

DOI: <https://doi.org/10.25276/2410-1257-2021-2-68-71>

Поиск оптимальных условий для хранения роговичных тканеинженерных конструкций

С.А. Борзенко^{1,2}, С.В. Костенев¹, А.В. Дога¹, В.Г. Ли¹, Д.С. Островский¹, М.Х. Хубецова¹¹ ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени акад. С.Н. Фёдорова» МЗ РФ, Москва² ФГБОУ ВО «МГМСУ имени А.И. Евдокимова» МЗ РФ, Москва

РЕФЕРАТ

Цель. Сравнение прозрачности дегидратированных и недегидратированных тканеинженерных конструкций роговицы после криоконсервации.

Материал и методы. Прозрачность тканеинженерных конструкций роговицы оценивали методом спектрофотометрии. Были сформированы 3 группы сравнения: 1-я группа – контрольная (свежие лентиккулы), 2-я группа – NaCl⁻ (тканеинженерная конструкция без обезвоживания), 3-я группа – NaCl⁺ (тканеинженерная конструкция с предварительной дегидратацией). Данные спектрофотометра оценивались в 2 этапа. На первом этапе измеряли прозрачность контрольной груп-

пы (n=30). На втором этапе исследовали прозрачность двух опытных групп после хранения в DMSO (группы NaCl⁻ и NaCl⁺).

Результаты. В группе NaCl⁺ прозрачность незначительно снижена по сравнению с контролем, а наиболее приближен к контролю был протокол с использованием NaCl⁻.

Заключение. В целом, группы NaCl⁻ и NaCl⁺ незначительно теряют свою прозрачность после размораживания в сравнении с контролем, поэтому обе группы могут рассматриваться как взаимозаменяемые.

Ключевые слова: хранение, криоконсервация, лентиккула, роговица, децеллюляризация, тканевая инженерия. ■

Точка зрения. Восток – Запад. 2021;2:68–71.

ABSTRACT

Research optimal conditions for storing of tissue-engineered corneas

S.A. Borzenok^{1,2}, S.V. Kostenev¹, A.V. Doga¹, V.G. Li¹, D.S. Ostrovskiy¹, M.K. Khubetsova¹¹ S.N. Fyodorov NMRC Eye Microsurgery Federal State Institution of the Russian Ministry of Health. Moscow² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry» of the Russian Ministry of Health. Moscow

Purpose. To compare the transparency of dehydrated and non-dehydrated tissue-engineered corneas for cryopreservation.

Materials and methods. Assessment transparency of tissue-engineered corneas using spectrophotometry. For comparison, three groups were performed: 1 – control group (fresh lenticules), 2 – NaCl⁻ group (dehydrated tissue-engineered corneas), 3 – NaCl⁺ group (non-dehydrated tissue-engineered corneas). The spectrophotometer data was evaluated in 2 stages. At stage 1, the transparency of the control group was measured (n=30). At the second stage, the transparency of two experimental groups after storage in DMSO (groups NaCl⁻ and NaCl⁺) was investigated.

Results. In the NaCl⁺ group, the transparency slightly decreased compared to the control, and the protocol using NaCl⁻ was the closed to the control.

Conclusion. In general, after thawing the NaCl⁻ and NaCl⁺ groups slightly decrease their transparency in comparison with the control, so both groups can replace each other.

Key words: storage, cryopreservation, lenticule, cornea, decellularization, tissue engineering. ■

Point of View. East – West. 2021;2:68–71.

Операция ReLEx SMILE является полностью фемтосекундной технологией, позволяющей корригировать миопию и сложный миопический астигматизм [1]. В ходе данной операции остается лентиккула, которая может расцени-

ваться как истинный трансплантат. Было показано, что повторная имплантация лентиккулы может восстанавливать как объем стромы роговицы, так и показатели аномалии рефракции после операции, как это было продемонстрировано на моде-

лях кроликов и обезьян [2, 3]. Также существуют сообщения о коррекции кератоконуса и гиперметропии с помощью имплантации интрастромальных лентиккул [4, 5]. Однако в большинстве работ применялась свежая лентиккула, что мо-

Таблица

Оценка прозрачности лентикулы и ТК после криоконсервирования		
№	Действующие компоненты	Описание методики
2	1,5 M NaCl + ДНКаза 5 Ед/мл и РНКаза 5 Ед/мл n=30	Инкубация в 1,5 M растворе хлорида натрия в течение 48 часов, с заменой раствора каждые 24 часа. Затем инкубация в растворе ДНКазы 5 Ед/мл (Sigma-Aldrich) и РНКазы 5 Ед/мл (Sigma-Aldrich) в течение 48 часов. Далее отмывка в растворе PBS в течение 72 часов, с заменой каждые 24 часа. Процедура децеллюляризации проводилась при комнатной температуре и при непрерывном встряхивании в шейкере.

жет ограничить ее использование в будущем. Решением данной проблемы может являться успешное хранение свежих лентикул с помощью различных криогенных консервантов [6-8].

Кроме того, наличие клеток в свежей ткани роговицы потенциально повышает риск иммунного отторжения лентикулы при трансплантации. Для решения этой задачи технологии тканевой инженерии, а именно методы децеллюляризации, позволяют создавать тканеинженерные конструкции роговицы (ТК). Целью данной методики является максимальное удаление клеток для снижения антигенной нагрузки при минимальном воздействии на структуру внеклеточного матрикса (ВКМ) [9-11]. Проблема хранения ТК является актуальной и общеизвестно, что после децеллюляризации лентикула набухает за счет отека коллагеновых волокон, что является критичным моментом, поскольку наличие жидкости в тканях при заморозке может привести к образованию кристаллов льда и разрушению клеток. Это приведет к нарушению прозрачности после размораживания тканей. На данный момент в литературе еще не было описано хранение ТК в диметилсульфоксиде (DMSO). В нашей работе мы попытались понять в рамках оценки прозрачности, существует ли связь между отечной и обезвоженной ТК после хранения в диметилсульфоксиде (DMSO). Для дегидратации ТК был использован разрешенный к клиническому применению в офтальмологии дисперсный вискоэластик (ДВ), содержащий 3,0% гиалуронат натрия и 4,0%-й хондроитин сульфат, массой 600.000 Дальгон.

ЦЕЛЬ

Сравнение прозрачности дегидратированных и недегидратированных тканеинженерных конструкций роговицы после криоконсервирования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Лентикулы были получены после операции ReLex SMILE для коррекции миопии средней степени и сложного миопического астигматизма (цилиндр до $-0,75$ дптр) на базе головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава РФ. Сферический эквивалент до операции ReLex SMILE составлял $-4,72 \pm 0,86$ дптр. Параметры лентикулы: толщина 77-120 мкм, ее диаметр 6,5 мм. Обработка лентикулы натрием хлоридом с нуклеазами (NaCl) проходила в лаборатории *in vitro*, в стерильных условиях на базе Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем головной организации МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова (табл.).

Спектральное пропускание лентикулы определяли с помощью спектрофотометра Multiskan GO (Thermo Scientific, США) с длиной волны света от 380 до 780 нм, с шагом 10 нм. Данные спектрофотометра оценивались в 2 этапа. На 1-м этапе измеряли нативные лентикулы – контрольная группа (n=30). На втором этапе исследовали прозрачность двух опытных групп после хранения. Важно заметить, что после децеллюляризации и перед хранением одну часть

образцов дегидратировали в ДВ в течение 1 часа (n=15), а другую часть не обезвоживали в ДВ (n=15). В связи с этим были сформированы две опытные группы: одна без добавления ДВ (NaCl-), а другая с добавлением ДВ (NaCl+).

Протокол хранения. Образцы групп для NaCl- и NaCl+ переносили в криопробирки, содержащие 1 мл 80%-й тканевой культуральной среды (среда Борзенко-Мороз) и 20%-й DMSO (Applichem, США). Далее криопробирки (Corning, США) помещали в контейнер coolcell (Corning, США) и переносили в низкотемпературный морозильник на 1 сутки, после чего контейнер переносили в сосуд Дьюара с жидким азотом с постоянной температурой -196°C . Далее через два дня образцы сначала размораживали на водяной бане, потом отмывали трижды в PBS. С целью снятия отека образцы обезвоживали в ДВ 1 час, затем их переносили в лунки 96-луночного планшета для измерения коэффициента пропускания (%). В качестве расчетного значения для статистического анализа данных использовали среднее для всей группы по 41 точке прозрачности полученного спектра.

В качестве описательных статистик переменных использовали среднее со стандартным отклонением ($M \pm SD$) и медиану с межквартильным размахом (Me (1-3 квартили)). Нормальность распределения переменных оценивалась с использованием теста Шапиро-Уилка. Гомогенность дисперсий оценивалась с помощью теста Бартлетта. Для сравнения прозрачности лентикул в рамках одного протокола обработки был использован кри-

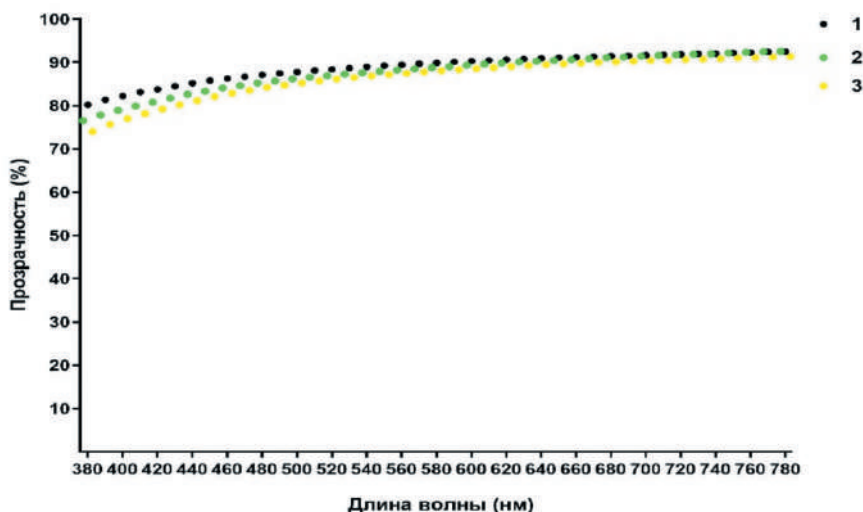


Рис. 1. Среднее спектральное пропускание на длинах волн от 380 до 780 Нм
Примечание: 1 – контрольная группа, 2 – группа NaCl-, 3 – группа NaCl+

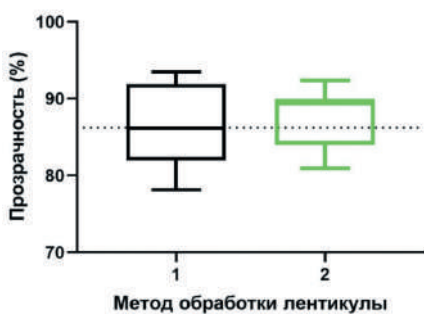


Рис. 3. Графики сравнения прозрачности 1-й (контрольной) и 2-й группы (NaCl-)

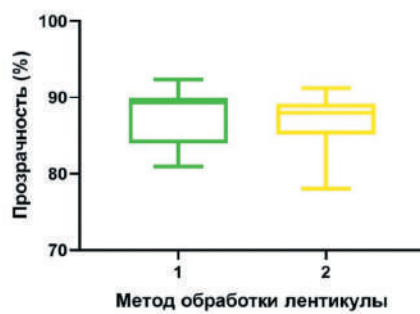


Рис. 4. Графики сравнения прозрачности 1-й (NaCl-) и 2-й (NaCl+) групп

терий Уилкоксона для двух зависимых групп и Т-критерий Стьюдента для парных и зависимых выборок: сравнивались связанные выборки в двух разных точках, например, контроль-протокол. Для сравнения независимых выборок был использован U-критерий Манна-Уитни, например, протокол-протокол. При оценке результатов статистически значимыми считали результаты при значениях $p < 0,05$. Данные визуализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8.4.3. Анализ полученных данных проводили с использованием среды для статистических вычислений R версии 4.0.2. (R Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные данные представлены на рисунках 1-4. В частности, как видно из *рисунка 1*, прозрачность в группе NaCl+ незначительно снижена по сравнению с контролем, тогда как наиболее приближен к контролю протокол с использованием NaCl-.

Проведенный анализ выявил статистически значимые различия (*рис. 2*) в группах контроль – NaCl+: $90,83 \pm 0,95$ против $86,47 \pm 4,07$; $(90,77 (90,10-91,60)$ против $88,01 (85,92-89,13)$; $p < 0,0001$). На *рис. 3* и *4* показано отсутствие статистически значимых различий, как в группах контроль – NaCl-: $86,87 \pm 5,40$ против $87,57 \pm 3,51$; $(86,17 (82,05-91,75)$ $89,35$

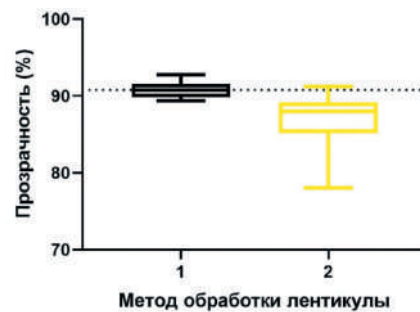


Рис. 2. Графики сравнения прозрачности 1-й (контрольной) и 2-й группы (NaCl+)

против $(85,17-89,90)$; $p \geq 0,596$), так и в группах NaCl- – NaCl+: $87,57 \pm 3,51$ против $86,47 \pm 4,07$; $(89,35 (85,17-89,90)$ против $(88,01 (85,92-89,13)$; $p \geq 0,345$) соответственно.

Таким образом, полученные представленные выше данные свидетельствуют, что, во-первых, предварительная дегидратация в ДВ, полученной ТК может незначительно уменьшить ее прозрачность в сравнении с контролем, и во-вторых, по-видимому, DMSO как мембранопроникающий криопротектор не приводит к значительному повреждению коллагеновой ультраструктуры внеклеточного матрикса ТК за счет препятствования образования кристаллов льда на внутриклеточном уровне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании нашего исследования мы считаем, что в целом группы NaCl- и NaCl+ незначительно теряют свою прозрачность после размораживания в сравнении с контролем. Обе группы могут рассматриваться как взаимозаменяемые.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sekundo W., Kunert K.S., Blum M. Small incision corneal refractive surgery using the small incision lenticule extraction (SMILE) procedure for the correction of myopia and myopic astigmatism: results of a 6 month prospective study. Br. J. Ophthalmol. 2011; 95 (3): 335-339.
2. Angunawela R.I., Riau A.K., Chaurasia S.S. et al. Refractive lenticule re-implantation after myopic ReLEx: a feasibility study of stromal restoration after refractive surgery in a rabbit model. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2012; 53 (8): 4975-4985.

3. Riau A.K., Angunawela R.I., Chaurasia S.S. et al. Reversible femtosecond laser-assisted myopia correction: a non-human primate study of lenticule re-implantation after refractive lenticule extraction. PLoS One. 2013; 8 (6): e67058
4. Pradhan K.R., Reinstein D.Z., Carp G.I. et al. Femtosecond laser-assisted keyhole endokeratophakia: correction of hyperopia by implantation of an allogeneic lenticule obtained by SMILE from a myopic donor. J. Refract. Surg. 2013; 29 (11): 777-782.
5. Sun L., Yao P., Li M. et al. The Safety and Predictability of Implanting Autologous Lenticule Obtained by SMILE for Hyperopia. J. Refract. Surg. 2015; 31 (6): 374-379.
6. Ganesh S., Brar S., Rao P.A. Cryopreservation of extracted corneal lenticules after small incision lenticule extraction for potential use in human subjects. Cornea. 2014; 33 (12): 1355-1362.
7. Liu Y.C., Williams G.P., George B.L. et al. Corneal lenticule storage before reimplantation. Mol. Vis. 2017; 23: 753-764.
8. Liang G., Wang L., Pan Z., Zhang F. Comparison of the Different Preservative Methods for Refractive Lenticules following SMILE. Curr. Eye Res. 2019; 44 (8): 832-839.
9. Shafiq M.A., Gemeinhart R.A. et al. Decellularized human cornea for reconstructing the corneal epithelium and anterior stroma. Tissue Eng. Part. C Methods. 2012; 18 (5): 340-348.
10. Yam G.H., Yusoff N.Z., Goh T.W. et al. Decellularization of human stromal refractive lenticules for corneal tissue engineering. Sci. Rep. 2016; 6: 26339.
11. Huh M.I., Lee K.P., Kim J. et al. Generation of Femtosecond Laser-Cut Decellularized Corneal Lenticule Using Hypotonic Trypsin-EDTA Solution for Corneal Tissue Engineering. J. Ophthalmol. 2018; 3: 2590536.



УФИМСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЛАЗНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

3-4 ИЮНЯ
ОНЛАЙН

ВОСТОК-ЗАПАД

МЕЖДУНАРОДНАЯ
КОНФЕРЕНЦИЯ
ПО ОФТАЛЬМОЛОГИИwww.eastwestufa.rueast-west-ufa@yandex.ruwww.ufaeyeinstitute.ruufaeyenauka@mail.ru

450008, г. Уфа, ул. Пушкина, 90

тел. (347) 273-49-97