

**ГИСТОМОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
РОГОВИЦ КРОЛИКОВ ПОСЛЕ
ИНТРАЛАМЕЛЛЯРНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ
БЕСКЛЕТОЧНОГО МОДУЛЯ СТРОМЫ
РОГОВИЦЫ ЧЕЛОВЕКА**

**Н.В. Пасечникова, В.В. Вит, Н.Ф. Леус, Б.М. Коган,
И.О. Насинник**

*ГУ "Институт глазных болезней и тканевой терапии им.
В.П. Филатова" НАМН Украины (Одесса)*

Вступление

Поражение роговицы вследствие заболеваний, травм и их последствий часто приводит к снижению зрения и слепоте [7]. Более 10 миллионов людей в мире страдают слепотой из-за патологии роговицы [14, 15], но только 120000 ее пересадок выполняется ежегодно [16]. До сих пор, наиболее распространенным методом лечения в клинике глазных болезней является пересадка нативной донорской роговой оболочки.

Несмотря на хорошие результаты, отмечаемые после первичной пересадки роговицы (приживаемость составляет 90% в течение 5 лет и 82% в течение 10 лет), результаты при повторных пересадках хуже примерно в два раза (приживаемость составляет 53% в течение 5 лет и 41% в течение 10 лет) [3, 13]. Кроме того, в 30% случаев после сквозной кератопластики наблюдается, по крайней мере, один эпизод отторжения трансплантата и около 5-7% случаев болезни трансплантата [9].

Существует растущая потребность в материале для трансплантации, что связано с острой нехваткой подходящей донорской ткани во многих странах из-за демографических проблем, увеличения случаев инфекционных заболеваний (ВИЧ, гепатиты, HTLV), более широкого использования рефракционной лазерной хирургии [1]. Наконец, этот дефицит усугубляется несовершенством законодательства и религиозными факторами.

Указанные проблемы пересадок нативной роговицы, а также технические трудности, возникающие при заборе роговичного материала, побуждают к поиску новых путей обеспечения материала для реконструктивных операций роговой оболочки.

Исследования в области тканевой инженерии роговичных эквивалентов привели к значительному прогрессу на протяжении последних нескольких лет. Так удалось получить такие эквиваленты с использованием природных или синтетических полимеров, сходных по своим свойствам и толщине с нативной роговицей [4, 6, 8, 11, 12].

Альтернативным путем получения материала для кератопластики является удаление клеток и молекул антигенов из тканей роговицы, для уменьшения иммунной реакции и получения остова роговицы. В последнее время получение остова на основе нативной ткани стало более привлекательным, поскольку бесклеточный матрикс имеет ту же структуру и состав что и нативная ткань. Несколько групп исследователей получили бесклеточную строму роговицы с использованием неионных "моющих средств" и ферментов. Они сообщили, что отмытая строма роговицы сохраняет такую же структуру как и нативная роговица [5, 10, 17, 18]. Однако, "моющие средства", как правило, обладают цитотоксическим эффектом и должны быть тщательно удалены из получаемого объекта. Возможен и другой путь, а именно получение бесклеточной ткани при использовании высокого гидростатического давления, но без "моющих средств" [2]. Однако на сегодняшний день все полученные материалы еще не обладают необходимыми свойствами, предъявляемыми к роговичным имплантам (хорошая биосовместимость, высокая оптическая прозрачность, плотность, чтобы выдержать хирургическую процедуру) [4]. Поэтому необходимы дальнейшие разработки.

Цель: изучить гистоморфологические изменения роговицы кролика после интраламеллярной имплантации бесклеточного модуля стромы роговицы человека (БМСРЧ).

Материалы и методы исследования

Участки роговой оболочки, полученные из энуклеированных глаз человека, обрабатывались по предложенной нами методике (патент Украины №44128). Согласно ей они помещались в

среду для культивирования ткани, а затем последовательно обрабатывались ферментами (трипсин, фосфолипаза, гиалуронидаза) и детергентами (Тритон X-100), что приводило к удалению и вымыванию клеточных и неклеточных элементов роговицы, отщеплению концевых пептидных участков коллагеновых молекул, обуславливающих их антигенные свойства.

Экспериментальное исследование выполнено на 10 кроликах (20 глаз), породы Шиншилла, весом 2,5-3 килограмма. Под общей анестезией с использованием тиопентала натрия 1 г/кг массы в условиях операционной на обоих глазах животных производилась интраламеллярная имплантация БМСРЧ. В 1 мм от лимба, скребцом производилась насечка на роговице. Карман в строме роговицы выполняли тупым способом, и расширяли до необходимых размеров при помощи шпателя. Затем в него имплантировали участок БМСРЧ диаметром 6 мм. После вмешательства проводилась стандартная противовоспалительная и антимикробная терапия. Животных осматривали 4 раза в неделю, с последующей фоторегистацией. Офтальмоскопически оценивалось состояние роговицы и имплантированного БМСРЧ. Срок наблюдения - 1,5 месяца.

Хирургическое вмешательство и выведение животных из эксперимента выполнено с соблюдением "Правил обращения с лабораторными животными", в частности с выполнением болезненных процедур под наркозом.

Энуклеированные глаза подвергались гистологической обработке по общепринятой методике с окраской срезов гематоксилин-эозином, выполнялась световая микроскопия.

Полученные результаты и их обсуждение

После обработки роговиц энуклеированных глаз человека по нашей методике (для получения бесклеточного модуля стромы роговицы человека), наблюдался отек стромы роговичных имплантов и незначительное их помутнение.

На следующий день после интраламеллярной имплантации на обоих глазах у всех животных наблюдалась смешанная гиперемия конъюнктивы, наличие скудного слизистого отделяемого, отек стромы роговицы, при этом отмечалось сохранение помутнения трансплантатов.

Спустя 6 суток после операции при осмотре животных признаков воспалительной реакции не наблюдалось, отек роговицы отсутствовал, трансплантаты частично просветлели.

У одного кролика на обоих глазах отмечалась выраженная воспалительная реакция на протяжении 7 дней, что привело к развитию неоваскуляризации роговицы и образованию бельма (рис.1).



Рис.1. Фотография глаза кролика через 1,5 месяца после имплантации БМСРЧ с воспалительной реакцией в результате которой развилась неоваскуляризация роговицы и образовалось бельмо.

На протяжении 1,5 месяцев после имплантации у 9 кроликов (18 глаз) глаза были спокойны, признаков воспаления не наблюдалось. Отмечалось просветление трансплантатов (рис.2).

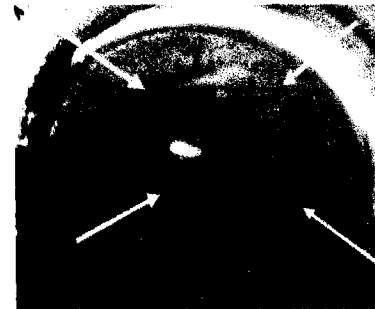


Рис.2. Фотография глаза кролика через 1,5 месяца после имплантации БМСРЧ. Границы трансплантата отмечены стрелочками.

При гистологическом исследовании микропрепаратов отмечается отсутствие воспалительной реакции в трансплантате и роговой оболочке реципиента. В БМСРЧ сохранена структура коллагеновых пластин, нет признаков отека, клеточные элементы отсутствуют. Воспалительная реакция в трансплантате и роговой оболочке реципиента отсутствует. Определяется незначительная гомогенизация коллагеновых пластин и уменьшение количества кератоцитов в роговице реципиента, однако сохраняется ее структура (рис.3 А). По краю трансплантата, в месте контакта края БМСРЧ и роговицы реципиента, определяется скопление кератоцитов, с признаками проникновения их в строму трансплантата (рис.3 Б).



Рис.3. Микропрепарат роговицы кролика через 1,5 месяца после имплантации БМСРЧ.

А. В БМСРЧ клеточные элементы отсутствуют, сохраняется структура коллагеновых пластин, нет признаков воспаления и отека (границы трансплантата отмечены стрелочками).

Б. В месте контакта края трансплантата и роговицы реципиента, определяется скопление кератоцитов (отмечено стрелочками).

Выводы

1. После интраламеллярной имплантации в роговицу кролика бесклеточного модуля стромы роговицы человека, полученного по нашей методике, у 9 кроликов (18 глаз) через 1,5 месяца отсутствовала воспалительная реакция, признаков отторжения трансплантата не наблюдалось. При этом сохранялась гистоархитектоника роговицы реципиента и структура трансплантата.

2. На основании полученных результатов можно предположить о возможности применения бесклеточного модуля стромы роговицы человека в качестве материала для послойной кератопластики.

Литература

1. Eye Bank Association of America. 1999 EBAA statistical report. - Washington, DC. - Eye Bank Association of America. - 1999.
2. Hashimoto Y. Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering / Y. Hashimoto, S.Funamoto, S.Sasaki [et al] // *Biomaterials*. - 2010. - Vol. 31. - P.3941-3948.
3. Kaminski S.L. Corneal sensitivity 10 years after epikeratoplasty / S.L. Kaminski, R.Biowski, J.R.Lucas [et al.] // *J. Refract. Surg.* - 2002. - Vol.18. - P.731-736.

4. 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.

5. Marquez S.P. Decellularization of bovine cornea for tissue engineering applications / S.P.Marquez, V.S.Martirnez, W.M.Ambrose [et al.] // *Acta Biomaterialia* - 2009. - Vol.5. - P.1839-1847.

6. Minami Y. Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture / Y.Minami, H.Sugihara, S.Oono // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 1993. - Vol.34. - P.2316-2324.

7. Moffatt S.L. Centennial review of corneal transplantation / S.L.Moffatt, V.A.Cartwright, T.H.Stumpf // *Clin. Exp. Ophthalmol.* - 2005. - Vol.33. - P.642-657.

8. Nishida K. Tissue engineering of the cornea / K.Nishida // *Cornea*. - 2003. - Vol.22. - P.28-34.

9. Panda A. Corneal graft rejection / A.Panda, M.Vanathi, A.Kumar [e.a.] // *Surv.Ophthalmol.* - 2007. - Vol.52. - P.375-396.

10. Pang K. A rabbit anterior cornea replacement derived from acellular porcine cornea matrix, epithelial cells and keratocytes / K.Pang, L. Du, X.Wu // *Biomaterials*. - 2010. - Vol. 31. - P.7257-7265.

11. Reichl S. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies / S.Reichl, J.Bednarz, C.C.Muller-Goymann // *Br. J. Ophthalmol.* - 2004. - Vol.88. - P.560-565.

12. Schneider Al. Constructing an in vitro cornea from cultures of the three specific corneal cell types / Al.Schneider, K.Maier-Reif, T.Graeve // *Vitro Cell.Dev.Biol.Anim.* - 1999. -V. 35. - P. 515-526.

13. Thompson R.W.Jr. Long-term graft survival after penetrating keratoplasty / Jr.R.W.Thompson, M.O.Price [e. a.] // *Ophthalmology*. - 2003. - Vol.110. - P.1396-1402.

14. Whitcher J.P. Corneal blindness: a global perspective / J.P. Whitcher, M.Srinivasan, M.P.Upadhyay // *Bull. World Health Organ.* - 2001. - Vol.79. - P.214-221.

15. Whitcher J.P. Prevention of corneal ulceration in the developing world / J.P.Whitcher, M.Srinivasan, M.P.Upadhyay // *Int. Ophthalmol. Clin.* - 2002. - Vol.42. - P.71-77.

16. World Health Organization. Report of consultation meeting on transplantation with national health authorities in the western pacific region. - 2005. - P.1-63.

17. Wu Z. The use of phospholipase A2 to prepare acellular porcine corneal stroma as a tissue engineering scaffold / Z. Wu, Y. Zhou, N. Li [et al] // Biomaterials. - 2009. - Vol.30. - P.3513-3522.

18. Xu Y.G. Development of a rabbit corneal equivalent using an acellular corneal matrix of a porcine substrate / Y.G. Xu, Y.S. Xu, C.Huang [e.a.] // Mol. Vis. - 2008. - Vol.14. - P.2180-2189.

Резюме

Пасечникова Н.В., Вит В.В., Леус Н.Ф., Коган Б.М., Насинник И.О. Гистоморфологическое исследование роговицы кроликов после интраламеллярной имплантации бесклеточного модуля стромы роговицы человека.

Авторами была исследована реакция роговицы кроликов на интраламеллярную имплантацию бесклеточного модуля стромы роговицы человека, полученного по разработанной методике. Через 1,5 месяца воспалительная реакция отсутствовала, признаков отторжения трансплантата не было. Гистоархитектоника роговицы реципиента и структура трансплантата были сохранены.

Ключевые слова: бесклеточная строма роговицы, кератопластика.

Резюме

Пасечникова Н.В., Вит В.В., Леус Н.Ф., Коган Б.М., Насинник И.О. Гистоморфологічне дослідження роговок кроликів після інтраламеллярної імплантації безклітинного модуля стромі рогівки людини.

Авторами була досліджена реакція рогівок кроликів на інтраламеллярну імплантацію безклітинного модуля стромі рогівки людини, отриманого за розробленою методикою. Через 1,5 місяця була відсутня запальна реакція, ознак відторгнення трансплантату не було. При цьому гистоархитектоніка рогівки реципієнта та структура імплантату були збережені.

Ключові слова: безклітинна строма рогівки, кератопластика.

Summary

Pasychnikova N.V., Vit V.V., Leus N.F., Kogan B.M., Nasinnyk I.O. Histomorphological study of the rabbits cornea after intralamellar transplantation of acellular stroma of the human cornea.

The authors studied the reaction of the rabbit cornea after interlamellar transplantation of acellular stroma of the human cornea. At the end of the observation the inflammatory reaction was absent. There were no signs of transplant rejection. In addition the histoarchitectonics of recipient cornea and implant structure is preserved.

Key words: acellular stroma of the cornea, keratoplastic.

Рецензент: д.мед.н., проф. Л.А. Сухіна

ОСОБЕННОСТИ НАРУШЕНИЙ ОПТИКИ РОГОВИЦЫ У БОЛЬНЫХ С КЕРАТОКОНУСОМ ПО ДАННЫМ КЕРАТОТОПОГРАФИИ

Н.В. Пасечникова, Т.С.Завгородняя,

Е.И. Драгомирецкая

ГУ "Институт глазных болезней и тканевой терапии
им. В.П. Филатова" НАМН Украины (Одесса)

ГУ "Запорожская медицинская академия
последипломного образования"

Вступление

Основным методом, позволяющим детально изучить оптику роговицы, является кератотопография. Этот же метод является "золотым стандартом" диагностики кератоконуса. До появления кератотопографов распространенность кератоконуса в общей популяции варьировала от 0,033 до 0,054 % [5]. В последнее десятилетие, в связи с высокой популярностью рефракционных операций на роговице и внедрением в практику офтальмологов современных кератотопографов повысилась и выявляемость этого заболевания. По мнению Wilson S.E. с соавт., кератоконус встречается гораздо чаще - до 5,5% - среди миопов [6]. При анализе кератотопограмм у лиц с нестабильной рефракцией, сниженной остротой зрения в очках, миопией более 10 Дптр и астигматизмом более 2-х Дптр. (с косыми осями), частота субклинических проявлений кератоконуса возрастает до 10-20 % [1]. Пропорционально развитию диагностики развиваются и новые направления в лечении прогрессирующих эктазий роговицы. Наряду с традиционными жесткими линзами и сквозной кератопластикой в практику офтальмологов внедряется полимеризация коллагеновых волокон роговицы - Corneal Collagen Cross - Linking (CCC-L), имплантация роговичных колец Intacs и колец Ferrara [4]. Выбор и эффективность этих методик зависит от стадии забо-