

Р.З. Кадыров, И.Р. Карачурина, Г.И. Гарипова, С.Р. Гатиятуллина
**БИОИНЖЕНЕРНЫЕ ЭКВИВАЛЕНТЫ СТРОМЫ РОГОВИЦЫ
НА ОСНОВЕ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ КОЛЛАГЕНУ МАТЕРИАЛОВ**
*ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии»
Минздрава России, г. Уфа*

Цель исследования: изучить состояние проблемы по созданию искусственной роговицы на основе анализа литературы за последние 10 лет.

Материал и методы. Нами были изучены результаты исследований 42 зарубежных научных источников. В этих публикациях авторы предлагают следующие материалы для создания искусственной роговицы: желатиновые гидрогели, ацеллюлярная роговица, коллагеноподобные пептиды, фиброин шелка и синтетические полимеры.

Результаты и обсуждение. В отличие от коллагена эти биоконструкции более стабильны по биомеханическим свойствам, но вызывают более выраженную иммунную реакцию организма после трансплантации, лишь желатиновые гидрогели вызывают меньшую антигенную реакцию. Коллагеноподобные короткие пептиды обладают способностью к самосборке и создают цепи с заданными свойствами. Этот процесс напоминает эмбриональное развитие роговицы. Роговицу свиней, обработанную различными методами, используют для создания ацеллюлярной роговицы, которая обладает низкой иммуногенностью и по структуре близка к нативной роговице. Фиброин шелка характеризуется высокой прочностью и используется как альтернатива амниотической мембране. Синтетические полимеры чаще применяются в комплексе с нативными соединениями внеклеточного матрикса. Деструкция этих подложек зависит от концентрации полимеров и протекает длительно.

Заключение. Таким образом, несмотря на широкий ряд предлагаемых неколлагеновых материалов для создания искусственной роговицы, требуется дальнейший поиск оптимальных биоконструкций, обладающих качествами донорской роговицы.

Ключевые слова: искусственная роговица, биоинженерия, желатиновые гидрогели, коллагеноподобные пептиды, ацеллюлярная роговица, синтетические полимеры, фиброин шелка.

R.Z. Kadyrov, I.R. Karachurina, G.I. Garipova, S.R. Gatiyatullina
**BIOENGINEERING EQUIVALENTS OF THE CORNEAL STROMA
BASED ON THE MATERIALS ALTERNATIVE TO COLLAGEN**

Purpose: to examine the state of the problem to create an artificial cornea based on the analysis of literature for the last 10 years.

Material and methods. We have studied the results of the research based on 42 foreign scientific sources. In these publications the authors offer the following materials: gelatin hydrogels, acellular cornea, collagen-like peptides, silk fibroin and synthetic polymers.

Results and discussion. Unlike collagen, these bioconstructions are more stable in biomechanical properties but cause a more pronounced immune response of the body after transplantation. Only gelatin hydrogels cause a lesser antigenic reaction. Collagen-like short peptides have the ability to self-assemble and create chains with desired properties. This process resembles an embryonic development of the cornea. The cornea of pigs treated by different methods is used to create an acellular cornea which has low immunogenicity and structurally is close to the native cornea. The silk fibroin is characterized by high strength and is used as an alternative to the amniotic membrane. Synthetic polymers are often used in combination with native compounds of the extracellular matrix. The destruction of these substrates depends on the concentration of polymers and takes a long time.

Conclusions. Thus, despite a wide variety of the proposed non-collagen materials for the creation of the artificial cornea, further search for optimal bioconstructions with donor corneal qualities is required.

Key words: artificial cornea, bioengineering, gelatin hydrogels, collagen-like peptides, acellular cornea, synthetic polymers, silk fibroin.

В отечественной и зарубежной литературе достаточно много информации о регенерации эпителия роговицы. В то же время значительно меньше данных о восстановлении ее стромы. В последнее время были проведены большие разработки в этом направлении с использованием коллагена.

Кроме коллагена для конструирования стромы роговицы используются различные материалы природного происхождения (фиброин шелка, рыба чешуя, бесклеточная (ацеллюлярная) роговица, желатиновые гидрогели, коллагеноподобные пептиды) и синтетические соединения. Одним из существенных преимуществ этих материалов являются их биомеханические свойства, которые значительно лучше, чем у коллагена. Вместе с тем некоторые из этих материалов не всегда отвечают требованиям биоинтеграции, поскольку являются чужеродными для глаза.

Желатиновые гидрогели. Желатин является денатурированной формой коллагена и в отличие от коллагенового геля обладает более высокой способностью к биodeградации и биоабсорбции. Так же, как и коллагеновые гидрогели, желатиновые гидрогели могут быть использованы после кроссликинга, улучшающего их биомеханические свойства. Тем не менее желатин менее подвержен антигенным реакциям.

В начале исследований использовался порозный желатиновый гидрогель как проводник для пролиферации предшественников фибробластов и дифференцированных фибробластов в строме роговицы кроликов. Подложки с клетками имплантировали в средней части стромы роговицы кроликов. Они синтезировали виментин, ламинин, коллаген 1 и 4 типов через неделю после операции. Роговицы животных в ходе наблюдения оставались

прозрачными без признаков воспаления и иммунных реакций. Отмечается также, что подложки слабо деградировали в течение указанного периода наблюдения.

В опытах *in vitro* было показано [7], что включение хондроитин сульфата (ХС) улучшает биосовместимость желатинового гидрогеля по данным клеточной адгезии и пролиферации кератоцитов. Увеличение концентрации ХС в подложке увеличивает синтез коллагена и гликозаминогликанов (ГАГ) кератоцитами кролика, при этом не наблюдается цитотоксичности и экспрессии провоспалительного IL-6.

Ян и Гао с соавт. [2,12] исследовали биосовместимость композитных желатин-полилактидных пленок и кератоцитов эпителиальных клеток. Формировали пленки, засеянные клетками роговицы кролика, двух типов – со случайной ориентацией волокон, где эпителиальные клетки показали несколько лучшую пролиферацию, и с параллельной ориентацией волокон, с преимущественным увеличением кератоцитов.

Ацеллюлярная роговица (АР). В настоящее время одним из хорошо изученных материалов для замещения стромы роговицы является ацеллюлярная роговица, которая обладает низкой иммуногенностью. Кроме этого, она наиболее близка по строению к нативной роговице по типу организации коллагеновых фибрилл и содержанию протеогликанов. Методы децеллюризации включают: замораживание, методы осцилляции, использование детергентов (тритон, додецилсульфат натрия и деоксихолат натрия) и ферментов, обработку кислотами и щелочами, гипотоническими или гипертоническими растворами. Наилучшие результаты дает применение комбинированных методов обработки.

Большинство исследований по АР были выполнены в Китае на роговице свиней и некоторые из этих исследований проведены на пациентах. Ацеллюлярная роговица свиней обладает хорошей гистосовместимостью и низкой иммуногенностью, а также по содержанию коллагенов и протеогликанов она почти не отличается от роговицы человека и совпадает с ней на 91%.

Ма с соавт. [8] биоинженерную роговицу создавали из пластов АР свиней толщиной 20 мкм, которые помещались на дефект роговицы кроликов. После накладки первого пласта его поверхность засеивалась кератоцитами. Затем накладывался следующий пласт, который снова засеивался кератоцитами. И так накладывали 5 пластов АР с засеянными ке-

ратоцитами. Такой метод кератопластики давал хорошие результаты.

Чжан Х. с соавт. [14] провели переднюю послойную кератопластику с АР свиней пациентам с грибковыми язвами роговицы. У 25 пациентов наблюдалась неоваскуляризация трансплантатов, которая уменьшалась по ходу наблюдения. Через месяц после операции у всех пациентов исчез отек и восстановилась прозрачность роговицы.

Кроме АР свиней для кератопластики также использовалась АР человека. На 64 пациентах с вирусными, бактериальными и грибковыми кератитами, а также с ожогами роговицы проводилась передняя глубокая послойная кератопластика с применением АР человека – не было ни одного случая отторжения трансплантата.

Недавно были проведены исследования [13] с целью создания модели роговицы для сквозной кератопластики. Из АР свиней формировали образцы 2-х типов: 1-й включал Боуменову мембрану и передние слои стромы роговицы, 2-й состоял из задних слоев стромы и Десцеметовой мембраны. Оба типа подложек засеивались клетками роговицы человека, затем были имплантированы с помощью сквозной кератопластики 20 кроликам. Наблюдение велось в течение 28 дней. Модель роговицы 1-го типа постепенно восстанавливала прозрачность к 7-му дню после операции. Однако к 14-му дню появились отек роговицы и гиперемия конъюнктивы, свидетельствующие о начале отторжения трансплантата. Аналогичные изменения происходили и в образце 2 типа, но при этом роговица оставалась мутной. Авторы делают вывод о том, что трансплантат 1-го типа подходит для сквозной кератопластики роговицы человека, но требует дальнейшего изучения.

Коллагеноподобные пептиды. Одним из перспективных направлений в регенеративной медицине и биоинженерии является использование амфифильных коротких пептидов для создания элементов внеклеточного матрикса и других компонентов тканей. Короткие пептиды в зависимости от набора аминокислот формируют наноструктуры с направленными свойствами [3].

Исследователями группы Мэй Гриффитс [5,6] были изучены гидрогели, содержащие комплекс коллагеноподобного пептида (CLP- collagen like peptide) с полиэтиленгликоль малеимидом (PEG), пентапептиды YIGSR (тирозин-изолейцин-глицин-серин-аргинин) и IKVAV (изолейцин-лизин-валин-аланин-валин). Комплекс подвергали кросс-

линкингу с использованием карбодиимида (EDC) и N- гидроксисукцинимид (NHS). Сформированные подложки имплантировали при помощи послойной кератопластики кроликам и морским свинкам и наблюдали в течение 6-12 месяцев. До 3 месяцев после имплантации наблюдался незначительный рост сосудов, совпадавший с ухудшением прозрачности. Затем рост сосудов прекращался и при этом восстанавливалась прозрачность роговицы. В эти сроки импланты покрывались эпителием. Через 6 месяцев в строме появлялись субэпителиальные нервные волокна, а механическая чувствительность не отличалась от нормы. К 12 месяцам полностью сформировались многослойный эпителий, нервные волокна и популяция стромальных клеток, сходные с нормальной роговицей.

Фиброин шелка. Шелк – это продукт жизнедеятельности тутового шелкопряда (*Bombyx mori*) и личинок ночных бабочек других видов. В последние годы значительно возрос интерес к шелку как к материалу для решения биоинженерных задач в разных областях медицины. Шелковые волокна состоят в основном из двух типов протеинов – фиброина и серицина. Для биоинженерных целей используется очищенный от серицина фиброин. Он в зависимости от способа обработки может приобретать структуру пленок, губок, гидрогелей и фиброзных матриксов. Фиброин шелка обладает исключительными биомеханическими свойствами. Например, прочность фиброина на разрыв превышает прочность коллагена – 610-690 МПа и 0,9-7,4 МПа соответственно в зависимости от способа обработки [4]. В то же время фиброин подвергается биodeградации, время которой зависит от типа его структуры и составляет от 2 месяцев до года.

Механическая прочность и особенности биodeградации фиброина определяются его вторичной структурой, так называемыми β -листами, антипараллельными складками молекулы, которые удерживаются водородными связями. Чем больше число β -листов, тем прочнее фиброин и тем дольше его время деградации. Предлагается использовать фиброин как заменитель амниотической мембраны (АМ) для лечения поверхностных повреждений глаза.

Для фиброина шелка, несмотря на его прозрачность при толщине пленок от 5 до 50 мкм, все же характерно ухудшение оптических свойств при увеличении толщины материала. Например, при толщине около 150 мкм фиброиновые пленки становятся непрозрач-

ными [1]. Несмотря на это ряд исследователей изучают возможности использования фиброиновых подложек для моделирования стромы роговицы. В этом смысле интерес представляют работы группы Дэвида Каплана, которая исследовала особенности биосовместимости и деградации фиброина, миграции и пролиферации клеток роговицы и нервных клеток на фиброиновых пленках [10].

Применение полимеров. Синтетические полимеры, такие как полигликолевая кислота (PGA), полимолочная кислота (PLA), полилактид-гликолид (PLGA), поли- ϵ -капролактон (PCL), полиглицерол-себакат (PGS), полиэстер уретан карбамид (PEUU) и полигидроксиалканоаты (PHA), используют в биоинженерии тканей в силу их биосовместимости, биodeградации и высоких биомеханических свойств. Такие полимеры, как PGA, PLGA, PCL и PLA, одобрены FDA (Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (США)) и применяются для биоинженерии элементов стромы роговицы.

Исследователи во главе с Sharma S. [9] в опытах *in vitro* изучили структуру, механические и оптические свойства подложек из PCL, сформированных методом электроспиннинга. Одной из задач их работы было протестировать подложки для возможного использования в качестве замены амниотической мембраны (АМ). Подложки засеивались лимбальным эпителием из донорских глаз и культивировались в течение двух недель для изучения процессов адгезии, пролиферации и выживаемости клеток. Эпителиальные клетки мигрировали с периферии подложки и через 24 часа прикреплялись к синтетическому матриксу, к 7-10 дню инкубации формировали однослойный, а к 10-14 дню – полноценный многослойный эпителий. Это подтверждалось наличием экспрессии маркеров корнеальных эпителиальных клеток – цитokerатинов K3/12, K19, интегринов $\beta 1$ и ABCG2.

Интересные исследования по созданию стромы роговицы *in vitro* были проведены в группе Джеймса Фанденберга, которая известна по исследованиям свойств стромальных стволовых клеток роговицы (ССКР). Авторы использовали в качестве подложек для ССКР, изготовленных методом электроспиннинга из PEUU толщиной 200 мкм. Культивирование проводили на подложках с параллельно ориентированными и случайно направленными волокнами и со слитной структурой, не содержащей нити. На подложках с параллельной ориентацией волокон

ССКР вытягивались вдоль нити и приобрета-ли свойства кератоцитов, которые синтезиро-вали высокоорганизованный коллагеновый матрикс, сходный с коллагеном 1-го типа. На

подложках двух других типов также наблю-дался синтез сходного внеклеточного матрик-са, однако ориентация волокон была случай-ной [11].

Сведения об авторах статьи:

Кадыров Радик Завилович – д.м.н., генеральный директор ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирур-гии» Минздрава России. Адрес: 450075, г. Уфа, ул. П. Зорге, 67/1. E-mail: radkad@yandex.ru.

Карачурина Ирина Рависовна – врач-офтальмолог ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России. Адрес: 450075, г. Уфа, ул. П. Зорге, 67/1. E-mail: 79273361909@yandex.ru.

Гарипова Гузель Ильясовна – врач-офтальмолог ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Мин-здрава России. Адрес: 450075, г. Уфа, ул. П. Зорге, 67/1. E-mail: guzelka-garipova@rambler.ru.

Гатиятуллина Светлана Рамильевна – врач-офтальмолог ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирур-гии» Минздрава России. Адрес: 450075, г. Уфа, ул. П. Зорге, 67/1. E-mail: gatiyatullinaS@yandex.ru.

ЛИТЕРАТУРА

1. A dual-layer silk fibroin scaffold for reconstructing the human corneal limbus / L.J. Bray [et al.] // *Biomaterials*. – 2012. – Vol. 33, №13. – P. 3529-3538.
2. Aligned fibrous scaffold induced aligned growth of corneal stroma cells in vitro culture / G. Yan [et al.] // *Chem. Res. Chin. Univ.* – 2012. – №28. – P. 1022–1025.
3. Peptide-based functional biomaterials for soft-tissue repair / K. Hosoyama [et al.] // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2019. – №7. – P. 1-19.
4. Silkworm silk-based materials and devices generated using bio-nanotechnology / W. Huang [et al.] // *Chem. Soc. Rev.* – 2018. – Vol. 47, №17. – P. 6486–6504.
5. Islam, M.M. Multifunctional biomimetic materials for corneal regeneration: thesis for doctoral degree (Ph.D.). – Karolinska Institutet, Sweden, 2016. – 32 p.
6. Short peptide analogs as alternatives to collagen in pro-regenerative corneal implants / J.R. Jangamreddy [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2018. – №69. – P. 120-130.
7. Lai, J.Y. Corneal stromal cell growth on gelatin/chondroitin sulfate scaffolds modified at different NHS/EDC molar ratios / J.Y. Lai // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14, №1. – P. 2036-2055.
8. Corneal stroma regeneration with acellular corneal stroma sheets and keratocytes in a rabbit model / X.Y. Ma [et al.] // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10, №7. – P. e0132705.
9. Cellular response of limbal epithelial cells on electrospun poly-ε-caprolactone nanofibrous scaffolds for ocular surface bioengineering: a preliminary in vitro study / S. Sharma [et al.] // *Molecular Vision*. – 2011. – №17. – P. 2898-2910.
10. In vitro 3D corneal tissue model with epithelium, stroma, and innervations / S. Wang [et al.] // *Biomaterials*. – 2017. – №112. – P. 1–9.
11. Bioengineering organized, multilamellar human corneal stromal tissue by growth factor supplementation on highly aligned synthetic substrates / J. Wu [et al.] // *Tissue Engineering: Part A*. – 2013. – Vol. 19, №17-18. – P. 2063-2075.
12. Effect of fiber alignment in electrospun scaffolds on keratocytes and corneal epithelial cells behavior / J. Yan [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res.: Part A*. – 2012. – Vol. 100, №2. – P. 527–535.
13. Construction of a full-thickness human corneal substitute from anterior acellular porcine corneal matrix and human corneal cells / K. Zhang [et al.] // *Int. J. Ophthalmol.* – 2019. – Vol. 12, №3. – P. 351-362.
14. Lamellar keratoplasty treatment of fungal corneal ulcers with acellular porcine corneal stroma / M.C. Zhang [et al.] // *Am. J. Transplant.* – 2015. – Vol. 15, №4. – P. 1068-1075.

REFERENCES

1. Bray L.J. [et al.]. A dual-layer silk fibroin scaffold for reconstructing the human corneal limbus. *Biomaterials*. 2012;33(13):3529-3538 (in Engl.). doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.01.045.
2. Yan G. [et al.]. Aligned fibrous scaffold induced aligned growth of corneal stroma cells in vitro culture. *Chem. Res. Chin. Univ.* 2012;(28):1022–1025 (in Engl.).
3. Hosoyama K. [et al.]. Peptide-based functional biomaterials for soft-tissue repair. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019;(7):1-19 (in Engl.). doi: 10.3389/fbioe.2019.00205.
4. Huang W. [et al.]. Silkworm silk-based materials and devices generated using bio-nanotechnology. *Chem. Soc. Rev.* 2018;47(17):6486–6504 (in Engl.). doi: 10.1039/c8cs00187a.
5. Islam M.M. Multifunctional biomimetic materials for corneal regeneration: thesis for doctoral degree (Ph.D.). Karolinska Institutet. Sweden. 2016. 32 p. (in Engl.).
6. Jangamreddy J.R. [et al.]. Short peptide analogs as alternatives to collagen in pro-regenerative corneal implants. *Acta Biomaterialia*. 2018;(69):120-130 (in Engl.). doi: 10.1016/j.actbio.2018.01.011.
7. Lai J.Y. Corneal stromal cell growth on gelatin/chondroitin sulfate scaffolds modified at different NHS/EDC molar ratios. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14(1):2036-2055 (in Engl.). doi: 10.3390/ijms14012036.
8. Ma X.Y. [et al.]. Corneal stroma regeneration with acellular corneal stroma sheets and keratocytes in a rabbit model. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132705 (in Engl.). doi: 10.1371/journal.pone.0132705.
9. Sharma S. [et al.]. Cellular response of limbal epithelial cells on electrospun poly-ε-caprolactone nanofibrous scaffolds for ocular surface bioengineering: a preliminary in vitro study. *Molecular Vision*. 2011;(17):2898-2910 (in Engl.).
10. Wang S. [et al.]. In vitro 3D corneal tissue model with epithelium, stroma, and innervations. *Biomaterials*. 2017;(112):1–9 (in Engl.). doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.09.030.
11. Wu J. [et al.]. Bioengineering organized, multilamellar human corneal stromal tissue by growth factor supplementation on highly aligned synthetic substrates. *Tissue Engineering: Part A*. 2013;19(17-18):2063-2075 (in Engl.). doi: 10.1089/ten.TEA.2012.0545.
12. Yan J. [et al.]. Effect of fiber alignment in electrospun scaffolds on keratocytes and corneal epithelial cells behavior. *J. Biomed. Mater. Res.: Part A*. 2012;100(2):527–535 (in Engl.). doi: 10.1002/jbm.a.33301.
13. Zhang K. [et al.]. Construction of a full-thickness human corneal substitute from anterior acellular porcine corneal matrix and human corneal cells. *Int. J. Ophthalmol.* 2019;12(3):351-362 (in Engl.). doi: 10.18240/ijo.2019.03.01.
14. Zhang M.C. [et al.]. Lamellar keratoplasty treatment of fungal corneal ulcers with acellular porcine corneal stroma. *Am. J. Transplant.* 2015;15(4):1068-1075 (in Engl.). doi: 10.1111/ajt.13096.