

УДК 617.713-089.843:547.962.9-778.317-092.9

## Електронно-мікроскопічна структура еквівалентів строми рогівки людини на основі колагену

Н. І. Молчанюк, канд. біол. наук, О. І. Бузник, канд. мед. наук;

Н. Є. Думброва, д-р мед. наук, професор, Н. В. Пасєчнікова, член-кор. НАМНУ, д-р мед. наук.

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

E-mail: a\_buznik@bk.ru

### Ключевые слова:

еквівалент строми рогівки людини,  
замітник донорської рогівки, колаген,  
електронно-мікроскопічна структура

**Актуальність.** Роботами останніх років показано можливість синтезу еквівалентів строми рогівки шляхом утворення хімічних зв'язків між молекулами колагену I або III типів [6]. Завдяки біохімічним процесам «зшивки» (cross-linking) молекул колагену нам вдалося отримати трансплантат, який по оптичним та механічним властивостям був подібний строми людської рогівки. Іншими експериментальними дослідженнями показано, що такий колагеновий матрикс був добрим субстратом для проліферації *in vivo* та *in vitro* рогівкового епітелію і нервів [6]. Крім того, аналог рогівкової строми, синтезований з колагену свиней, не викликав реакції відторгнення при його трансплантації у рогівку кроликів [7]. Попередні результати фази I клінічних випробувань підтверджують результати експериментальних досліджень про відсутність реакції відторгнення з боку рогівки на колагеновий еквівалент рогівкової строми та його інтеграцію в рогівку хворих на кератоконус II-III стадій, що підтверджено проростанням трансплантату нервами та його покриттям епітелієм реципієнта [3]. Введення в структуру імплантів синтетичного фосфоліпиду з протизапальними властивостями 2-метакрилоілоксіетил фосфорілхоліну (МФХ) покращило механічні властивості колагенових еквівалентів строми рогівки людини (КЕСРЛ) та зменшило ступінь

**Метою** роботи було вивчення електронно-мікроскопічної структури біо-синтетичних безклітинних еквівалентів строми рогівки людини (ЕСРЛ) на основі мереж колагену та метил-фосфорілхоліну (МФХ), що взаємно проникають.

**Матеріал і методи.** Структура колаген-метилфосфорілхолінових ЕСРЛ (К-МФХ ЕСРЛ) з 18% розчинів рекомбінантного людського колагену (РЛК) III типу або свинячого ателоколагену (САК) I типу вивчалась під трансмісійним електронним мікроскопом.

**Результати.** В структурі ЕСРЛ виявлена наявність колагеноподібних тонких фібрил діаметром 2-8 нм з переважно повздожньою регулярною орієнтацією. Фібрили мали свою типову ультраструктуру та розташування, однак ознак, характерних для структури людської рогівки, не визначалось. Фібрили із САК виявились децю товстішими і були не так регулярно розташовані порівняно з фібрилами з РЛК, але це не впливало на прозорість імплантів.

**Висновок.** Збереження відмінних оптичних властивостей ЕСРЛ на основі РЛК III типу та САК I типу при відсутності характерної структури та розташування колагенових волокон, притаманних людській рогівці, можна пов'язати з надмалим розміром фібрил, що утворюються в результаті кросс-лінкінгу молекул колагену, тому вони не викликають розсіювання світла при проходженні крізь них.

їхньої неоваскуляризації на моделі лужного опіку у тварин [4]. Перші результати клінічного застосування колаген-метилфосфорілхолінових еквівалентів строми рогівки людини (К-МФХ ЕСРЛ) показали безпечність та перспективність використання подібних імплантів у хворих з важкою патологією рогівки, де пересадка донорської рогівки має високий ризик відторгнення [2]. Разом з тим, дані про ультраструктуру цих імплантів обмежені, що свідчить про їх недостатню вивченість.

**Мета** роботи - електронно-мікроскопічне дослідження еквівалентів строми рогівки на основі людського і свинячого колагену з введенням в їхню структуру МФХ.

### Матеріал і методи дослідження

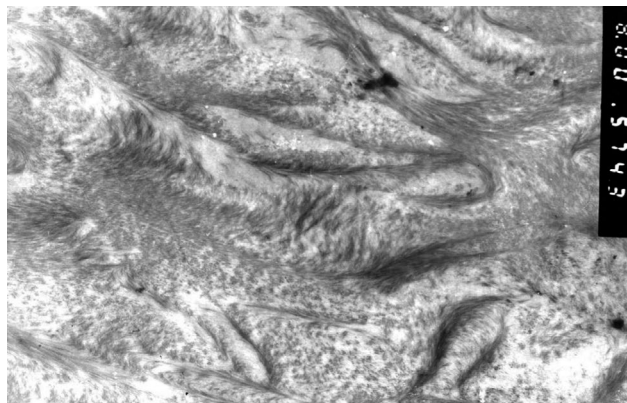
#### Синтез К-МФХ ЕСРЛ

КЕСРЛ синтезували в лабораторії біохімії ДУ «Інститут ОХ і ТТ ім. В.П. Філатова» та лабораторії відділу клітинної біології Інституту клінічної та експериментальної медицини Лінчопінгського університету (м. Лінчопінг, Швеція) шляхом створення двох мереж, що взаємно проникають: перша мережа – на основі 18% розчину рекомбінантного

людського колагену III типу (Fibrogen Inc., США) або свинячого ателоколагену I типу (Nippon Meat Packers, Inc., Японія, або Koken Co., Ltd, Півд. Корея), поперечні зв'язки між молекулами яких утворювалися 1-етил-3-(3-диметил амінопропіл) карбодіимідом та N-гідроксі-сукцинімідом; друга мережа утворювалась на основі МФХ – Paramount Fine Chemicals Co. Ltd (Китай), поперечні зв'язки між молекулами якого утворювалися полі (етиленгліколь) діакрилатом (Sigma-Aldrich, Канада), амонію пересульфатом (Sigma-Aldrich, Канада) та N,N,N',N'- тетраметил етилендіаміном (Sigma-Aldrich, Канада) [2]. МФХ зі своїми «зшивачами» додавалися до колагену в процесі синтезу. Отриманий гель розподілявся на предметному склі, накривався другим предметним склом з товщиною прокладок між ними від 0,25 до 0,5 мм та залишався при 100% вологості у камері, яка була заповнена азотом, при кімнатній температурі на 16 годин. В результаті отримували прозорий гідрогель – К-МФХ ЕСРЛ, який відмивали розчином Рингеру, стерилізували та зберігали в 1% розчині хлороформу при 4 °С.

#### **Трансмісійна електронна мікроскопія К-МФХ ЕСРЛ**

Робота виконана в лабораторії патологоанатомічних та електронно-мікроскопічних досліджень ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України». Для дослідження використовували 8 КЕСРЛ діаметром 6 мм та товщиною 500 мкм: по чотири зразки, виготовлених з рекомбінантного людського колагену III типу та з свинячого ателоколагену I типу. Матеріал фіксували у 2,5 % розчині глютаральдегіду на фосфатному буфері з рН 7,4 з наступною дофіксацією 1 % розчином осмієвої кислоти при тому ж рН буферного розчину. Потім зразки зневоднювалися у спиртах висхідної концентрації. Просочування матеріалу та його заключення проводилось у суміші епон-аралдїт. Після цього ультратонкі зрізи контрастувалися за методикою Reynolds [8]. Матеріал вивчався під трансмісійним електронним мікроскопом ПЕМ-100-01 (ТОВ «Selmi», Україна).



**Рис. 1.** Фрагмент К-МФХ ЕСРЛ з свинячого ателоколагену I типу з типовим розташуванням фібрил. Електронна мікрофотографія. Збільшення: X 8 000.

#### **Результати дослідження та їх обговорення**

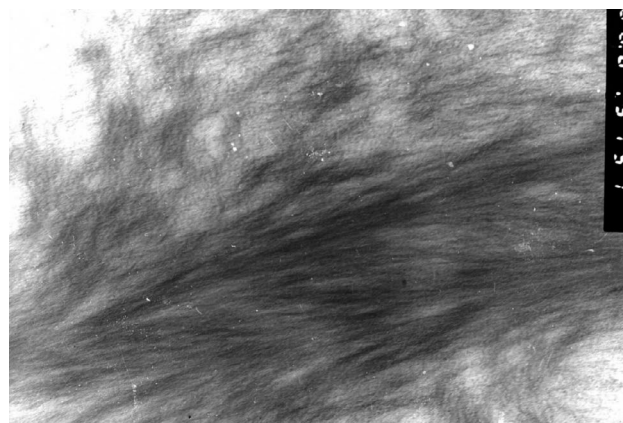
К-МФХ ЕСРЛ на основі свинячого ателоколагену I типу

Орієнтація більшої частини колагенових пучків повздовжня. Невелика їх частина розташовується на зрізі по діагоналі або зрізана упоперек (рис. 1).

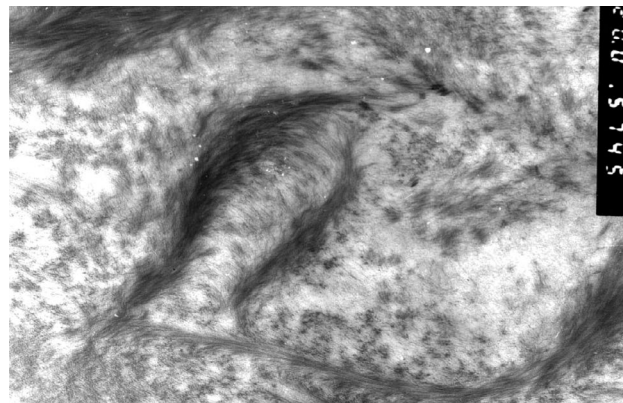
При великому збільшенні (близько 50 тис.) пучки складаються з дуже тонких фібрил діаметром 2-8 нм, які не мають чітких меж, та не виявляється їхня поперечна смугастість (рис. 2).

Фібрили мають тенденцію до злипання, створюючи більш потовщені волокна. По периферії таких пучків розташовуються фібрили, які від'єднані від них, та безструктурні пухкі маси із цих фібрил. На окремих зрізах зустрічаються ділянки цих мас із більш щільно укладеними фібрилами. Серед них сформовані петлеподібні потовщені утворення з тонких коротких фібрил (рис. 3).

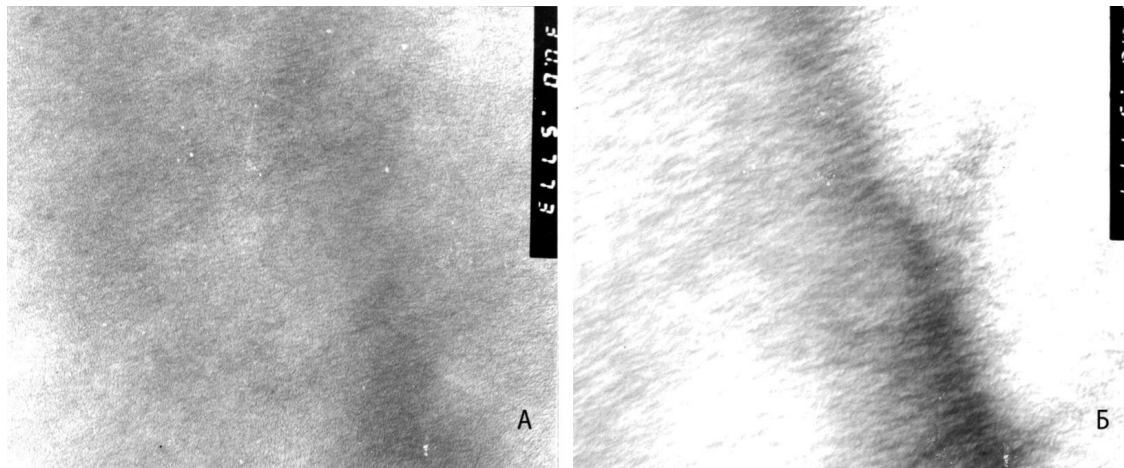
К-МФХ ЕСРЛ на основі рекомбінантного людського колагену III типу



**Рис. 2.** Фрагмент К-МФХ ЕСРЛ з свинячого ателоколагену I типу. Виявлена переважно повздовжня орієнтація тонких фібрил. Електронна мікрофотографія. Збільшення: X 60 000.



**Рис. 3.** Фрагмент К-МФХ ЕСРЛ з свинячого ателоколагену I типу з фібрилами, що злипаються, та ділянками їх пухкого розташування. Електронна мікрофотографія. Збільшення: X 20 000.



**Рис. 4.** Фрагменти К-МФХ ЕСРЛ з рекомбінантного людського колагену III типу.  
 А – Типова структура КЕСРЛ з людського колагену. Електронна мікрофотографія. Збільшення: X 30 000;  
 Б – Ділянка з тонкими фібрилами, які мають нечіткі контури. Електронна мікрофотографія. Збільшення: X 60 000.

Великі площі на зрізах займають поля з однорідного матеріалу, в масі якого розрізняються однотипні дуже тонкі волоконця з переважно повздовжньою орієнтацією. На окремих невеликих ділянках при великому збільшенні виявлені скупчення цих тонких, розташованих роз'єднано, фібрил діаметром 2-5 нм з нечіткими контурами (Рис. 4А, 4Б).

В цій роботі були проведені одні з перших електронно-мікроскопічні дослідження К-МФХ ЕСРЛ. Вони виявили наявність в структурі імплантів колагеноподібних тонких фібрил з переважно повздовжньою регулярно орієнтованою орієнтацією. Колагенові фібрили мали типову ультраструктуру та розташування, однак ознак, характерних для структури людської рогівки [1], не визначалось. Наші дані співпадають з даними Hayes S., et al., які також виявили в ультраструктурі К-МФХ ЕСРЛ з рекомбінантного людського колагену III типу регулярно орієнтовані надтонкі колагенові фібрили [5].

Нами вперше було виявлено, що ультраструктура імплантів із свинячого ателоколагену дещо відрізняється від ультраструктури імплантів із рекомбінантного людського колагену: колагенові фібрили із свинячого колагену виявились дещо товстішими і були не так регулярно розташовані порівняно з фібрилами з рекомбінантного людського колагену, але це не впливало на прозорість імплантів.

**Висновок.** Таким чином, збереження відмінних оптичних властивостей еквівалентів строми рогівки на основі рекомбінантного людського колагену III типу та свинячого ателоколагену I типу при відсутності характерної структури та розташування колагенових волокон, притаманних людській рогівці, можна пов'язати з надмалим розміром фібрил, що утворюються в результаті карбодіімідного кросс-лінкінгу молекул колагену (2-8 нм), тому вони не викликають розсіювання світла при проходженні крізь них.

## Література

1. **Вит В. В.** Строение зрительной системы человека / Вит В. В. – Одесса: Астропринт. – 2003. – 664 с.
2. **Buznyk O.** Bioengineered corneas grafted as alternatives to human donor corneas in three high-risk patients / O. Buznyk, N. Pasyechnikova, M.M. Islam, S. Iakymenko, P. Fagerholm, M. Griffith // Clin. Transl. Sci. – 2015. – Vol. 8 (№5). – P. 558-562.
3. **Fagerholm P.** A biosynthetic alternative to human donor tissue for inducing corneal regeneration: 24-month follow-up of a phase 1 clinical study / P. Fagerholm, N. S. Lagali, K. Merrett, [et al.] // Sci. Transl. Med. – 2010. – Vol. 2. – P.46 ra61.
4. **Hackett J. M.** Biosynthetic corneal implants for replacement of pathologic corneal tissue: performance in a controlled rabbit alkali burn model / J. M. Hackett, L. Gan, M. Griffith, [et al.] // Invest. Ophth. Vis. Sci. – 2011. - Vol. 52 (№2). – P. 651-657.
5. **Hayes S.** The structural and optical properties of type III human collagen biosynthetic corneal substitutes / S. Hayes, P. Lewis, M. M. Islam, J. Douth, T. Sorensen, M. Griffith, K. M. Meek // Acta Biomaterialia. – 2015. – Vol. 25. – P. 121-130.
6. **Liu Y.** Properties of porcine and recombinant human collagen matrices for optically clear tissue engineering applications / Y. Liu, M. Griffith, M. A. Watsky, [et al.] // Biomacromolecules. – 2006. – Vol. 7. – P. 1819-1828.
7. **Liu Y.** A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation / Y. Liu, L. Gan, D. J. Carlsson, [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2006. – Vol. 47. – P. 1869-1875.
8. **Reynolds E. S.** The use of lead citrate at pH as an electron-opaque strain in electron microscopy // J. Cell. Biol. – 1963. – Vol. 17 (№ 1). – P. 208-212.

Поступила 11.04.2017

## Электронно-микроскопическая структура эквивалентов стромы роговицы человека на основе коллагена

Молчанюк Н. И., Бузник А. И., Думброва Н. Е., Пасечникова Н. В.

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

**Цель работы** – изучение электронно-микроскопической структуры биосинтетических бесклеточных эквивалентов стромы роговицы человека (ЭСРЧ) на основе взаимопроникающих сетей коллагена и метилфосфорилхолина (МФХ).

**Материал и методы.** Структура коллаген-метилфосфорилхолиновых ЭСРЧ (К-МФХ ЭСРЧ) из 18% растворов рекомбинантного человеческого коллагена (РЧК) III типа либо свиного ателоколлагена (САК) I типа изучались под трансмиссионным электронным микроскопом.

**Результаты.** Выявлено наличие в структуре ЭСРЧ коллагеноподобных тонких фибрилл диаметром 2-8 нм с преимущественно продольной регулярной ориен-

тацией. Признаков, характерных для структуры человеческой роговицы, не определялось. Коллагеновые фибриллы в имплантах из САК оказались немного более толстыми и были не так регулярно расположены в сравнении с фибриллами в имплантах из РЧК, но это не влияло на прозрачность имплантов.

**Вывод.** Сохранение отличных оптических К-МФХ ЭСРЧ на основе РЧК III типа и САК I типа при отсутствии характерной структуры и расположения коллагеновых волокон, свойственных человеческой роговице, связано с чрезвычайно малым размером фибрилл, которые образуются в результате кросс-линкинга молекул коллагена, поэтому они не вызывают рассеивания света при прохождении сквозь них.

**Ключові слова:** эквивалент стромы роговицы человека, заменитель донорской роговицы, коллаген, электронно-микроскопическая структура