

УДК 617.7

**Н.В. Пасечникова, В.В. Вит, Н.Ф. Леус, С.А. Якименко,
А.И. Бузник, С.Г. Коломийчук, И.О. Насинник**

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

ПРИМЕНЕНИЕ ИМПЛАНТОВ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА В КАЧЕСТВЕ РОГОВИЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Коллагеновый аналог стромы роговицы (КАСР) был синтезирован путем «поперечной сшивки» свиного коллагена I типа 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимидом и N-гидроксисукцинимидом. Получен гидрогель, по оптическим и механическим свойствам схожий с человеческой роговицей. После интраламеллярной имплантации КАСР в роговицу кролика (8 кроликов — 8 глаз) имплант сохранял прозрачность в сроки наблюдений до 12 мес, незначительные помутнения поверхностных слоев роговицы наблюдались на 2 из 8 глаз. Гистологические исследования выявили структурную сохранность импланта и отсутствие воспалительной реакции. Полученные данные свидетельствуют о том, что КАСР в перспективе могут быть использованы в качестве материала для кератопластики.

Ключевые слова: роговица, имплантация, кератопластика.

Свыше 10 млн человек в мире страдают от слепоты, связанной с помутнением роговицы. Основным методом лечения роговичной слепоты остается пересадка донорской роговицы [1]. В большинстве стран потребность в донорской роговице в разы превышает ее наличие. В связи с этим все большую актуальность приобретает поиск альтернативных материалов для кератопластики.

В настоящее время в качестве аналогов донорской роговицы наиболее широко применяются амниотическая оболочка [2] и кератопротезы [3]. Однако амниотическая оболочка может использоваться только для лечебных покрытий язв роговицы различной этиологии, ее применение при более тяжелых деструктивных процессах роговицы ограничено. Кератопротезы используются для восстановления зрения при осложненных бельмах роговицы и несмотря на успехи, достигнутые в этой области в последние десятилетия, имеют определенные показания для применения.

В работах ряда авторов [4–6] была показана возможность получения гидрогелевого импланта на основе коллагена I или III типов, который по оптическим, химическим и физическим свойствам был схож с человеческой роговицей и при пересадке в рогови-

цу экспериментальных животных (мышей, кролей, свиней), а также в роговицу человека не вызывал аллергических реакций, в большинстве случаев сохранял прозрачность и прорастал нервами из роговицы реципиента.

Цель — синтезировать аналог стромы донорской роговицы, изучить его свойства *in vitro* и оценить переносимость *in vivo*.

Материал и методы. Работа была одобрена биоэтическим комитетом ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины». Коллагеновый аналог стромы роговицы (КАСР) был получен путем «поперечной сшивки» свиного коллагена I типа (ателоколлаген) 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимидом и N-гидроксисукцинимидом.

Рефракционные свойства полученного КАСР *in vitro* оценивали на рефрактометре Abbe. Механические свойства КАСР оценивали по переносимости наложения на него 12 узловых швов, как при пересадке человеческой роговицы.

Переносимость КАСР *in vivo*. После интраламеллярной имплантации гидрогелевых дисков диаметром 6 мм в роговицу кролика (8 кроликов — 8 глаз) оценивали состояние роговицы и КАСР в месте имплан-

© Н.В. Пасечникова, В.В. Вит, Н.Ф. Леус и др., 2011

тации (шкала В.В. Войно-Ясенецкого), васкуляризация роговицы (шкала В.М. Непомнящей). Срок наблюдения — 12 мес. Световая микроскопия роговиц кролей после окраски гематоксилин-эозином проведена через 12 мес после имплантации.

Результаты и их обсуждение. В результате «сшивки» коллагена образовался полупрозрачный имплант толщиной 0,5 мм с включениями единичных пузырьков воздуха (рис. 1). Рефракционный индекс полученного КАСР колебался в пределах 1,24–1,30, что незначительно ниже, чем у человеческой роговицы (1,37–1,38). Эластичность и прочность полученного КАСР позволяли фиксировать его 12 узловыми швами при моделированной частичной послойной пересадке роговицы на изолированном кроличьем глазу.

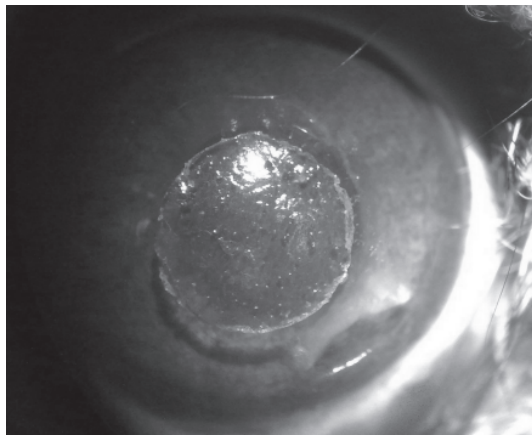


Рис. 1. Коллагеновый имплант перед имплантацией в роговицу кролика

При интраламеллярной имплантации КАСР сохранял прозрачность на всех глазах животных на протяжении 12 мес. Васкуляризации роговицы не наблюдалось ни на одном из оперированных глаз. Незначительные помутнения поверхностных слоев роговицы реципиента (плотность 1–2 балла) после имплантации наблюдались на 2 из 8 глаз, притом только на протяжении первой недели. В отдаленные сроки наблюде-

ний (до 12 мес) ограниченное облаковидное помутнение (плотность 2 балла) в поверхностных слоях роговицы сохранялось на 1 из 8 глаз. Гистологические исследования выявили структурную сохранность импланта и отсутствие воспалительной реакции (рис. 2).

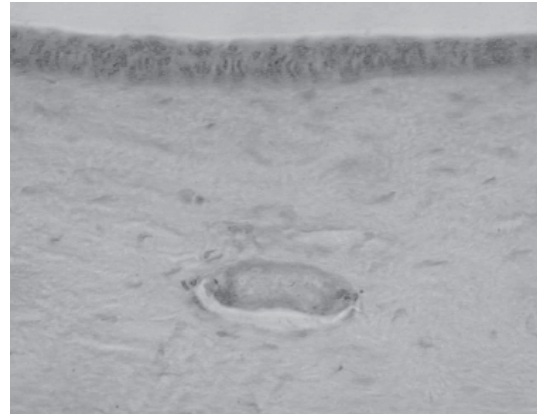


Рис. 2. Роговица кролика № 2, через 12 мес после имплантации. Имплант в строме роговицы, без сосудов и клеточных элементов. Окраска гематоксилин-эозином, $\times 100$

Полученные нами данные подтверждают возможность получения импланта, схожего по оптическим и механическим свойствам с человеческой роговицей, путем образования поперечных сшивок между молекулами коллагена по методике Y. Liu et al. [5]. Основной трудностью при изготовлении импланта было удаление включений воздуха из него, от которых нам пока не удалось полностью избавиться, что может сказываться как на качестве зрения потенциального реципиента, так и на прочности импланта. Проведенные клинические наблюдения и гистологические исследования согласуются с данными других авторов о ареактивности и длительном сохранении этих имплантов в роговице экспериментальных животных [5, 6], что свидетельствует о перспективе их клинического использования в качестве материала для кератопластики.

Список литературы

1. *Whitcher J. P.* Corneal blindness: a global perspective / J. P. Whitcher, M. Srinivasan, M. P. Upadhyay // *Bull. World Health Organ.* — 2001. — V. 79. — P. 214–221.
2. *Amniotic membrane in ophthalmology* / H. S. Dua, J. A. P. Gomes, A. J. King, V. S. Mahajan // *Surv. Ophthalmol.* — 2004. — V. 49. — P. 51–77.
3. *Якименко С. А.* 45-летние результаты кератопротезирования в Институте им. В. П. Филатова / С. А. Якименко // *Офтальмол. журн.* — 2008. — № 3. — С. 13–18.
4. *Corneal regeneration following implantation of a biomimetic tissue-engineered substitute* / P. Fagerholm, N. S. Lagali, D. J. Carlsson [et al.] // *Clin. Trans. Sci.* — 2009. — V. 2. — P. 162–164.

5. A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation / Y. Liu, L. Gan, D. J. Carlsson [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2006. — V. 47. — P. 1869–1875.

6. Tissue engineered recombinant human collagen-based substitutes for implantation: performance of type I versus type III collagen / K. Merrett, P. Fagerholm, C. R. McLaughlin [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2008. — V. 49. — P. 3887–3894.

Н.В. Пасєчнікова, В.В. Віт, М.Ф. Лєус, С.А. Якименко, О.І. Бузник, С.Г. Коломийчук, І.О. Насінник
ЗАСТОСУВАННЯ ІМПЛАНТІВ НА ОСНОВІ КОЛАГЕНУ В ЯКОСТІ РОГІВКОВОГО ТРАНСПЛАНТАТА В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Колагеновий аналог строми рогівки (КАСР) був синтезований шляхом «поперечного зшивання» свинячого колагену І типу 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл) карбодіїмідом і N-гідроксисукцинімідом. Отримано гідрогель, який за оптичними і механічними властивостями схожий на людську рогівку. Після інтраламелярної імплантації КАСР у рогівку кроля (8 кролів — 8 очей) імплант зберігав прозорість у терміни спостережень 12 міс, незначні помутніння поверхневих шарів рогівки спостерігалися на 2 з 8 очей. Гістологічні дослідження виявили структурне збереження імпланту та відсутність запальної реакції. Отримані дані свідчать про перспективність подальшого використання отриманого КАСР у якості матеріалу для кератопластики.

Ключові слова: рогівка, імплантація, кератопластика.

N.V. Pasechnikova, V.V. Vit, M.F. Leus, S.A. Yakimenko, O.I. Buznik, S.G. Kolomiychuk, I.O. Nasinnik
APPLICATION OF COLLAGEN IMPLANTS AS A CORNEAL GRAFT IN EXPERIMENT

Collagen substitute of corneal stroma (CSCS) was synthesized by porcine type I collagen cross-linking with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and N-hydroxysuccinimide. Obtained implant had optical and mechanical properties similar to human cornea. It showed satisfactory biocompatibility when was implanted into rabbit corneas (8 rabbits — 8 eyes): CSCS has been preserved its clarity during 12 months follow-up. Fine opacities of superficial corneal layers have been observed in 2/8 eyes. Light microscopy confirmed good integrity of the implants and absence of inflammation in corneal stroma. Our data suggest that CSCS synthesized by collagen cross-linking might be a potential material for keratoplasty.

Key words: cornea, implantation, keratoplasty.