

УДК 617.713-089.843-092.9

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

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

## **ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ И УЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РОГОВИЦ КРОЛИКОВ ПОСЛЕ ИНТРАЛАМЕЛЛЯРНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ БЕСКЛЕТОЧНОГО МОДУЛЯ СТРОМЫ РОГОВИЦЫ ЧЕЛОВЕКА**

Исследована реакция роговиц кроликов на интраламеллярную имплантацию бесклеточного модуля стромы роговицы человека, полученного по разработанной методике. Через 2,5 месяца воспалительная реакция отсутствовала, признаков отторжения трансплантата не было. Гистоархитектоника роговицы реципиента и ламеллярная структура трансплантата были сохранены.

**Ключевые слова:** бесклеточная строма роговицы, кератопластика.

Поражение роговицы вследствие заболеваний, травм и их последствий часто приводит к снижению зрения и слепоте. Более 10 млн людей в мире страдают слепотой из-за патологии роговицы, но только 120 000 ее пересадок выполняется ежегодно [1]. До сих пор наиболее распространенным методом лечения в клинике глазных болезней является пересадка нативной донорской роговой оболочки.

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 [2]. 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 поли-

меров, сходных по своим свойствам и толщине с нативной роговицей [3, 4].

Альтернативным путем получения материала для кератопластики является удаление клеток и молекул антигенов из ткани роговицы в целях 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, 6]. Однако «моющие средства», как правило, оказывают цитотоксический эффект 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» [7].

Однако на сегодняшний день все полученные материалы еще не обладают необходимыми свойствами, предъявляемыми к роговичным имплантам [3], поэтому необходимы дальнейшие разработки.

Цель — изучение гистологических и ультраструктурных изменений роговицы кролика после интраламеллярной имплан-

© Н.В. Пасечникова, В.В. Вит, Н.Е. Думброва и др., 2011

тации бесклеточного модуля стромы роговицы человека (БМСРЧ).

**Материал и методы.** Участки роговой оболочки, полученные из энуклеированных глаз человека, обрабатывали по предложенной нами методике (патент Украины № 44128). Согласно этой методике 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 14 кроликах (28 глаз) породы шиншилла массой 2,5–3 кг. 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 производили насечку 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 проводили стандартную противовоспалительную и антимикробную терапию. Животных осматривали 4 раза в неделю с последующей фоторегистрацией. Офтальмоскопически оценивали состояние роговицы и имплантированного БМСРЧ. Срок наблюдения — 2,5 месяца.

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

Для световой микроскопии энуклеированные глаза кроликов подвергали гистологической обработке по общепринятой методике с окраской срезов гематоксилин-эозином.

Обработку образцов для ультраструктурного исследования проводили по стандартной методике, применяемой в электронной микроскопии.

**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 (рис. 1).

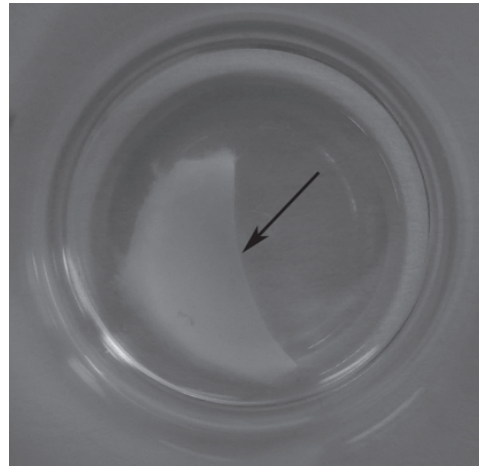


Рис. 1. Бесклеточный модуль стромы роговицы человека перед имплантацией

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

На протяжении 2,5 месяца после имплантации у 13 кроликов (26 глаз) глаза были спокойны, признаков воспаления не наблюдалось. Отмечалось просветление трансплантатов (рис. 2).

При гистологическом исследовании микропрепаратов отмечается отсутствие

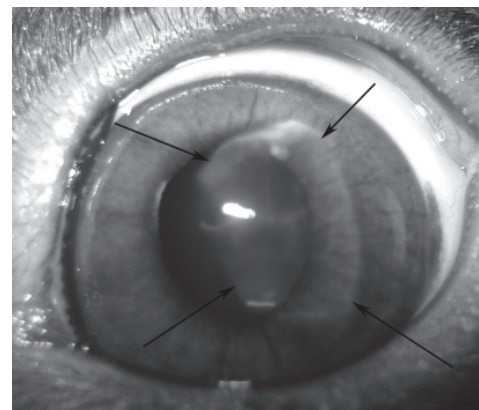


Рис. 2. Глаз кролика через 2,5 месяца после имплантации БМСРЧ. Границы трансплантата отмечены стрелками

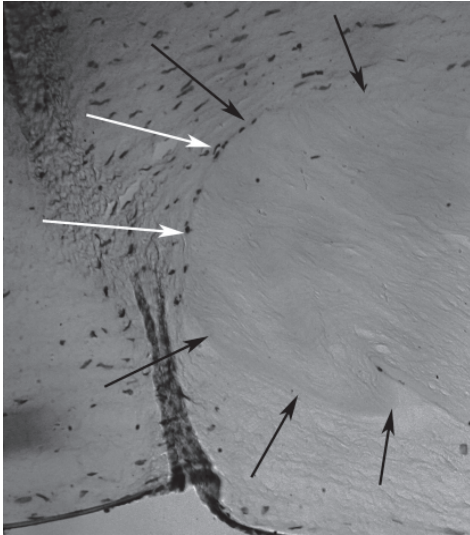


Рис. 3. Роговица кролика через 2,5 месяца после имплантации БМСРЧ. В БМСРЧ клеточные элементы отсутствуют, сохраняется структура коллагеновых пластин, нет признаков воспаления и отека (границы трансплантата отмечены черными стрелками). В месте контакта края трансплантата и роговицы реципиента скопление кератоцитов (отмечено белой стрелкой)

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. По краю трансплантата в месте контакта края БМСРЧ и роговицы реципиента определяется скопление кератоцитов с признаками проникновения их в строму трансплантата (рис. 3).

#### Список литературы

1. *Whitcher J. P.* Corneal blindness: a global perspective / J. P. Whitcher, M. Srinivasan, M. P. Upadhyay // *Bull World Health Organ.* — 2001. — V. 79. — P. 214–221.
2. Eye Bank Association of America. 1999 EBAA statistical report. — Washington, DC : Eye Bank Association of America, 1999.
3. A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation / Y. Liu, L. Gan, D. J. Carlsson [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2006. — V. 47. — P. 1869–1875.
4. *Nishida K.* Tissue engineering of the cornea / K. Nishida // *Cornea.* — 2003. — V. 22. — P. 28–34.
5. Decellularization of bovine cornea for tissue engineering applications / S. P. Marquez, V. S. Martirnez, W. M. Ambrose [et al.] // *Acta Biomaterialia.* — 2009. — V. 5. — P. 1839–1847.
6. 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. — V. 30. — P. 3513–3522.
7. *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. — V. 31. — P. 3941–3948.

При ультраструктурном исследовании в бесклеточном модуле стромы роговицы человека отмечается отсутствие клеточных элементов, незначительное рассоединение коллагеновых волокон с сохранением ламеллярной структуры стромы роговицы (рис. 4).

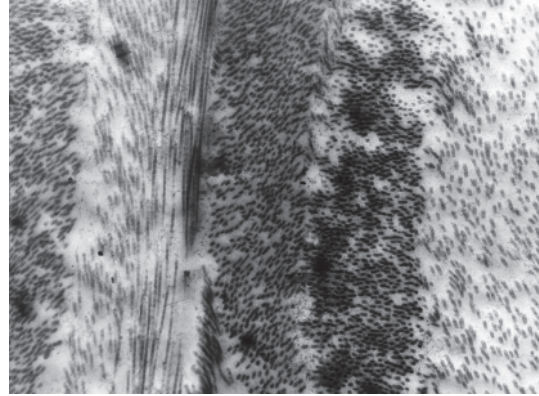


Рис. 4. Ультраструктура бесклеточного модуля стромы роговицы человека через 2,5 месяца после интраламеллярной имплантации в роговицу кролика. Электронная микроскопия,  $\times 15\,000$

Таким образом, после интраламеллярной имплантации в роговицу кролика бесклеточного модуля стромы роговицы человека, полученного по нашей методике, у 13 кроликов (26 глаз) через 2,5 месяца отсутствовала воспалительная реакция, признаков отторжения трансплантата не наблюдалось. При этом сохранялась гистоархитектоника роговицы реципиента и ламеллярная структура трансплантата. На основании полученных результатов можно предположить возможность применения бесклеточного модуля стромы роговицы человека в качестве материала для послойной кератопластики.

*Н.В. Пасечнікова, В.В. Віт, Н.Ф. Леус, Б.М. Коган, І.О. Насінник*

**ГІСТОЛОГІЧНЕ Й УЛЬТРАСТРУКТУРНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ РОГІВОК КРОЛИКІВ ПІСЛЯ ІНТРАЛАМЕЛЯРНОЇ ІМПЛАНТАЦІЇ БЕЗКЛІТИННОГО МОДУЛЯ СТРОМИ РОГІВКИ ЛЮДИНИ**

Досліджена реакція рогівок кроликів на інтраламелярну імплантацію безклітинного модуля строми рогівки людини, отриманого за розробленою методикою. Через 2,5 місяця була відсутня запальна реакція, ознак відторгнення трансплантата не було. При цьому гістоархітектоніка рогівки реципієнта та ламелярна структура імплантата були збережені.

*Ключові слова: безклітинна строма рогівки, кератопластика.*

*N.V. Pasychnikova, V.V. Vit, N.F. Leus, B.M. Kogan, I.O. Nasinnik*

**HISTOLOGICAL AND ULTRASTRUCTURAL STUDY OF THE RABBITS CORNEA AFTER INTRALAMELLAR TRANSPLANTATION OF ACELLULAR STROMA OF THE HUMAN CORNEA**

The reaction of the rabbit cornea after interlamellar transplantation of acellular stroma of the human cornea was studied. 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 lamellar structure is preserved.

*Key words: acellular stroma of the cornea, keratoplasty.*