

УДК 617.713-004.1-089.843:547.962.9-092.9

### РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ИМПЛАНТОВ НА ОСНОВЕ ПОПЕРЕЧНО-СШИТОГО КОЛЛАГЕНА В КАЧЕСТВЕ АНАЛОГА ДОНОРСКОЙ РОГОВИЦЫ

**Н. В. Пасечникова**, д. мед. н., проф., **В. В. Вит**, д. мед. н., проф., **Н. Ф. Леус**, д. мед. н., проф.,  
**С. А. Якименко**, д. мед. н., проф., **А. И. Бузник**, к. мед. н., **С. Г. Коломийчук**, науч. сотр.,  
**И. О. Насинник**, мл. науч. сотр.

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

*Колагеновый аналог стромы роговицы (КАСР) був синтезований шляхом «поперечного зшивання» свинячого колагену I типу 1-етил-3-(3-диметил амінопропіл) карбодіімідом і N-гідроксисукцинімідом. Отриманий прозорий імплант, який за оптичними і механічними властивостями схожий на людську роговицю. Після інтраламелярної імплантації КАСР в роговицю кроля (8 кролів — 8 очей) трансплантат зберігав свою прозорість в терміні спостережень 12 міс., незначні помутніння поверхневих шарів роговиці спостерігалися на 2 з 8 очей протягом першого тижня. На 1 оці помутніння розсмоктались, на другому — утворилося обмежене хмароподібне помутніння роговиці. Гістологічні дослідження виявили структурне збереження імпланту та відсутність запальної реакції. Отримані дані свідчать про перспективність подальшого використання КАСР, синтезованого шляхом «поперечного зшивання» колагену як матеріалу для кератопластики.*

**Ключевые слова:** кератопластика, «поперечно-сшитый» коллаген, клиничко-морфологические показатели

**Ключові слова:** кератопластика, «поперечно-зшитий» колаген, клініко-морфологічні показники

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** Свыше 10 миллионов человек в мире страдают от слепоты, связанной с помутнением роговицы. Основным методом лечения роговичной слепоты остается пересадка донорской роговицы [4]. 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 [6, 7] и кератопротезы [3, 5]. 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, но несмотря на успехи, достигнутые в этой области в последние десятилетия, имеют ограниченные показания для своего применения.

В работах ряда авторов [8–10] была показана возможность получения гидрогелевого импланта на основе коллагена I или III типов, сходного по своим оптическим, химическим и физическим свойствам с человеческой роговицей, и при пересадке

в роговицу экспериментальных животных (мышей, кроликов, свиней), а также в роговицу человека не вызывающего аллергических реакций, в большинстве случаев сохраняющего свою прозрачность и прорастающего нервами из роговицы реципиента.

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

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Работа была одобрена биоэтическим комитетом ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова НАМН Украины». Наблюдение, уход, операции на животных, а также выведение их из эксперимента выполнялись согласно Хельсинкской декларации об использовании животных в экспериментальных исследованиях.

Колагеновый аналог стромы роговицы (КАСР) был получен путем «поперечной сшивки» 10 % кислого раствора свиного коллагена I типа — ателоколлаген (Koken, Япония) 1-этил-3-(3-диметил аминопропил) карбодіімідом (Sigma-Aldrich, Канада) и N-гідроксисукцинімідом (Sigma-Aldrich, Канада) по методике Liu Y., с соавт. [9]. Полученный гель распределялся на предметном стекле, накрывался вторым предметным стеклом с толщиной прокладки между ними 0,5 мм и консервировался при 100 % влажно-

---

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

сти в течение двух суток (первые сутки — при 21°C, вторые сутки — при 37°C). В результате консервирования получался полупрозрачный гидрогель, который промывался раствором Рингера и сохранялся в этом растворе с добавлением 4 % раствора гентамицина при 4°C.

*Рефракционные свойства* полученного КАСР *in vitro* оценивались на рефрактометре Abbe (Bellingham&Stanley, Великобритания). *Механические свойства* КАСР оценивались по переносимости наложения на него двенадцати узловых швов при проведении частичной послойной пересадки роговицы на изолированном глазу кролика.

*Переносимость КАСР in vivo.* В работе использованы 8 кроликов породы шиншилла массой 2,4–2,8 кг. После введения кролика в наркоз 1 % раствором тиопентала натрия из расчета 1 мл/кг массы тела на правых глазах животных проведена интраламеллярная имплантация коллагеновых дисков диаметром 6 мм в роговицу.

Методика имплантации: скребицом проводили разрез роговицы длиной 3 мм, глубиной 2/3 толщины роговицы на 12 часах в 2 мм от лимба. На этой глубине шпателем расслаивали роговицу до области зрачка для формирования «кармана» 7x7 мм. В сформированный карман шпателем заводили имплант и центрировали его напротив зрачка. На разрез роговицы накладывали два узловых шва нейлон 9/0. После операции животным в оперированный глаз проводили инстилляцию 0,5 % раствора левофлоксацина (Santen Oy, Финляндия) 4 раза в день в течение семи дней. Швы удаляли через 14 дней.

Клинические наблюдения осуществляли ежедневно на протяжении первой недели, затем — еженедельно.

Состояние роговицы и КАСР в месте имплантации оценивалось по шкале В. В. Войно-Ясенецкого [1], васкуляризация роговицы по шкале В. М. Непомнящей [2]. Срок наблюдения составил 12 месяцев.

*Гистологические исследования.* Световая микроскопия оперированных роговиц после их окраски гематоксилин-эозином проведена через 12 мес. после имплантации, после того как животные были выведены из эксперимента воздушной эмболией в ушную вену.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** В результате «сшивки» коллагена образовался полупрозрачный имплант толщиной 0,5 мм, с включениями единичных пузырьков воздуха (рис. 1).

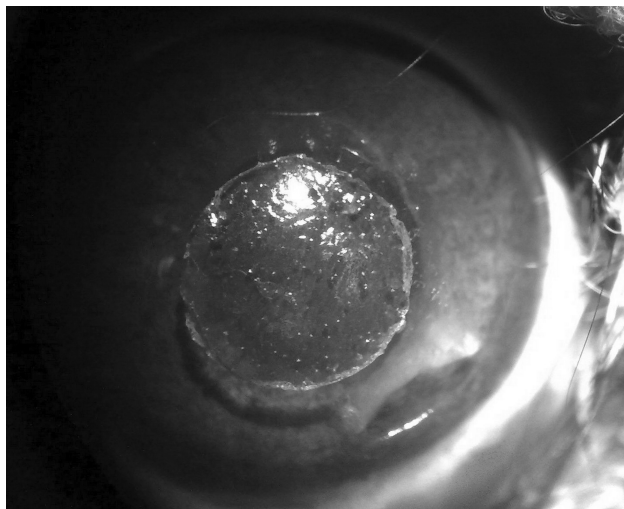


Рис. 1. Коллагеновый имплант перед имплантацией в роговицу кролика.

Рефракционный индекс полученного импланта колебался в пределах 1,24–1,3, что незначительно ниже, чем у человеческой роговицы (1,37–1,38). Эластичность и прочность полученного КАСР позволяли фиксировать его двенадцатью узловыми швами при моделированной частичной послойной пересадке роговицы на изолированном кроличьем глазу.

При интраламеллярной имплантации КАСР сохранял свою прозрачность на всех глазах оперированных животных на протяжении 12 месяцев. Васкуляризации роговицы не наблюдалось ни на одном из оперированных глаз. Незначительные помутнения поверхностных слоев роговицы реципиента (плотность 1–2 балла) после имплантации отмечены на двух из 8 глаз, притом только на протяжении первой недели. В отдаленные сроки наблюдений (до 12 мес.) ограниченное облаковидное помутнение (плотность 2 балла) в поверхностных слоях роговицы сохранялось на одном из 8 глаз (рис. 2 — кролик с прозрачной роговицей и с помутнением).

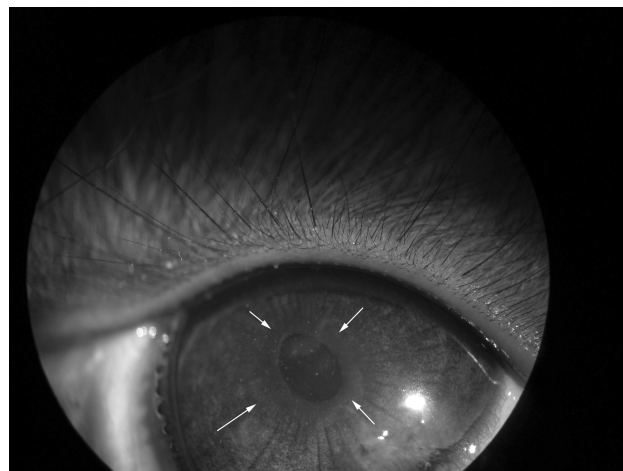


Рис. 2. Глаз кролика № 2 через 12 мес. после имплантации. Собственная роговица прозрачна. Имплант прозрачный, с точечными включениями воздуха (края импланта отмечены стрелками).

Гистологические исследования выявили структурную сохранность импланта и отсутствие воспалительной реакции в роговице кролика (рис. 3).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные подтверждают возможность получения импланта, схожего по своим оптическим и механическим свойствам с человеческой роговицей, путем образования поперечных сшивков между молекулами коллагена по методике Liu Y., с соавт. [9]. 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 хорошей биосовместимости и устойчивости этих имплантов в роговице экспериментальных животных [9, 10].

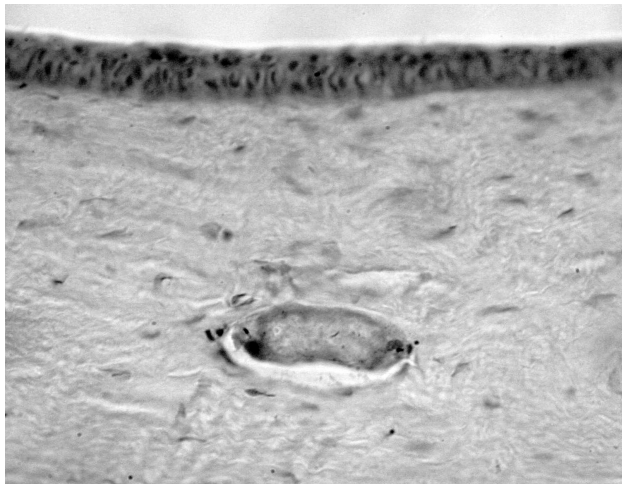


Рис. 3. Роговица кролика № 2 (с рис. 2). Через 12 мес. после имплантации. Имплант в строме роговицы, без сосудов и клеточных элементов. Окраска гематоксилин-эозин. X100.

Дальнейшие наши исследования будут направлены на изучение возможности использования КАСР в качестве аналога донорской роговицы при лечении заболеваний роговой оболочки в эксперименте, а при их успехе — и в клинике.

Биоинженерный коллагеновый аналог стромы роговицы, полученный путем образования поперечных сшивок между молекулами коллагена, обладает оптическими и механическими свойствами, схожими с роговицей человека. Его ареактивность

и длительное сохранение в строме роговицы свидетельствуют о вероятной перспективе клинического использования коллагеновых имплантов в качестве материала для кератопластики.

### ЛИТЕРАТУРА

1. **Войно-Ясенецкий В. В.** Тканевая несовместимость при пересадке роговой оболочки // дис. ... доктора мед. наук, 14.00.08. — Одесса, 1961. — 436 с.
2. **Непомящая В. М.** Применение сыворотки ожоговых реконвалесцентов при лечении ожогов глаз различной этиологии // дис. . . . канд. мед. наук, 14.00.08. — Одесса, 1968. — 421 с.
3. **Пучковская Н. А., Якименко С. А.** Оптическое кератопротезирование. — К., «Здоров'я». — 1988. — 180 с.
4. **Філатов В. П.** Оптична пересадка рогівки і тканинна терапія. — К.: ДМВ, 1948. — 382 с.
5. **Якименко С. А.** 45 летние результаты кератопротезирования в Институте им. В. П. Филатова // Офтальмол. журн. — 2008. — № 3. — С. 13–18.
6. **Якименко С. А., Бузник О. І.** Трансплантація амніотичної оболонки в лікуванні важких опіків очей // Офтальмол. журн. — 2010. — № 3. — С. 47–51.
7. **Dua H. S., Gomes J. A.P., King A. J., Maharajan V. S.** Amniotic membrane in ophthalmology // Surv. Ophthalmol. — 2004. — Vol. 49. — P. 51–77.
8. **Fagerholm P., Lagali N. S., Carlsson D. J., Merrett K., Griffith M.** Corneal regeneration following implantation of a biomimetic tissue-engineered substitute // Clin. Trans. Sci. — 2009. — Vol. 2. — P. 162–164.
9. **Liu Y., Gan L., Carlsson D. J., Fagerholm P., Lagali N., et al.** A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2006. — Vol. 47. — P. 1869–1875.
10. **Merrett K., Fagerholm P., McLaughlin C. R., Dravida S., Lagali N. S., et al.** Tissue engineered recombinant human collagen-based substitutes for implantation: performance of type I versus type III collagen // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2008. — Vol. 49. — P. 3887–3894.

### CLINICAL AND HISTOLOGICAL RESULTS OF EXPERIMENTAL USE OF IMPLANTS BASED ON CROSS-LINKED COLLAGEN AS DONOR CORNEA ANALOGUE

Pasechnikova N. V., Vit V. V., Leus M. F., Yakymenko S. A., Buznyk O. I.

Odessa, Ukraine

Bioengineered substitute of the corneal stroma (BSCS) was synthesized by porcine type I collagen cross-linking with 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide and N-hydroxysuccinimide. The obtained transparent implant had optical and mechanical properties similar to the human cornea. It showed satisfactory biocompatibility when was implanted into rabbit corneas (8 rabbits — 8 eyes): BSCS has preserved its clarity during 12 months of the follow-up. Fine opacities of the superficial corneal layers have been observed in 2/8 eyes during the 1<sup>st</sup> postoperative week. In 1 eye opacity resolved, in the 2<sup>nd</sup> eye tiny fine opacity was formed. Light microscopy confirmed good integrity of the implants and absence of inflammation in the corneal stroma. Our data suggest that BSCS synthesized by collagen cross-linking might be a potential material for keratoplasty.

