

УДК 617.713–089.843.168:612.085.1

РЕАКЦИЯ РОГОВИЦЫ КРОЛИКА НА ИНТРАЛАМЕЛЛЯРНУЮ ИМПЛАНТАЦИЮ БЕСКЛЕТОЧНОГО МОДУЛЯ СТРОМЫ РОГОВИЦЫ ЧЕЛОВЕКА. ПЕРВЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Н. В. Пасечникова, д.м.н., проф., **В. В. Вит**, д.м.н., проф., **Н. Ф. Леус**, д.м.н., проф.,
С. А. Якименко, д.м.н., проф., **А. И. Бузник**, к.м.н., **И. О. Насинник**, м.н.с.

Авторами була досліджена реакція рогівки кролика на інтраламелярну імплантацію безклітинного модуля стромы рогівки людини, отриманого за розробленою методикою. На 10 день спостереження була відсутня запальна реакція, ознак відторгнення трансплантату не було. При цьому гістоархітектоніка рогівки реципієнта та структура імпланта були збережені.

Ключевые слова: бесклеточная строма роговицы, кератопластика, эксперимент

Ключові слова: безклітинна строма рогівки, кератопластика, експеримент

Введение. Поражение роговицы вследствие заболеваний, травм и их последствий часто приводит к снижению зрения и слепоте [7]. Поэтому более 10 миллионов людей в мире слепы из-за патологии роговицы [14, 15], но только 120000 ее пересадок выполняется ежегодно [16]. До сих пор наиболее распространенным методом в клинике глазных болезней является пересадка нативной донорской роговой оболочки.

Несмотря на хорошие результаты, отмечаемые после первичной пересадки роговицы (приживаемость составляет 90 % в течение 5 лет и 82 % в течение 10 лет), при повторных пересадках результаты ниже примерно в два раза (приживаемость составляет 53 % в течение 5 лет и 41 % в течение 10 лет) [3, 13]. Кроме того, в 30 % случаев применения сквозной кератопластики наблюдается, по крайней мере, один эпизод отторжения трансплантата и около 5–7 % случаев болезни трансплантата [9].

Вместе с тем, существует растущая потребность в материале для трансплантации, что связано с острой нехваткой подходящей донорской ткани во многих странах из-за демографических проблем, с ростом частоты увеличения случаев инфекционных заболеваний (ВИЧ, гепатиты, HTLV), более широким использованием рефракционной лазерной хирургии [1]. Наконец, этот дефицит усугубляется прорехами в законодательстве и религиозными факторами.

Указанные проблемы, связанные с пересадкой нативной роговицы, а также чисто технические трудности, возникающие при заборе материала для этой цели, побуждают к поиску новых путей обеспечения материала для реконструктивных операций роговой оболочки.

Поэтому многие группы ученых пытались заменить чем-то донорскую роговицу, чтобы преодолеть нынешнюю нехватку аллотрансплантатов.

Исследования в области тканевой инженерии роговичных эквивалентов привели к значительному прогрессу на протяжении последних нескольких лет. Так, удалось получить эквиваленты с использованием природных или синтетических полимеров, сходные по своим свойствам и толщине с нативной роговицей. Но эти исследования были ограничены экспериментами *in vitro* [4, 6, 8, 11, 12].

Альтернативным путем получения материала для кератопластики является удаление клеток и молекул антигенов из тканей роговицы с целью уменьшения иммунной реакции и получения остова роговицы. В последнее время получение остова на основе нативной ткани стало более привлекательным, поскольку бесклеточный матрикс имеет ту же структуру и состав, что и нативная ткань. В последнее время нескольким группам исследователей удалось получить бесклеточную строму роговицы с использованием неионных моющих средств и ферментов. Они сообщили, что отмытая строма роговицы сохраняет такую же структуру, как и нативная роговица [5, 10, 17, 18]. Однако моющие средства, как правило, обладают цитотоксическим эффектом и должны быть тщательно удалены из получаемого объекта. Возможен и другой путь, а именно необходимость получения бесклеточной ткани при использовании высокого гидростатического давления, но без применения моющих средств [2].

Однако на сегодняшний день все полученные материалы еще не обладают необходимыми свойствами, предъявляемыми к роговичным имплантам (хорошая биосовместимость, высокая оптическая прозрачность, плотность, чтобы выдержать хирур-

© Н. В. Пасечникова, В. В. Вит, Н. Ф. Леус, С. А. Якименко,
А. И. Бузник, И. О. Насинник, 2011

гическую процедуру) [4]. Поэтому дальнейшие разработки весьма актуальны.

Цель: Изучить реакцию роговицы кролика на интраламеллярную имплантацию бесклеточного модуля стромы роговицы человека (БМСРЧ).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ. Участок роговой оболочки, полученный из энуклеированного глаза человека, обрабатывался по предложенной нами методике (патент Украины № 44128). Согласно ей он помещался в среду для культивирования ткани, а затем последовательно обрабатывался ферментами (трипсин, фосфолипаза, гиалуронидаза) и детергентами (Тритон X-100), что приводило к удалению и вымыванию клеточных и неклеточных элементов роговицы, отщеплению концевых пептидных участков коллагеновых молекул, обуславливающих их антигенные свойства.

Экспериментальное исследование выполнено на двух глазах кролика, породы шиншилла массой 2,5 килограмма. Под общей анестезией с использованием тиопентала натрия 1 г/кг массы в условиях операционной на обоих глазах животного производилась интраламеллярная имплантация БМСРЧ. В 1 мм от лимба скребцом наносилась насечка на роговице. Карман в строме роговицы выполняли тупым способом и расширяли до необходимых размеров при помощи шпателя. Затем в него имплантировали фрагмент БМСРЧ диаметром 6 мм. На место разреза накладывали 1–2 узловых роговичных шва. После вмешательства проводилась стандартная противовоспалительная и антибактериальная терапия. Животных осматривали четыре раза в неделю, с последующей фоторегистацией. Оценивалось состояние роговицы и БМСРЧ в месте имплантации, а также степень воспалительной реакции. Срок наблюдения — 10 дней.

Хирургическое вмешательство и выведение животных из эксперимента выполнены с соблюдением «Правил обращения с лабораторными животными», в частности, с выполнением болезненных процедур под наркозом.

Энуклеированные глаза подвергались гистологической обработке по общепринятой методике с окраской срезов гематокселин-эозином и микроскопировались.

РЕЗУЛЬТАТЫ. При выполнении обработки роговиц энуклеированных глаз человека по нашей методике наблюдался отек стромы роговичного импланта и незначительное его помутнение (рис. 1, 2).

На следующий день после интраламеллярной имплантации наблюдалась смешанная гиперемия конъюнктивы глаз кроликов, наличие скудного слизистого отделяемого, отек стромы роговицы, при этом помутнение имплантов сохранялось.

На третий день после имплантации имела место невыраженная воспалительная реакция и отек роговицы, при этом импланты оставались полупрозрачными (рис. 3). При осмотре спустя 6 суток после операции не наблюдалось признаков воспалительной реакции и отека роговицы, импланты частично просветлели. (рис. 4).

На десятый день после имплантации глаза кроликов были спокойны, признаков воспаления не наблюдалось. Отмечалось частичное просветление импланта.

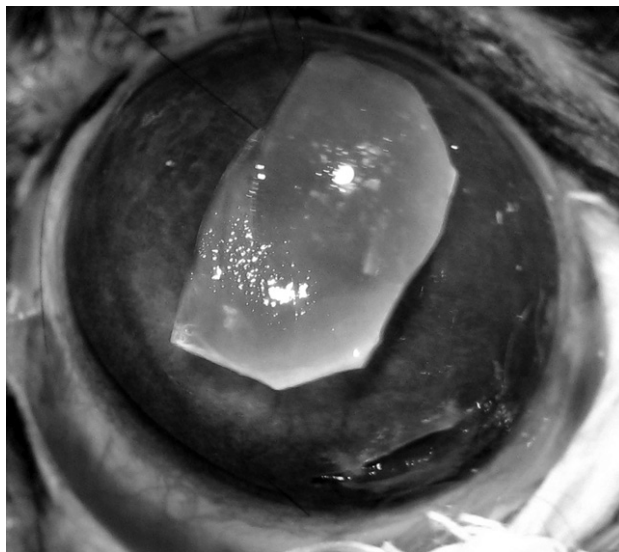


Рис. 1. Бесклеточный матрикс стромы роговицы человека, полученный по нашей методике, перед имплантацией.

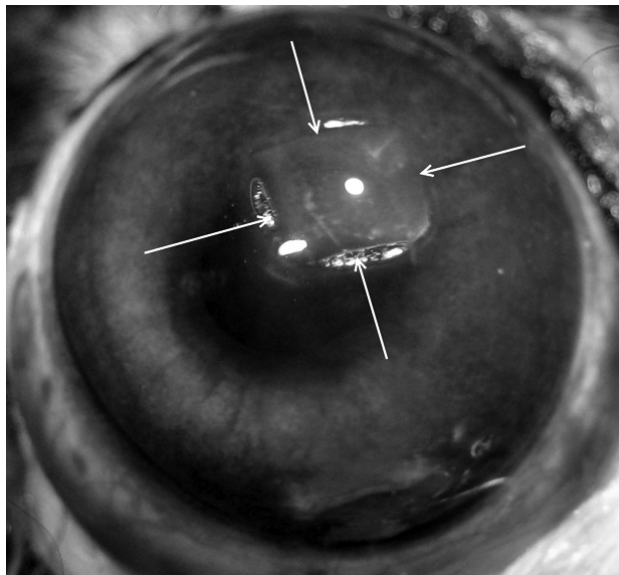


Рис. 2. Роговица кролика сразу после интраламеллярной имплантации БМСРЧ. В центральной зоне в слоях роговицы определяется полупрозрачный имплант (границы импланта указаны стрелками).

При гистологическом исследовании микропрепарата отмечается отсутствие воспалительной реакции в трансплантате и роговой оболочке реципиента. В БМСРЧ сохранена структура коллагеновых пластин, нет признаков отека, клеточные элементы отсутствуют.

В роговой оболочке реципиента присутствует передний и задний эпителий. Передний эпителий несколько истончен и отмечается нарушение его гистоархитектоники. Выявляется отек стромы роговицы реципиента, незначительная гомогенизация коллагеновых пластин и уменьшение количества кератоцитов. Особенно выражено это

в задних слоях роговицы (рис. 5). В месте контакта края трансплантата и роговицы реципиента определяется увеличение количества кератоцитов, трансформирующихся в фибробласты, что, по всей видимости, отражает начальные явления рубцевания (рис. 6).

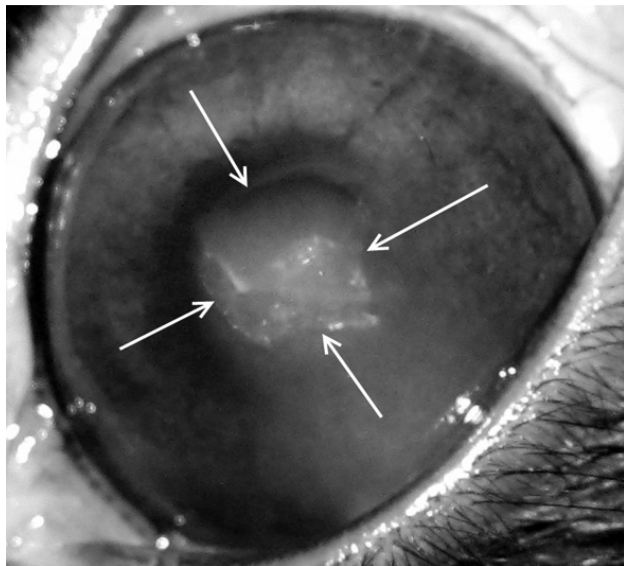


Рис. 3. Роговица кролика на третий день после интра-ламеллярной имплантации БМСРЧ. Отмечается незначительная воспалительная реакция и отек роговицы. Имплант полупрозрачен (границы импланта указаны стрелками).

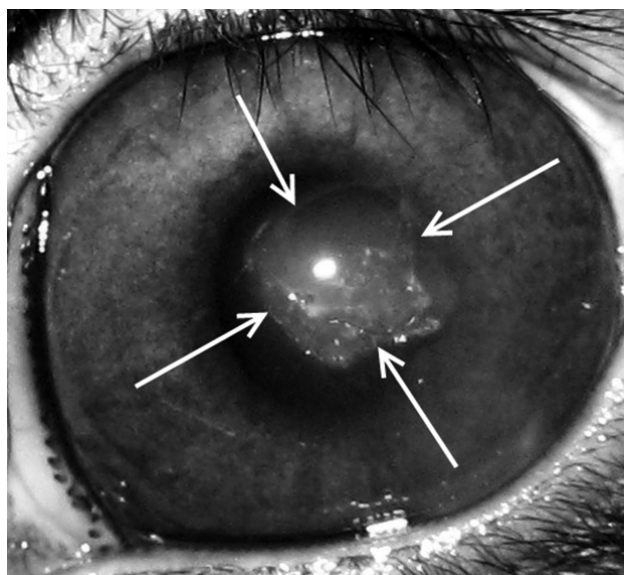


Рис. 4. Роговица кролика на шестой день после интра-ламеллярной имплантации БМСРЧ. Глаз спокоен, признаков воспалительной реакции не наблюдалось, имплант частично просветлел (границы импланта указаны стрелками).

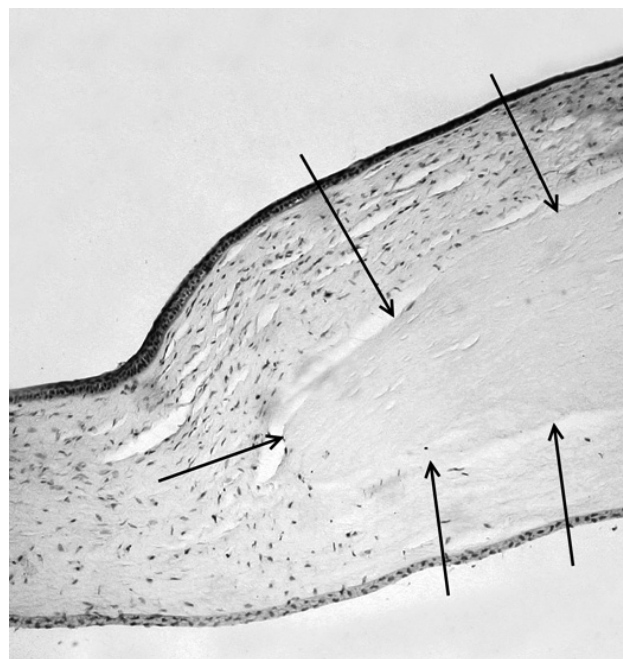


Рис. 5. Роговица кролика на десятые сутки после интра-ламеллярной трансплантации бесклеточного матрикса роговицы человека. Отсутствие воспалительной реакции в трансплантате и роговой оболочке реципиента. Сохранена структура трансплантата (границы импланта указаны стрелками). Окраска гематоксилин-эозином. x 40.

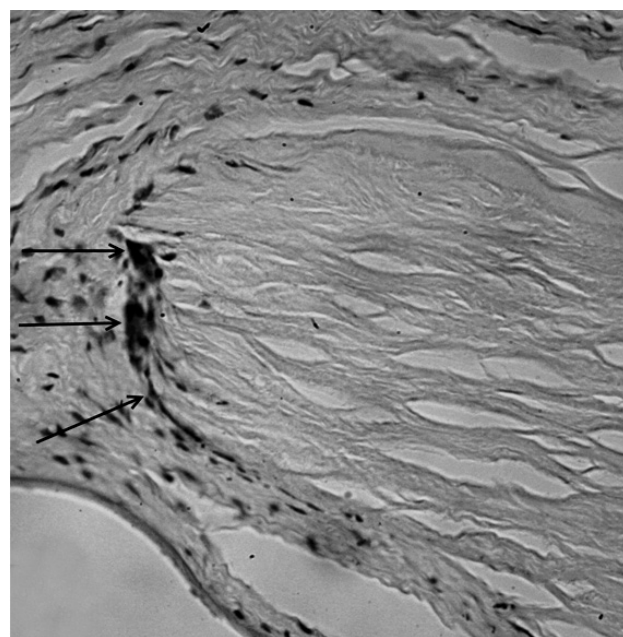


Рис. 6. Роговица кролика на десятые сутки после интра-ламеллярной трансплантации бесклеточного матрикса роговицы человека. В месте контакта края трансплантата и роговицы реципиента определяется увеличение количества кератоцитов, трансформирующихся в фибробласты (указано стрелками). Окраска гематоксилин-эозином. x 120.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

После интраламеллярной имплантации в роговицу кролика бесклеточного модуля стромы роговицы человека, полученного по нашей методике, на 10 день воспалительная реакция отсутствовала, признаков отторжения трансплантата не наблюдалось. При этом сохранялась гистоархитектоника роговицы реципиента и структура импланта. Полученные результаты дают основание говорить о целесообразности дальнейшего изучения возможности применения бесклеточного модуля стромы роговицы человека и животных в офтальмологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Eye Bank Association of America. 1999 EBAA statistical report // Washington, DC. — Eye Bank Association of America. — 1999.
2. **Hashimoto Y.** Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering / Y. Hashimoto, S. Funamoto, S. Sasaki [et al] // *Biomaterials* — 2010. — Vol. 31. — P.3941–3948
3. **Kaminski S. L.** Corneal sensitivity 10 years after epikeratoplasty / S. L. Kaminski, R. Biowski, J. R. Lucas [et al] // *J. Refract. Surg.* — 2002. — Vol.18. — P.731–736.
4. **Liu Y.** A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation / Y. Liu, L. Gan, D. J. Carlsson [et al] // *Invest Ophthalmol Vis Sci* — 2006. — Vol.47. — P.1869–1875.
5. **Marquez S. P.** Decellularization of bovine cornea for tissue engineering applications / S. P. Marquez, V. S. Martinez, W. M. Ambrose [et al] // *Acta Biomaterialia* — 2009. — Vol.5. — P.1839–1847.
6. **Minami Y.** Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture / Y. Minami, H. Sugihara, S. Oono // *Invest Ophthalmol Vis Sci* — 1993. — Vol.34. — P.2316–2324.
7. **Moffatt S. L.** Centennial review of corneal transplantation / S. L. Moffatt, V. A. Cartwright, T. H. Stumpf // *Clin Exp Ophthalmol* — 2005. — Vol.33. — P.642–657.
8. **Nishida K.** Tissue engineering of the cornea / K. Nishida // *Cornea* — 2003. — Vol.22. — P.28–34.
9. **Panda A.** Corneal graft rejection / A. Panda, M. Vanathi, A. Kumar [et al] // *Surv Ophthalmol* — 2007. — Vol.52. — P.375–396.
10. **Pang K.** A rabbit anterior cornea replacement derived from acellular porcine cornea matrix, epithelial cells and keratocytes, / K. Pang L. Du, X. Wu // *Biomaterials* — 2010. — Vol. 31. — P.7257–7265
11. **Reichl S.** Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies / S. Reichl, J. Bednarz, C. C. Muller-Goymann // *Br J Ophthalmol* — 2004. — Vol.88. — P.560–565.
12. **Schneider Al.** Constructing an in vitro cornea from cultures of the three specific corneal cell types / Al. Schneider, K. Maier-Reif, T. Graeve // *Vitro Cell Dev Biol Anim* — 1999. — Vol.35. — P.515–526.
13. **Thompson R. W. Jr.** Long-term graft survival after penetrating keratoplasty / Jr. R. W. Thompson, M. O. Price, P. J. [et al] // *Ophthalmology* — 2003. — Vol.110. — P.1396–1402.
14. **Whitcher J. P.** Corneal blindness: a global perspective / J. P. Whitcher, M. Srinivasan, M. P. Upadhyay // *Bull World Health Organ* — 2001. — Vol.79. — P.214–221.
15. **Whitcher J. P.** Prevention of corneal ulceration in the developing world / J. P. Whitcher, M. Srinivasan, M. P. Upadhyay // *Int Ophthalmol Clin* — 2002. — Vol.42. — P.71–77.
16. World Health Organization. Report of consultation meeting on transplantation with national health authorities in the western pacific region. — 2005. — P.1–63.
17. **Wu Z.** The use of phospholipase A2 to prepare acellular porcine corneal stroma as a tissue engineering scaffold / Z. Wu, Y. Zhou, N. Li [et al] // *Biomaterials* — 2009. — Vol.30. — P.3513–3522.
18. **Xu Y. G.** Development of a rabbit corneal equivalent using an acellular corneal matrix of a porcine substrate / Y. G. Xu, Y. S. Xu, C. Huang [et al] // *Mol Vis* — 2008. — Vol.14. — P.2180–2189.

THE REACTION OF THE RABBIT CORNEA AFTER INTRALAMELLAR TRANSPLANTATION OF THE ACELLULAR STROMA OF THE HUMAN CORNEA. FIRST RESULTS

Pasychnikova N. V., Vit V. V., Leus N. F., Yakimenko S. A. Buznyk A. I., Nasinnyk I. O.

Odessa, Ukraine

The authors studied the reaction of the rabbit cornea after interlamellar transplantation of the acellular stroma of the human cornea. During 10 days' observation the inflammatory reaction as well as signs of transplant rejection was absent. The histoarchitectonics of the recipient cornea and implant structure was preserved.

