. Однако замечена выраженная интерференция материала в области видимого излучения, что вероятно связано с неоднородностью ТМ из ПМК в виде пор.

Как было отмечено ранее, обработка поверхности материала низкотемпературной плазмой атмосферного давления способствует гидрофилизации поверхности полимера.

Исследование влияния низкотемпературной плазмы на поверхностные и физико-химические характеристики ТМ из ПМК представлено на примере мембраны, полученной травлением в 1,0М растворе NaOH при температуре 44°C в течении 15 минут. Кроме того, учитывая результаты плазменной модификации пленки ПМК, был выбран один режим воздействия – 30с. Данное решение было обосновано минимальностью деструктивного воздействия плазмы и достижение необходимой гидрофильности материала в данном временном промежутке.

Согласно полученным данным по модификации ТМ из ПМК при времени воздействия плазмой 30с шероховатость мембраны составила: R_a внутренней стороны 9,4нм, внешней – 18,1нм; R_q внутренней стороны 10,8нм, внешней – 26,6нм; R_t внутренней стороны 6,8нм, внешней – 19,1нм, что статистически не отличалось от мембран без плазменной стерилизации, $p > 0,05$.

Анализ смачивания показал, что воздействие плазмы на ТМ из ПМК снизило краевой угол исходных мембран в 1,5 раза (по воде), составив $50,3 \pm 3,7^\circ$. Подобный эффект был получен и у пленок ПМК: плазма уменьшила значение данного показателя в 1,4 раза (на 27,3%) и приблизила свойства материала к гидрофильным. Анализ показал отсутствие значимой разницы значений смачивания между сторонами мембраны, $p > 0,05$.

Как и в случае с пленками ПМК, плазменная модификация увеличила СЭП мембран в 1,7 раза, составив $52,9 \text{ мДж/м}^2$. Наблюдаемые изменения энергии произошли главным образом за счет увеличения полярной составляющей. Полярность ТМ из ПМК после модификации составила 0,34. Статистический анализ показал отсутствие значимой разницы поверхностной энергии между сторонами мембраны, $p > 0,05$.

Согласно анализу спектров, коэффициент пропускания мембран из ПМК после плазменного воздействия в области видимого излучения лежит в пределах 93% – 96%, что на 2% меньше ТМ без модификации. Прозрачность пленки составила $2,3 \pm 0,03$. Сохранялась выраженная интерференция материала в области видимого излучения, что вероятно связано с неоднородностью ТМ из ПМК в виде пор.

В серии экспериментов по стерилизации полученных мембран было установлено, что стерилизация γ -облучением не изменяет значений угла и энергии поверхности, сохраняя полученные в ходе модификации в плазме гидрофильные свойства поверхности ТМ из ПМК. Стерилизация горячим паром под давлением разрушает ТМ из ПМК.

Полученные результаты по оценке бактерицидного действия низкотемпературной плазмы атмосферного давления ТМ из ПМК позволили сделать вывод, что плазма обладает стерилизующей способностью уже на 30с и может применяться в качестве стерилизующего агента.

В пятом разделе приведены результаты медико–биологического обоснования применения прототипов кератоимплантатов из ПЭТФ и ПМК в лечении буллезной кератопатии.

В результате проведенных цитологических испытаний ТМ из ПЭТФ и ПМК на цитотоксичность до и после плазменного воздействия установлено, что разработанные мембраны не оказывают цитотоксического действия на культуру мононуклеарных клеток (рис. 11, 12).

Результаты *in vitro* реакции культуры фибробластоподобных клеток на клеточно-молекулярную биосовместимость ТМ из ПЭТФ и ПМК свидетельствуют об их относительной биоинертности в отношении стромальных клеток человека.

Согласно результатам по имплантации ТМ из ПЭТФ в слои роговицы при индуцированной буллезной кератопатии спустя 2 недели после имплантации по данным осмотра наблюдалось уменьшение блефароспазма, слезотечения и отека роговой оболочки. Спустя месяц после имплантации указанные симптомы полностью купировались, роговая оболочка была фактически полностью прозрачная, местами в роговице наблюдались новообразованные сосуды (рис. 13а). По данным ОКТ толщина роговой оболочки спустя 2 недели уменьшилась на 19,5%, через месяц – на 31,7%, $p < 0,05$ (рис. 13б). Необходимо отметить, что значимый вклад в толщину роговицы вносил постоперационный «роговичный карман» глубиной до 60мкм, в который имплантировалась ТМ из ПЭТФ.

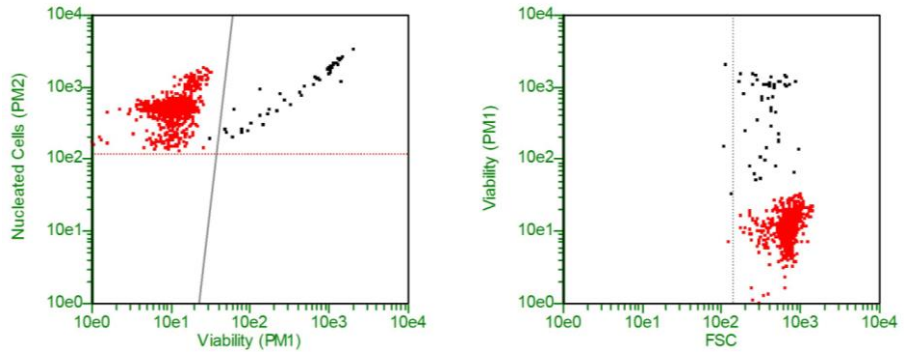


Рисунок 11 – Количество жизнеспособных и погибших клеток *in vitro*, культивируемых с прототипами кератоимплантатов из ПЭТФ

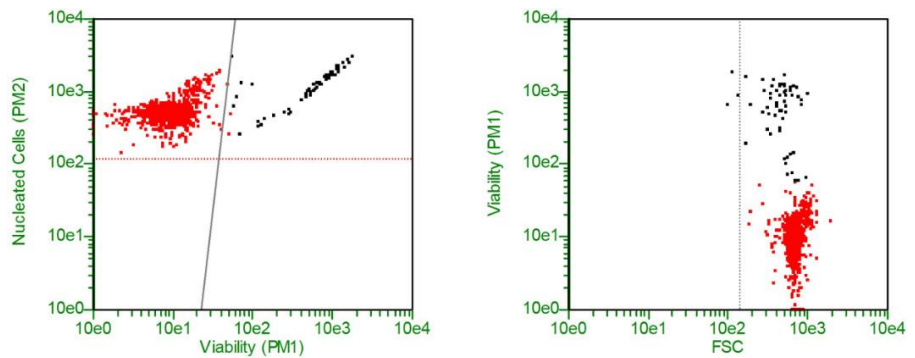


Рисунок 12 – Количество жизнеспособных и погибших клеток *in vitro*, культивируемых с прототипами кератоимплантатов из ПМК

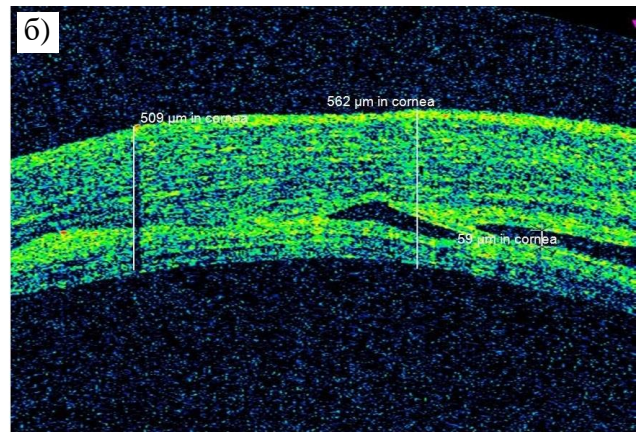
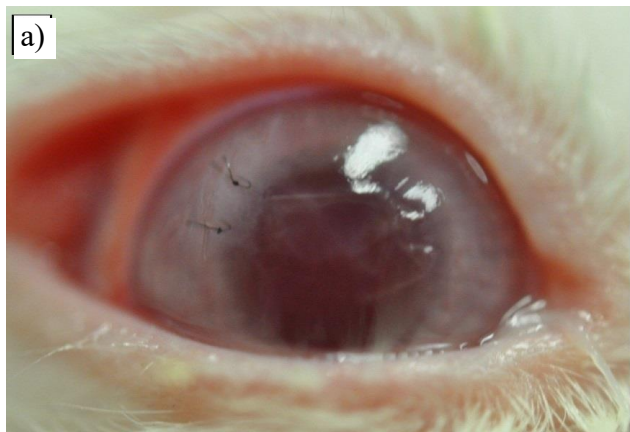


Рисунок 13 – Состояние переднего отрезка глаза (а) и ОКТ роговицы (б) животного с индуцированной буллезной кератопатией спустя месяц после имплантации ТМ из ПЭТФ

Спустя месяц после внутрискромальной имплантации ТМ из ПЭТФ при гистологическом исследовании передний эпителий роговицы имел нормальное строение и был представлен 4–5 слоями плоских эпителиоцитов (рис. 14а). Толщина данного слоя составляла 35 ± 7 мкм, что на 27,5% ($p < 0,05$) меньше исходного – до имплантации – значения, которое составляло $48,3 \pm 3,5$ мкм. Собственное вещество роговой оболочки содержало в большинстве полей зрения компактно расположенные коллагеновые волокна. Местами коллагеновые волокна сохраняли умеренно выраженный повышенный извитой ход. Удельный объем щелей между ними составил $12,3 \pm 2,4\%$, что в 2,6 раза ($p < 0,05$) меньше данного показателя до начала лечения. В нижней 1/3 стромы визуализировался послеоперационный роговичный карман с имплантированной ТМ из ПЭТФ. Непосредственно к мембране прилежала грануляционная ткань с умеренно выраженной лейкоцитарной инфильтрацией, удельным объемом $8,6 \pm 3,4\%$ (рис. 14б). Местами, в строме роговицы встречались тонкостенные новообразованные сосуды объемом не более 5,2%.

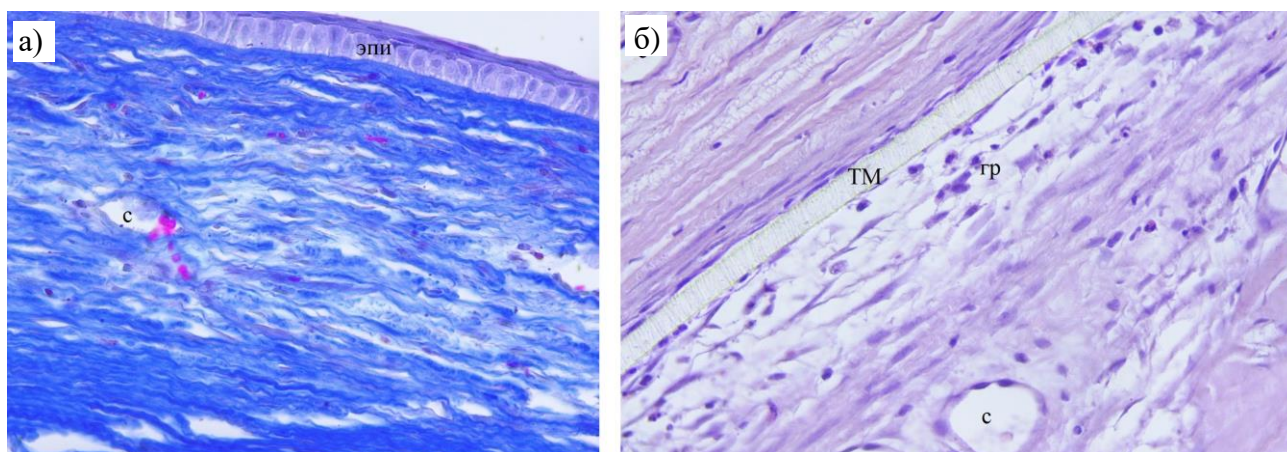


Рисунок 14 – Передний эпителий (эпи), тонкостенные сосуды (с), грануляционная ткань (гр) в роговице животного с индуцированной БК спустя месяц после имплантации ТМ из ПЭТФ. Окраска: по Маллори (а), гематоксилином и эозином (б). Увеличение: а – $\times 200$; б – $\times 400$

Согласно результатам электронно-микроскопического исследования в непосредственной близости с ТМ из ПЭТФ обнаруживались лимфоциты с крупными ядрами, в ядре которых преобладал эухроматин, хорошо визуализировалось ядрышко с выраженными гранулярным, фибриллярным и аморфным компонентами (рис. 15). Вокруг ядра лимфоцитов присутствовала хорошо развитая гранулярная ЭПС с без расширения ее полостей. В цитозоле обнаруживались митохондрии с нормальной структурой и единичные лизосомы. В порах ТМ из ПЭТФ определялось межклеточное вещество с псевдоподиями клеток (преимущественно, фибробластов).

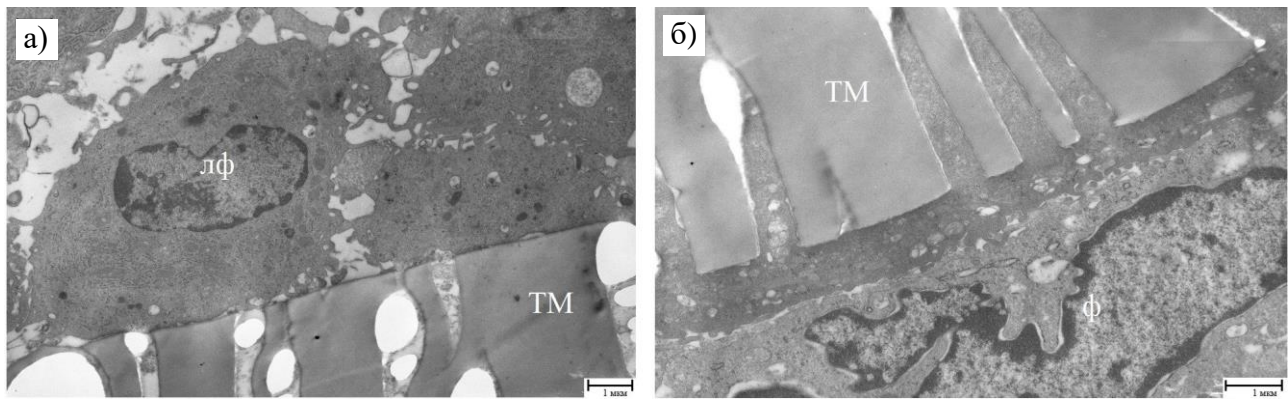


Рисунок 15 – ПЭМ фрагмента трековой мембраны (ТМ) из ПЭТФ и прилегающего к ней лимфоцита (лф) и фибробласта (ф) в роговице экспериментального животного с буллезной кератопатии спустя месяц после имплантации материала

Наличие сосудов, как и грануляционной ткани с лейкоцитарной инфильтрации, являлось результатом реакции роговой оболочки на искусственный материал и протекания первичной альтерации – воспаления вследствие развития буллезной кератопатии. Альтеративные явления при воспалении включают тканевой распад и усиленный обмен веществ, приводящий к ряду физико-химических изменений в тканях и высвобождению воспалительных медиаторов и модуляторов – биологически активных веществ, ответственных за возникновение и поддержание воспалительных явлений. Повышение же концентрации провоспалительных цитокинов, выделенных фибробластами стромы роговицы и оставшимися после повреждения эндотелиоцитами эндотелиального слоя, в свою очередь, усиливает альтерацию, привлекая в очаг воспаления клетки иммунной защиты. Инородный материал – ТМ из ПЭТФ – несмотря на свою биоинертность (см. данные по цитотоксичности и реакции стромальных клеток на полимер), представляет собой «угрозу» для иммунокомпетентных клеток организма, в первую очередь для Т-лимфоцитов (CD4+, CD8+) и макрофагов, которые и запускают иммунную реакцию в тканях роговой оболочки. Создавая цитокиновый «пул» в очаге воспаления и месте имплантации, данные клетки опосредованно воздействуют на окружение, привлекая фибробластов для фиброгенеза, тучных клеток и эндотелиоцитов, последние из которых под действием VEGF включаются в васкулогенез, формируя тонкостенные сосуды.

Согласно результатам по имплантации ТМ из ПМК в переднюю камеру глаза при индуцированной буллезной кератопатии спустя 2 недели после имплантации по данным осмотра наблюдалось уменьшение блефароспазма, слезотечения и отека роговой оболочки, спустя месяц указанные симптомы полностью купировались, роговица прозрачная (рис. 16а). Огромным преимуществом данной мембраны является ее прозрачность и пропускная способность ($t(\lambda) = 95\% - 98\%$) по сравнению с ТМ из ПЭТФ, коэффициент пропускания которой составляет около 40%. В условиях *in vivo* рассматриваемый полимер фактически не заметен (рис. 16а), что делает материал перспективным для использования в кератопластике. По данным ОКТ

толщина роговой оболочки спустя 2 недели уменьшилась на 18,6%, через месяц – на 40,1%, $p < 0,05$ (рис. 16б).

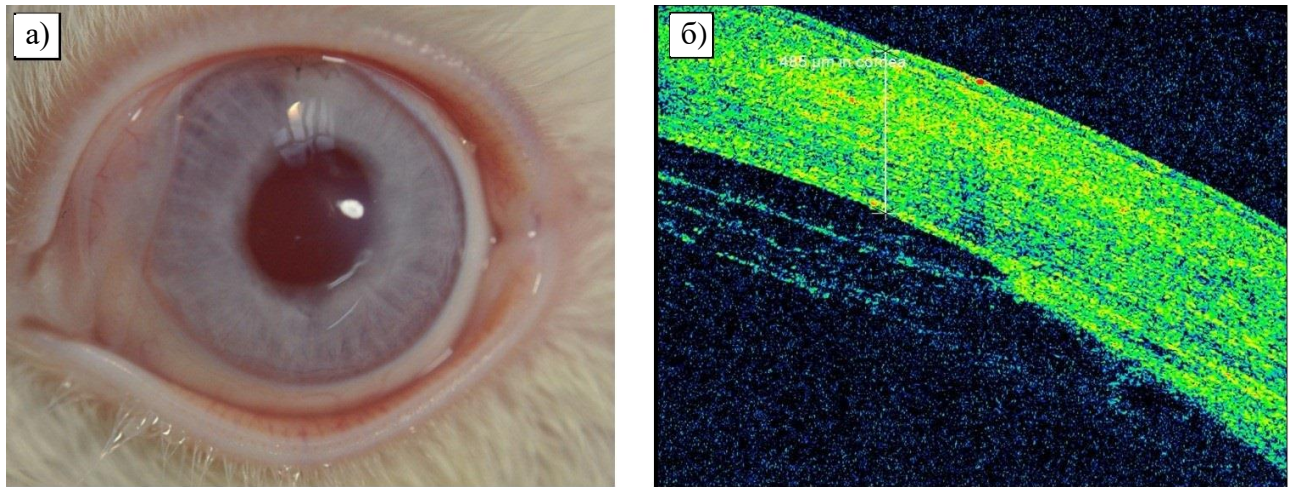


Рисунок 16 – Состояние переднего отрезка глаза (а) и ОКТ роговицы (б) животного с индуцированной буллезной кератопатией спустя месяц после имплантации ТМ из ПМК

Спустя месяц после внутрикамерной имплантации ТМ из ПМК при гистологическом исследовании передний эпителий роговицы был представлен 4-5 слоями плоских эпителиоцитов. Толщина данного слоя составляла $30,1 \pm 6$ мкм, что на 37,7% ($p < 0,05$) меньше исходного – до имплантации – значения, и на 15,7% меньше значения группы животных с имплантированной ТМ из ПЭТФ ($p < 0,05$). Собственное вещество роговой оболочки содержало преимущественно компактно расположенные коллагеновые волокна. Удельный объем щелей между ними составил $7,9 \pm 3,3\%$, что на 35,8% ($p < 0,05$) меньше данного показателя животных с имплантированной мембраной их ПЭТФ. Окрасивание альциановым синим при рН 2,5 показало наличие сильно кислых сульфатированных гликозаминогликанов (ГАГ) в строме роговицы после имплантации. Известно, что сульфатированные ГАГ уменьшают воспалительный ответ на хирургическую травму и модулируют процессы заживления без развития чрезмерного фиброза. Частично связывающие продукты распада и свободные радикалы кислорода ГАГ способны блокировать антигенные детерминанты, ингибируя развитие иммунных и аутоиммунных процессов. Это подавляет интенсивность каскада медиаторов воспаления и количество макрофагов в очаге (травмы или послеоперационные участки), тем самым уменьшая воспалительный ответ ткани на повреждение. Встречались тонкостенные новообразованные сосуды объемом не более 3% ($p < 0,05$) и лейкоцитарная инфильтрация, удельным объемом 4,9%. Задняя пограничная мембрана не изменена и хорошо визуализировалась на всем протяжении. Обнаружена адгезия мононуклеарных лейкоцитов, наслоенных на поврежденную поверхность роговицы, к десцеметовой мембране. Во многих местах эндотелий представлял собой слой изолированных отростчатых клеток.

Наличие сосудов с лейкоцитарной инфильтрации свидетельствовало о реакции роговой оболочки на искусственный материал и на протекание первичной альтерации – воспаления вследствие развития буллезной кератопатии. Однако, учитывая положение самого материала – в передней камере, природу самого полимера, а также действие введенных и наслоенных на заднюю поверхность роговицы моноклеарных лейкоцитов, объем новообразованных сосудов и лейкоцитарной инфильтрации меньше, что свидетельствовало об уменьшении выраженности воспалительных реакций. Кроме того, гистологическое исследование показало отсутствие избыточного фиброгенеза.

Создаваемый воспалением и введенными в переднюю камеру моноклеарными лейкоцитами пул цитокинов приводит к ряду внутритканых изменений в роговице: уменьшение выраженности воспалительных реакций и эндотелиально-мезенхимальный переход пролиферированных эндотелиоцитов. Дополнительным механизмом действия введенных в переднюю камеру моноклеарных лейкоцитов может быть их индуцирующее действие на стволовые клетки, локализирующиеся в области кольца Швальбе. Трековая мембрана из ПМК не только создает дополнительную площадку для прикрепления клеток, которые под действием направленного потока внутриглазной жидкости к углу передней камеры могут не адгезироваться к поврежденной поверхности роговицы, но и вследствие наличия пор способствуют сохранению питания роговой оболочки, которое она получает из жидкости передней камеры и сосудистого сплетения лимба. Кроме того, поры и выраженная шероховатость поверхности материала являются дополнительной опорой прикрепления клеток.

Для лучшей конгруэнтности поверхностей мембраны и роговой оболочки, материал необходимо не только фиксировать узловыми швами к роговице, но и предварительно придавать ему форму, близкую к роговичной кривизне. В этом случае, процент адгезированных клеток к поверхности полимера и роговице будет выше, а процент утраченных вследствие направленного потока внутриглазной жидкости к углу передней камеры будет ниже. Для этого разрабатывался способ придания материалу определенной кривизне (Пат. 2637230).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключении приведены основные результаты диссертации и сформулированы выводы о перспективах их практического применения в хирургии роговицы.

1. Наиболее перспективными для создания кератоимплантатов являются полиэтилентерефталат и полимолочная кислота.

2. Определены требования к параметрам кератоимплантатов для хирургического лечения буллезной кератопатии. Технические требования к кератоимплантату из полиэтилентерефталата: средний диаметр пор 0,4–0,6 мкм; плотность –

$6,2 \times 10^7$ пор/см²; геометрия пор – цилиндрическая; краевой угол смачивания 30°–55°; проницаемость по Н₂О 4–6 мл/мин*см² (при Р = 0,1 бар). Технические требования к кератоимплантату из полимолочной кислоты: средний диаметр пор 0,4–1,5 мкм; средняя плотность – $(3,2 \pm 0,4) \times 10^6$ пор/см²; геометрия пор – цилиндрическая; краевой угол смачивания 30°–55°; поверхностная энергия 25–55 мДж/м²; коэффициент пропускания не ниже 85%.

3. Разработаны технологии получения кератоимплантатов резорбируемого и нерезорбируемого типов. Резорбируемый кератоимплантат следует получать путем облучения пленки полимолочной кислоты (поли(L-лактид), молекулярный вес $M_w = 121000$ г/моль) толщиной (15–25) мкм пучком тяжелых ионов Хе с энергией 160 МэВ, селективного щелочного травления в водном 1,0М растворе NaOH при температуре 44°C в течении 10–25 минут, и последующего воздействия на стороны изделия низкотемпературной плазмы (температура поверхности 35°C–40°C) в течении 30 секунд. Нерезорбируемый кератоимплантат следует получать путем облучения пленки полиэтилентерефталата толщиной 8–10 мкм пучком тяжелых ионов Ag с энергией 41 МэВ, селективного щелочного травления в водном 1,5М растворе NaOH при температуре (72–82)°C, и последующего воздействия на стороны изделия низкотемпературной плазмы (температура поверхности 35°C–40°C) в течении 30 секунд.

4. Созданы прототипы имплантатов из полиэтилентерефталата и полимолочной кислоты с заданными характеристиками.

5. Доказано, что воздействие низкотемпературной плазмы увеличивает значения параметров шероховатости, снижает краевой угол смачивания, увеличивает значения свободной энергии поверхности, изменяет оптические свойства прототипов кератоимплантатов из полиэтилентерефталата и полимолочной кислоты.

6. Выбран наиболее щадящий метод стерилизации кератоимплантатов из полиэтилентерефталата и полимолочной кислоты – применение в качестве стерилизующего агента ионизированной плазменной среды. Стерилизация разработанных изделий проводится путем обработки низкотемпературной плазмой каждой стороны изделия в асептических условиях продолжительностью 30 секунд после облучения и селективного щелочного травления пленок полиэтилентерефталата и полимолочной кислоты, после чего имплантаты могут храниться в специальных пакетах для стерилизации в течение 21 дня до момента использования.

7. Имплантация прототипа кератоимплантата из полиэтилентерефталата в слои роговицы экспериментального животного с буллезной кератопатией способствует переходу альтеративных изменений роговицы в фазу пролиферативного воспаления, не вызывая избыточный фиброгенез и формирование соединительнотканного рубца. Имплантация прототипа кератоимплантата из полимолочной кис-

лоты в переднюю камеру глаза с последующим наслоением суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов купирует альтеративную воспалительную реакцию и способствует эндотелиально–мезенхимальному переходу эндотелия.

8. Кератоимплантат из полиэтилентерефталата рекомендуется применять при тяжелом течении буллезной кератопатии: при наличии стойкого диффузного стромального отека, множественных булл на поверхности роговицы, прорастании в глубоких слоях собственного вещества роговой оболочки сосудов. Мембрана на основе полиэтилентерефталата обеспечит купирование болевого синдрома, уменьшение роговичного отека и улучшит качество жизни пациента. Имплантацию кератоимплантата из полиэтилентерефталата необходимо производить в нижние слои стромы роговицы вблизи десцеметовой мембраны однократно в первые дни госпитализации пациента в стационар.

Кератоимплантат из полимолочной кислоты рекомендуется применять при появлении начальных признаков буллезной кератопатии (умеренно выраженный отек, мелкие и единичные буллы на поверхности роговицы) и в сочетании с наслоением на внутреннюю поверхность роговой оболочки аутологичных мононуклеарных лейкоцитов. Мембрана на основе полимолочной кислоты с введением в переднюю камеру суспензии клеток обеспечит уменьшение роговичного отека, купирование булл и улучшение зрительных функций пациента. Имплантацию кератоимплантата из полимолочной кислоты необходимо производить в переднюю камеру глаза с нанесением на внутреннюю поверхность роговицы суспензии аутологичных мононуклеаров крови с последующим подшиванием мембраны к роговой оболочке путем нанесения двух узловых швов в парацентральной области роговицы нитками 10/00 однократно в первые дни госпитализации пациента в стационар. Суспензию аутологичных мононуклеаров крови рекомендуется вводить на границе трековой мембраны на основе полимолочной кислоты и внутренней поверхности роговицы трехкратно в течении года после имплантации изделия.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, входящих в перечень ВАК:

1. **Филиппова Е.О.,** Карпов Д.А., Градобоев А.В., Сохорева В.В., Пичугин В.Ф. Воздействия низкотемпературной плазмы и γ -облучения на поверхностные свойства трековых мембран из полиэтилентерефталата // Перспективные материалы. – 2016. – № 5. – С. 1–13.

2. **Филиппова Е.О.,** Сохорева В.В., Пичугин В.Ф. Исследование возможности применения ядерных трековых мембран для офтальмологии // Мембраны и мембранные технологии. – 2014. – Т. 4. – № 4. – С. 267–271.

3. **Филиппова Е.О.**, Шулепов И.А., Филиппов А.В. Экспериментальное исследование трения скольжения для трековых мембран // Трение и смазка в машинах и механизмах. – 2015. – №. 6. – С. 42–46.

4. **Филиппова Е.О.**, Кривошеина О.И., Запускалов И.В. Интрастромальная имплантация трековых полимерных мембран в лечении эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы // Медицинский Вестник Башкортостана. – 2015. – Т. 10. – №. 2. – С. 137–139.

5. **Филиппова Е.О.**, Каланда Н.С., Пичугин В.Ф., Алейник А.Н., Гурьев А.М., Белоусов М.В. Исследование процесса стерилизации трековых мембран из полиэтилентерефталата с помощью низкотемпературной атмосферной плазмы // Медицинская техника. – 2017. – № 2. (302) . – С. 26–29.

6. **Филиппова Е.О.**, Кривошеина О.И. Эффективность применения суспензии мононуклеарных лейкоцитов в хирургии эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы // Сибирский научный медицинский журнал. – 2018. – Т. 38. – № 3. – С. 49–53.

7. **Филиппова Е.О.**, Пичугин В.Ф., Хлусов И.А., Дзюман А.Н., Зайцев К.В. Гостюхина А.А. Поверхностные свойства и биосовместимость *in vitro* трековой мембраны на основе полиэтилентерефталата после комбинированного воздействия атмосферной низкотемпературной плазмы и ионизирующего γ - излучения радионуклида ^{60}Co // Бюллетень сибирской медицины. – 2018. – № 4. – С. 5–9.

8. **Филиппова Е.О.**, Кривошеина О.И., Запускалов И.В. Экспериментальное исследование применения аутологичных мононуклеаров крови в лечении эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы // Медицинский Вестник Башкортостана. – 2016. – Т. 11. – №. 1. – С. 113–115.

9. **Филиппова Е.О.**, Кривошеина О.И., Запускалов И.В. Локальное применение аутологичных мононуклеаров крови в лечении эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы // Бюллетень сибирской медицины. – 2016. – Т. 15. – № 2. – С. 70–75.

10. **Филиппова Е.О.**, Кривошеина О.И. Эффективность внутрикамерного введения аутологичных мононуклеаров крови в хирургическом лечении эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы // Медицинский Вестник Башкортостана. – 2017. – Т. 12. – №. 2. – С. 41–44.

11. Иванова Н.М., **Филиппова Е.О.**, Карпов Д.А., Пичугин В.Ф. Свойства тонких пленок на основе полимолочной кислоты после паровой стерилизации // Перспективные материалы. – 2019. – № 8. – С. 42–52.

12. **Филиппова Е.О.**, Черняков А.С., Иванова Н.М. Применение полимерных материалов в лечении заболеваний роговицы // Вестник Авиценны. – 2019. – Т. 21(3). – С. 496–501.

13. **Филиппова Е.О.**, Кривошеина О.И., Хлусов И.А., Пичугин В.Ф., Дзюман А.Н., Зайцев К.В. Интрастромальная имплантация трековых мембран с пренатальными стромальными клетками человека при эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы в эксперименте // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – 18 (2). – С. 157–164.

14. **Филиппова Е.О.**, Корепанов В.И., Пичугин В.Ф. Влияние плазменной модификации поверхности и стерилизации на оптические характеристики трековых мембран из полиэтилентерефталата // Журнал технической физики. – 2020. – Т. 90. – № 4. – С. 665–670.

15. **Филиппова Е.О.**, Пичугин В.Ф., Филиппов А.В., Градобоев А.В. Механическо-трибологические свойства трековых мембран из полиэтилентерефталата после паровой и лучевой стерилизации // Трение и износ. – Т. 40. – № 6. – С. 694–699.

16. Дениско М.С., Кривошеина О.И., **Филиппова Е.О.**, Мустафина Л.Р. Патоморфологические особенности регенерации роговицы при экспериментально индуцированной дистрофии на фоне интрастромального введения аутологичных мононуклеарных лейкоцитов // Медицинский академический журнал. – 2018. – Т. 18. – № 3. – С. 57–63.

17. **Филиппова Е.О.** Структурные изменения роговицы на фоне интрастромальной имплантации трековых мембран на основе полиэтилентерефталата // Морфология. – 2019. – Т. 155. – № 2. – С. 294–295.

18. **Филиппова Е.О.** Морфологические особенности экспериментально индуцированной эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы // Морфология. – 2019. – Т. 155. – № 2. – С. 294.

19. **Филиппова Е.О.**, Кривошеина О.И. Особенности проявлений экспериментально индуцированной эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы и эффективность клеточной терапии заболевания // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2020. – № 64 (1). – С. 23–30.

20. **Филиппова Е.О.**, Карпов Д.А., Пичугин В.Ф., Ульбрихт М. Исследование влияния низкотемпературной плазмы и паровой стерилизации на свойства трековых мембран из полиэтилентерефталата // Перспективные материалы. – 2020. – № 1. – С. 21–32.

21. Иванова Н.М., **Филиппова Е.О.**, Алейник А.Н., Пичугин В.Ф. Влияние низкотемпературной плазмы и γ -излучения на поверхностные свойства тонких пленок на основе полимолочной кислоты // Физика и химия обработки материалов. – 2020. – № 6. – С. 40–55.

22. **Филиппова Е.О.**, Иванова Н.М., Пичугин В.Ф. Влияние внутрикамерной имплантации плёнок полимолочной кислоты, модифицированных в плазме на протекание индуцированной *in vivo* буллёзной кератопатии // Вестник Авиценны. – 2021. Т. 23 (1). – С. 32–38.

23. Иванова Н. М., **Филиппова Е. О.**, Твердохлебов С. И., Левкович Н. В., Апель П. Ю. Получение, структура и свойства трековых мембран на основе полимолочной кислоты // Мембраны и мембранные технологии. – 2021. – №. 5. – С. 313–322.

В зарубежных изданиях, входящих в базы Scopus, Web of Science:

1. **Filippova E.O.**, Pichugin V.F., Sokhoreva V.V. Potential use of nuclear track membranes in ophthalmology // Petroleum Chemistry. – 2014. – Vol. 54. – №. 8. – P. 669–672.

2. **Filippova E.O.**, Karpov D.A., Gradoboev A.V., Sohoreva V.V., Pichugin V.F. Influence of Low-Temperature Plasma and γ Radiation on the Surface Properties of PET Track Membranes // Inorganic Materials: Applied Research. – 2016. – Vol. 7. – №. 5. – P. 484–492.

3. **Filippova E.O.**, Filippov A.V., Shulepov I.A. Experimental Study of Sliding Friction for PET Track Membranes // IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering. – 2016. – Vol. 125. – P. 1–7.

4. **Filippova E.O.**, Calanda N.S., Pichugin V.F. Sterilization of Polyethylene Terephthalate Track Membranes Using Low temperature Atmospheric-pressure Plasma // Biomedical Engineering. – 2017. – Vol. 51. – № 2. – P. 111–115.

5. **Filippova E.O.**, Krivosheina O.I., Khlusov I.A., Pichugin V.F., Dzyuman A.N., Zaitsev K.V. Intrastromal implantation of track-etched membranes overlaid by prenatal stromal cells for bullous keratopathy in the experiment // Bulletin of Siberian Medicine. – 2019. – Vol. 18 (2). – P. 157–164.

6. **Filippova E.O.**, Ivanova N.M., Pichugin V.F., Sun Z. Polylactic acid films implantation into the anterior chamber of eye in vivo // IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering. – 2019. – Vol. 597. – P. 1–5.

7. **Filippova E.O.**, Pichugin V.F., Khlusov I.A., Dzyuman A.N., Zaitsev K.V., Gostyukhina A.A. Surface properties and in vitro biocompatibility of a track membrane based on polyethylene terephthalate after exposure to low-temperature atmospheric plasma and ionizing γ -radionuclide ^{60}Co // Bulletin of Siberian Medicine. – 2018. – Vol. 17 (2). P. 152–162.

8. **Ekaterina O. Filippova**, Vladimir F. Pichugin Low temperature plasma and steam sterilization influence on the PET track-etched membrane surface properties // AIP Conference Proceedings. – 2018. – Vol. 2051. – P. 020089-1–020089-4.

9. **Ekaterina O. Filippova**, Vladimir F. Pichugin Steam sterilization effect on the PET track-etched membranes properties // AIP Conference Proceedings. – 2018. – Vol. 2051. – P. 020090-1–020090-4.

10. **Filippova E.**, Pichugin V., Gradoboev A., Filippov A. V. Sterilization influence on PET track membrane properties // 13 Oct 2016, In : AIP Conference Proceedings. 1772

11. **Ekaterina O. Filippova**, Nina M. Ivanova Poly(lactic acid) properties after steam sterilization and possibility of its using as a corneal implant // AIP Conference Proceedings. – 2019. – Vol. 2167. – P. 020104-1-020104-4.

12. Ivanova N.M., **Filippova E.O.**, Karpov D.A., Pichugin V.F. Poly(lactic Acid) Thin Films Properties after Steam Sterilization // Inorganic Materials: Applied Research. – 2020. – Vol. 11. – No. 2. – P. 377–384.

13. **Filippova E.O.**, Korepanov V.I., Pichugin V.F. Effect of Plasma Modification of Surface and Sterilization on Optical Characteristics of Poly(ethylene Terephthalate) Track Membranes // Technical Physics. – 2020. – Vol. 65. – № 4. – P. 640–644.

14. **Ekaterina O. Filippova**, Nina M. Ivanova The Influence of the Plasma Modification on Properties of PCL Films as Corneal Implants // AIP Conference Proceedings. – 2020. – Vol. 2310. – P/ 020096-1–020096-4.

15. **Ekaterina O. Filippova**, Anna D. Zhuravleva, Evgeniya A. Gorbunova, Nina M. Ivanova The Influence of Implantation of Plasma-Modified Poly(lactic Acid) Films on the Structure of the Cornea // AIP Conference Proceedings. – 2020. – Vol. 2310. – P/ 020097-1–020097-4.

16. Ivanova N.M., **Filippova E.O.**, Aleinik A.N., Pichugin V.F. Effect of Low-Temperature Plasma Treatment and γ Irradiation on the Surface Properties of Thin Films Based on Poly(lactic Acid) // Inorganic Materials: Applied Research. – 2021. – Vol. 12. – № 3. – P. 664–675.

17. Ivanova N.M., **Filippova E.O.**, Tverdokhlebov S.I., Levkovich N.V., Apel P.Y. Preparation, Structure, and Properties of Track-Etched Membranes Based on Poly(lactic Acid) // Membranes and Membrane Technologies. – 2021. – Vol. 5. – P. 282-290.

Патенты на изобретения РФ

1. Пат. 2594447 Российская Федерация, МПК51 C1, A61F 9/007. Способ лечения эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы / **Филиппова Е. О.**, Запускалов И. В., Кривошеина О. И.; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России. – № 2015131871/14; заявл. 30.07.2015; опубл. 20.08.2016, Бюл. № 23 – 7 с.

2. Пат. 2637230 Российская Федерация, МПК51, B01D 67/00, B29C 21/10. Способ формирования полимерной трековой мембраны с полостью заданной кривизны и устройство для его осуществления / **Филиппова Е. О.**, Филиппов А. В., Кудияров В. Н.; заявитель и патентообладатель ФГАОУ ВО НИ ТПУ; заявл. 26.10.2016, опубл. 01.12.2017, Бюл. № 34 – 13 с.

3. Пат. 2601317 Российская Федерация, МПК51, A61K 35/16, A61P 27/02. Способ лечения эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы / **Филиппова Е. О.**, Запускалов И. В., Кривошеина О. И.; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, Филиппова Е. О., Запускалов И. В., Кривошеина О. И. – № 2015131769; заявл. 30.06.2015; опубл. 10.10.2016, Бюл. № 31 – 14 с.

4. Пат. 2674237 Российская Федерация, МПК51 С1, А61F 9/00, А61К 35/16, А61Р 27/02. Способ хирургического лечения эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы / Кривошеина О. И.; Дениско М. С., **Филиппова Е. О.**, заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, Кривошеина О. И.; Дениско М. С., Филиппова Е. О. – № 2017127350; заявл. 31.07.2015; опубл. 05.12.2018, Бюл. № 34 – 13 с.

Отпечатано в типографии

Издательский дом Томского государственного университета

634050, г. Томск, Московский тр., 8. Тел. 8(3822) 52-98-49

Формат 60x84 1/16. Объем 1,5 п.л. Тираж 120 экз.

Заказ № 4898. Подписано в печать 20.12.2021 г.