

УДК 617.713–089.843:611.841.2–547.962.9–018

Ультроструктурные изменения коллагеновых волокон стромы роговицы и их отношение с межклеточным веществом при различных способах обработки, с целью получения её бесклеточной стромы

Н. В. Пасечникова, д. м. н., проф., И. О. Насинник, м. н. с., Н. Ф. Леус, д. м. н., проф.,
Н. Е. Думброва, д. м. н., проф., Н. И. Молчанюк, к. б. н.

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова НАМН Украины»
Одесса, Украина

Ключевые слова: роговица, трансплантация, экспериментальные исследования

Ключові слова: рогівка, трансплантація, експериментальні дослідження

Проведенные исследования показали, что разработанный авторами способ обработки роговиц, полученных из энуклеированных глаз, включающем двухмоментное воздействие Triton X-100 и гидроксида аммония до и после ультразвуковой обработки, позволяет получить бесклеточный модуль стромы роговицы с наименьшим повреждением ультроструктуры коллагеновых волокон.

Ultrastructural changes in the collagenic fibers of the corneal stroma, their organization and relation with the intercellular substance in different methods of treatment for obtaining the acellular corneal stroma

N. V. Pasechnikova, I. O. Nasinnik, N. F. Leus, N. E. Dumbrova, N. I. Molchanyuk

SI «Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of National Academy of Medical Sciences of Ukraine»

Key words: cornea, transplantation, experimental study

The conducted investigations showed that the developed method of treating the corneas obtained from the enucleated eyes including the two-moment influence of Triton X-100 and ammonium hydroxide before and after ultrasonic treatment allowed to obtain the acellular module of the corneal stroma with the smallest damage of the ultrastructure of the collagenic fibers.

Введение. Проблема постоянно растущего дефицита донорского материала с каждым годом становится все более актуальной. Не решена также проблема борьбы с тканевой несовместимостью как причиной отторжения трансплантата роговицы. Это способствует поиску новых материалов, которые могли бы использоваться в качестве аналога донорской роговицы. Несмотря на достижения фармакотерапии, офтальмохирургии и тканевой инженерии, на данный момент не разработано материала, отвечающего всем требованиям, предъявляемым к биоэквиваленту донорской роговицы.

Одним из путей получения материала для кератопластики является удаление клеток и молекул антигенов из тканей нативной роговицы, для уменьшения иммунной реакции и получения остова роговицы [7, 15, 10, 12, 13, 16].

Для удаления клеточных элементов и их компонентов из сосудистой ткани, клапанов сердца, кожи и связок успешно использовались Triton X-100 [2, 9], натрий додецил сульфат (SDS) [3, 6], натрий дексихолат [5, 8], и полиэтиленгликоль [12]. Однако, эти «моющие средства» обладают токсическими свойствами и требуют хорошего отмывания. В некоторых случаях обработка «моющими растворами» и последующее их отмывание может привести к денатурации и разрушению структуры тканей, что приводит к помутнению трансплантата.

Группа ученых, возглавляемая Wu Z., применила фосфолипазу A2 для удаления клеточных элементов из свиной роговицы, что позволило сохранить

© Н. В. Пасечникова, И. О. Насинник, Н. Ф. Леус,
Н. Е. Думброва, Н. И. Молчанюк, 2013

волокон коллагена неповрежденными и 80 % протеогликанов. Полученный материал был совместим с клетками роговицы *in vitro* и при имплантации в роговицу кролика в естественных условиях *in vivo* [15]. Экстрацеллюлярный матрикс в последующем был лиофилизирован для формирования соответствующего размера пор, что способствовало бы миграции кератоцитов [16].

Несколько групп авторов описали эффективные методики получения бесклеточного каркаса роговой оболочки [13, 10, 1, 18, 17, 7], при этом сохранялась их биосовместимость с тканями реципиента. Однако данные методики не давали возможности получить необходимые механические свойства ткани.

Существует методика удаления клеток из ткани, используя высокое гидростатическое давление, без применения «моющих средств» [4]. При этом наблюдалось более выраженное удаление клеточных структур по сравнению с использованием Triton X-100, и лаурил сульфат натрия (SDS) [14].

Разработка способа удаления клеток из роговиц, полученных из глаз человека, энуклеированных по причине некурабельной меланомы хориоидеи, может дать возможность получить каркасы роговицы со свойствами, сопоставимыми с нативной роговой оболочкой по прочности, прозрачности и оптическим свойствам, нетоксичный, обладающий способностью взаимодействовать с роговичной тканью хозяина, способный поддерживать репаративные процессы, миграцию и пролиферацию клеток роговицы, для взаимоинтеграции и выполняющий функции полупроницаемой мембраны для кислорода и диффузии питательных веществ, что и определяет актуальность планируемой работы.

Цель: Изучить состояние (ультраструктуру) коллагеновых волокон стромы роговицы, определить их организацию и отношение с межклеточным веществом при различных способах обработки в процессе получения бесклеточной стромы роговицы

Материал и методы

В исследовании было 44 роговиц, полученных из энуклеированных глаз с меланомой сосудистой оболочки глаза, удаленных по причине высокого риска для жизни пациента; глаз с болезненной глаукомой и после травмы глаза, несовместимой с сохранением глаза как органа.

Роговицы были разделены на пять групп (по 8 роговиц в каждой группе) в зависимости от метода обработки:

1) Роговицы замачивались в растворе, включающем 2 % Triton X-100 и 0,1 % гидроксид аммония в течение 24 часов, с последующим отмыванием при помощи шейкера в фосфатном буфере в течение 48 часов при температуре 4°C.

2) Роговицы подвергались воздействию ультразвуком в растворе декстрана с последующим отмыванием в растворе, включающем Triton X-100 и гидроксид аммония с двукратным повторением процедур. В завершение обработки проводилось отмывание в фосфатном буфере.

3) Проводилось замачивание роговиц в растворе, включающем Triton X-100 и гидроксид аммония, с последующей обработкой ультразвуком в растворе декстрана и повторное отмывание в растворе Triton X-100 и гидроксида аммония. Последним этапом проводилось отмывание в фосфатном буфере.

4) Выполнялось воздействие на роговицы ультразвуком в растворе декстрана до и после отмывания в растворе Triton X-100 и гидроксида аммония с последующим воздействием лаурил сульфата натрия. В финале отмывание в фосфатном буфере.

5) Воздействие ультразвуком в растворе декстрана до и после отмывания в растворе Triton X-100 и гидроксида аммония с последующим воздействием лаурил сульфата натрия и этанола. В конце отмывание в фосфатном буфере.

В шестую группу входило четыре роговицы, помещенные в физиологический раствор и использовавшиеся в качестве контроля.

Все полученные образцы подвергались электронно-микроскопическому исследованию, которое проводилось на базе лаборатории патоморфологических и электронно-микроскопических исследований ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова НАМН Украины». Подготовка препарата и электронная микроскопия проводились по стандартной методике.

Результаты

После завершения биохимических методик, направленных на удаление клеток и межклеточного вещества для получения бесклеточной стромы, в группах с использованием раствора лаурил сульфата отмечалось помутнение коллагеновой стромы. Остальные виды обработки не приводили к помутнению материала.

При электронной микроскопии образцов, обработанных с использованием раствора лаурил сульфата, гистоархитектоника роговичной ткани сохранена. Ламеллы рыхлые, однородной окраски, однако встречаются распадающиеся фрагменты ламелл. Между ними встречаются единичные клеточные элементы в состоянии распада. На больших увеличениях коллагеновые фибриллы (КФ) неоднородные по всей длине, рыхлые, с изъеденными контурами и тонкофибрилярной поперечной исчерченностью. Определяются участки разволокнения и распада КФ. Встречаются грубозернистые осмиофильные конгломераты из распавшихся роговичных фибрилл. В связи с низкими оптическими свойствами, образцы, обработанные лаурил сульфатом, были исключены из исследования *in vivo*.

При проведении электронного микроскопического исследования в материале, представленном как контрольный (нативная роговица помещенная в физиологический раствор), отмечается слабая осмиофильность ткани. При небольших увеличениях (8 000–10 000) видна хорошо сохранившаяся ламеллярность стромы и хорошо сохранившиеся в ней КФ, единичные кератоциты и остатки клеточных мембран. Коллагеновые ламеллы несколь-

ко разрушены. По ультраструктуре КФ близки к нормальной, хотя встречаются (при больших увеличениях 60 000–80 000) КФ с элементами деградации (различные стадии деградации и распада КФ). Встречаются большие очаги из остатков распавшихся КФ. В задних отделах стромы местами значительные расслоения между ламеллами и увеличение количества поврежденных КФ. Последние истончены, подвергаются фрагментации и разрушению их остова. Отмечаются сохраняющиеся КФ со слабой осмиофильностью, рыхлостью, утратой четкости контуров. В конечном итоге вместо КФ остаются тонкозернистые тяжи. Т.о. выражено истончение, дезорганизация и деструкция КФ. Матрикс, в целом, умеренной электронной плотности (Рис. 1)

При изучении материала 1 группы, подвергнутого воздействию раствора, включающего Triton X-100 и гидроксид аммония, с последующим отмыванием в фосфатном буфере, при малых увеличениях отмечается дезорганизация структуры ламелл, наличие больших бесструктурных очагов, остатки КФ истончены, фрагментированы, дезориентированы. Слабая осмиофильность матрикса. Встречаются мембранные фрагменты распавшихся клеток. При большом увеличении: часть КФ сохраняет лишь свой остов, большая же часть фрагментирована, подвергается деструкции. От КФ остаются как бы «зернистые следы». Состояние ультраструктур аналогично изменениям в материале контрольной группы, но отмечается большая выраженность и обширность повреждений (Рис. 2).

Во 2 группе, где роговицы подвергались воздействию ультразвуком в растворе декстрана с по-

следующим отмыванием в растворе, включающем Triton X-100 и гидроксид аммония с двукратным повторением процедур, а в завершении отмытые в фосфатном буфере, при увеличении 8 000–12000 общий вид: ламеллы стромы построены из коротких неоднородной осмиофильности КФ. Пучки рыхлые, с большим числом электронно-прозрачных участков. Встречаются мембранные фрагменты распавшихся клеток. При большом увеличении: часть КФ сохраняют остов, просматриваются протофибриллы: часть — в виде зернистых тяжей, распадающихся на фрагменты и подвергающиеся полной деструкции (Рис. 3).

При исследовании материала 3 группы, обработка которого заключалась в замачивании роговиц в растворе, включающем Triton X-100 и гидроксид аммония, с последующей обработкой ультразвуком в растворе декстрана и повторном отмывании в растворе Triton X-100 и гидроксида аммония. Электронная микроскопия на малых увеличениях показала следующие изменения: ламеллы стромы построены из коротких неоднородной осмиофильности КФ. Пучки рыхлые, с большим числом электронно-прозрачных участков (Рис.4). При большом увеличении: часть КФ сохраняют остов, просматриваются протофибриллы: часть — в виде зернистых тяжей, распадающихся на фрагменты и подвергающиеся полной деструкции.

После воздействия на роговицы ультразвука в растворе декстрана до и после отмывания в растворе Triton X-100 и гидроксида аммония с последующим воздействием лаурил сульфата натрия (4 группа), при электронной микроскопии материала, в передней

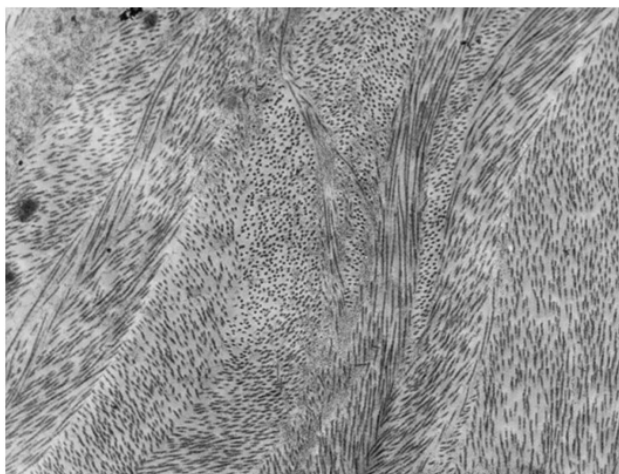


Рис. 1. Электронная микрофотография роговицы из контрольной группы. Определяется хорошо сохранившаяся ламеллярность стромы и хорошо сохранившиеся в ней КФ. Коллагеновые ламеллы несколько разрушены. Увеличение 8 000X.

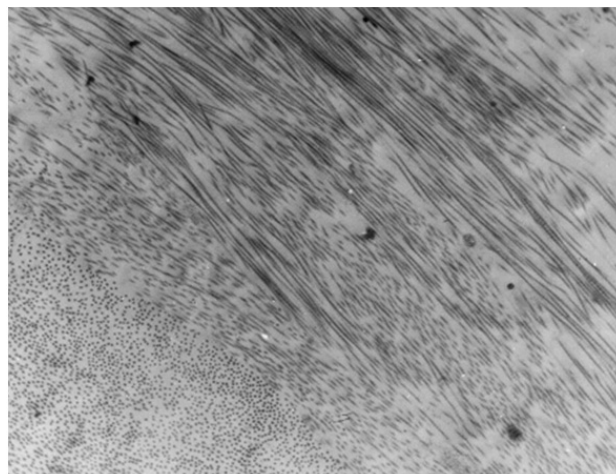


Рис. 2. Электронная микрофотография ультраструктуры роговицы из первой группы. При воздействии Triton X-100 и гидроксида аммония отмечается дезорганизация структуры ламелл, наличие больших бесструктурных очагов, истончение остатков КФ, их фрагментация и дезориентация. Увеличение 8 000X.

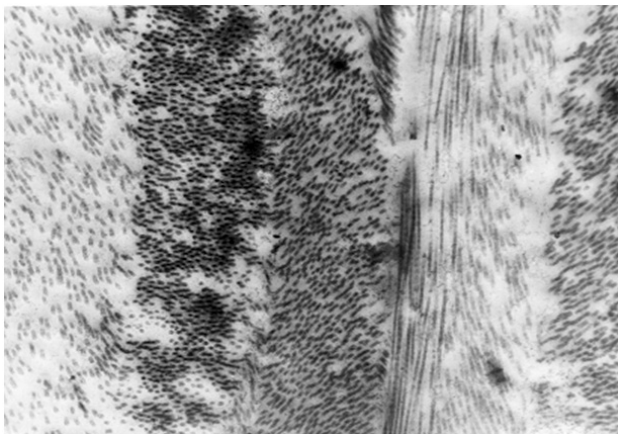


Рис. 3. Электронная микрофотография ультраструктуры роговицы из второй группы. Ламеллы стромы построены из коротких неоднородной осмиофильности КФ. Пучки рыхлые, с большим числом электронно-прозрачных участков. Увеличение 8 000X

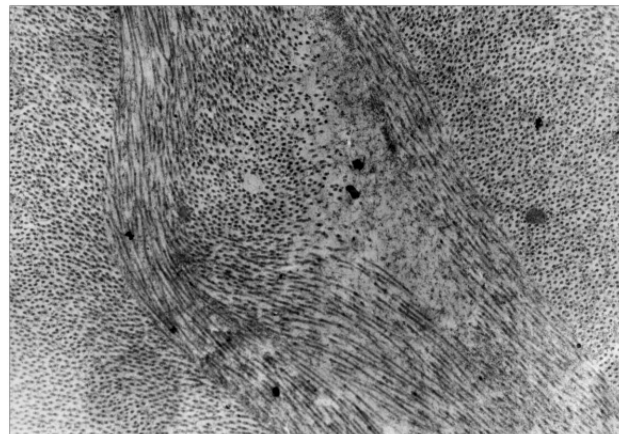


Рис. 4. Электронная микрофотография ультраструктуры роговицы из третьей группы. Сохранена ламеллярность стромы. КФ тонкие, ламеллы рыхлые; встречаются небольшие очаги расщепления КФ. Увеличение 8000X

строме отмечается очень рыхлая структура ламелл. Матрикс значительно просветлен. КФ части ламелл значительно дезорганизованы, истончены, извиты, укорочены. Вокруг них много «войлокоподобного» материала. При большом увеличении вместо КФ местами лишь скопления «войлокоподобного» материала и более плотного зернистого материала. КФ более сохраненной структуры окружают такие участки. КФ в состоянии глубокой деградации, рассоединяются на протофибриллы, теряют осмиофильность, распадаются. Вокруг много «войлокоподобного» материала. Материал этот, как можно заключить по исследованию на больших увеличениях, образуется в результате распада КФ (Рис. 5).

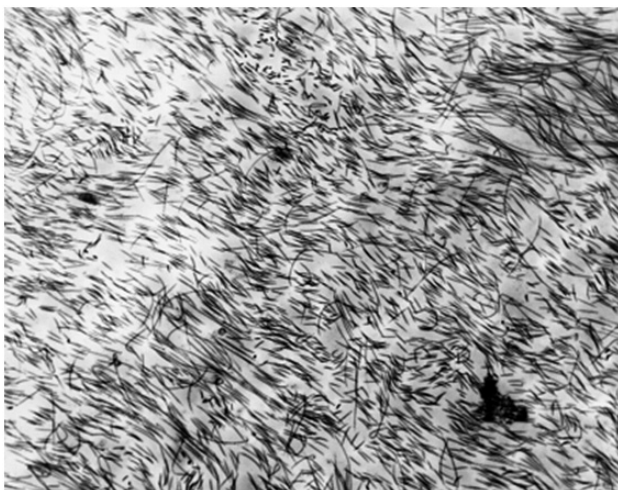


Рис. 5. Электронная микрофотография ультраструктуры роговицы из четвертой группы. Отмечается очень рыхлая структура ламелл. Матрикс значительно просветлен. КФ части ламелл значительно дезорганизованы, истончены, извиты, укорочены. Увеличение 8000X

В заднем отделе стромы пучки КФ в ламеллах менее дезорганизованы. Однако на отдельных участках вместо КФ располагается лишь «войлокоподобный» материал. КФ приобретают вид «бамбуковых» палочек, истончаются, распадаются, окружены элементами распада. Как показали исследования материала при большом увеличении (до 120000), КФ распадаются на отдельные волоконца, ворсинки, мелкие фрагменты и т.п., которые и формируют массы «войлокоподобного» материала.

Бесклеточная строма роговиц из 5 группы получена путем обработки ультразвуком в растворе декстрана до и после отмывания в растворе Triton X-100 и гидроксида аммония с последующим воздействием лаурил сульфата натрия и этанола. Электронномикроскопическое исследование показало, что в передней строме структура ламелл сохранена. Матрикс, в основном, умеренной электронной плотности. В местах, где по-видимому, были клетки — электронно-прозрачные участки. КФ имеют различную степень деградации структуры.

В заднем отделе стромы в отдельных местах нарушена архитектура ламелл и наблюдается дезинтеграция КФ. КФ более толстые, чем в передней строме, но присутствуют очаги их распада с формированием большого количества «войлокоподобного» материала. Часть КФ имеет менее измененную ультраструктуру. Матрикс умеренной электронной плотности.

Заключение

Подводя итоги ультраструктурному изучению нашего материала, можно констатировать, что характер повреждения КФ при всех способах обработки однотипный, но степень выраженности изменений в них варьирует. Выраженная дезинте-

грация, фрагментация, деструкция и гомогенизация структуры КФ, а также слабая осмиофильность межфибрилярного матрикса связаны с утратой основных веществ матрикса стромы и веществ, обволакивающих и скрепляющих ультраструктурные элементы коллагеновой фибриллы. Тем не менее, применение методики, включающей двухмомент-

ное воздействие Triton X-100 и гидроксида аммония до и после ультразвуковой обработки, позволило получить бесклеточный модуль стромы роговой оболочки с наименьшим повреждением коллагеновых фибрилл. Данный вид обработки был отобран для дальнейшего исследования в эксперименте *in vivo*.

Литература

1. **Amano S.** Decellularizing corneal stroma using N₂ gas / S. Amano, N. Shimomura, S. Yokoo [et al.] // *Mol. Vis.* — 2008. — Vol. 14. — P. 878–882.
2. **Bader A.** Tissue engineering of heart valves — human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves / A. Bader, T. Schilling, O. E. Teebken [et al.] // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* — 1998. — Vol. 14. — P. 279–284.
3. **Grauss R. W.** Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling / R. W. Grauss, M. G. Hazekamp, S. van Vliet [et al.] // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* — 2003. — Vol. 126. — P. 2003–2010.
4. **He H.** Use of high-pressure processing for oyster shucking and shelf-life extension / H. He, R. M. Adams, D. F. Farakas [et al.] // *J. Food. Sci.* — 2002. — Vol. 67. — P. 640–645.
5. **Imanishi J.** Growth factors: Importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea / J. Imanishi, K. Kamiyama, I. Iguchi [et al.] // *Progr. Retin Eye Res.* — 2000. — Vol. 19. — P. 113–129.
6. **Korossis S. A.** In-vitro assessment of the functional performance of the decellularized intact porcine aortic root / S. A. Korossis, H. E. Wilcox, K. G. Watterson [et al.] // *J. Heart Valve Dis.* — 2005. — Vol. 14. — P. 408–422.
7. **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.
8. **Mertsching H.** Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation / H. Mertsching, T. Walles, M. Hofmann [et al.] // *Biomaterials.* — 2005. — Vol. 26. — P. 6610–6617.
9. **Meyer S. R.** Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat / S. R. Meyer, B. Chiu, T. A. Churchill [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res. A.* — 2006. — Vol. 79. — P. 254–262.
10. **Oh J. Y.** Processing porcine cornea for biomedical applications / J. Y. Oh, M. K. Kim, H. J. Lee [et al.] // *Tissue Eng. Part C Methods.* — 2009. — Vol. 15, № 4. — P. 635–645.
11. **Ohji M.** Basement membrane synthesis by human corneal epithelial cells in vitro / M. Ohji, N. Sundar Raj, J. R. Hassell [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* — 1994. Vol. 35. — P. 479–485.
12. **Ota T.** Novel method of decellularization of porcine valves using polyethylene glycol and gamma irradiation / T. Ota, S. Taketani, S. Iwai [et al.] // *Ann Thorac. Surg.* — 2007. — Vol. 83. — P. 1501–1507.
13. **Ponce Mórquez S.** Decellularization of bovine corneas for tissue engineering applications / S. Ponce Mórquez, V. S. Martinez, W. Mc Intosh Ambrose [et al.] // *Acta Biomater.* — 2009. — Vol. 5. — P. 1839–1847.
14. **Sasaki S.** In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas / S. Sasaki, S. Funamoto, Y. Hashimoto [et al.] // *Mol. Vis.* — 2009. — Vol. 15. — P. 2022–2028.
15. **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.
16. **Xiao J.** Construction of the recellularized corneal stroma using porous acellular corneal scaffold / J. Xiao, H. Duan, Z. Liu [et al.] // *Biomaterials.* — 2011. — Vol. 32. — P. 6962–6971.
17. **Zhang C.** A comparative study on biocompatibility of acellular corneal stroma materials prepared by serial digestion methods. / C. Zhang, Y. Jin, Hu D. [et al.] // *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* — 2006. — Vol. 20. — P. 185–188.
18. **Zhang C.** Survival and integration of tissue-engineered corneal stroma in a model of corneal ulcer / C. Zhang, X. X. Nie, D. Hu [et al.] // *Cell Tissue Res.* — 2007. — Vol. 29. — P. 249–257.

Поступила 8.02.2013