

Экспериментальные исследования

УДК 617.713–089.844–036.8:612.085.1

Исследование эффективности интраламеллярной кератопластики эквивалента стромы роговицы на основе децеллюляризированной роговицы свиньи в эксперименте

Н. В. Пасечникова, д-р мед. наук, член-корр. НАМНУ, Б. М. Коган, канд. мед. наук, С. Г. Коломийчук, науч. сотр.

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

E-mail: koganb@ukr.net

Актуальность. Усовершенствование методов децеллюляризации роговицы животных с целью получения биоинженерных образцов при их дальнейшей кератопластике позволяет решить актуальную проблему трансплантологии — получение донорского материала.

Цель. Изучить клиническую эффективность интраламеллярной кератопластики эквивалента стромы роговицы (ЭСР) с применением различных способов его получения в эксперименте на животных.

Материал и методы. Роговые оболочки из энуклеированных свиных глаз использовались для получения бесклеточных эквивалентов стромы роговицы посредством пяти вариантов децеллюляризации, различающихся по времени и условиям инкубации в растворах детергентов — 0,5 % раствора додецилсульфата натрия и Тритон X-100, протеолитических ферментов, например, 0,1 % раствора папаина с многократным использованием ультразвукового аппарата (CD 3800 A, 50 Вт), что способствовало удалению клеточных и неклеточных элементов роговицы.

Экспериментальные исследования были выполнены на 25 кроликах породы Шиншилла. На одном глазу животного производилась интраламеллярная кератопластика эквивалентов стромы роговицы, полученных по одному из пяти способов децеллюляризации. После оперативного вмешательства проводилась антимикробная и противовоспалительная терапия. Осмотр животных осуществлялся через день в течение месяца с проведением фоторегистрации и флуоресцеинового теста. Офтальмоскопически оценивали наличие отделяемого, конъюнктивальную инъекцию, состояние эквивалента стромы роговицы и собственной роговицы экспериментального животного, а в поздние сроки степень приживления и наличие реакции отторжения.

Результаты. При сравнительном анализе полученных данных после интраламеллярной кератопластики ЭСР степень изменения клинических показателей (отделяемое в конъюнктивальной полости, степень гиперемии конъюнктивы, отек роговицы (трансплантата), воспалительная инфильтрация, помутнение роговицы (трансплантата) и флуоресцеиновый тест), оцениваемых в баллах, была значительно менее выражена в случае ЭСР разновидности № 4, составляя 0,13 балла.

Следует также отметить, что в случае улучшения клинической картины локализация воспалительного очага в роговице после интраламеллярной кератопластики при применении разновидностей № 1, № 2, № 3 и № 5 смещается от центральной к парацентральной части, тогда как при разновидности № 4 во многих случаях локализация воспалительного очага была менее выражена (0,38 балла).

Вывод. Анализ состояния роговицы глаз кроликов после проведения ИКП ЭСР различных разновидностей показал, что наименее выраженная реакция

Ключевые слова: интраламеллярная кератопластика, роговица свиньи, децеллюляризация, эквивалент стромы роговицы, эксперимент

глаза отмечалась в случае применения разновидности № 4, что позволяет рекомендовать ее для дальнейшего изучения в доклинических и клинических исследованиях.

Актуальность. В настоящее время, несмотря на успехи в изучении этиопатогенеза различных заболеваний переднего отдела глаза, патология роговой оболочки является одной из главных причин потери зрения. Поэтому, во многих случаях при тяжелых клинических формах поражения роговицы хирургический метод лечения, а именно кератопластика, является единственным эффективным методом лечения [1, 14, 22].

Однако применение такого радикального способа лечения, как кератопластика, затруднено из-за угрозы отторжения трансплантата в случае антигенной несовместимости и сложности получения качественного донорского материала, что, в свою очередь, обуславливает актуальность поиска и разработки альтернативных вариантов донорской роговицы [1, 2, 4, 5, 7, 8, 16–19, 21].

В течение последнего десятилетия ксенотрансплантация, т. е. пересадка органов, тканей и клеток от животных, позволяет решить актуальную проблему трансплантологии — получение донорского материала. В частности, учитывая, что антигенный состав тканей свиньи наиболее близок к человеческому организму, использование для трансплантации органов этих животных, особенно островков Лангерганса поджелудочной железы, наиболее перспективно [5, 6, 8].

В этой связи становится актуальным вопрос рассмотрения возможности использования роговицы свиней в качестве трансплантата при кератопластике у человека.

При использовании роговицы свиньи следует обращать внимание, что после соответствующей подготовки образцов, а именно проведения децеллюляризации, трансплантаты по своим иммунологическим характеристикам, биосовместимости, механической прочности и оптической прозрачности должны соответствовать нативной человеческой роговице и обеспечивать оптимальную среду для стромальных и эпителиальных клеток при последующей миграции таковых в ткани трансплантата [8, 10, 11, 17, 27].

В связи с этим, проведение экспериментальных исследований, направленных на разработку и усовершенствование методов децеллюляризации донорской роговицы с целью получения биоинженерных образцов при их дальнейшей кератопластике как никогда является актуальной задачей экспериментальной и клинической офтальмологии [4, 5, 7, 11, 18, 27].

Цель работы — изучить клиническую эффективность интраламеллярной кератопластики эк-

вивалента стромы роговицы с применением различных способов его получения в эксперименте на животных.

Материал и методы

Роговые оболочки из энуклеированных свиных глаз использовались для получения бесклеточных эквивалентов стромы роговицы посредством пяти вариантов децеллюляризации, различающихся по времени и условиям инкубации в растворах детергентов — 0,5 % раствора додецилсульфата натрия и Тритон X-100, протеолитических ферментов, например 0,1 % раствора папаина с многократным использованием ультразвукового аппарата (CD 3800 А, 50 Вт), что способствовало удалению клеточных и неклеточных элементов роговицы [5].

Экспериментальные исследования были выполнены на 25 кроликах (50 глаз) породы Шиншилла массой 2,5–3,0 кг. Под общей анестезией с использованием тиопентала натрия из расчета 1 г/кг массы в условиях операционной на одном глазу животного производилась интраламеллярная кератопластика [1,3] эквивалентов стромы роговицы (ИКП ЭСР), полученных по одному из пяти способов децеллюляризации. В соответствии с этим все экспериментальные животные были разделены на 5 групп.

После оперативного вмешательства проводилась антимикробная и противовоспалительная терапия. Осмотр животных осуществлялся через день в течение месяца с проведением фоторегистрации и флюоресцеинового теста для оценки эпителиального покрова роговицы. Офтальмоскопически оценивали наличие отделяемого, конъюнктивальную инъекцию, состояние эквивалента стромы роговицы и собственной роговицы экспериментального животного, а в поздние сроки степень приживления и наличие реакции отторжения [5]. Признаки оценивались в баллах по следующей условной шкале. Отделяемое в конъюнктивальной полости: 0 — отсутствует; 1 — слизистое скудное; 2 — слизистое обильное; 3 — слизистое гноевое. Степень гиперемии конъюнктивы: 0 — бледно-розовая, соответствующая физиологической норме; 1 — слабая гиперемия конъюнктивы глазного яблока; 2 — умеренно-выраженная гиперемия конъюнктивы глазного яблока; 3 — выраженная гиперемия конъюнктивы глазного яблока. Отек роговицы: 0 — отек роговицы отсутствует, роговица прозрачная на всем протяжении; 1 — локальный отек эпителия роговицы в зоне воспаления; 2 — локальный отек эпителия с переходом на поверхностные слои стромы; 3 — локальный отек в поверхностных и средних слоях стромы. Воспалительная инфильтрация: 0 — инфильтрация отсутствует; 1 — точечные единичные (не более трех) субэпителиальные инфильтраты; 2 — точечные множественные (более трех) субэпителиальные инфильтраты; 3 — множественные субэпителиальные инфильтраты размером более 1 мм; 4 — локальная инфильтрация в поверхностных и средних слоях стромы. Флюоресцеиновый тест: 0 — отсутствует; 1 — точечное окрашивание роговицы; 2 — площадь окрашивания < 3 мм²; 3 — площадь окрашивания > 3 мм². Помутнение роговицы: 0 — отсутствует; 1 — есть. Локализа-

ция воспалительного очага в роговице: 1 — центральная; 2 — парацентральная.

Хирургическое вмешательство и выведение животных из эксперимента (через 1 месяц) было выполнено согласно «Общим этическим принципам экспериментов на животных», которые одобрены III Национальным конгрессом (Киев, 2007) и в соответствии с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей» (Страсбург, 1986).

Для визуализации полученных данных при сравнительном описании клинических показателей состояния глаза кроликов после проведения ИКП ЭСР разных разновидностей (№ 1–5) данные были представлены в виде «коробочных» графиков — диаграмм диапазонов (рис. 1–7). При проведении сравнительного статистического анализа клинических показателей состояния глаза кроликов, полученных через 1 месяц после проведения трансплантации ЭСР разновидностей № 1–5, использовали непараметрический критерий Крускалла-Уоллиса, а при попарном сравнении между группами — критерий Манна-Уитни. Полученные данные обрабатывались с использованием компьютерной программы SPSS 10.0.

Результаты и их обсуждение

На основе проведения сравнительной статистической оценки всех исследованных клинических показателей состояния роговицы глаз кроликов после проведения пяти разновидностей ИКП ЭСР и рассчитанных по непараметрическому критерию для множественных сравнений Крускалла-Уоллиса, установлено, что существует высокая степень достоверности различий между группами данных разновидностей № 1–5 по показателям отделяемого в конъюнктивальной полости, степени гиперемии конъюнктивы, отека роговицы (трансплантата), помутнения роговицы (трансплантата) и локализации воспалительного очага в роговице (табл. 1).

При попарном сравнении различия между разновидностями № 1 и № 2 после ИКП ЭСР, рассчитанному по критерию Манна-Уитни, показатели отделяемого в конъюнктивальной полости и степени гиперемии конъюнктивы разновидности № 1 были в 4,3 раза, а отека роговицы (трансплантата) в 3,6 раза выше соответствующих показателей № 2 (рис. 1–7).

При попарном сравнении разновидностей № 1 и № 2, анализ клинических показателей состояния глаза показал наличие достоверных изменений по следующим показателям — отделяемое в конъюнктивальной полости и степень гиперемии конъюнктивы ($p=0,01$), а также наличие отека роговицы (трансплантата) ($p=0,005$).

Сопоставление ЭСР разновидностей № 1 и № 3 после ИКП показало, что в случае ЭСР № 3 степень отделяемого в конъюнктивальной полости и степени гиперемии конъюнктивы были в 6,5 раза, а отека роговицы (трансплантата) в 3,6 раза ниже по сравнению с № 1 (рис. 1–7). При этом отмечалась достоверная разница между показателями «конъюнктивальное отделяемое», «степень гиперемии конъюнктивы» ($p=0,01$) и «отек роговицы (трансплантата)» ($p=0,005$).

Следует отметить очень низкие значения исследуемых клинических показателей в случае разновидности № 4, а именно: «конъюнктивальное отделяемое», «степень гиперемии конъюнктивы» и «отек роговицы (трансплантата)» — 0,13 балла (рис. 1–7). Сравнение ЭСР разновидностей № 1 и № 4 выявило снижение показателя конъюнктивальное отделяемое и степени гиперемии конъюнктивы в 12,5 раза, а отека роговицы (трансплантата) в 10,6 раза по сравнению с ЭСР разновидности № 1 ($p=0,001$).

В случае разновидности № 5 после ИКП ЭСР при сравнении с № 1 также отмечалось снижение ряда клинических показателей — отделяемое в конъюнктивальной полости и степень гиперемии конъюнктивы были снижены в 6,5 раза ($p=0,001$), а отека роговицы (трансплантата) в 3,6 раза ($p=0,005$) (рис. 1–7).

Сравнение клинических показателей (отделяемое в конъюнктивальной полости, отек роговицы (трансплантата), степень гиперемии конъюнктивы) после ИКП ЭСР разновидностей № 2 и № 3 обнаружило отсутствие достоверных изменений состояния глаза, хотя степень изменений отделяемого в конъюнктивальной полости и гиперемии

Таблица 1. Сравнительный анализ клинических показателей оценки состояния глаз кроликов после проведения интрамеллярной кератопластики эквивалентов стромы роговицы разновидностей № 1–5 ($n=8$)

Клинические показатели	Стат. показатели	Номер разновидности ЭСР					p
		1	2	3	4	5	
Конъюнктивальное отделяемое	Средний ранг	35,00	19,06	16,88	14,69	16,88	0,001
Степень гиперемии конъюнктивы	Средний ранг	35,00	19,06	16,88	14,69	16,88	0,001
Отек роговицы / трансплантата	Средний ранг	33,38	18,44	18,44	13,81	18,44	0,002
Воспалительная инфильтрация	Средний ранг	18,50	23,50	23,50	18,50	18,50	0,500
Флюоресцеиновый тест	Средний ранг	23,25	20,25	20,25	17,88	20,88	0,825
Помутнение роговицы / трансплантата	Средний ранг	29,50	19,50	17,00	17,00	19,50	0,041
Локализация воспалительных очагов в роговице / трансплантате	Средний ранг	21,81	23,88	25,94	7,00	23,88	0,001

Примечание. p — уровень значимости, рассчитанный по непараметрическому критерию для множественных сравнений Крускалла-Уоллиса

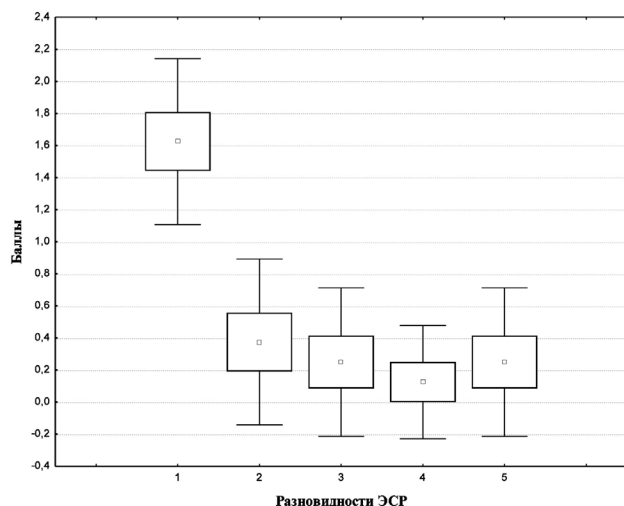


Рис. 1. Изменение клинического показателя «отделяемое в конъюнктивной полости» после проведения ИКП эквивалента стромы роговицы в зависимости от модификации (данные представлены в виде: □ — среднее арифметическое, m — стандартная ошибка среднего и SD — стандартное отклонение).

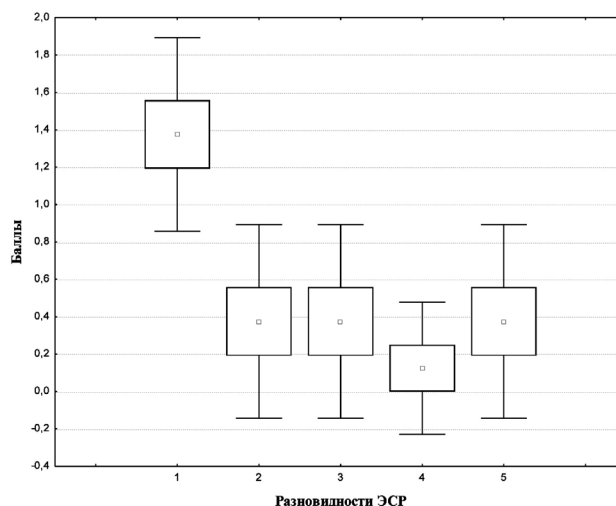


Рис. 3. Изменение клинического показателя «отек роговицы» после проведения ИКП эквивалента стромы роговицы в зависимости от модификации (данные представлены в виде: □ — среднее арифметическое, m — стандартная ошибка среднего и SD — стандартное отклонение).

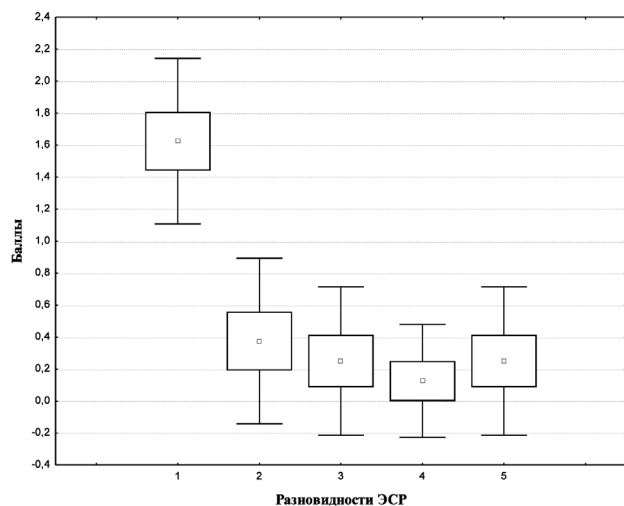


Рис. 2. Изменение клинического показателя «степень гиперемии конъюнктивы» после проведения ИКП эквивалента стромы роговицы в зависимости от модификации (данные представлены в виде: □ — среднее арифметическое, m — стандартная ошибка среднего и SD — стандартное отклонение).

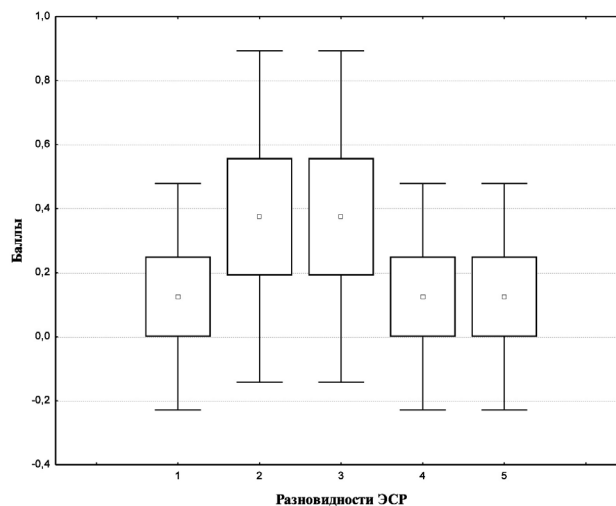


Рис. 4. Изменение клинического показателя «воспалительная инфильтрация» после проведения ИКП эквивалента стромы роговицы в зависимости от модификации (данные представлены в виде: □ — среднее арифметическое, m — стандартная ошибка среднего и SD — стандартное отклонение).

конъюнктивы при разновидности № 3 была в 1,5 раза ниже этих показателей при разновидности № 2 (рис. 1–7).

Отсутствие достоверных изменений было характерно и для попарного сравнения разновидностей № 2 и № 4, несмотря на снижение уровня клинических показателей (отделяемое в конъюнктивной полости, отек роговицы (трансплантата), степень гиперемии конъюнктивы) в случае разновидности № 4 в 2,9 раза (рис. 1–7).

Не выявлено значимой разницы при сравнении разновидностей № 2 и № 5 после проведенной

ИКП ЭСР — степень отделяемого в конъюнктивной полости и степень гиперемии конъюнктивы была снижена в 1,5 раза, а степень отека роговицы (трансплантата) не изменилась по сравнению с показателями разновидности № 2 (рис. 1–7).

Попарное сравнение клинических показателей после проведенной ИКП ЭСР с разновидностями № 3 и № 5 показало снижение степени отделяемого в конъюнктивной полости и степени гиперемии конъюнктивы в 1,9 раза, а отека роговицы (трансплантата) в 2,9 раза по отношению к показателям разновидности № 3 ($p > 0,05$) и отсутствие каких-ли-

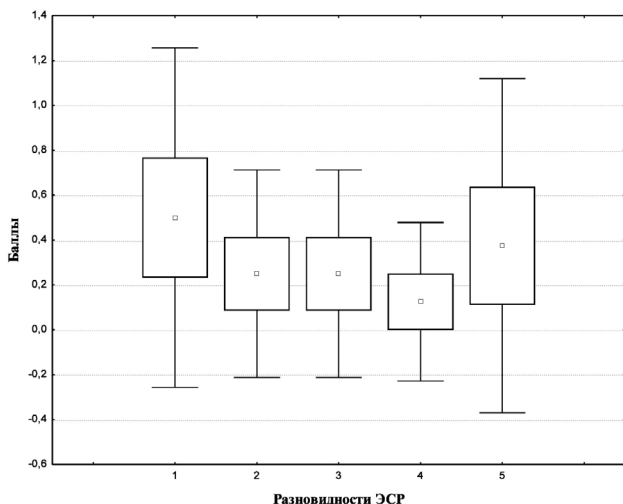


Рис. 5. Изменение клинического показателя «флюоресцеиновый тест» после проведения ИКП эквивалента стромы роговицы в зависимости от способа их получения (данные представлены в виде: \square — среднее арифметическое, m — стандартная ошибка среднего и SD — стандартное отклонение).

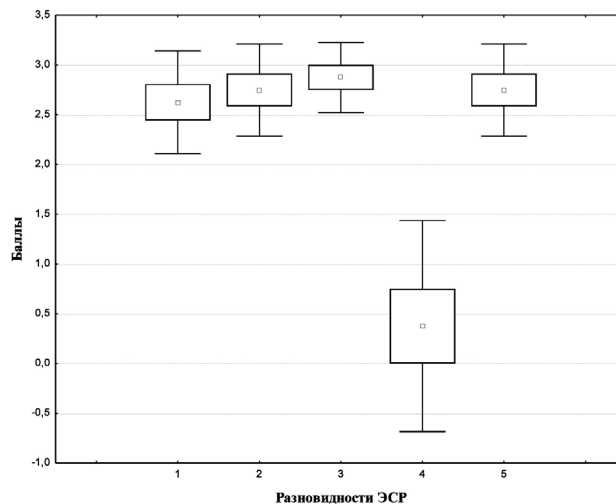


Рис. 7. Сравнительные величины показателя «локализация воспалительного очага в роговице» после проведения ИКП пяти разновидностей эквивалента стромы роговицы (данные представлены в виде: \square — среднее арифметическое, m — стандартная ошибка среднего и SD — стандартное отклонение).

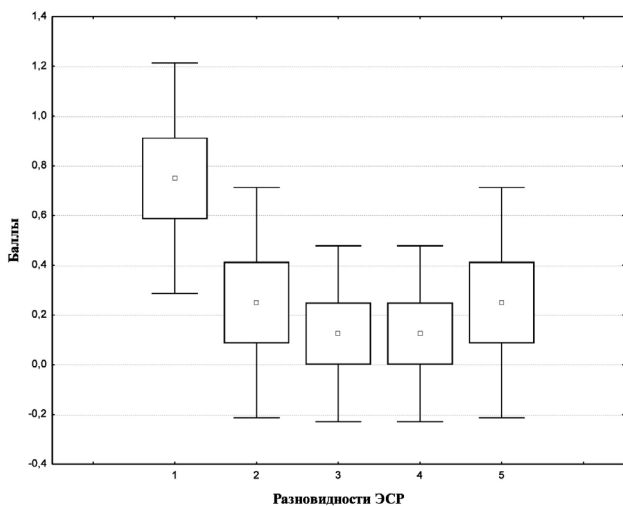


Рис. 6. Изменение клинического показателя «помутнение роговицы» после проведения ИКП эквивалента стромы роговицы в зависимости от модификации (данные представлены в виде: \square — среднее арифметическое, m — стандартная ошибка среднего и SD — стандартное отклонение).

бо различий при сопоставлении показателей разновидностей № 3 и № 5 ($p > 0,05$) (рис. 1–7).

Клинические показатели (отделяемое в конъюнктивальной полости, отек роговицы (трансплантата), степень гиперемии конъюнктивы) после ИКП ЭСР разновидности № 4 были также снижены по сравнению с разновидностью № 5 — снижение степени отделяемого в конъюнктивальной полости и степени гиперемии конъюнктивы в 1,9 раза, а отека роговицы (трансплантата) в 2,9 раза ($p > 0,05$) (рис. 1–7).

Сравнительный анализ всех разновидностей после ИКП ЭСР при оценке помутнения рогови-

цы (трансплантата) показал, что наиболее положительная реакция после проведенной операции была в случае разновидностей № 3 и № 4 (0,13 балла), тогда как при использовании разновидности № 1 составляла 0,75 балла, № 2 и № 5 — 0,25 балла (рис. 1–7), т. е. степень изменения показателя разновидностей № 2 и № 5 была в 3 раза ниже, а № 3 и № 4 — в 5,8 раза по сравнению с № 1. При сопоставлении разновидностей № 3 и № 4 по отношению к № 2 и № 5 отмечалось снижение уровня помутнения роговицы (трансплантата) в 1,9 раза. Попарное сравнение показало наличие достоверных различий между разновидностями № 1 и № 3 ($p < 0,015$), № 1 и № 4 ($p < 0,015$).

Следует отметить, что сравнительный статистический анализ по непараметрическому критерию для множественных сравнений Крускала-Уоллиса (табл. 1) и при попарном сравнении по Манну-Уитни показал отсутствие существенных различий между пятью разновидностями ЭСР после проведения ИКП таких клинических показателей, как воспалительная инфильтрация и флюоресцеиновый тест.

Наиболее низкие значения клинических показателей (воспалительная инфильтрация и флюоресцеиновый тест) после ИКП ЭСР отмечались при сравнительной оценке воспалительной инфильтрации в случае разновидностей № 1, № 4 и № 5, флюоресцеинового теста — разновидности № 4, составляя 0,13 балла (рис. 1–7).

Воспалительный очаг был смещен парацентрально при разновидности № 1 (2,63 балла), № 2 (2,75 балла), № 3 (2,87 балла) и № 5 (2,75 балла), тогда как при использовании разновидности № 4 вели-

чина балла составляла 0,38 по причине крайне низких значений патологических изменений (рис. 1-7). В этом случае достоверная разница между группами отмечалась при сравнении следующих разновидностей: № 1 и № 4 ($p=0,003$), № 2 и № 4 ($p=0,002$), № 3 и № 4 ($p=0,001$) и № 4 и № 5 ($p=0,002$).

В заключение следует отметить, что несмотря на большое количество работ по методам децеллюляризации, многие из них являются экспериментальными разработками в условиях *in vitro* [16,17,25] и полученные эквиваленты роговицы не всегда отвечают таким требованиям, как механическая прочность, прозрачность и биосовместимость.

В настоящее время децеллюляризованные роговицы являются предпочтительными по сравнению с их синтетическими или полусинтетическими аналогами [4,16,17], так как они имеют повышенные механические показатели и в них может быть сохранена нативная ультраструктура, включая факторы роста и другие биологически активные вещества [23]. Однако получение донорского материала от человека требует соблюдения правовых и этических норм. Существующие различные альтернативные варианты получения донорской роговицы (в том числе и ксеногенных трансплантатов) [17,24,27] нуждаются в стандартизации наиболее оптимальных способов децеллюляризации, необходимой для их клинического использования. К тому же, различные вещества, применяемые для децеллюляризации, могут обладать определенной цитотоксичностью, что также повышает требования к условиям получения децеллюляризованной роговицы.

В работах Н. В. Пасечниковой с соавт. (2011), Shafiq M. A. (2012), И. О. Насинника (2013) и Wilson S. L. (2016) использовался бесклеточный модуль стромы роговицы человека, что, несмотря на положительные результаты, ограничивается сложностью получения донорского материала [2, 3, 20, 23].

Использование физических методов, в частности высокого гидростатического давления, помимо сохранения хороших оптических свойств децеллюляризованной роговицы без ультраструктурных изменений [13], может вызывать нарушение внеклеточного матрикса [9], прозрачность которого восстанавливалась при дополнительной обработке [12].

В отличие от работы Yoeuek E. (2012) и Lee W. (2013) [15,26], в наших исследованиях мы применяли интраламеллярную кератопластику, а для повышения степени децеллюляризации роговицы свиньи использовали действие протеолитических ферментов в комбинации с ультразвуковой обработкой стромы роговицы.

В наших исследованиях использование ксено-трансплантации и применяемые способы децеллюляризации позволили решить проблему получения донорского материала и биосовместимости. Проведение ИКП ЭСР разных разновидностей с учетом клинических показателей состояния глаза экспериментальных животных позволило определить альтернативный и наиболее оптимальный способ получения децеллюляризованного ЭСР свиньи, отличающийся от прототипов достаточной прочностью, относительной простотой обработки и низкой себестоимостью.

Выводы

При сравнительном анализе полученных данных после интраламеллярной кератопластики эквивалентом стромы роговицы степень изменения клинических показателей (отделяемое в конъюнктивальной полости, степень гиперемии конъюнктивы, отек роговицы (трансплантата), воспалительная инфильтрация, помутнение роговицы (трансплантата) и флюоресцеиновый тест), оцениваемых в баллах, была значительно менее выражена в случае эквивалента стромы роговицы разновидности № 4, составляя 0,13 балла.

В случае улучшения клинической картины после интраламеллярной кератопластики при применении разновидностей № 1, № 2, № 3 и № 5 локализация воспалительного очага в роговице смещается от центральной к парацентральной части, тогда как при разновидности № 4 во многих случаях локализация воспалительного очага была менее выражена (0,38 балла).

Таким образом, анализируя состояние роговицы глаз кроликов после проведения интраламеллярной кератопластики эквивалентом стромы роговицы различных разновидностей, следует отметить, что наименее выраженная реакция глаза отмечалась при применении разновидности № 4, что позволяет рекомендовать ее для дальнейшего изучения в доклинических и клинических исследованиях.

Литература

1. Душин Н. В., Фролов М. А., Гончар П. А. Кератопластика в лечении заболеваний глаз (оптическая, рефракционная, лечебная, косметическая): Учеб. пособие / Н. В. Душин, М. А. Фролов, П. А. Гончар. — М.: РУДН, 2008. — 168 с.
2. Насинник И. О. Экспериментальне обґрунтування застосування алоstaticного трансплантату роговкової оболонки. — Автореф. дис. ...канд. мед. наук. — Одеса, 2013. — 19 с.
3. Пасечникова Н. В. Реакция роговицы кролика на интраламеллярную имплантацию бесклеточного модуля стромы роговицы человека. Первые результаты / Н. В. Пасечникова, В. В. Вит, Н. Ф. Леус и др. // Офтальмол. журн. — 2011. — № 1. — С. 57–60.

4. **Пасечникова Н. В.** Результаты клинико-морфологического применения имплантов на основе поперечно-сшитого коллагена в качестве аналога донорской роговицы / Н. В. Пасечникова, В. В. Вит, Н. Ф. Леус и др. // Офтальмол. журнал. — 2011. — № 4. — С. 58–60.
5. **Пасечникова Н. В.** Изучение эффективности послойной пересадки гетерогенного эквивалента стромы роговицы в эксперименте // Н. В. Пасечникова, Б. М. Коган, Т. И. Глуш и др. // Офтальмол. журн. — 2014. — № 2. — С. 64–70.
6. **Bartholomew L. R.** Ultraso und biomicroscopy of globes from young adult pigs / L. R. Bartholomew, D. X. Pang, D. A. Sam, J. C. Cavender // *Am. J. Vet. Res.* — 1997. — V. 58. — P. 942–948.
7. **Choi J. S.** Bioengineering endothelialized neo–corneas using donor–derived corneal endothelial cells and decellularized corneal stroma / J. S. Choi, J. K. Williams, M. Greven et al. // *Biomaterials.* — 2010. — V. 31. — P. 6738–6745.
8. **Cox A.** Current advances in xenotransplantation / A. Cox, R. Zhong // *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* — 2005. — V. 4. — P. 490–494.
9. **Crapo P. M.** An overview of tissue and whole organ decellularization processes / P. M. Crapo, T. W. Gilbert, S. F. Badylak // *Biomaterials.* — 2011. — V. 32, № 12. — P. 3233–3243.
10. **Duan X.** Dendrimer crosslinked collagen as a corneal tissue engineering scaffold: mechanical properties and corneal epithelial cell interaction / X. Duan, H. Sheardown // *Biomaterials.* — 2006. — V. 27. — P. 4608–4617.
11. **Gilbert T. W.** Decellularization of tissue sandorgans / T. W. Gilbert, T. L. Sellaro, S. F. Badylak // *Biomaterials.* — 2006. — V. 27. — P. 3675–3683.
12. **Hashimoto Y.** Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering / Hashimoto Y., S. Funamoto, S. Sasaki et al. // *Biomaterials.* — 2010. — V. 31, № 14. — P. 3941–3948.
13. **Hashimoto, Y.** Ultrastructural analysis of the decellularized cornea after interlamellar keratoplasty and microkeratome-assisted anterior lamellar keratoplasty in a rabbit model / Y. Hashimoto, S. Hattori, S. Sasaki et al. // *Sci. Rep.* — 2016. — 6, 27734; doi: 10.1038/srep27734.
14. **Kaminsky S. L.** Corneal sensitivity 10 years after epikeratoplasty / S. L. Kaminsky, R. Biowski et al. // *J. Refract. Surg.* — 2002. — V. 18. — P. 731–736.
15. **Lee W.** A comparison of three methods of decellularization of pig corneas to reduce immunogenicity / W. Lee, Y. Miyagawa, C. Long et al. // *Int. J. Ophthalmol.* — 2014. — V. 7, № 4. — P. 587–593.
16. **Liu Y.** A simple. Cross–linked collagen tissue substitute for corneal implantation / Y. Liu, L. Gan, D. J. Carlson et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2006. — V. 47, № 5. — P. 1869–1875.
17. **Mórquez S. P.** Decellularization of bovine corneas for tissue engineering applications // S. P. Mórquez, V. S. Martínez, W. Mc. Ambrose et al. // *Acta Biomaterialia.* — 2009. — V. 5, № 6. — P. 1839–1847.
18. **Pasyechnikova N.** Collagen-Based Bioengineered Substitutes of Donor Corneal Allograft Implantation: Assessment and Hypotheses. N. Pasyechnikova, V. Vit, N. Leus et al. // *MENDI Ophthalmol. J.* — 2012. — V. 1, № 1. — P. 10–13.
19. **Rafat M.** PEG-stabilized carbodiimide crosslinked collagen–chitosanhydrogels for corneal tissue engineering / M. Rafat, F. Li, P. Fagerholm et al. // *Biomaterials.* — 2008. — V. 29. — P. 3960–3972.
20. **Shafiq M. A.** Decellularized human cornea for reconstructing the corneal epithelium and anterior stroma / M. A. Shafiq, R. A. Gemeinhart, B. Y. Yue, A. R. Djalilian // *Tissue Eng. Part. C. Methods.* — 2012. — V. 18, № 5. — P. 340–348.
21. **Thompson R. W. Jr.** Long–term graft survival after penetrating keratoplasty / R. W. Jr. Thompson, M. O. Price, P. J. Bowers, F. W. Price // *Ophthalmology.* — 2003. — V. 110. — p. 1396–1402.
22. **Whitcher J. P.** Corneal blindness: a global perspective / John P. Whitcher, M. Srinivasan, Madan P. Upadhyay // *Bulletin of the World Health Organization.* — 2001. — V. 79. — P. 214–221.
23. **Wilson S. L.** Corneal Decellularization: A Method of Recycling Unsuitable Donor Tissue for Clinical Translation? / S. L. Wilson, L. E. Sidney, S. E. Dunphy et al. // *Curr. Eye Res.* — 2016. — V. 41, № 6. P. 769–782.
24. **Yang Lu.** Characterization of a Hydrogel Derived from Decellularized Corneal Extracellular Matrix / : Lu Yang, Yao Qin Ke, Feng Bei et al. // *J. Biomaterials and Tissue Engineering.* — 2015. — V. 5, № 12. — P. 951–960.
25. **Yoeruek E.** Decellularization of porcine corneas and repopulation with human corneal cells for tissue–engineered xenografts / E. Yoeruek, T. Bayyoud, C. Maurus et al. // *Acta Ophthalmol.* — 2012. — V. 90, № 2. — P. e125–e131.
26. **Yoeruek E.** Reconstruction of corneal stroma with decellularized porcine xenografts in a rabbit model / E. Yoeruek, T. Bayyoud, C. Maurus et al. // *Acta Ophthalmol.* — 2012. — V. 90, № 3. — P. e206–e210.
27. **Zheng Wu.** The use of phospholipase A₂ to prepare acellular porcine corneal stroma as a tissue engineering scaffold / Zheng Wu, Yang Zhou, Naiyang Li et al. // *Biomaterials.* — 2009. — V. 30. — P. 3513–3522.

Дослідження ефективності інтраламелярної кератопластики еквівалента строми рогівки на основі децелюляризованої свинячої рогівки в експерименті

Н. В. Пасечникова, Б. М. Коган, С. Г. Коломійчук

ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України»; Одеса (Україна)

Актуальність. Удосконалення методів децелюляризації рогівки тварин з метою отримання біоінженерних зразків для їх подальшої кератопластики дозволяє вирішити актуальну проблему трансплантології — отримання донорського матеріалу.

Мета. Вивчити клінічну ефективність інтраламелярної кератопластики еквівалента строми рогівки (ЕСР) із застосуванням різних способів його отримання в експерименті на тваринах.

Матеріал і методи. Рогові оболонки з видалених свинячих очей використовувалися для отримання безклітинних еквівалентів строми рогівки за допомогою п'яти варіантів децелюляризації, що розрізняються за часом і умовами інкубації в розчинах детергентів — 0,5 % розчину додецилсульфату натрію і Тритон X-100, протеолітичних ферментів, наприклад, 0,1 % розчину папаїну з багаторазовим використанням ультразвукового апарату (CD 3800 A, 50 Вт), що сприяло видаленню клітинних і неклітинних елементів рогівки. Експериментальні дослідження були виконані на 25 кроликах породи Шиншила. На одному оці тварин проводили інтраламелярну кератопластику еквівалентом строми рогівки, отриманим по одному з п'яти способів децелюляризації. Після оперативного втручання проводилася антимікробна і протизапальна терапія. Огляд тварин здійснювався через день протягом місяця з проведенням фотореєстрації і флюоресцеїно-

вого тесту. Офтальмоскопічно оцінювали наявність виділень, кон'юнктивальну ін'єкцію, стан еквівалента строми рогівки і власної рогівки експериментальної тварини, а в пізні терміни — ступінь приживлення і наявність реакції відторгнення.

Результати. При порівняльному аналізі отриманих даних після інтраламелярної кератопластики ЕСР ступінь зміни клінічних показників (виділення в кон'юнктивальній порожнині, ступінь гіперемії кон'юнктиви, набряк рогівки (трансплантата), запальна інфільтрація, помутніння рогівки (трансплантата) і флюоресцеїновий тест), які оцінюються в балах, був значно менше виражений в разі ЕСР різновиду № 4, складаючи 0,13 бала.

Слід також зазначити, що в разі поліпшення клінічної картини локалізація запального осередка в рогівці після інтраламелярної кератопластики при застосуванні різновидів № 1, № 2, № 3 та № 5 зміщується від центральної до парацентральної частини, тоді як при різновиді № 4 у багатьох випадках локалізація запального осередка була менш виражена (0,38 бала).

Висновки. Аналізуючи стан рогівки очей кроликів після проведення інтраламелярної кератопластики ЕСР, слід зазначити, що найменш виражена реакція ока відзначалася в разі застосування різновиду № 4, що дозволяє рекомендувати його для подальшого вивчення в доклінічних і клінічних дослідженнях.

Ключові слова: інтраламелярна кератопластика, рогівка свиняча, децелюляризація, еквівалент строми рогівки, експеримент

Поступила 13.03.2017