

# МЕХАНИЗМ РАЗВИТИЯ ГЛИСТЕНИНГА В ИНТРАОКУЛЯРНЫХ ЛИНЗАХ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Интраокулярная линза (ИОЛ) – это искусственная линза, используемая для замены собственного нативного хрусталика глаза в случаях его помутнения при катаракте или других дегенеративных процессах [1]. Ежегодно в мире проводится около 20 млн хирургических вмешательств с имплантацией ИОЛ. С учетом увеличивающейся продолжительности жизни количество имплантаций в будущем, несомненно, будет расти.

Эволюция материалов, используемых для производства ИОЛ, продолжается до настоящего времени с момента новаторской демонстрации Harold Ridley в 1949 г. [2]. Изначально ИОЛ выполнялись из полиметилметакрилата – РММА (другое название Plexiglass – оргстекло). Этот материал был выбран из-за его прозрачности и отличной биосовместимости. Однако в связи с ригидностью РММА имплантация линз выполнялась через большие разрезы, что увеличивало риск послеоперационных осложнений и удлиняло время госпитализации. Через некоторое время были разработаны новые полимерные материалы, которые обладали не только высокой биосовместимостью и хорошими оптическими характеристиками, но и выраженной гибкостью. Линзы, выполненные из этих материалов, можно складывать, чтобы имплантировать их в глаз через минимально возможный разрез (2-3 мм для гибких материалов vs 5-7 мм для жестких материалов). Первыми гибкими линзами были ИОЛ из силикона [3], затем в офтальмо-

логическую практику вошли гидрогелевые ИОЛ [4, 5].

Гидрогелевые ИОЛ производят из поли-гидроксиэтилметакрилата – poly-HEMA, перекрестно сшитого полимера, который при отсутствии воды становится жестким, а в воде набухает и имеет консистенцию гибкого геля. Развитие рынка гибких ИОЛ привело к увеличению распространенности различных вариантов линз из гидрофобного материала. Они выполнены из сополимеров, т.е. есть из смеси мономеров метилметакрилата (ММА), этилметакрилата (ЕМА), 2-гидроксиэтилметакрилата (HEMA) и т.д. Путем изменения некоторых параметров, таких как количество отдельных мономеров и перекрестное сшивание полимерных цепей, могут быть получены гидрофобные акриловые сополимеры с разными физико-химическими свойствами. Например, РММА обеспечивает жесткость материала, РЕМА придает материалу определенную гибкость и эластичность [6–8], а гидроксильная группа в поли-HEMA ответственна за увеличение гигроскопичности полимера [9].

Накопление воды – это проблема, которая в различной степени затрагивает все материалы, из которых производятся ИОЛ. Содержание воды в гидрофильных полимерах в равновесном состоянии составляет 18-32%, в то время как в гидрофобных материалах – только 0,1-0,5% [9]. Обычно вода проникает в линзу путем диффузии и может накапливаться в своеобразных полостях – зонах низкой плотности материала. Если вода равномерно распределяется вну-

три линзы без формирования крупных вакуолей, то проблем со зрением не возникает. Напротив, накопление воды в материале линзы в виде крупных вакуолей, которое и носит название глестенинг, может сопровождаться снижением зрения. Действительно, аномальное накопление воды приводит к переменчивости показателя преломления в различных зонах линзы. Это вызывает диффузию световых лучей, что может ухудшить качество изображения на сетчатке. Поскольку зрение обеспечивается не только оптическими, но и нейронными функциями, влияние глестенинга на зрение по данным литературы до сих пор остается предметом дискуссий [10–13]. Глестенинг возникает спустя некоторое время после имплантации – от нескольких месяцев до нескольких лет [14]. При осмотре ИОЛ за щелевой лампой определяется характерный блеск, вызванный рассеянием света включениями воды (микровакуолями) [15]. Если размер и количество микровакуолей превысит определенный порог, то качество зрения пациента может значительно ухудшиться [16].

Впервые глестенинг был выявлен в гидрофобных акриловых ИОЛ, однако другие материалы, включая силикон, гидрогель и полиметилметакрилат, также подвержены формированию глестенинга. При осмотре за микроскопом выявляются блестящие микровакуоли, распределенные обычно по всему материалу линзы. Мелкие микровакуоли размером от нескольких мкм до 20 мкм имеют сферическую или чаще эллипсоидальную

## ИННОВАЦИИ В ОФТАЛЬМОЛОГИИ

форму. В исследованиях *in vitro*, когда появление глистенинга индуцируется тепловым шоком, могут формироваться особенно крупные вакуоли (более 20 мкм). При удалении ИОЛ из воды и высушивании, включения имеют тенденцию к исчезновению. Интересно, что при последующей гидратации во многих случаях микровакуоли, как правило, появляются и растут в тех же местах, где они были раньше. Физические характеристики глистенинга (светорассеяние и пропускание света) [17–20] и его влияние на зрение (контрастная чувствительность и острота зрения) [21–26] изучены в большом количестве крупных исследований.

В этих исследованиях был предложен возможный механизм образования вакуолей внутри ИОЛ [27–37]. Очевидно, что в материале ИОЛ имеет место спинодальный распад, который представляет собой расщепление однородного вещества на различные фазы. Исходная однородная смешиваемая многокомпонентная полимерная сеть в результате тепловой нагрузки разделяется на несмешивающиеся домены. Kato et al. [37], используя термодинамические параметры, описали данное это явление в линзах AcrySof. Они также утверждают, что когда материал подвергается последовательным процессам нагрева и охлаждения, микровакуоли появляются в одних и тех же позициях [37].

Согласно более современной теории [27] появление вакуолей объясняется разницей осмотического давления между полостями в материале и жидкостью, в которой ИОЛ находится после имплантации. Следуя этому предположению, образование вакуолей является результатом изначального присутствия в материале гидрофильных примесей в виде частиц второй фазы [28–31] или примесей, образовавшихся в результате гидролиза при старении материала [32].

До настоящего времени все исследования базировались на физических методах и были сосредоточены на макроскопических оптических эффектах (светорассеяние, пропускание света) или на моделировании роста вакуолей. Исследований молекулярной основы этого явления, т.е.

химической природы изменений в полимере, происходящих при формировании глистенинга, до сих пор не проводилось. Согласно результатам нашего исследования, комбинационная рамановская спектроскопия (РС) представляет собой отличный метод изучения механизма появления глистенинга.

Рамановская спектроскопия (спектроскопия комбинационного рассеяния, колебательная спектроскопия) – это метод аналитической спектроскопии [38], широко используемый во многих областях науки, таких как науки о жизни [39, 40], мягкой материи [41] и науки о полимерах [42]. В основе рамановской спектроскопии лежит способность исследуемых систем (молекул) к неупругому (рамановскому, или комбинационному) рассеянию монохроматического света. Колебательная спектроскопия дает ключевую информацию о структуре молекул. Для сбора спектра требуется направить падающий луч точно на образец, а затем собрать рассеянный свет. Наблюдая положение и интенсивность полос в спектре комбинационного рассеяния, можно идентифицировать химические компоненты или изучить внутримолекулярные взаимодействия. Не существует двух молекул, которые имеют одинаковые спектры комбинационного рассеяния, а интенсивность рассеянного света связана с количеством

вещества. Высокая химическая специфичность рамановской спектроскопии позволяет идентифицировать вещества, входящие в состав исследуемого образца, и их концентрацию. Наконец, комбинируя этот метод с оптической микроскопией, можно получить рамановские спектры в микрометрическом масштабе (микрораман) и рамановские карты выбранных химических компонентов [43].

Ранее рамановская спектроскопия уже использовалась в области офтальмологии [44, 45], в том числе для характеристики контактных линз и человеческого хрусталика [46–51].

В данной работе мы объединили оптическую микроскопию с микрорамановской спектроскопией для анализа отдельных участков ИОЛ внутри и вокруг микровакуоли. В частности, в работе проводится сравнение двух различных материалов ИОЛ: первый представляет собой стандартный гидрофобный акриловый сополимер, а второй отличается присутствием в материале определенного количества гидрофильного полимерного компонента.

Мы провели точный анализ интенсивности полос полимерного и водного компонентов материалов, получив информацию о том, как происходит дисперсия воды в полимерах и формирование микровакуолей. Кроме того, используя мультивариантный статистический анализ (ана-

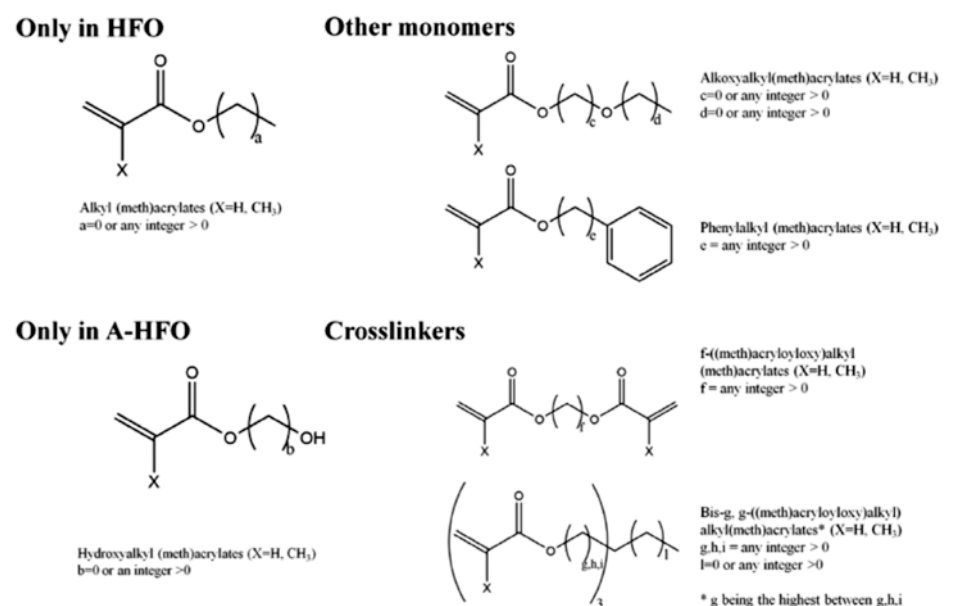


Рис. 1. Химическая структура мономеров, входящих в состав сополимеров материала анализируемых ИОЛ



лиз главных компонент), мы изучили механизм скопления воды и формирования микровакуолей.

### ИОЛ

Мы провели оптический и рамановский анализ двух типов ИОЛ, выполненных из сополимеров. **Линзы были предоставлены компанией Soleko s.p.a.** Известно, что одна из моделей ИОЛ, обозначенная в дальнейшем как линзы HFO (Hydrophobic Foldable Ocular), характеризуется выраженной склонностью к формированию глистенинга. Материал ИОЛ HFO содержит следующую смесь полимеров (см. рис. 1): алкил (мет)акрилаты, алкоксиалкил (мет)акрилат, фенилалкил (мет)акрилат и некоторые сшивающие агенты, такие как f-((мет)акрилоилокси) алкил (мет)акрилаты и бис-g-g-(((мет)акрилоилокси) алкил) алкил (мет)акрилаты. Для производства другой модели ИОЛ, обозначенной в дальнейшем как линзы A-HFO (Advanced-Hydrophobic Foldable Ocular), используется модифицированная полимерная смесь, в которой алкил (мет)акрилаты заменены гидроксилалкил (мет)акрилатами (см. рис. 1). Наличие этого последнего компонента снижает внутреннюю гидрофобность материала без увеличения коэффициента гидратации полимера, который остается на уровне около 1%. При производстве обоих типов ИОЛ к полимерным

смесям добавляли также полимер, блокирующий УФ-излучение (бензотриазолфенол), и радикальный инициатор (бис-алкилпероксидикарбонаты). Оба материала имеют температуру стеклования значительно ниже физиологической температуры: 1° С для HFO и 8° С для A-HFO. Показатель преломления исследуемых ИОЛ составляет: 1,526 (при длине волны 546 нм, T=20° С) и 1,506 (при длине волны 546 нм, T=20° С) для HFO и для A-HFO соответственно. **При равновесии в водных растворах содержание воды в линзах составляет 1,1% (HFO) и 2,9% (A-HFO). Оптическая сила анализируемых ИОЛ была стандартной и составляла ≈20 диоптрий.**

### Активация глистенинга

Формирование глистенинга активировалось по протоколу, описанному в патенте US6636299В1 [52]. ИОЛ выдерживали на водяной бане с дистиллированной водой при температуре 48° С в течение 48 часов. За это время вода проникала внутрь ИОЛ, которые, тем не менее, оставались прозрачными. Затем выполняли так называемый тепловой удар – ИОЛ быстро погружались во вторую водяную баню с дистиллированной водой при температуре 25° С, где выдерживались в течение 24 часов. Протокол активации глистенинга и схематическое оптическое изображение ИОЛ представлены на рис. 2а. На рисун-

ке 2b представлены репрезентативные изображения линз HFO и A-HFO в том виде, в каком они находились в конце эксперимента.

### Рамановская система

Рамановские спектры были получены при помощи инвертированного рамановского конфокального микроскопа (WiTec, Alpha 300). Система оснащена лазерным источником возбуждения с длиной волны 532 нм. Лазер фокусировали на ИОЛ через объектив микроскопа с 60-кратным увеличением (NA=0,8). Обратнo-рассеянный свет был собран этим же объективом, пропущен через крайовой фильтр и направлен на спектрограф при помощи оптического волокна 50 мкм, что обеспечивало конфокальность системы. Рамановские фотоны, рассеянные с использованием решетки 600 линий/мм, регистрировались ПЗС-матрицей, охлажденной до -60° С. Пространственное разрешение использованной конфокальной системы составляло ~0,6 мкм в поперечной плоскости и ~1,4 мкм по продольной оси. После активации глистенинга ИОЛ быстро фиксировали на дне стеклянной чашки Петри. Чтобы избежать высыхания ИОЛ, чашку заполняли дистиллированной водой. Как правило, мощность рамановского пучка, падающего на образец, составляла 6 мВт; время интегрирования для каждого спектра составляло 1 с. В этих условиях наблюдались флуктуации сигнала ниже, чем одна часть из 103, что оценивалось по повторным захватам рамановского сигнала в той же точке. Сбор спектров проводился в диапазоне волновых чисел 250-4000 см<sup>-1</sup> со спектральным разрешением ≈3 см<sup>-1</sup>.

### Оптический анализ глистенинга

После достижения равновесного состояния в обеих моделях ИОЛ при помощи оптического микроскопа проводилась оценка степени выраженности глистенинга. Как и ожидалось, в линзах HFO все поле зрения было заполнено огромным количеством микровакуолей, размер которых варьировался от 5 до 25 мкм. Напротив, в линзах A-HFO было обнаружено гораздо меньшее количество микровакуолей, в

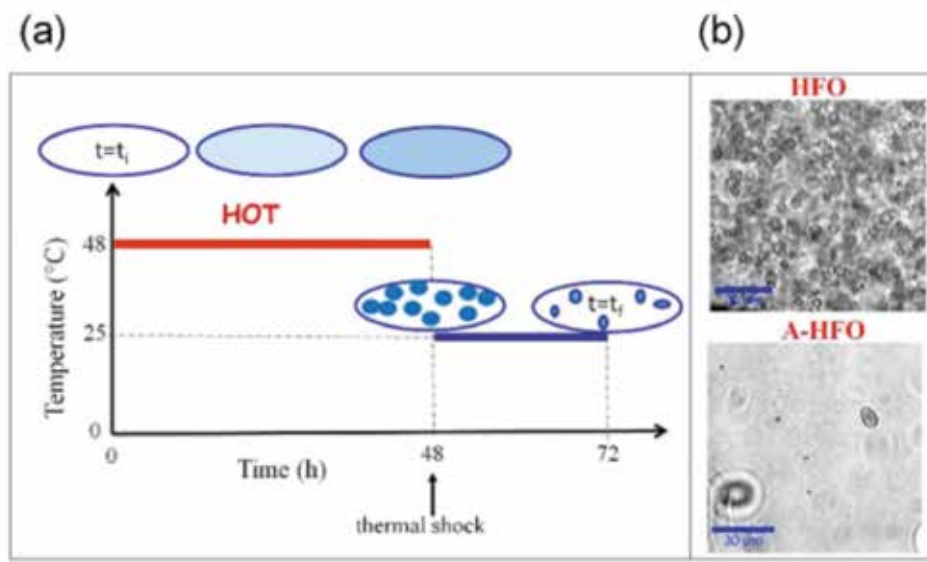


Рис. 2. Схематическое изображение процедуры активации глистенинга (а). Типичные изображения ИОЛ при оптической микроскопии после активации глистенинга (б): вверху – линза HFO, внизу – линза A-HFO. Шаг шкалы составляет 30 мкм

## ИННОВАЦИИ В ОФТАЛЬМОЛОГИИ

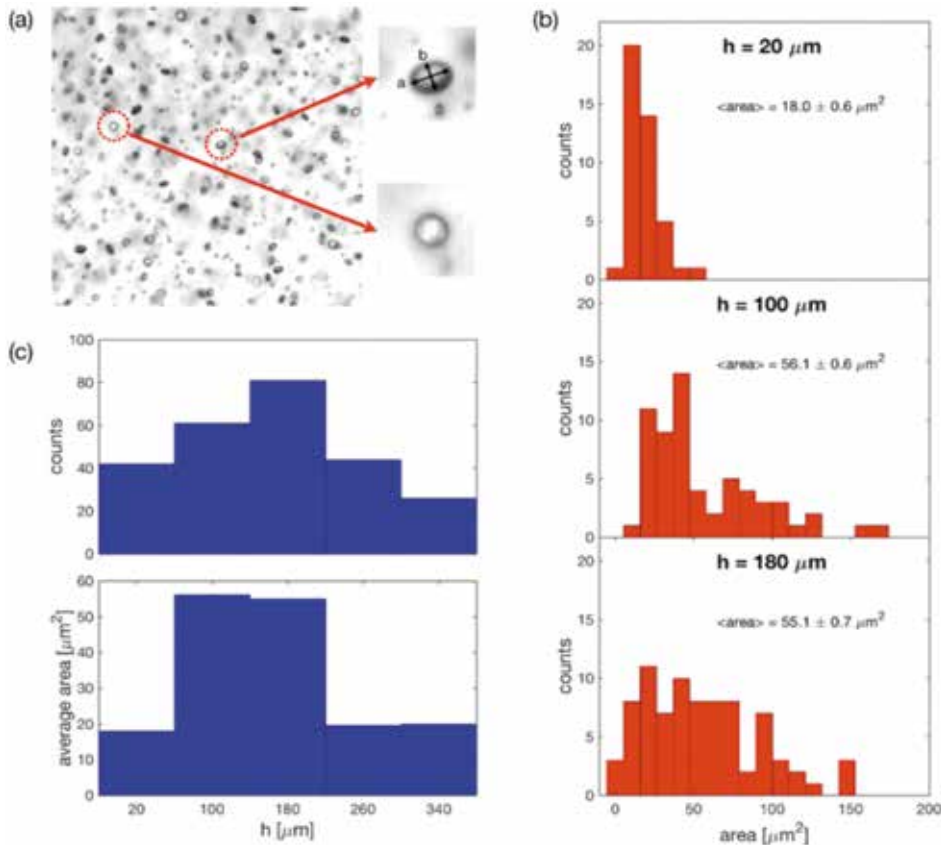


Рис. 3. Оптические изображения линз НФО. На двух вкладках показаны типичные сферическая и эллипсоидная вакуоли на большом увеличении (а). Распределение площади эллипсов, рассчитанное для трех разных глубин расположения вакуолей в материале ИОЛ ( $h=20, 100$  и  $180$  мкм) (б). Для каждой гистограммы указаны средняя площадь и стандартное отклонение. Распределение общего количества вакуолей, обнаруженных в зоне площадью  $0,02$  мкм<sup>2</sup> (верхняя часть), и средней площади вакуолей (нижняя часть) в зависимости от глубины их расположения в материале ИОЛ (с)

основном представляющих собой крошечные включения; часто все поле зрения было совершенно свободным от микровакуолей. Важно отметить, что из-за чрезвычайно малого числа вакуолей в анализ были включены линзы А-НФО со степенью глистенинга, равной нулю по классификации Miyata [33]. Анализ количества и размера вакуолей в линзах НФО был выполнен путем получения изображений зоны ИОЛ площадью  $160 \times 130$  мкм на разных глубинах материала –  $h$  ( $h=20, 100, 180, 260$  и  $340$  мкм).

Как видно на рис. 3а, только несколько вакуолей имеют сферическую форму, в то время как большинство из них выглядят эллипсоидальными. Это связано со случайной динамикой процесса сополимеризации, который сопровождается формированием неоднородной структуры материала. По факту, при производстве сополимеров компоненты объемной полимерной сети в материале соединяются не полностью, а полимерные

цепи укладываются не идеально. Как следствие, случайным образом в материале могут быть сформированы области с более низкой плотностью,

которые и могут заполняться водой. Заполнение этих полостей водой приводит к скачкообразным изменениям показателя преломления, что приводит к рассеянию света. Чтобы рассчитать распределение микровакуолей по размерам, мы оценили площадь эллипса путем измерения осей  $a$  и  $b$  (см. рис. 3а). На рисунке 3б показано распределение площадей вакуолей на разных глубинах материала ИОЛ вместе с соответствующими средними значениями и стандартными отклонениями. Самые большие вакуоли находились во внутренней области искусственного хрусталика, что явно связано с трудностью высвобождения воды из хрусталика во время его сжатия, индуцированного тепловым шоком. В соответствии с этим площади вакуолей начинают уменьшаться по мере приближения к верхнему краю ИОЛ. Наконец, на рис. 3в показано распределение количества вакуолей (обнаруженных на площади  $0,02$  мкм<sup>2</sup>) и средней площади вакуолей в зависимости от глубины расположения в материале ИОЛ.

### Рамановские спектры ИОЛ

Прежде всего, мы записали рамановские спектры (спектры комбинационного рассеяния) ИОЛ до формирования глистенинга. На рисунке 4 показаны спектры ИОЛ НФО и А-НФО в диапазоне волновых чисел

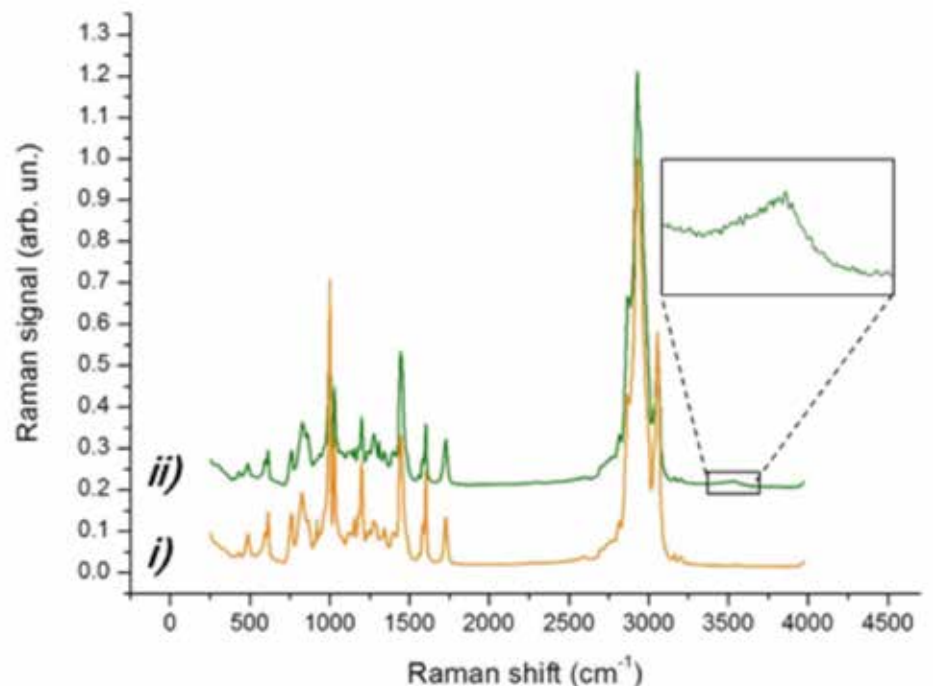


Рис. 4. Типичные рамановские спектры, полученные при анализе линз НФО (i) и А-НФО (ii).



от 500 до 3800  $\text{cm}^{-1}$ . Первой важной информацией, основанной на полученных спектрах, были данные о биосовместимости материалов линз. Фактически, ключевую проблему для биосовместимости полимерных материалов создают включения в материал мономеров, которые не полностью полимеризовались [48]. Интересно, что такие мономеры создают мощные рамановские спектры, которые исчезают после полимеризации. Например, мономеры создают полосы вблизи 1640  $\text{cm}^{-1}$ , приписываемые растяжению связей  $\text{C}=\text{C}$ . Наличие в полученном спектре такой полосы свидетельствует о присутствии в материале остаточных мономеров, что может быть использовано в качестве чувствительного теста для контроля качества материала. Данный пик полностью отсутствовал в наших спектрах, и это свидетельствовало о довольно хорошей степени биосовместимости анализируемых материалов.

Большинство рамановских полос, наблюдаемых при анализе линз HFO, идентифицированы в соответствии с данными литературы [53–62]. Полосы в диапазоне волновых чисел 800–1800  $\text{cm}^{-1}$ , то есть 496, 622, 768, 1004, 1032, 1157, 1181, 1204, 1346, 1449, 1585 и 1605  $\text{cm}^{-1}$ , в основном можно отнести к колебаниям колец и алкильным группам. Другие полосы, такие как полосы вблизи 1730 и 1460  $\text{cm}^{-1}$ , относятся к связи  $\nu(\text{C}=\text{O})$  группы  $\text{C}-\text{COO}$  и связи  $\delta(\text{C}-\text{H})$  группы  $\text{O}-\text{CH}_3$  соответственно. Широкая полоса между волновыми числами 2600 и 3200  $\text{cm}^{-1}$  является результатом сочетания многих симметричных и асимметричных колебаний связей  $\text{CH}_{2,3}$ . Наконец, для линз HFO стоит отметить наличие небольшого, но четко выявляемого пика около 3540  $\text{cm}^{-1}$  (см. вкладку в рисунке). Эту полосу приписывают свободным гидроксильным группам; она четко различима по более широким полосам растяжения связей  $\text{OH}$  в молекуле воды (симметричные и асимметричные растяжения связей в группах  $\text{O}-\text{H}$  в диапазоне волновых чисел 3200–3700  $\text{cm}^{-1}$ ) [63].

#### Рамановский анализ отдельных микровакуолей

Измерения проводились путем получения спектров комбинацион-

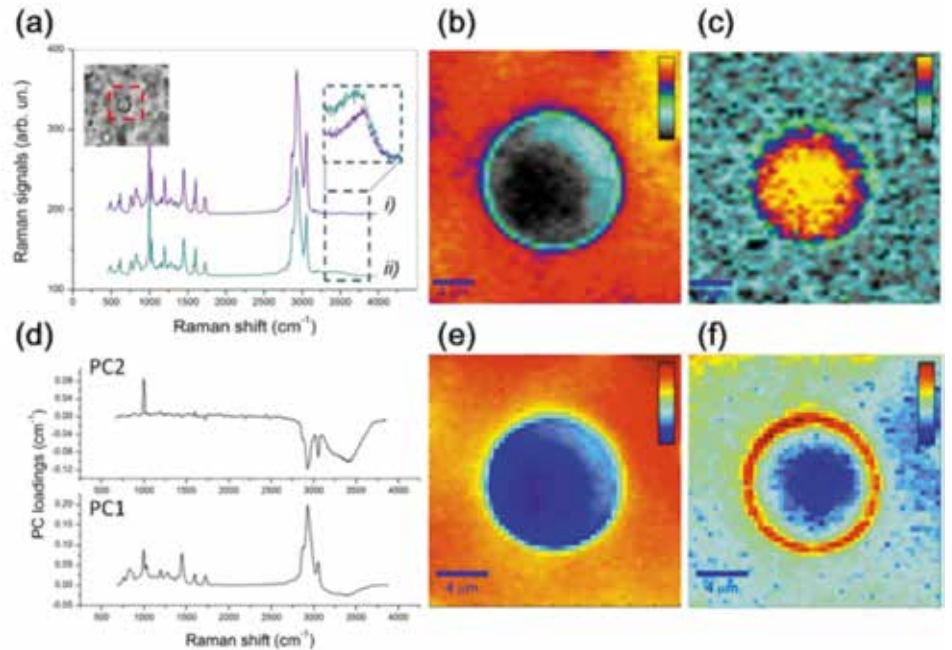


Рис. 5. Типичные рамановские спектры, полученные при анализе внешней части (i) и внутренней части (ii) микровакуоли (a). На вкладке представлено оптическое изображение отдельной микровакуоли в линзе HFO, выбранной для проведения рамановского анализа. Пунктирной линией ограничена зона, сканируемая лазерным лучом. Рамановское изображение микровакуоли, представленной на части a), получена полоса интенсивности полимера в диапазоне между 2800 и 2900  $\text{cm}^{-1}$  (b). Распределение воды в микровакуоли получено путем построения графика интенсивности характеристик в диапазоне от 3200 до 3700  $\text{cm}^{-1}$  (c). График нагрузки первой (внизу) и второй (вверху) главных компонент, полученный в результате анализа спектров, сформированных при растровом сканировании вакуоли и участка полимера вокруг нее (d). Карта первой главной компоненты, полученная в результате анализа главных компонент рамановского спектра (e). То же, что и для части e), но для второй главной компоненты (f)

ного рассеяния при растровом сканировании, центрированном на одной отдельной микровакуоли в экваториальной зоне линзы. Область анализа была немного больше, чем размер вакуоли, для того чтобы исследовать состояние полимера вокруг вакуоли, т.е. ее стенок. Как правило, растровые сканирования выполнялись в области площадью 20x20  $\mu\text{m}$  с шагом 0,5  $\mu\text{m}$ . Мощность комбинационного пучка, падающего на образец, составляла 6 мВт, а время интегрирования для каждого спектра составляло 1 с. Эта процедура применялась для обоих проанализированных типов ИОЛ.

#### Рамановский анализ глистенинга в линзах HFO

На рисунке 5a показаны типичные спектры комбинационного рассеяния, записанные с внешней части (i) и с внутренней части (ii) микровакуоли, что показано на вкладке того же рисунка. Можно сразу заметить, что оба спектра идентичны спектрам, полученным до активации формирования глистенинга (см. рис. 4), за исключением спектральной области 3200–3700  $\text{cm}^{-1}$ , где появляются новые

пики. В частности, внутри вакуоли можно отметить совместное присутствие полос воды (симметричное и асимметричное растяжение связей в группах  $\text{OH}$ ) и полос полимера. Очевидно, что интенсивность полос полимера внутри вакуоли слабее, чем интенсивность полос полимера во внешней части вакуоли. Это связано с тем, что внутри вакуоли концентрация полимера уменьшается, а концентрация воды увеличивается. Полученные данные подтверждают общепринятую точку зрения, что вакуоли – это не просто заполненные водой полости, а скорее области, в которых наблюдается совместное присутствие полимеров и воды.

Чтобы оценить среднюю концентрацию воды внутри микровакуоли, мы сравнили интенсивность полос полимера и воды с интенсивностью полос, полученных от чистых образцов этих двух компонентов. Рассчитав средние значения полос полимера и воды внутри микровакуоли, мы обнаружили, что относительная концентрация воды составляет 23%. Наоборот, во внешней части вакуоли полоса воды не определялась, по

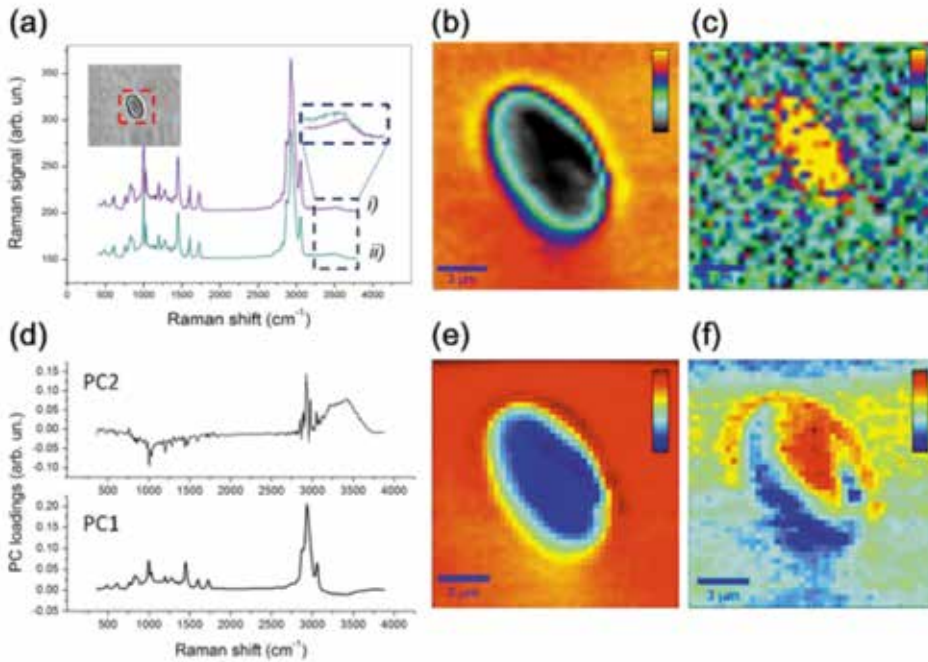


Рис. 6. Типичные рамановские спектры, полученные при анализе внешней части (i) и внутренней части (ii) микровакуоли (a). На вкладке представлено оптическое изображение отдельной микровакуоли в линзе A-HFO, выбранной для проведения рамановского анализа. Пунктирной линией ограничена зона, сканированная лазерным лучом. Рамановское изображение микровакуоли, представленной на части a), получена полоса интенсивности полимера в диапазоне между 2800 и 2900  $\text{cm}^{-1}$  (b). Распределение воды в микровакуоли получено путем построения графика интенсивности характеристик в диапазоне от 3200 до 3700  $\text{cm}^{-1}$  (c). График нагрузки первой (внизу) и второй (вверху) главных компонент, полученный в результате анализа спектров, сформированных при растровом сканировании вакуоли и участка полимера вокруг нее (d). Карта первой главной компоненты, полученная в результате анализа главных компонент рамановского спектра (e). То же, что и для части e), но для второй главной компоненты (f)

крайней мере, на уровне чувствительности нашего теста. В то же время иногда мы наблюдали присутствие ранее упомянутой полосы, свидетельствующей о наличии во внешней части вакуоли свободных групп OH (но не воды), как показано на вкладке рис. 5a. Присутствие пика свободных групп OH, наблюдаемое только после активации формирования глистенинга, логически объясняется гидролизом сложноэфирных групп, ускоренным активацией глистенинга (нагревание до высокой температуры и последующий тепловой шок).

Поскольку концентрация полимера внутри вакуоли была несколько меньше, чем в окружающем ее материале, мы смогли создать рамановское изображение вакуоли путем построения в цветовой шкале полос интенсивности (области) полимерных групп в диапазоне волновых чисел 2800–2900  $\text{cm}^{-1}$  (см. рис. 5b). Похожее изображение может быть получено также путем построения графика интенсивности полос воды в диапазоне волновых чисел 3200–3700  $\text{cm}^{-1}$ . Как можно заметить, несмотря на одновременное присутствие

воды внутри вакуоли и свободных групп OH во внешней части вакуоли, различие между рамановскими полосами этих двух групп оказалось достаточным для воспроизведения вакуоли (рис. 5b).

Более глубокое понимание механизма формирования глистенинга можно получить с помощью многомерного спектрального анализа. В частности, мы выполнили анализ главных компонент спектров, полученных при ранее упомянутом растровом сканировании. На рисунках 5e и 5f представлены карты первой и второй главных компонент соответственно, а на рис. 5d показана нагрузка обеих главных компонент. Интересно, что карта первой главной компоненты очень похожа на простые карты комбинационного рассеяния на рис. 4b, c, воспроизводящие форму вакуолей. Высокие значения на картах соответствуют точкам с высоким содержанием полимера (положительные значения компоненты нагрузки), в то время как низкие значения соответствуют точкам с высоким содержанием воды (отрицательные значения компоненты нагрузки). Таким обра-

зом, глобальная карта первой главной компоненты и нагрузки суммируют информацию карт 5b и 5c.

Более интригующим является результат, предоставленный по второй главной компоненте. Фактически, карта второй главной компоненты определяет границу микровакуоли, предполагая наличие оболочки вокруг вакуоли с низкой степенью гидратации. Кроме того, в нагрузке можно выявить контрвариацию рамановских характеристик полимера с отрицательными полосами групп  $\text{CH}_2$  и положительным пиком вблизи 1001  $\text{cm}^{-1}$ . Последнее можно отнести к колебаниям фенильных групп, поэтому можно предположить, что в области вокруг вакуоли увеличено количество фенильных фрагментов. **Учитывая гидрофобность фенильных колец, логично предположить, что они создают гидрофобную «клетку» для молекул воды. Вода оказывается запертой внутри гидрофобной капсулы и вынуждена оставаться в более гидрофильной области, что и приводит к образованию микровакуоли. С этой точки зрения, микровакуоли образуются за счет случайного расположения полимерных компонентов в сложной текстуре ИОЛ.**

#### Рамановский анализ глистенинга в линзах A-HFO

Для линз A-HFO был проведен анализ, аналогичный тому, который был выполнен для HFO. Как было упомянуто в Разделе 2.1, данный тип ИОЛ характеризуется более редким формированием глистенинга, а вакуоли имеют более мелкие размеры. В линзе A-HFO мы также выбрали одну микровакуоль и проанализировали область вокруг нее. Типичные спектры комбинационного рассеяния, зарегистрированные с внешней и с внутренней части вакуоли, представлены на рис. 6a. Как и в случае с линзами HFO, спектр, зарегистрированный внутри микровакуоли, показал типичную широкую полосу воды (растяжение связей групп OH) в диапазоне волновых чисел между 3200 и 3700  $\text{cm}^{-1}$ , в то время как за пределами вакуоли полосы воды заменяются на более узкий пик свободных групп OH, также

наблюдаемый перед активацией глистенинга.

Итак, чтобы оценить эффективность концентрации воды внутри микровакуоли, мы вычли из общего значения концентрацию свободных групп ОН, характерную для сухой ИОЛ. Концентрация воды внутри микровакуоли для линз А-НФО составила 18%, а для линз НФО – 23%. Такая концентрация была характерной для большого числа вакуолей, проанализированных в данном исследовании, что подтверждает более низкую тенденцию к ограничению воды в микровакуоли. Рамановское изображение выбранной микровакуоли, полученное как с точки зрения интенсивности полос комбинационного рассеяния (рис. 6b и 6c), так и с точки зрения карт первой главной компоненты (рис. 6e), дает информацию, аналогичную для линз НФО, и хорошо воспроизводит геометрию вакуоли. В то же время, анализ второй главной компоненты показывает несколько иную картину. Действительно, хотя анализ второй главной компоненты подчеркивает изменение, связанное с распределением гидрофобных фенильных колец (см. отрицательные значения нагрузки второй главной компоненты вблизи 1001, 1204 и 1401 см<sup>-1</sup>), пространственное распределение баллов второй главной компоненты лишь отчасти воспроизводит гидрофобную «клетку», наблюдаемую в линзах НФО. Это позволяет предположить, что в линзах А-НФО благодаря равномерному распределению гидрофильного компонента вода склонна к равномерному распространению по всей полимерной матрице ИОЛ. Это позволяет избежать улавливания воды средами с высоким содержанием фенильных колец.

Материалы, из которых изготавливают интраокулярные линзы, имеют сложную структуру и представляют собой химически и физически связанные полимерные цепи. Поскольку процесс сополимеризации по своей природе является случайным, остается возможность формирования неоднородного и не полностью связанного объемного полимера. Как следствие, в полимере могут появляться области с более низкой плотностью, которые могут быть подвержены заполнению

водой, что приводит к формированию глистенинга. В данной работе мы исследовали два типа ИОЛ, выполненных из материалов с различной степенью гидрофобности, за счет чего они обладают совершенно различной степенью склонности к формированию глистенинга. Сначала мы провели оптическую микроскопию материала ИОЛ, в результате чего мы обнаружили, что микровакуоли имеют тенденцию накапливаться в самой внутренней части ИОЛ, где они также имеют наибольший размер. В то время как в линзах НФО признаки глистенинга были очевидными, в линзах А-НФО количество микровакуолей было незначительным (нулевая степень глистенинга).

Во второй части нашего исследования мы провели анализ отдельных микровакуолей при помощи спектроскопии комбинационного рассеяния. Анализируя рамановские полосы полимера и воды, мы заметили, что вакуоли – это не просто заполненные водой карманы, а пространственные области, в которых вода сосуществует с полимерной сетью. Мы также количественно оценили концентрацию воды внутри микровакуоли, которая составила 23% для линз НФО и 18% для линз А-НФО. Кроме того, по результатам проведенного нами анализа главных компонент спектров комбинационного рассеяния, мы наблюдали увеличенное количество фенильных колец вокруг вакуоли. Принимая во внимание гидрофобность фенильных колец, логично предположить, что они создают своеобразную «клетку» для молекул воды. В результате молекулы воды вынуждены оставаться в более гидрофильной области, что и приводит к образованию микровакуоли. **Эффект глистенинга в более гидрофильных ИОЛ выражен значительно в меньшей степени. Это связано с тем, что при хорошем распределении гидрофильного компонента вода склонна к равномерному распространению по всей полимерной матрице ИОЛ, а это позволяет избежать улавливания средами, богатыми фенильными кольцами.** Возможно, что другие мономеры, придающие гидрофобность материалу, способствуют формированию глистенинга в

других гидрофобных ИОЛ.

**В заключение можно отметить, что благодаря хорошо сбалансированному сочетанию гидрофобных и гидрофильных полимеров эффект глистенинга может быть практически устранен. Действительно, в то время как в линзах НФО вода, проникающая в полимер, часто собирается в вакуоли, в линзах А-НФО вода равномерно распределена по всему материалу. Примечательно, что использованный нами экспериментальный подход может применяться в будущем для оценки других клинически доступных гидрофобных акриловых материалов ИОЛ.**

#### Благодарность

Авторы благодарят Soleko s.p.a. за предоставление ИОЛ для экспериментов, и, в частности, докторов М. Conte, А. Quercioli и G. Carnacina за стимулирующие дискуссии о составе полимерных соединений. Авторы также благодарят профессора О. Tarallo за плодотворные дискуссии по химии полимеров.

#### Раскрытие интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанного с этой статьей.

Перевод к.м.н. Михайлова Т.Н.

#### Литература

1. D. V. Leaming, "Practice styles and preferences of ASCRS members--1994 survey," *J. Cataract Refract. Surg.* 21(4), 378–385 (1995).
2. H. Ridley, "Intra-ocular acrylic lenses; a recent development in the surgery of cataract," *Br. J. Ophthalmol.* 36(3), 113–122 (1952).
3. K. R. Mehta, S. N. Sathe, and S. D. Karyekar, "The new soft intraocular lens implant," *J. Am. Intraocul. Implant Soc.* 4(4), 200–205 (1978).
4. E. Epstein, "History of intraocular lens implant surgery," in *Soft implant lenses in cataract surgery*, T. R. Mazzocco, G. M. Rajacich, E. Epstein, ed. (Slack, 1986).
5. R. Menapace, M. Amon, and U. Radax, "Evaluation of 200 consecutive IOGEL 1103 capsular-bag lenses implanted through a small incision," *J. Cataract Refract. Surg.* 18(3), 252–264 (1992).
6. L. Werner, D. J. Apple, M. Escobar-Gomez, A. Ohlström, B. B. Crayford, R. Bianchi, and S. K. Pandey, "Postoperative deposition of calcium on the surfaces of a hydrogel intraocular lens," *Ophthalmology* 107(12), 2179–2185 (2000).
7. E. J. Hollick, D. J. Spalton, P. G. Ursell, and M. V. Pande, "Biocompatibility of poly(methyl methacrylate), silicone, and AcrySof intraocular lenses: randomized comparison of the cellular reaction on the anterior lens surface," *J. Cataract Refract. Surg.* 24(3), 361–366 (1998).


**ИННОВАЦИИ В ОФТАЛЬМОЛОГИИ**

8. E. Epstein, "Use of soft lenses," *J. Cataract Refract. Surg.* 16(6), 779 (1990).
9. M. Tetz and M. R. Jorgensen, "New hydrophobic IOL materials and understanding the science of glistenings," *Curr. Eye Res.* 40(10), 969–981 (2015).
10. D. B. Elliott, "Contrast sensitivity decline with ageing: a neural or optical phenomenon?" 7, 415–419 (1987).
11. L. Werner, J. C. Stover, J. Schwiegerling, and K. K. Das, "Effects of Intraocular Lens Opacification on Light Scatter, Stray Light, and Overall Optical Quality/Performance," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57(7), 3239–3247 (2016).
12. K. K. Das, J. C. Stover, J. Schwiegerling, and M. Karakelle, "Technique for measuring forward light scatter in intraocular lenses," *J. Cataract Refract. Surg.* 39(5), 770–778 (2013).
13. H. Nishihara, S. Yaguchi, T. Onishi, M. Chida, and M. Ayaki, "Surface scattering in implanted hydrophobic intraocular lenses," *J. Cataract Refract. Surg.* 29(7), 1385–1388 (2003).
14. D. K. Dhaliwal, N. Mamalis, R. J. Olson, A. S. Crandall, P. Zimmerman, O. C. Alldredge, F. J. Durcan, and O. Omar, "Visual significance of glistenings seen in the AcrySof intraocular lens," *J. Cataract Refract. Surg.* 22(4), 452–457 (1996).
15. D. Tripti, R. S. Haldar, S. Geetha, K. Niyogi, and R. K. Khandal, "Materials for intraocular lenses (IOLs): Review of developments to achieve biocompatibility," *E-Polymers* 9(1), 124 (2009).
16. U. Gunenc, F. H. Oner, S. Tongal, and M. Ferliel, "Effects on visual function of glistenings and folding marks in AcrySof intraocular lenses," *J. Cataract Refract. Surg.* 27(10), 1611–1614 (2001).
17. D. H. Kim, R. H. James, R. J. Landry, D. Calogero, J. Anderson, and I. K. Ilev, "Quantification of glistenings in intraocular lenses using a ballistic-photon removing integrating-sphere method," *Appl. Opt.* 50(35), 6461–6467 (2011).
18. J. M. Artigas, A. Felipe, A. Navea, M. C. García-Domene, A. Pons, and J. Mataix, "Determination of scattering in intraocular lenses by spectrophotometric measurements," *J. Biomed. Opt.* 19(12), 127006 (2014).
19. B. N. Walker, R. H. James, D. Calogero, and I. K. Ilev, "A novel full-angle scanning light scattering profiler to quantitatively evaluate forward and backward light scattering from intraocular lenses," *Rev. Sci. Instrum.* 86(9), 095004 (2015).
20. T. Oshika, Y. Shiokawa, S. Amano, and K. Mitomo, "Influence of glistenings on the optical quality of acrylic foldable intraocular lens," *Br. J. Ophthalmol.* 85(9), 1034–1037 (2001).
21. S. Yoshida, H. Matsushima, M. Nagata, T. Senoo, I. Ota, and K. Miyake, "Decreased visual function due to high-level light scattering in a hydrophobic acrylic intraocular lens," *Jpn. J. Ophthalmol.* 55(1), 62–66 (2011).
22. A. Waite, N. Faulkner, and R. J. Olson, "Glistenings in the single-piece, hydrophobic, acrylic intraocular lenses," *Am. J. Ophthalmol.* 144(1), 143–144 (2007).
23. H. Minami, K. Toru, K. Hiroi, and S. Kazama, "Glistening of Acrylic Intraocular Lenses," *Rinsho Ganka* 53(5), 991–994 (1999).
24. J. Colin and I. Orignac, "Glistenings on intraocular lenses in healthy eyes: effects and associations," *J. Refract. Surg.* 27(12), 869–875 (2011).
25. G. Christiansen, F. J. Durcan, R. J. Olson, and K. Christiansen, "Glistenings in the AcrySof intraocular lens: pilot study," *J. Cataract Refract. Surg.* 27(5), 728–733 (2001).
26. M. van der Mooren, L. Franssen, and P. Piers, "Effects of glistenings in intraocular lenses," *Biomed. Opt. Express* 4(8), 1294–1304 (2013).
27. D. M. Saylor, D. Coleman Richardson, B. J. Dair, and S. K. Pollack, "Osmotic cavitation of elastomeric intraocular lenses," *Acta Biomater.* 6(3), 1090–1098 (2010).
28. R. F. Fedors, "A new mechanism of failure in polymers," *J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed.* 12(2), 81–84 (1974).
29. R. F. Fedors, "Osmotic effects in water absorption by polymers," *Polymer (Guildf.)* 21(2), 207–212 (1980).
30. R. F. Fedors, "Cracking in a glassy epoxy resin induced by water absorption," *Polymer (Guildf.)* 21(6), 713–715 (1980).
31. A. Thomas and K. Muniandy, "Adsorption and desorption of water in rubbers," *Polymer (Guildf.)* 28(3), 408–415 (1987).
32. L. Gautier, B. Mortaigne, V. Bellenger, and J. Verdu, "Osmotic cracking in unsaturated polyester matrices under humid environments," *J. Appl. Polym. Sci.* 79(14), 2517–2526 (2001).
33. A. Miyata, N. Uchida, K. Nakajima, and S. Yaguchi, "Clinical and experimental observation of glistening in acrylic intraocular lenses," *Jpn. J. Ophthalmol.* 45(6), 564–569 (2001).
34. B. E. Thomes and T. A. Callaghan, "Evaluation of in vitro glistening formation in hydrophobic acrylic intraocular lenses," *Clin. Ophthalmol.* 7, 1529–1534 (2013).
35. N. Z. Gregori, T. S. Spencer, N. Mamalis, and R. J. Olson, "In vitro comparison of glistening formation among hydrophobic acrylic intraocular lenses(1)," *J. Cataract Refract. Surg.* 28(7), 1262–1268 (2002).
36. T. Shiba, K. Mitooka, and H. Tsuneoka, "In vitro analysis of AcrySof intraocular lens glistening," *Eur. J. Ophthalmol.* 13(9-10), 759–763 (2003).
37. K. Kato, M. Nishida, H. Yamane, K. Nakamae, Y. Tagami, and K. Tetsumoto, "Glistening formation in an AcrySof lens initiated by spinodal decomposition of the polymer network by temperature change," *J. Cataract Refract. Surg.* 27(9), 1493–1498 (2001).
38. E. Smith and G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach* (John Wiley & Sons Ltd, 2005).
39. D. W. Shipp, F. Sinjab, and I. Notingher, "Raman spectroscopy: techniques and applications in the life sciences," *Adv. Opt. Photonics* 9(2), 315–428 (2017).
40. F. Siebert and P. Hildebrandt, *Vibrational Spectroscopy in Life Science* (Wiley, 2008).
41. M. S. Amer, *Raman Spectroscopy for Soft Matter Applications* (John Wiley & Sons, 2009).
42. H. G. M. Edwards, A. F. Johnson, and I. R. Lewis, "Applications of Raman spectroscopy to the study of polymers and polymerization processes," *J. Raman Spectrosc.* 24(8), 475–483 (1993).
43. J. Popp and T. Mayerhöfer, *Micro-Raman Spectroscopy: Theory and Application* (De Gruyter, 2018).
44. G. Rusciano, P. Capriglione, G. Pesce, S. Del Prete, G. Cennamo, D. Di Cave, L. Cerulli, and A. Sasso, "Raman microspectroscopy analysis in the treatment of acanthamoeba keratitis," *PLoS One* 8(8), e72127–e72135 (2013).
45. G. Rusciano, G. Zito, G. Pesce, S. Del Prete, G. Cennamo, A. Sasso, "Assessment of conjunctival microvilli abnormality by micro-Raman analysis" *J. Biophotonics* (5), 551–559 (2016).
46. A. Bertoluzza, P. Monti, J. V. Garcia-Ramos, R. Simoni, R. Caramazza, and A. Calzavara, "Applications of Raman spectroscopy to the ophthalmological field: Raman spectra of soft contact lenses made of poly-2-hydroxyethylmethacrylate (PHEMA)," *J. Mol. Struct.* 143, 469–472 (1986).
47. A. Bertoluzza, P. Monti, R. Simoni, R. Caramazza, M. Cellini, L. De Martino, and A. Calzavara, "Applications of Raman spectroscopy to ophthalmological field: Raman spectra of soft contact lenses made of polyvinylpyrrolidone," in *Laser Scattering Spectroscopy of Biological Objects (Studies in Physical & Theoretical Chemistry)*, J. Stepanek, P. Anzenbacher, and B. Sedlacek, ed. (Elsevier, 1987), vol 45, pp. 595–604.
48. A. Bertoluzza, C. Fagnano, P. Monti, G. Semerano, J. V. Garcia-Ramos, R. Caramazza, and M. Cellini, "Raman spectra of intraocular lenses before and after implantation in relation to their biocompatibility," *J. Raman Spectrosc.* 18(2), 151–152 (1987).
49. P. Monti and R. Simoni, "The role of water in the molecular structure and properties of soft contact lenses and surface interactions," *J. Mol. Struct.* 269(3-4), 243–255 (1992).
50. P. Monti, R. Simoni, R. Caramazza, and A. Bertoluzza, "Applications of Raman spectroscopy to ophthalmology: spectroscopic characterization of disposable soft contact lenses," *Biospectroscopy* 4(6), 413–419 (1998).
51. K. Krysztofciak, K. Ciezar, and M. Kościński, "Raman imaging of layered soft contact lenses," *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* 15(2), e149–e152 (2017).
52. United States Patent: US6636299B1, (2003).
53. G. Rusciano, A. Martinez, G. Pesce, G. Zito, and A. Sasso, "Micro-Raman analysis of glistenings in intraocular lenses," *Proc. SPIE* 10333 Optical Methods for Inspection, Characterization, and Imaging of Biomaterials III, 103331A (2017).
54. H. Zhu, K. C. Jha, R. S. Bhatta, M. Tsieng, and A. Dhinjowala, "Molecular structure of poly(methyl methacrylate) surface. I. Combination of interface-sensitive infrared-visible sum frequency generation, molecular dynamics simulations, and ab initio calculations," *Langmuir* 30(39), 11609–11618 (2014).
55. B. Schneider, J. A. Štokr, P. Schmidt, M. Mihailov, S. Dirlikov, and N. Peeva, "Stretching and deformation vibrations of CH<sub>2</sub>, C(CH<sub>3</sub>) and O(CH<sub>3</sub>) groups of poly(methyl methacrylate)," *Polymer (Guildf.)* 20(6), 705–712 (1979).
56. S. Dirlikov and J. Koenig, "Assignment of the carbon-hydrogen stretching and bending vibrations of poly(methyl methacrylate) by selective deuteration," *Appl. Spectrosc.* 33(6), 555–561 (1979).
57. H. Willis, V. Zichy, and P. Hendra, "The laser-Raman and infra-red spectra of poly(methyl methacrylate)," *Polymer (Guildf.)* 10(9), 737–746 (1969).
58. I. Lipschitz, "The vibrational spectrum of poly(methylmethacrylate): A review," *Polym. Plast. Technol. Eng.* 19(1), 53–106 (1982).
59. K. J. Thomas, M. Sheeba, V. P. N. Nampoori, C. P. G. Vallabhan, and P. Radhakrishnan, "Raman spectra of polymethyl methacrylate optical fibres excited by a 532 nm diode pumped solid state laser," *J. Opt. A, Pure Appl. Opt.* 10(5), 055303 (2008).
60. S. C. Goheen, R. M. Saunders, S. D. Harvey, and P. C. Olsen, "Raman spectroscopy of 2-hydroxyethyl methacrylate-acrylamide copolymer using gamma irradiation for cross-linking," *J. Raman Spectrosc.* 37(11), 1248–1256 (2006).
61. F. Pallikari, G. Chondroukous, M. Rebelakis, and Y. Kotsalas, "Raman spectroscopy: A technique for estimating extent of polymerization in PMMA," *Mater. Res. Innov.* 4(2-3), 89–92 (2001).
62. X. Xu, H. Ming, Q. Zhang, and Y. Zhang, "Properties of Raman spectra and laser induced birefringence in polymethyl methacrylate optical fibres," *J. Opt. A, Pure Appl. Opt.* 4(3), 237–242 (2002).
63. C. Choe, J. Lademann, and M. E. Darwin, "Depth profiles of hydrogen bound water molecule types and their relation to lipid and protein interaction in the human stratum corneum in vivo," *Analyst (Lond.)* 141(22), 6329–6337 (2016).

**GIULIA RUSCIANO<sup>1,2</sup> \*  
**ANGELA CAPACCIO<sup>1</sup>, GIUSEPPE PESCE<sup>1</sup>, ANTONIO SASSO<sup>1,2</sup>****

<sup>1</sup> Department of Physics "E. Pancini", University of Naples Federico II - Compl. Univ. M.S. Angelo, via Cinthia - I-80126, Naples, Italy

<sup>2</sup> National Institute of Optics (INO-CNR), c/o Comprensorio Olivetti - Via CampiFlegrei 34 - I-80078 Pozzuoli (NA), Italy

\* giulia.rusciano@unina.it