

УДК 617.713-003.93-76:578.683:683:612.085.2

### ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МОНОСЛОЯ ФЕТАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ НА МЯГКИХ КОНТАКТНЫХ ЛИНЗАХ, СОДЕРЖАЩИХ КОЛЛАГЕН

**Н. В. Пасечникова**, д-р мед. наук, **Г. И. Дрожжина**, д-р мед. наук,

**О. Н. Иванова**, канд. мед. наук, **И. О. Насинник**, врач,

**А. Г. Попандопуло\***, д-р мед. наук, **А. С. Кавелина\***, лаборант

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова АМН Украины»

\*ИНВХ им. В.К. Гусака АМН Украины, Донецк

*У роботі, в умовах експерименту, розглянуті особливості культивування моношару фетальних фібробластів на гідрофільних м'яких контактних лінзах, які містять колаген, що важливо в умовах ранньої спонтанній та стимульованій регенерації рогівкової тканини при її тяжких ушкодженнях.*

*В результаті проведеного дослідження в умовах in vitro виявлено, що в групі культуральних лінз, що містять 13% поліактиламід у не вдалося одержати повноцінний моношар фібробластів. У другій групі культуральних, гідрофільних лінз, до складу яких входило 12% поліакрламід у 1% колагену, був одержаний моношар фетальних фібробластів, що покривають практично всю площу внутрішньої поверхні лінз на 5 добу культивування.*

**Ключевые слова:** регенерация роговицы, мягкие контактные линзы, фибробласты, коллаген.

**Ключові слова:** регенерація рогівки, м'які контактні лінзи, фібробласти, колаген.

**Введение.** Заболевания и повреждения роговицы, при которых нарушаются процессы регенерации и имеется выраженная несостоятельность ее слоев, приводят к значительному снижению остроты зрения и слепоте, что остается актуальной проблемой офтальмологии [1, 5, 7, 8, 11].

В настоящее время для регенерации слоев роговой оболочки при тяжелых формах рецидивирующих эрозий, язвенных кератитах, синдроме сухого глаза, нейротрофических и аутоиммунных процессах с успехом применяют консервативную терапию, а при недостаточном ее эффекте различные виды покрытий [3, 4, 9, 10, 12].

Потенциальные регенеративные возможности биологического покрытия — поверхностной послойной кератопластики (КП), предложенной в 1968 г. Н. А. Пучковской, несомненно велики. Принцип операции состоит в том, что по мере регенерации собственной роговичной ткани под поверхностным послойным трансплантатом, последний самостоятельно рассасывается, выполняя роль «биологической повязки» [12].

Применение гидрофильных лечебных мягких контактных линз (МКЛ) хорошо зарекомендовало себя при лечении хронических заболеваний роговицы. Лечебные свойства МКЛ связаны с их способностью покрывать поврежденную роговицу в качестве механической повязки, защищая ра-

невую поверхность от проникновения инфекции, создавая таким образом механический барьер, а также усиливая клеточную репарацию поврежденной ткани. Кроме того, МКЛ способны поглощать значительные количества лекарственных средств, создавая при их использовании для лечебных целей эффективные терапевтические концентрации лекарственных средств в тканях переднего отдела глаза [6, 13, 14, 15].

В последние десятилетия стало очевидным, что классическая фармакотерапия, хирургические методы лечения, а также и законодательные сложности с получением донорского материала, не всегда могут обеспечить адекватную помощь в лечении тяжелых заболеваний роговицы, а поэтому проблема ранней спонтанной и стимулированной регенерации ткани роговицы остается по-прежнему актуальной [2].

Выбор эмбриональной (фетальной) ткани для лечения заболеваний роговицы не случаен, так как фетальные ткани (ФТ) характеризуются содержанием большого количества бластных клеток, которые легко мигрируют, быстро делятся, образуют межклеточные контакты и приспособляются к новым условиям существования. Более того, ФТ

содержат биологически активные вещества, которые стимулируют регенерацию поврежденных тканей реципиента, устойчивы к гипоксии, неминуемо возникающей вследствие травмы, не вызывают иммунной реакции отторжения, поскольку в 1-м и 2-м триместрах гестации еще не экспрессированы белки гистосовместимости I и II классов и, следовательно, отвечают условиям выбора трансплантата [2, 18, 19].

Наиболее успешные результаты применения фетальных клеток (ФК) в офтальмологии, по данным литературы, представили M. S. Insler и L. G. Zopez в журнале «Cornea». Авторы описали трансплантацию фетальных клеток эндотелия роговицы человека приматам и показали, что пересаженные роговичные эндотелиальные клетки человека нормально функционируют и сохраняют свои функции насоса [19].

В 1982 г. Friend et al. предложили способ культивирования роговичных эпителиальных клеток на базальной мембране, полученной из роговицы кролика. В дальнейшем изучалась возможность применения других субстратов, таких как гидрогель, покрытый фибронектином, коллагеновые матрицы, фибрин и т. д., для культивирования эпителия *ex vivo* (Kobayashi, Ikada, 1991; Minami et al., 1993; Rama et al. 2001).

Российские исследователи изучали эффект трансплантации культивированных *in vitro* фетальных клеток роговицы в эксперименте, а затем у больных с различной патологией переднего отдела глаза, используя форсированные схемы инстилляций (в концентрации 10<sup>6</sup> кл/мл питательной среды) и субконъюнктивальные инъекции (в количестве 200000 клеток в 0,2–0,3 мл физиологического раствора) суспензии фетальных клеток эпителия, стромы и эндотелия роговицы человека. Результаты трансплантации суспензии фетальных клеток показали купирование роговичного синдрома, отека трансплантата, стимуляцию процессов регенерации, восстановление кровотока в 80% случаев в зоне некроза при тяжелых ожогах конъюнктивы и склеры [11].

В эксперименте на модели щелочного ожога роговицы фибробласты, культивированные на микроносителях, включенных в коллагеновый гель, фиксировали на глазу экспериментального животного МКЛ. Гистологически тканевая культура клеток на микроносителях в коллагеновом геле приводила к формированию нормальной структуры роговицы, а клинически — к ускорению закрытия дефекта роговицы [16].

В других исследованиях применяли монослой аллогенных или ксеногенных фетальных клеток (содержащих более 80% эпителиальных клеток и около 20% стромальных клеток), адгезированных на внутренней поверхности контактной линзы,

что способствовало эпителизации роговицы. Недостаток метода заключается в том, что монослой не обладает гистотипическими свойствами, так как содержит эпителиальные и стромальные клетки и не обеспечивает оптимальной репарации в ране [17].

Анализ литературных данных свидетельствует о формировании в офтальмологии нового направления — клеточной и тканевой инженерии, основанной на использовании культивированных клеток роговицы — которое обеспечивает замещение, стимулирует процессы репаративной регенерации при различных повреждениях роговой оболочки за счет имплантации или трансплантации выращенных *in vitro* клеток из здоровых тканей [20, 21]. Терапевтические эффекты пересадок, вероятно, связаны с наличием в ФК эмбриоспецифических ростовых факторов, цитокинов и других сигнальных молекул, способных активировать регенерацию и выживание клеток в тканях реципиента.

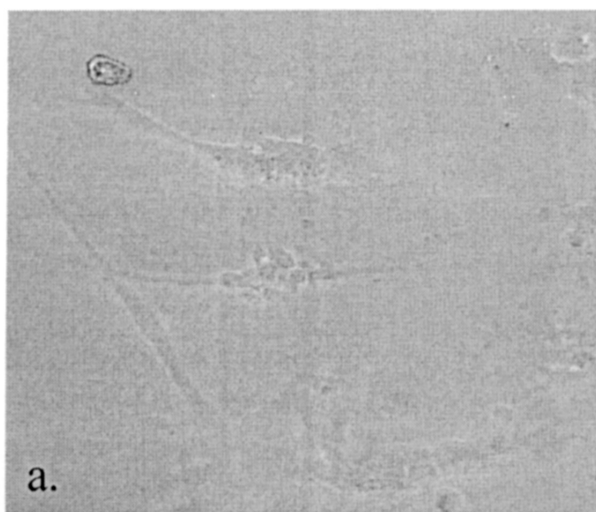
Целью работы явилось исследование особенностей культивирования монослоя фетальных фибробластов на гидрофильных мягких контактах линзах, содержащих коллаген.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Источником культуры фибробластов служили фетальные клетки из роговицы глаза 8-недельных эмбрионов человека, полученных при проведении искусственного прерывания беременности по медицинским показаниям, причем сыворотка крови матери дала отрицательный результат при тестировании на вирусы гепатитов В и С, цитомегаловирус, вирус иммунодефицита человека, простого герпеса, а также сифилис.

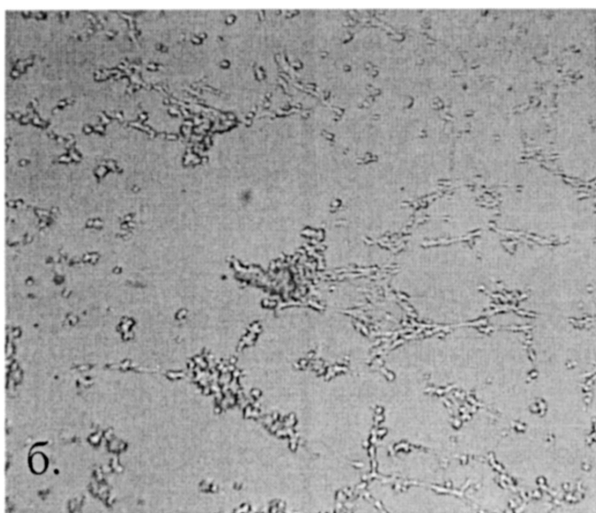
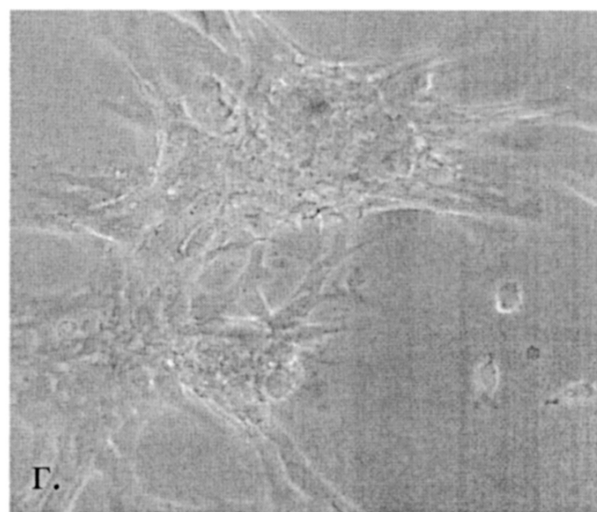
Для подложки использовали два вида мягких контактных линз (МКЛ) (АКВАЛАН, Украина), длительного ношения, диаметром 14,5 мм. Все линзы представляли собой гидрогель с высоким водосодержанием (87%). В состав первой группы линз дополнительно входило 13% полиакриламида. Во вторую группу дополнительно было включено 12% полиакриламида и 1% коллагена (крысиного). При этом все МКЛ сохраняли высокие физико-механические характеристики по ряду показателей (кислородо-содержание, ионо-проницаемость, смачиваемость, эластичность, биологическая совместимость, прочность).

Культивирование аллогенных эмбриональных клеток проводили в лаборатории клеточного и тканевого культивирования (ЛКТК) в соответствии с международными стандартами GMP, на базе института неотложной и восстановительной хирургии им. В. К. Гусака АМН Украины.

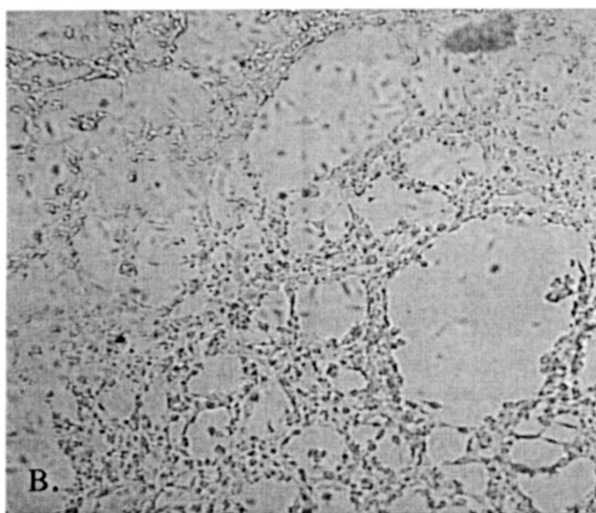
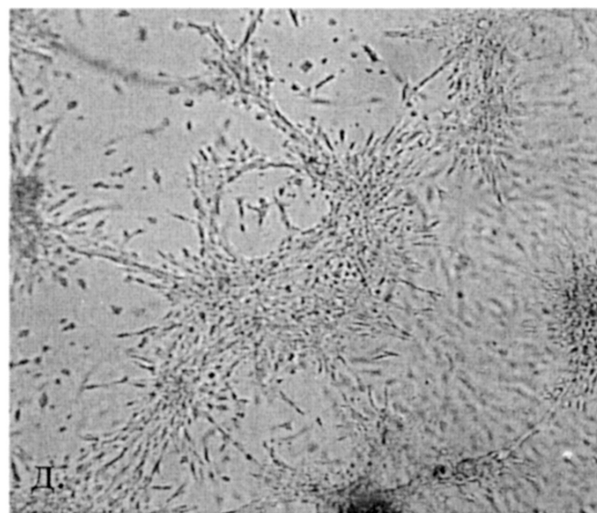
Для выращивания культуры клеток на контактной линзе перед культивированием МКЛ промывали раствором PBS («Sigma», USA) и помещали на 24-х луночное плато. Клеточную суспензию в концентрации 600 тыс./мл наносили на внутреннюю поверхность линзы в 2 мл среды DMEM/F12 1:1 («Sigma», USA), содержащей 20% ЭТС («Биолот», Россия) с добавлением эпидермального фактора EGF роста 10 нг/мл, («Sigma», USA), инсулина 5 мкг/мл, («Sigma», USA), изопротеринола («Sigma», USA). Затем «культуральные линзы» помещались в биореактор (CO<sub>2</sub>-инкубатор), с поддержанием стабильной температуры (37°C), влажности (в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> с насыщением влажности 95%), кислотности [14].



1  
с  
у  
т  
к  
и



4  
с  
у  
т  
к  
и



6  
с  
у  
т  
к  
и

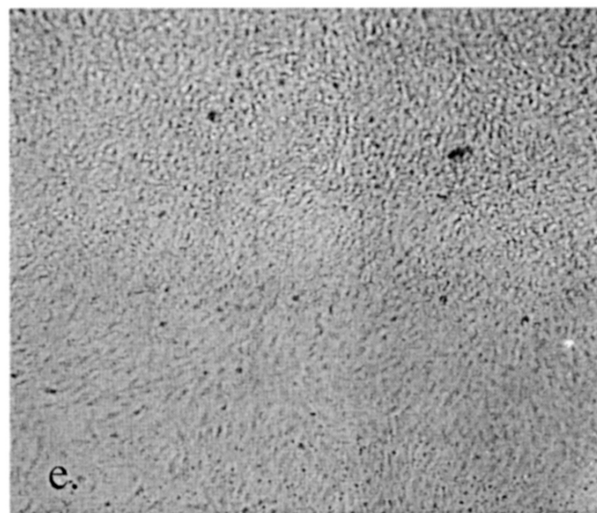


Рис. 1. Культура фетальных клеток на линзе, содержащей 13% полиакриламида. Фазово-контрастная микроскопия (увеличение  $\times 200$ ).

Рис. 2. Культура фетальных клеток на линзе, содержащей 12% полиакриламида и 1% коллагена. Фазово-контрастная микроскопия (увеличение  $\times 200$ ).

В процессе культивирования производился периодический контроль состояния растущих клеток. Наблюдение за пролиферацией клеток проводилось с помощью фазово-контрастной микроскопии (двухсоткратное увеличение), а также применения цитологического метода окраски по Романовскому-Гимза. Длительность культивирования составила 2-7 суток (в зависимости от состава линз), смену питательной среды проводили каждые 3 дня. На 5-е сутки часть объектов с культивированными клетками фиксировали в 10% растворе нормального формалина, окрашивали гематоксилином и эозином.

На этапе культивирования добились увеличения числа клеток в 100 и более раз в сравнении с начальным количеством.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** В первой группе на первые сутки цитологически определялись единичные отростчатые клетки на поверхности культуральной линзы, на четвертые сутки — отростчатые клетки вытянутой формы, заполняющие поверхность МКЛ на одну треть, на пятые сутки культивирования цитологическая картина показала наличие клеток вытянутой, и в меньшей степени — округлой формы, заполняющих чуть менее половины поверхности МКЛ (рис. 1 а, б, в).

Во второй группе линз в первые сутки культивирования клетки прикреплялись в течение 40 минут — 2 часов после пассирования трипсин-версеном (1:3). Цитологически видны единичные отростчатые клетки вытянутой формы, островками покрывающие центральную часть внутренней поверхности линзы. На 4 сутки цитологически определяются отростчатые клетки вытянутой формы, занимающие около 5 поверхности культуральной линзы (почти все поле зрения). На 5 сутки культивирования фетальных фибробластов определяются клетки преимущественно округлой формы. Среди них присутствует небольшая группа вытянутых клеток. Клетки культуры формируют монослой (рис. 2 г, д, е).

Таким образом очевидно, что в первой группе линз, содержащих 13% полиакриламида, не удалось получить полноценный монослой фибробластов. Во второй группе гидрофильных линз, в состав которых входило 12% полиакриламида и 1% коллагена, был получен монослой фетальных фибробластов, покрывающий практически всю площадь внутренней поверхности линз на пятые сутки культивирования (рис. 3 — см. обложку).

### ВЫВОДЫ

1. При культивировании фибробластов в условиях *in vitro* монослой клеток на внутренней поверхности МКЛ не образуется.

2. Образование монослоя фибробластов на внутренней поверхности мягкой контактной линзы, в состав которой включен 1% коллагена, возможно. На пятые сутки культивирования клетки покрывают практически всю поверхность линзы.

Авторы благодарят  
профессора Мальцева Э. В.,  
профессора Вута В. В.,  
профессора Леуса Н. Ф.

за консультативную помощь на начальном этапе выполнения работы.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Волков В. В., Забойникова Т. П., Каминская Л. Ю. и др. Акантамебный кератит // Вестник офтальмологии. — 1994. — № 1. — С. 29-31.
2. Гарлан Д. М., Кірк А. Д. Майбутнє трансплантації органів і тканин — Чи можуть модулятори шляхів костимуляції Т-клітин революціонізувати запобігання відторгненню трансплантата? // Рік XLV. — 2000. — Ч. 2. — С. 145.
3. Горгиладзе Т. У. Пересадка роговицы. — Батуми: Сабчота Аджара, 1983. — С. 89-95.
4. Дронов М. М. Руководство по кератопластике. — Санкт-Петербург: «Влазипресс», 1997. — С. 115-117.
5. Каспаров А. А. Офтальмогерпес. — М.: Медицина, 1994. — 223 с.
6. Кивасев А. А., Бабич Г. А., Зеленская М. В. Отдаленные результаты применения терапевтических мягких контактных линз // Офтальмол. журн. — 1983. — № 4. — С. 197-198.
7. Комах Ю. А., Комах Ю. А., Мороз З. И., Борзенюк С. А. Современное состояние повторной пересадки роговицы // Офтальмохирургия. — 1997. — № 1. — С. 19-27.
8. Майчук Ю. Ф. Паразитарные заболевания глаз. — М.: Медицина, 1988. — 287 с.
9. Майчук Ю. Ф. Терапевтические алгоритмы при инфекционных язвах роговицы // Вестн. офтальмол. — 2000. — № 3. — С. 35-37.
10. Макаров П. В. К хирургической тактике лечения тяжелой и особо тяжелой ожоговой травмы глаз (сообщение 2) // Вестн. офтальмол. — 2002. — № 4. — С. 8-10.
11. Макаров П. В., Гундорова Г. В., Ходжабякин А. В. и др. Применение фетальных клеток роговицы человека для лечения различной патологии органа зрения. — М., 2000.
12. Пучковская Н. А., Бархаш С. А., Бушмиц Д. Г. и др. Основы пересадки роговой оболочки. — Киев: Здоровье, 1971. — С. 277.
13. Ушаков Н. А., Новиков С. А., Гладких А. Ф. и др. Применение мягких контактных линз при ожогах легкой и средней степени тяжести и при ранениях роговицы // Боевые повреждения органа зрения. Тезисы докладов науч. конф. Вмед.а. — Санкт-Петербург, 1993. — С. 159.
14. Патент РФ № 2173868. Способ изготовления лечебных контактных линз. Заявка № 99117875, заявлено 18.08.1999 г., приоритет 18.08.1999 г.
15. Патент РФ № 2124537. Композиция и способ изготовления контактной линзы. Заявка № 96113245, заявлено 04.07.1996 г., приоритет 04.07.1996 г.
16. Патент РФ № 2000102601 от 04.02.2000. Способ лечения дефектов роговицы. Опубликовано 10.09.2001.
17. Патент РФ № 2173122. Способ лечения эрозий роговицы. Опубликовано 10.09.2001.

18. Терских В. В. и др. Эпидермальные кератиноциты человека и животных. Проблемы культивирования и трансплантация. — Москва: Наука, 1995, 1. — С. 4, 82.
19. Insler M. S., Zopez L. G. Heterologous Transplantation versus Enhancement of Human Corneal Endotelium // Cornea. — 1991. — Vol. 10. — № 2. — P. 136-148.
20. Kenyon K. R. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders / K. R. Kenyon, S. C. G. Tseng // Ophthalmology. — 1989. — Vol. 96. — P. 709-723.
21. Rao S. K. Limbal allografting from related live donors for corneal surface reconstruction / Rao S. K. [et al.] // Ophthalmology. — 1999. — Vol. 106. — P. 822-828.

Поступила 15.07.2000.

Рецензент д-р мед. наук проф. Э. В. Мальцев

### PECULIARITIES OF CULTIVATION OF THE MONOLAYER OF FETAL FIBROBLASTS ON THE SOFT CONTACT LENSES, WHICH CONTAIN THE COLLAGEN

Pasechnikova N. V., Drozhzhina G. I., Ivanova O. N., Nasinnik I. O., Popandopulo A. G., Kavelina A. S.  
Odessa, Ukraine

Under the conditions of the experiment the work considered the peculiarities of cultivation of the monolayer of fetal fibroblasts on the hydrophilic soft contact lenses, which contain collagen; it is promising with respect to the early spontaneous and stimulated regeneration of the corneal tissue in its severe affection.

As a result of the study in vitro, it is revealed that the valuable monolayer of fibroblasts could not be obtained in the group of the cultural lenses, containing 13% of polyacrylamide. In the second group of the cultural, hydrophilic lenses, composition of which had 12% of polyacrylamide and 1% of collagen, the monolayer of the fetal fibroblasts was obtained, covering practically the entire area of the internal surface of lenses on the 5<sup>th</sup> day of cultivation.



УДК 617.713-085.322+617.713-003.93

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ АБСОРБИРУЮЩЕГО РАНЕВОГО ПОКРЫТИЯ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА ПРИ ПОВРЕЖДЕНИЯХ РОГОВИЦЫ

**Н. В. Пасечникова**, д-р мед. наук, проф., **С. А. Якименко**, д-р мед. наук, проф.,  
**А. И. Бузник**, врач, **И. О. Насинник**, мл. научн. сотр., **Т. Б. Кустрин**, врач

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

*Проведено експериментальне дослідження використання абсорбуючого ранового покриття рогівки.*

*Отримані в експерименті дані вказують на можливість застосування для лікувальної кератопластики абсорбуючого ранового покриття на базі колагену як біопокриття при поверхневих і глибоких ушкодженнях строми рогівки.*

**Ключевые слова:** повреждения роговицы, раневое покрытие, коллаген, регенерация.

**Ключові слова:** пошкодження рогівки, раньове покриття, колаген, регенерація.

**Введение.** Повреждения и заболевания роговицы занимают одно из ведущих мест среди причин слепоты и слабовидения. Ранения глаза с дефицитом ткани роговицы, ожоги глазного яблока, инфекционные, нейротрофические, аутоиммунные и аллергические язвы роговицы протекают с нарушением процессов регенерации [14,15,16].

Для регенерации слоев роговицы при различных заболеваниях успешно применяют консервативную терапию, а при низкой ее эффективности различные виды покрытий для лечебной кератопластики.

Отдельным направлением в лечении дефектов и язв роговицы явилась разработка новых материалов для биопокрития, одним из которых стал амнион, применяемый с 40-х годов прошлого столетия [1].

В настоящее время наряду с лечебной кератопластикой используется метод конъюнктивальной пластики роговицы, разработанный Х. Кребсом (1887). Независимо от него Х. Кунт (1889) разработал собственные способы конъюнктивального покрытия роговицы и определил показания к их применению. Аутоконъюнктивальная пластика роговицы является операцией выбора при показаниях к экстренной кератопластике, когда отсутствует донорский материал [5,6,9].

В. П. Филатов показал важность послойной кератопластики как подготовительной, мелиоративной операции. Эффективность предложенной

© Н. В. Пасечникова, С. А. Якименко, А. И. Бузник, И. О. Насинник, Т. Б. Кустрин, 2009.