

Влияние фактора роста rhBMP-2 в составе коллагенового носителя на морфологические и биомеханические характеристики роговицы

В.Д. Захаров¹, О.В. Зайратьянц², А.Ю. Андреев¹, Е.О. Осидак³, С.А. Борзенко¹, С.В. Крашенинников⁴, А.С. Карягина⁵, С.П. Домогатский^{3, 6}

¹ ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Москва;

² МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва;

³ ООО фирмы «Имтек», Москва;

⁴ НИЦ «Курчатовский институт» Москва;

⁵ ФГБУ «ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва;

⁶ ФГБУ «РКНПК» Минздрава России, Москва

РЕФЕРАТ

При тяжелых ожоговых бельмах, когда кератопластика является неэффективной, единственным методом восстановления зрения является кератопротезирование. Низкие биомеханические характеристики бельма значительно усложняют операцию и сказываются на развитии осложнений, для профилактики и лечения которых разработаны укрепляющие методики с использованием аутологичных тканей. Однако их применение имеет ряд трудностей, таких как отбор и моделирование трансплантата нужной формы, слабые адаптационные возможности материала и его лизис в послеоперационном периоде. В настоящей работе предложен новый способ повышения биомеханических свойств бельма роговицы путем имплантации коллагеновой мембраны с фактором роста костной ткани rhBMP-2 в строму роговицы. Экспериментально доказано увеличение прочностных характеристик роговицы через 2-3 недели после имплантации коллагеновой мембраны с rhBMP-2.

Цель. Оценка влияния rhBMP-2 в составе коллагеновой мембраны на морфологические и биомеханические характеристики роговицы.

Материал и методы. Работа выполнена на 18 кроликах породы шиншилла. Для приготовления имплантатов (коллагеновых мембран) использовали стерильный раствор 2% очищенного нативного

го коллагена крысы I типа («ИМТЕК»), в который добавляли стерильный раствор rhBMP-2 (ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи). Полученная коллагеновая мембрана имплантирована в интрастромальный «от лимба до лимба» карман роговицы. Срок эксперимента составил 90 суток. Препараты роговицы исследованы на предмет морфологии и биомеханики.

Результаты. В послеоперационном периоде наблюдали интенсивный ангиогенез с умеренной воспалительной реакцией, которая стихала на 8-е сутки. Гистологическое исследование выявило приживление имплантата с последующим его замещением молодой соединительной тканью. Исследование биомеханических свойств показало значительное увеличение прочностных характеристик роговицы в месте имплантации.

Выводы. Доказана принципиальная возможность изменения морфологических и биомеханических свойств тканей роговицы под действием фактора роста rhBMP-2, что является перспективным направлением для укрепления бельма на различных этапах кератопротезирования и требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: роговица, кератопротезирование, rhBMP-2, коллаген, биомеханика. ■

Авторы не имеют финансовых или имущественных интересов в упомянутых материале и методах.

Офтальмохирургия. – 2016. – № 4. – С. 20–28.

ABSTRACT

Influence of rhBMP-2 growth factor in composition with collagen carrier on morphological and biomechanical characteristics of cornea

V.D. Zaharov¹, O.V. Zayratyants², A.Y. Andreev¹, E.O. Osidak³, S.A. Borzenok¹, S.V. Krashenninikov⁴, A.S. Karyagina⁵, S.P. Domogatskiy^{3, 6}

¹ The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow;

² The A.I. Evdokimov Moscow State Medical Dentistry University, Moscow;

³ The Imtek Ltd, Moscow;

⁴ The Research Center «Kurchatov Institute», Moscow;

⁵ The N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow;

⁶ The Russian Cardiology Research-Production Complex FGBU «Cardiology», Moscow

In case of severe burn leukomas when keratoplasty is ineffective, the only way to restore vision is keratoprosthetics. Low biomechanical characteristics of leukoma make the surgery significantly more difficult and affect the development of complications, for their prevention and treatment the techniques strengthening cornea using autologous tissue

are elaborated. However, their use has a number of difficulties, such as the selection and simulation of grafts in necessary form, weak adaptive capacity of the material and its lysis in the postoperative period. In this paper a new method is presented to improve biomechanical properties of the corneal leukoma using the implantation of collagen membrane with

the growth factor of bone rhBMP-2 in the corneal stroma. An increase of the strength characteristics of cornea 2-3 weeks after the implantation of collagen membrane with rhBMP-2 was proved experimentally.

Purpose. To assess the impact of rhBMP-2 in a collagen membrane composition of the carrier on morphological and biomechanical characteristics of the cornea.

Material and methods. The study was performed in 18 rabbits of the chinchilla breed. For a preparation of the implants (collagen membranes) we used a sterile 2% solution of the purified native rat collagen of the type I («ИМТЕК»), to which a sterile solution of rhBMP-2 (produced by the N.F. Gamaleya Center of Epidemiology and Microbiology) was added. The obtained collagen membrane was implanted into the intrastromal «from limbus to limbus» corneal pocket. The experimental period was 90 days. Corneal samples were investigated for morphology and biomechanics.

Results. In the postoperative period an intense angiogenesis was observed with a moderate inflammatory reaction, which subsided on the 8th day. Histological examination revealed a graft retention followed by its replacement by young connective tissue. A study of the biomechanical properties showed a significant increase in the strength characteristics of the cornea in the site of implantation.

Conclusions. The feasibility of morphological and biomechanical properties changes of the corneal tissue under the action of growth factor rhBMP-2 is proved. This is a promising direction for leukoma strengthening at various stages of keratoprosthetics and requires a further study.

Key words: cornea, keratoprosthetics, rhBMP-2, collagen, biomechanics. ■

No author has a financial or proprietary interest in any material or method mentioned.

The Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery.- 2016.- No. 4.- P. 20-28.

По данным ВОЗ не менее 10 млн. чел. во всем мире потеряли предметное зрение из-за заболеваний, так или иначе связанных с патологией роговицы. Успешное развитие кератопластики не может полностью решить всех проблем на данном этапе. Так, при тяжелых ожоговых бельмах IV-V категории (по классификации Пучковской Н.А. и Непомящей В.М., 1973) кератопластика является неэффективной, о чем свидетельствуют данные литературы, где частота помутнений трансплантата после кератопластики варьирует от 53 до 82% [4]. В таких случаях единственным методом восстановления зрения является кератопротезирование [8, 10].

Этот метод даёт хорошие результаты уже на ранних сроках после операции. Однако бельма, подлежащие кератопротезированию, нередко имеют низкие биомеханические характеристики, являются истонченными, неравномерными по толщине, что значительно усложняет саму операцию и напрямую сказывается на развитии возможных осложнений, наиболее серьезным из которых является развитие асептического некроза роговицы с последующей протрузией кератопротеза [5]. В целях профилактики и лечения подобных осложнений разработаны методы укрепления бельма с использованием различных пластических материалов [6].

Среди таких операций наибольшее распространение получили ме-

тодики с использованием аутологичных тканей человека: укрепление бельма аутонадкостницей большеберцовой кости, фасцией височной мышцы, слизистой оболочкой полости рта, аутохрящом ушной раковины, аутоотеноновой капсулой, перикардом и т.д. [1, 3, 9]. Однако использование аутологичных тканей имеет ряд серьёзных недостатков. Во-первых, аутологичные ткани обладают слабыми адаптационными возможностями к неестественному для них биологическому окружению и, как следствие, все они в той или иной степени подвержены лизису как в раннем, так и позднем послеоперационном периоде. Во-вторых, отбор аутоматериала связан с дополнительными, зачастую болезненными операциями. К тому же моделирование имплантата нужной формы и размера из аутоматериала, который ограничен в своем объеме, значительно снижает возможности успешного проведения операции. Как следствие, использование аутологичных тканей не всегда даёт стойкий эффект и вынуждает к повторному проведению укрепляющих кератопластик [7].

В этой связи разработка альтернативных способов, способных в той или иной мере компенсировать вышеперечисленные недостатки, является весьма актуальной задачей. На современном этапе активно ведутся работы по созданию тканеинженерных конструкций, способных выступать в роли необходимых

эквивалентов [13, 15, 21, 22]. Однако, по нашему мнению, сама концепция передачи свойств одной ткани путем её пересадки в другую не способна полностью решить всех проблем. Главной из них остается лизис трансплантируемого материала на разных сроках после операции. Вполне возможно, что для решения данной задачи необходимо выйти за рамки классической концепции и проверить новую, в рамках которой мы предлагаем перформировать исходную ткань роговицы в более подходящую для кератопротезирования (механически плотную, устойчивую к процессам ишемии) посредством воздействия на нее биологически активными молекулами, факторами роста.

В современной тканевой инженерии активно используются биокомпозитные материалы, содержащие полимерный носитель и факторы роста [16]. Такие материалы вводятся непосредственно в зону повреждения, где они служат как источником факторов роста, так и субстратом для прикрепления клеток. Использование коллагена в качестве основного материала для контролируемых систем доставки факторов роста является предпочтитель-

Для корреспонденции:

Андреев Андрей Юрьевич, аспирант
ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза»
им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России
E-mail: docandreev@gmail.com

ным в виду его слабой антигенности, биорезорбируемости в организме и высокой биосовместимости [14]. Коллагеновые имплантаты способны пролиферации фибробластов [12]. Учитывая то, что наиболее успешно применяемой тканью в целях укрепления белым на разных этапах кератопротезирования является хрящевая ткань, мы решили использовать соответствующий фактор роста – rhBMP-2.

Группа костных морфогенетических белков (Bone Morphogenic Proteins, BMP) регулирует регенерацию костной ткани [20]. BMP-2 индуцирует дифференцировку мезенхимальных клеток в хондрогенные и остеогенные клетки, а также способствует васкуляризации близлежащих тканей [18]. Рекombинантный BMP-2 человека (rhBMP-2) используется в клинике при лечении повреждений костной и хрящевой ткани. Однако в доступной литературе нами не обнаружено работ, посвященных изучению и применению этого фактора роста в офтальмологии. Учитывая вышеизложенное, мы считаем перспективной разработку имплантируемого материала на основе коллагена, содержащего rhBMP-2, и исследование возможностей его применения для консолидации роговичной ткани перед кератопротезированием.

ЦЕЛЬ

Оценка влияния фактора роста костной ткани rhBMP-2 в составе коллагенсодержащего носителя на морфологические и биомеханические характеристики роговицы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе были использованы следующие материалы: стерильный водный раствор нативного коллагена I типа (10 мг/мл) из сухожилий крысы, содержащий 20 мМ уксусной кислоты, pH 3,5 (Q C11-ND, «Имтек», Россия). Водно-солевой раствор, содержащий 3,4 мг/мл rhBMP-2, 10 мМ NaCl, 20 мМ уксусной кислоты, pH 4,5. rhBMP-2, модифицированный с целью повышения растворимости и содержания активной димер-

ной формы белка, получали микробиологическим синтезом в клетках *Escherichia coli*. Биологическая активность фактора, протестированная *in vitro* и *in vivo*, полностью соответствует активности фирменного препарата rhBMP-2 (R@D systems, Канада), полученного в клетках эукариот.

Экспериментальная работа основана на анализе данных, полученных в результате исследования 24 кроликов-самцов породы шиншилла возрастом 6 мес. со средней массой 2,5-3,0 кг. Все процедуры с животными проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Животных содержали при естественном освещении, температуре $22 \pm 2^\circ \text{C}$, в свободном доступе к воде и корму. У животных оперировали только один глаз для сохранения ориентации в окружающем пространстве.

В соответствии с типом имплантируемого материала, кролики были разделены на 2 группы. Первую группу составили 12 кроликов (12 глаз), в роговицу которых был имплантирован коллагеновый носитель без фактора роста. Во вторую группу вошли 12 кроликов (12 глаз), в роговицу которых был имплантирован фактор роста rhBMP-2 на коллагеновом носителе. Контролем служили парные, интактные глаза.

Коллоидный раствор крысиного коллагена смешивали с раствором rhBMP-2 таким образом, чтобы в конечной смеси концентрация rhBMP-2 была 20 мкг/мл. Полученную смесь, титруя при постоянном перемешивании, доводили раствором 1 М NaOH до нейтральных значений pH. Инкубировали смесь при $+4^\circ \text{C}$ в течение 2 часов, затем разливали по 1,0 мл в лунки 24-луночного планшета. Для формирования геля полученную смесь инкубировали при $+37^\circ \text{C}$ в течение 30 минут. Образованные коллагеновые гидрогели, извлеченные из планшета, отмывали в 500 мл фосфатного буферного раствора Рингера-Кребса при комнатной температуре в течение 24 часов с заменой раствора каждые 8 часов. Далее гели выкладывали на поверхность и сушили их до полного высыхания потоком воздуха при $+37^\circ \text{C}$. Полученные плен-

ки регидратировали в 20 мл фосфатного раствора Рингера-Кребса при $+37^\circ \text{C}$ в течение 2 часов. В результате чего получали коллагеновую мембрану диаметром 12 мм полусферической формы и толщиной 0,2 мм. Все манипуляции были проведены в асептических условиях.

Операцию на глазах кроликов выполняли под микроскопом М620 фирмы Leica (Германия) при увеличении в 15 раз; использовали расслаиватель и шовный материал фирмы Mani (Япония). Ход операции был следующим. Для анестезии животным выполняли ретробульбарную блокаду 0,5% новокаином. Производился разрез роговицы протяженностью 5 мм на 2/3 ее глубины концентрично лимбу. В данной плоскости при помощи расслаивателя формировали роговичный интрастромальный карман «от лимба до лимба», чтобы максимально приблизить данную методику к реальным условиям кератопротезирования. При помощи пинцета для зазывания и шпателя проводилась имплантация тканеинженерной конструкции в полость сформированного кармана, возникающие в некоторых случаях складки имплантируемого материала расправлялись при помощи легкой компрессии, создаваемой шпателем на поверхности роговицы. На разрез накладывался шов по Пирсу. По окончании операции для профилактики инфекции производили подкожноconjunctивальную инъекцию гентамицина сульфата 1,0% в объеме 0,5 мл. Далее в течение одной недели инстиллировали окомистин по 1 капле 2 раза в день. Для исключения риска самопроизвольного травмирования оперированного глаза и занесения инфекции кроликам одевались специальные воротники.

Результаты экспериментов оценивали морфологически, для этого по 2 кролика из каждой группы выводились из эксперимента на 28, 56 и 84 сутки. Забой животных осуществляли внутривенным введением фенобарбитала. Глаза животных энуклеировали и проводили обработку материала для гистологического исследования. Роговую оболочку вырезали по окружности лимба, а затем фиксировали в формалине в течение суток. Полученный

диск роговицы разрезали пополам, перпендикулярно по отношению к сосудам. Оба фрагмента обезживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Срезы толщиной 8-10 мкм изготавливали на микротоме и окрашивали гематоксилином и эозином. Исследование срезов роговицы проводили под световым микроскопом при 16- и 40-кратном увеличении.

Для исследования биомеханических характеристик оставшиеся животные (12 кроликов) выводились из эксперимента на тех же сроках. Забой животных осуществляли внутривенным введением фенобарбитала. Глаза животных энуклеировали, роговую оболочку вырезали по окружности, захватывая при этом участок склеры, отступая 3 мм от лимба. Для чистоты эксперимента использовали свежесрезанные ткани животных, полученные непосредственно перед проведением исследования. Полученный диск роговицы (рис. 1) зажимали между двух металлических пластин с отверстием 12 мм в центре, соответствующем диаметру роговицы таким образом, чтобы фиксация происходила за ткань склеры, а роговица была интактной (рис. 2). Готовую конструкцию опускали в физиологический раствор, чтобы препятствовать высыханию тканей во время исследования. Биомеханические свойства оценивали, используя масштабированный аналог теста ASTM D5748. Исследование состоит в двухосном нагружении тканей с постоянной скоростью (в нашем случае 1 мм/мин) до прокола. Испытания проводили на универсальной испытательной машине фирмы Instron (США) модели 5982 с использованием датчика нагрузки ± 50 Н серии 2530. По результатам испытаний определяли максимальную нагрузку (характеризующую прочность образцов) и наклон упругой области кривой (характеризует жесткость испытуемого образца). Парные, интактные глаза животных, выведенных из эксперимента, были исследованы по той же методике для оценки биомеханических свойств нативных роговиц.

Для клинической оценки состояния глаз животных по методике Ченцовой Е.В. [11] определяли степень воспалительной реакции и васкуля-

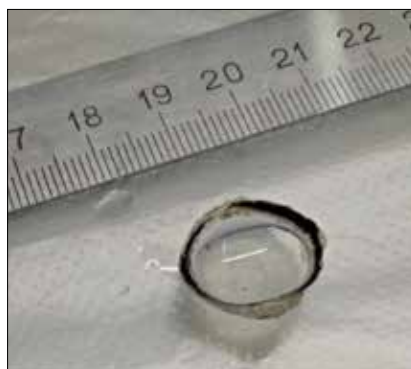


Рис. 1. Свежесрезанный корнеосклеральный диск роговицы

ризацию роговицы, а интенсивность помутнения роговицы оценивали по методике Войно-Ясенецкого В.В. [2]. Наблюдаемые изменения регистрировались путем фотографирования на фотошелевой лампе фирмы Opton (Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клиническая картина

Первая группа (коллаген без rhBMP-2)

На первом этапе исследования клиническая картина регистрировалась ежедневно. В раннем послеоперационном периоде (первые 4 суток) в первой группе во всех 12 случаях отмечено наличие незначительного отека роговицы в области операционного шва (рис. 3). Отек был обусловлен, по всей видимости, наличием операционной травмы. На 14 сутки после операции у 4-х кроликов отек сохранялся, отмечен рост новообразованных сосудов в области операционного шва (рис. 4), которые самопроизвольно заустевали к концу первого месяца наблюдения. Дальнейшая клиническая картина была стабильной, роговица сохраняла прозрачность, признаков воспаления не наблюдалось. К концу 3-го мес. наблюдения швы снимались (рис. 5).

Вторая группа (коллаген с rhBMP-2)

К середине второй недели (12 дней) у кроликов этой группы отмечалась незначительная инъекция новообразованных сосудов экстен-

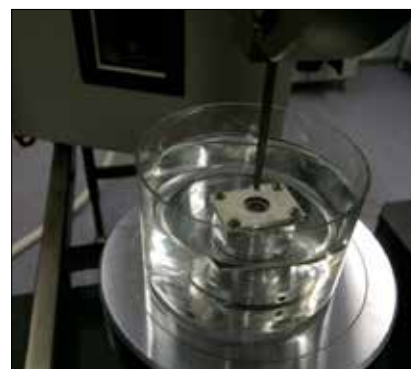


Рис. 2. Фиксация роговицы перед проведением испытания

трично лимбу, выраженный отек и помутнение всех слоев роговицы (рис. 6). Дальнейшая клиническая картина характеризовалась постепенным нарастанием неоваскуляризации роговицы, отека и наличием локального помутнения имплантата (рис. 7, 8). К концу второго месяца (56 дней) у всех кроликов клиническая картина стабилизировалась. Клинических признаков острого инфекционного поражения окружающих тканей при осмотре не обнаружено. К концу периода наблюдения (84 дня) у всех кроликов наблюдалось наличие бельма 2-й категории (рис. 9).

Световая микроскопия

Первая группа (коллаген без rhBMP-2)

Роговица относительно равномерной толщины с минимальными изменениями. Имплант сохранен на всем его протяжении, хотя и с очагами истончения, частично расщепления и накоплением в таких участках отечной жидкости. Роста грануляционной ткани не выявлено. В образце 1 мес. – вокруг имплантата имеется отек стромы. В строме нарушение упорядоченности хода пучков коллагеновых волокон (разнонаправлены и различной толщины), но клеточность не повышена. Выявляются единичные новообразованные, хорошо сформированные сосуды микроциркуляторного русла, преимущественно вокруг (выше и ниже) имплантата. Передний эпителий толщиной от 2-х до 4-х слоев, без особенностей. Пе-



Рис. 3. 4-е сутки после имплантации коллагеновой мембраны в стромальный карман роговицы кролика: отек в области шва

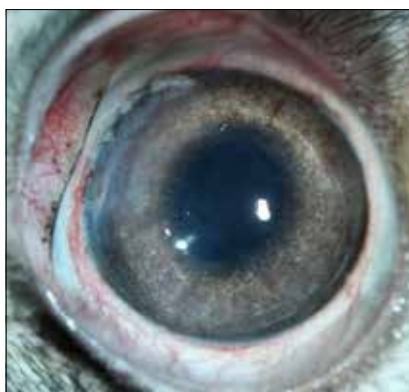


Рис. 4. 14 суток после имплантации коллагеновой мембраны, наличие новообразованных сосудов в области операционного шва



Рис. 5. 80 дней после имплантации коллагеновой мембраны в стромальный карман роговицы кролика, шов снят. Роговица прозрачная, признаки воспаления отсутствуют



Рис. 6. 12 дней после имплантации коллагеновой мембраны с фактором роста rhBMP-2. Инъекция новообразованных сосудов эксцентрично лимбу, выраженный отек и помутнение всех слоев роговицы



Рис. 7. 28 день после имплантации коллагеновой мембраны с фактором роста rhBMP-2. Уменьшение отека и наличие локального облаковидного помутнения



Рис. 8. 56 день после имплантации коллагеновой мембраны с фактором роста rhBMP-2. Стабилизация клинической картины, признаки острого воспаления окружающих тканей отсутствуют

редняя пограничная (боуменова) и задняя (десцemetова) мембраны без особенностей (рис. 10). В образце 2 и 3 мес. – аналогичная морфологическая картина, однако значительно меньше выражен отек стромы и более упорядочен ход ее коллагеновых волокон (рис. 11).

Вторая группа (коллаген с rhBMP-2)

1 месяц. Роговица неравномерно утолщена и значительно изменена. Относительно сохранены, хотя и отечны, с повышенной клеточностью, отдельные участки стромы, преимущественно ближе к десцemetовой мембране. На большем протяжении строма замещена молодой соединительной тканью с разнонаправленными и разной величины пучками коллагеновых во-

локон, множеством новообразованных полнокровных сосудов разного калибра, с лимфо-макрофагальной, преимущественно периваскулярной, инфильтрацией с примесью нейтрофилов и эозинофилов. Передний эпителий различной толщины – от двух-трех до 6-7 слоев, с пролиферацией базального слоя. Передняя пограничная (боуменова) мембрана неравномерной толщины и с извитым ходом. Задняя (десцemetова) мембрана, как и прилежащий к ней слой стромы (слой Дюа), сохранены в большей степени, как и задний эпителий (эндотелий). Вокруг импланта, особенно между ним и боуменовой мембраной, разрастания грануляционной ткани, воспалительная инфильтрация, отек и неоваскуляризация выражены значительно больше (сохранная строма

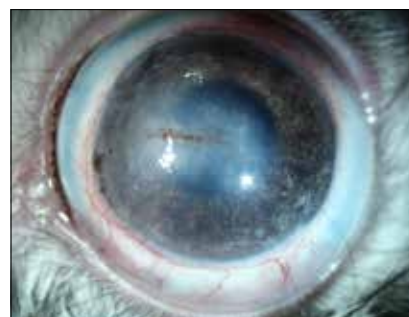


Рис. 9. Конец периода наблюдения, 84 дня после имплантации коллагеновой мембраны с фактором роста rhBMP-2. Наличие бельма 2-й категории. Шов снят

роговицы практически отсутствует), чем на отдалении от него, а также между ним и десцemetовой мембраной. Местами имплант разволок-

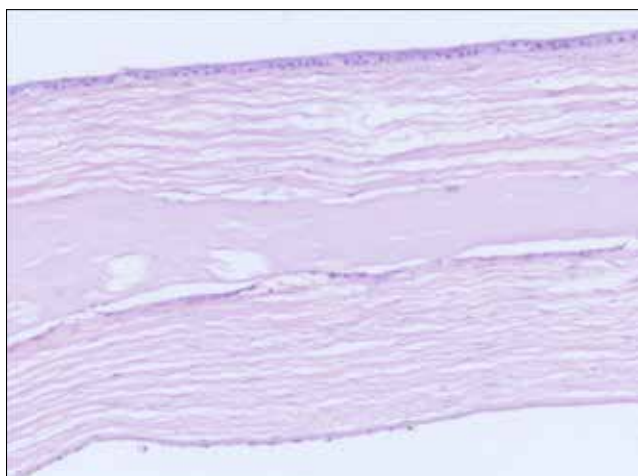


Рис. 10. 1 мес. после введения коллагенового имплантата в строму роговицы кролика. Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 120$

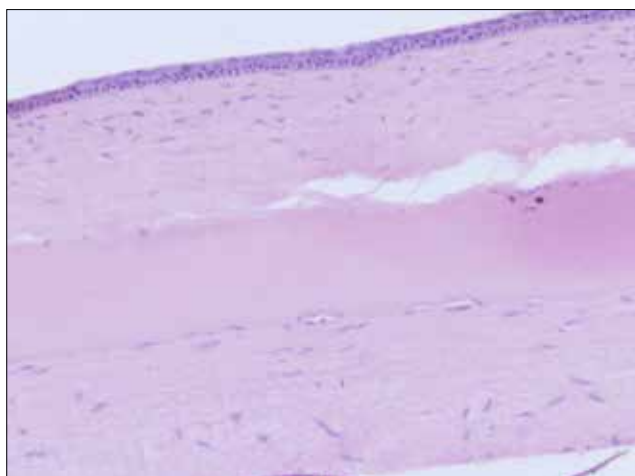


Рис. 11. 3 мес. после введения коллагенового имплантата в строму роговицы кролика. Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 200$

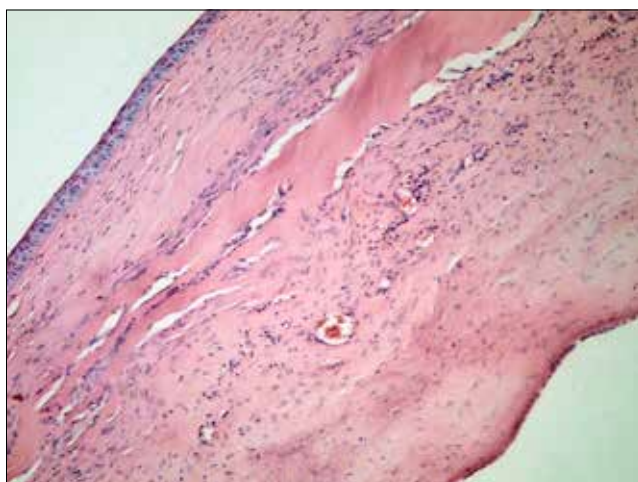


Рис. 12. 1 мес. после введения коллагенового имплантата с фактором роста rhBMP-2 в строму роговицы кролика. Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 120$

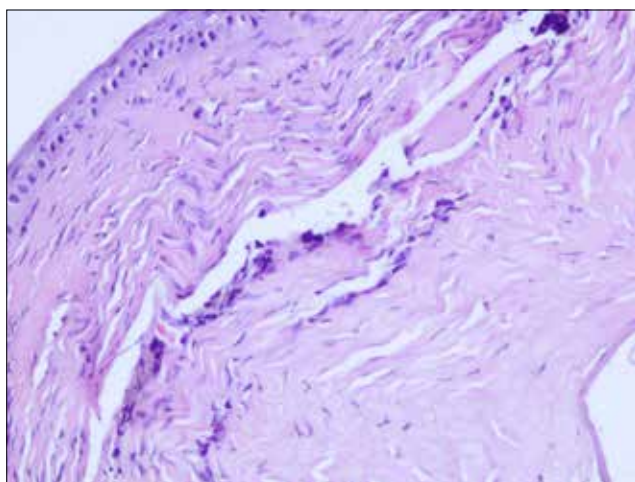


Рис. 13. 3 мес. после введения коллагенового имплантата с фактором роста rhBMP-2 в строму роговицы кролика. Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 200$

нен, в него проникают разрастания грануляционной ткани с лимфо-макрофагальной с примесью лейкоцитов инфильтрацией и единичными сосудами (рис. 12).

3 месяца. Роговица неравномерной толщины и значительно изменена. На большем протяжении, особенно в центральной области, в строме вокруг имплантата – разрастания созревающей и, местами, зрелой соединительной ткани. Имплант частично сохранен, хотя и с очагами истончения и расщепления. В таких очагах в него врастает грануляционная (созревающая соединительная) ткань. В менее зрелых участках со-

единительной ткани множество новообразованных сосудов, обилие клеток (фибробластов). В более зрелых участках на некотором отдалении от границ имплантата – нормальная строма замещена зрелой соединительной (рубцовой) тканью с небольшим количеством сосудов и повышенной клеточностью за счет большого числа преимущественно фибробластов. Пучки коллагеновых волокон стромы разнонаправлены и различной толщины. Передняя пограничная (боуменова) мембрана неравномерной толщины и с извитым ходом. Задняя (десцеметова) мембрана, как и прилегающий к

ней слой стромы (слой Дюа), сохранены в большей степени, но с выраженным и неравномерным склерозом и отеком. Задний эпителий (эндотелий) интактен (рис. 13).

Исследование биомеханических свойств

Результаты биомеханических испытаний представлены на рис. 14 и в табл. 1 и 2. Из анализа формы деформационных кривых видно, что у интактной роговицы присутствуют участки как упругой, так и смешанной деформации, в то время как у имплантата наблюдается практически только упругий участок, после

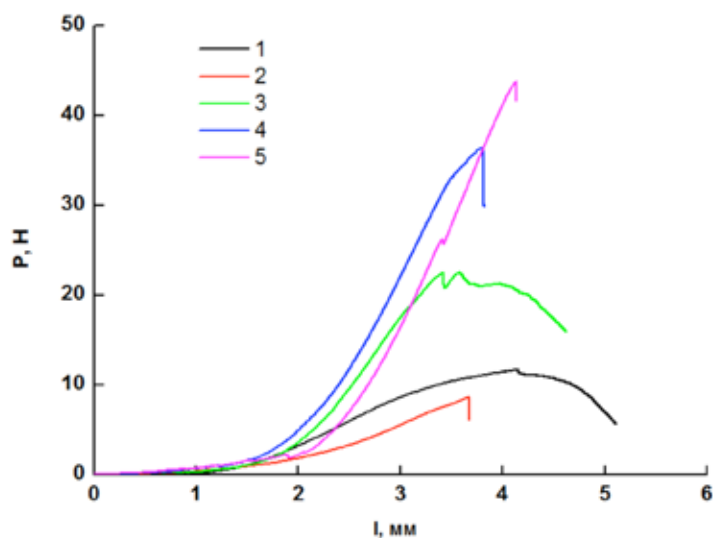


Рис. 14. Типичные деформационные кривые при испытаниях на прокол: неоперированная роговица (1), имплантат (2); оперированная роговица: через 1 мес. после имплантации (3), через 2 мес. после имплантации (4); через 3 мес. после имплантации (5)

Таблица 1

Механические характеристики исследованных образцов			
Имплантат без ghBMP-2	1 мес.	2 мес.	3 мес.
Максимальная нагрузка, Н	13,72±1,4	19,26±1,3	24,97±1,5
Наклон упругой области кривой Н/мм	11,47±0,7	15,96±0,9	17,36±0,9
Имплантат с ghBMP-2	1 мес.	2 мес.	3 мес.
Максимальная нагрузка, Н	22,5±1,3	36,4±1,5	43,8±1,5
Наклон упругой области кривой Н/мм	16,4±0,9	22,8±0,9	27,2±0,9

Таблица 2

Механические характеристики исследованных образцов	
Имплантат	
Максимальная нагрузка, Н	3,7±1,3
Наклон упругой области кривой Н/мм	2,9±0,8
Неоперированная роговица	
Максимальная нагрузка, Н	11,7±1,1
Наклон упругой области кривой Н/мм	5,7±0,7

которого происходит разрушение образца. Также видно, что максимальная нагрузка разрушения у имплантата ниже, чем у нативной роговицы. Однако ситуация резко изменяется при введении имплантата в строум роговицы.

Через месяц после имплантации деформационные кривые роговиц

в контрольной группе и в группе с применением ghBMP-2, имея между собой вид качественно сходный, существенно отличаются от кривых интактной роговицы. При этом механические характеристики роговиц от кроликов из контрольной группы существенно ниже аналогичных свойств второй (опытной)

группы. Аналогичная картина наблюдается и при сравнительных испытаниях образцов роговиц через 2 и 3 мес. после имплантации. Такое положение вещей позволяет сделать вывод о положительном влиянии фактора роста на приживляемость имплантата. Из анализа экспериментальных кривых также видно, что эластичность образцов роговиц кроликов опытной группы несколько выше, чем в контрольной группе (для любого послеоперационного периода). Это может говорить о том, что, скорее всего, даже в долгосрочной перспективе механические характеристики роговиц контрольной группы не сравняются с характеристиками опытной группы.

Особенно наглядно разница видна на зависимостях контролируемых механических параметров от длительности послеоперационного периода (рис. 15). Можно выделить следующие характерные особенности: разница в нагрузках разрушения роговиц для контрольной и опытной групп не уменьшается (даже с учетом разброса результатов); рост этого параметра продолжается и через 3 мес. после имплантации (выход на предельные значения можно ожидать еще через 2-4 мес.); «прочность» роговиц опытной группы практически вдвое больше, чем контрольной; изменение наклона упругой области кривой от времени после имплантации сходно как для контрольной, так и для опытной групп, однако упругость роговиц, обработанных ghBMP-2, существенно выше, и разница не имеет тенденции к уменьшению; параметр «наклон упругой области кривой» демонстрирует, в отличие от нагрузки разрушения, явную тенденцию к «запределению», что может говорить об окончании формирования структуры коллагенового каркаса, которая в дальнейшем будет только укрепляться (прочность) без существенного изменения упругих свойств.

Все изложенные соображения подкрепляют высказанный ранее тезис о том, что даже в долгосрочной перспективе механические характеристики роговиц контрольной группы не сравняются с характеристиками опытной группы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на многолетнюю историю кератопротезирования, проблема надежной фиксации и длительного сохранения кератопротеза в тканях роговицы является весьма актуальной и трудно разрешимой. По нашему мнению, оптимальной для укрепления роговицы является хрящевая ткань, использование которой дает неплохие результаты.

Проведенное нами исследование позволило проверить принципиально новую концепцию укрепляющих кератопластик, в основе которой лежит применение фактора роста rhBMP-2 в составе коллагенового имплантата.

Костные морфогенетические белки (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs) – это группа факторов роста известных своей способностью индуцировать образование костной и хрящевой ткани. Известно порядка 20 видов BMP, отличающихся своей активностью и свойствами. Наиболее широко в клинической практике применяется рекомбинантный rhBMP-2. Продукты на его основе используются при спинальной травме, в челюстно-лицевой хирургии и т.д. Коммерческие препараты на основе коллагена, содержащие rhBMP-2, имеют разрешение Food and Drug Administration (FDA) на применение в клинике. Сам фактор роста в чистом виде для клинического применения не используется. Для достижения выраженного эффекта действия rhBMP-2 в области имплантации должно быть продолжительным в течение, по крайней мере, одной-двух недель. Для этого используют специально разработанные системы доставки – носители. Помимо контролируемого и замедленного высвобождения рекомбинантного BMP-2, носитель должен быть проницаем для новообразованных сосудов и клеток. На сегодняшний день для этих целей наиболее широко применяются носители на основе коллагеновой губки. Однако применение коллагеновой губки в условиях кератопротезирования, по нашему мнению, плохо удовлетворяет требованиям хирургии, в частности, крайне затруднительно имплантировать губчатую структуру

в стромальный карман или подшивать её при поверхностном укреплении. К тому же губчатые материалы явно проигрывают в плане длительного удержания в своей структуре самого фактора роста по сравнению с коллагеновыми мембранами, использование которых в условиях офтальмологических операций представляется нам наиболее целесообразным.

Ранее мы уже продемонстрировали принципиальную возможность контролируемого, замедленного высвобождения рекомбинантного BMP-2 из коллагенового носителя *in vitro* [17]. В данной работе, используя наш предыдущий опыт, мы продемонстрировали роль замедленного высвобождения rhBMP-2 из коллагеновой мембраны в улучшении биомеханических характеристик роговицы *in vivo*. Следует отметить, что примененная коллагеновая мембрана является абсолютно биосовместимым материалом, который не вызывает нежелательных побочных реакций в окружающих тканях.

Количество BMP-2, рекомендуемое к введению человеку, составляет от 4 до 12 мг фактора роста в концентрации 1,5 мг/мл [19]. Количество фактора, которое мы применяли для воздействия на роговицу кролика, было минимальным по сравнению с тем количеством, которое применяется при других реконструктивных операциях. К тому же сочетание разработанного нами носителя и способа его имплантации в роговицу делало выход фактора

роста за пределы стромы практически невозможным, что также должно способствовать минимизации возможных нежелательных эффектов при имплантации.

В итоге нам удалось изменить морфологию нативной роговицы кролика и увеличить ее биомеханические характеристики. Это происходит за счет замещения менее плотных коллагеновых фибрилл стромы роговицы более плотной и механически устойчивой соединительной тканью. К тому же помимо перестройки окружающей стромы мы наблюдали дополнительное формирование соединительной ткани, что позволило увеличить толщину роговицы, что может быть расценено положительно, так как в перспективе позволит восполнять недостаток ткани при хирургии на истонченных бельмах. Умеренный эффект неоваскуляризации роговицы является благоприятным результатом в условиях кератопротезирования, однако требует дальнейшего изучения, под вопросом остается его контролируемость и возможность развития неоваскулярной глаукомы. Суммируя полученные результаты, следует подчеркнуть, что тенденция к повышению прочностных характеристик роговицы под действием rhBMP-2 наблюдается во всех случаях и сохраняется после 3-х месяцев наблюдения.

Дальнейшие перспективы работы связаны с оценкой полученных нами результатов на модели ожогового бельма, а также возможностей

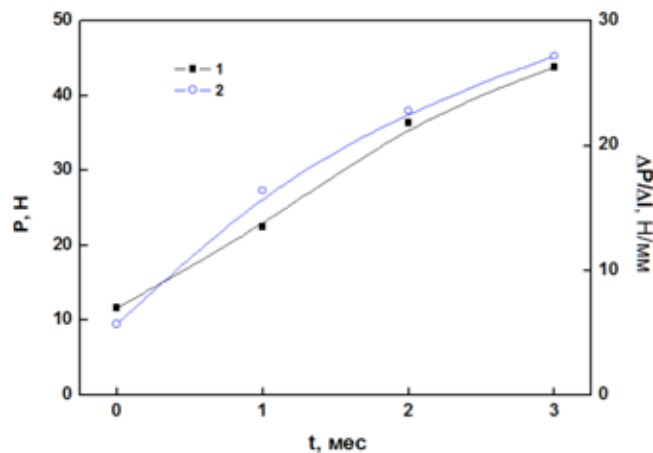


Рис. 15. Изменение максимальной нагрузки (1) и наклона упругой области кривой (2) в зависимости от длительности послеоперационного периода

применения данной методики в условиях реального кератопротезирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе данного исследования удалось установить, что нативный коллаген способен хорошо приживаться в роговице и постепенно замещаться собственными тканями, а также удерживать фактор роста rhBMP-2 при имплантации в ткани роговицы. Значительное увеличение прочностных свойств роговицы на всех этапах эксперимента свидетельствует о перспективности данной работы и её дальнейшего клинического успеха, что требует дополнительной экспериментальной проработки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бедило В.Я., Тарабукин В.И. Значение трансплантации тканей для профилактики разрушений роговицы при ее протезировании // Офтальм. журнал. – 1979. – № 7. – С. 394-396.
2. Войно-Ясенецкий В.В. Разрастание и изменчивость тканей глаза при его заболеваниях и травмах. – Киев, 1979. – 184 с.
3. Гундорова Р.А., Бойко А.В., Ченцова Е.В. Аутоотрансплантация хрящевой ткани при хирургическом лечении послеожоговых бельм // Вестник офтальмологии. – 1982. – № 3. – С. 22-25.
4. Гундорова Р.А., Илуридзе С.Л., Макаров П.В. и др. Иммунологические кри-

терии прогноза кератопластики при бельмах различной этиологии // Катарактальная и рефракционная хирургия. – 2011. – № 2. – С. 28-31.

5. Калинин Ю.Ю. Оптическое биокератопротезирование ожоговых бельм: Дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2005. – 303 с.

6. Нероев В.В., Гундорова Р.А., Макаров П.В. Ожоги глаз. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 224 с.

7. Мороз З.И. Медико-технологическая система оптического кератопротезирования: Дис. ... д-ра мед. наук. – М., 1987. – 312 с.

8. Пучковская Н.А., Якименко С.А., Непомнящая В.М. Ожоги глаз. – М.: Медицина, 2001. – 272 с.

9. Ушаков Н.А. О выборе рационального способа укрепления бельма в интересах сквозного кератопротезирования // Вестник офтальмологии. – 1973. – № 2. – С. 7-10.

10. Федоров С.Н., Мороз З.И., Зуев В.К. Кератопротезирование. – М.: Медицина, 1982. – 144 с.

11. Ченцова Е.В. Система патогенетически обоснованного лечения ожоговой травмы глаз: Дис. ... д-ра мед. наук. – М., 1996. – 304 с.

12. Brown R.A., Phillips J.B. Cell responses to biomimetic protein scaffolds used in tissue repair and engineering // Int. Rev. Cytol. – 2007. – Vol. 262. – P. 75-150.

13. Jin C.Z., Park S.R., Choi B.H. et al. In vivo cartilage tissue engineering using a cell-derived extracellular matrix scaffold // Artif. Organs. – 2007. – Vol. 31, № 3. – P. 183-192.

14. Lavik E., Langer R. Tissue engineering: current state and perspectives // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2004. – Vol. 65, № 1. – P. 1-8.

15. Mesa J.M., Zaporozhan V., Weinand C. et al. Tissue engineering cartilage with aged articular chondrocytes in vivo // Plast. Reconstr. Surg. – 2006. – Vol. 118, № 1. – P. 41-49.

16. Mikos A.G., Herring S.W., Ocbareon P. et al. Engineering complex tissues // Tissue Eng. 2006. – Vol. 12, № 12. – P. 3307-3339.

17. Osidak E.O., Osidak M.S., Sivogriyov D.E. et al. Regulation of the binding of the BMP-2 growth factor with collagen by blood plasma fibronectin // Prikl. biokhim. Mikrobiol. – 2014. – Vol. 50, № 2. – P. 226-231.

18. Sampath T.K., Rashba K.E., Doctor J.S. et al. Drosophila transforming growth factor beta superfamily proteins induce endochondral bone formation in mammals // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1993. – Vol. 90, № 13. – P. 6004-6008.

19. Simmonds M.C., Brown J.V., Heirs M.K. et al. Safety and effectiveness of recombinant human bone morphogenetic protein-2 for spinal fusion: a meta-analysis of individual-participant data // Ann. Intern. Med. – 2013. – Vol. 158, № 12. – P. 877-889.

20. Wang E.A., Rosen V., D'Alessandro J.S. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1990. – Vol. 87, № 6. – P. 2220-2224.

21. Wbu S.W., Hung K.C., Hsieh K.H. et al. In vitro and in vivo evaluation of chitosan-gelatin scaffolds for cartilage tissue engineering // Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. – 2013. – Vol. 33, № 5. – P. 2855-2863.

22. Yang Q., Peng J., Guo Q. et al. A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells // Biomaterials. – 2008. – Vol. 29, № 15. – P. 2378-2387.

Поступила 05.07.2016.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-15-00133) для АСК (получение rhBMP-2).

НОВОЕ
В
ОФТАЛЬМОЛОГИИ

Электронная версия www.eyepress.ru

РЕФЕРАТИВНО-ИНФОРМАЦИОННЫЙ ЖУРНАЛ

ООО «Издательство «Офтальмология»