На правах рукописи

АНДРЕЕВ АНДРЕЙ ЮРЬЕВИЧ

УКРЕПЛЕНИЕ ОЖОГОВЫХ БЕЛЬМ РОГОВИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФАКТОРА РОСТА rhBMP-2 (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

14.01.07 – глазные болезни
14.03.02 – патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2020

Работа выполнена на базе ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России и ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России.

Научные руководители: доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом витреоретинальной хирургии и диабета глаза ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России
Захаров Валерий Дмитриевич

доктор медицинских наук, профессор, главный внештатный специалист по патологической анатомии, заведующий кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России
Зайратьянц Олег Вадимович

Официальные оппоненты: Доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела патологии роговицы ФГБНУ "НИИ Глазных болезней"
Труфанов Сергей Владимирович

Член-корреспондент РАН, профессор, доктор медицинских наук, директор ГУ НИИ морфологии человека РАН
Кактурский Лев Владимирович

Ведущая организация: ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России

Защита диссертации состоится «23» ноября 2020 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д.208.014.01 при ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России по адресу: 127486, г. Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59А.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук **Ирина Альфредовна Мушкова**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. По недавней оценке Всемирной организации здравоохранения, в мире насчитывается приблизительно 4,9 миллионов людей, потерявших зрение обоих глаз в результате травматического поражения роговицы, и 23 миллиона, монокулярно ослепших по тем же причинам (Oliva M.S., Schottman T., Gulati M., 2012; Pascolini D., Mariotti S.P., 2012). Успешное развитие кератопластики на данном этапе не может полностью решить все проблемы лечения таких больных. Так, при тяжелых ожоговых бельмах IV-V категории (по классификации Н.А. Пучковской и В.М. Непомящей, 1973) кератопластика является неэффективной, о чем свидетельствуют данные статистики: частота помутнений трансплантата после кератопластики варьирует от 53 до 82% (Бедило В.Я. и др., 1979; Глазко В.И., 1983; Гундорова Р.А. и др., 1979; Джавришвили Г.В., 2005; Зуев В.К., 1974; de la Paz M.F. et al., 2007). В таких случаях единственным методом восстановления зрения является кератопротезирование (Копаева В.Г., 1982; Мороз З.И., 2007; Пучковская Н.А. и др., 2001; Филатов В.П., 1947).

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 асептический некроз роговицы с последующей протрузией кератопротеза (Макаров П.В. и др., 2003; Чернетский И.С., 2009; Bouhout S., 2017; Huang Y. et. al., 2012; Liu C., 2005; Robert M.C. et al., 2014; Tan A., 2012; Wang L. et al., 2015; Zerbe B.L., 2006).

В целях профилактики и лечения подобных осложнений разработаны методы укрепления бельма с использованием различных пластических материалов. Среди таких операций наибольшее распространение получили методики с использованием аутологичных тканей человека: аутонадкостницы большеберцовой кости, фасции височной мышцы, слизистой оболочки полости рта, аутохряща ушной раковины, аутотеноновой капсулы, перикарда и т.д. (Волков В.В. и др., 1972; Краснов М.М. и др., 1979; Ченцова Е.В., 1996; Heber K.L. et al., 1997; Mai C., 2013; Ziai S. et al., 2013). Однако использование аутологичных тканей имеет ряд серьёзных недостатков. Во-первых, они обладают слабыми адаптационными возможностями к неестественному для них биологическому окружению, и поэтому все в той или иной степени

подвержены лизису. 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 (Федоров С.Н. и др., 1982; Мороз З.И., 1987; Калинников Ю.Ю., 2005; Макаров П.В. и др., 2007; Нероев В.В. и др., 2013).

Настоящее исследование посвящено разработке альтернативного способа укрепления тканей роговицы. Данное направление весьма актуально в современном кератопротезировании, так как, несмотря на многократные попытки создания «идеального кератопротеза», решить проблему протрузии в долгосрочной перспективе, сохранив при этом удовлетворительные зрительные функции, не удаётся. По всей видимости, решение этой задачи заключается в комплексном подходе, подразумевающем совершенствование самих протезов и разработку мер профилактики, в основе которых лежит создание устойчивой и механически прочной ткани. И, если путь совершенствования кератопротезов напрямую зависит от эволюции материалов их изготовления и в данный момент находится в некотором «ожидании», то в таком направлении, как укрепление роговицы, открыты новые горизонты благодаря активно развивающейся регенеративной медицине.

На современном этапе активно ведутся работы по созданию тканеинженерных конструкций, способных выступать в роли необходимых эквивалентов (Канукова Т.А., 2015). Предлагаемый нами подход кардинально отличается от имеющихся на сегодняшний день способов укрепления бельм. В отличие от классических методов с применением аутологичных тканей, мы пытаемся перестроить бельмо в более плотную и механически устойчивую структуру благодаря собственным механизмам клеточной регенерации. Такой подход возможен благодаря применению сигнальных молекул – факторов роста. Стоит отметить, что такой подход ранее не применялся в офтальмологии, поэтому за основу, в качестве ориентира, были взяты работы смежных специальностей, в частности, травматологии и стоматологии, а также исследования в области биологии, клеточной инженерии и другие.

Учитывая, что наиболее успешно применяемой тканью в целях укрепления бельм на разных этапах кератопротезирования является хрящевая ткань,

представляется целесообразным использовать соответствующий фактор роста – рекомбинантный костный морфогенетический белок (Bone Morphogenic Proteins) человека (rhBMP-2).

Данная группа белков регулирует регенерацию костной ткани, длительное время используется в клинике при лечении повреждений костной и хрящевой ткани (Reddi A.H., 1992). BMP-2 индуцирует дифференцировку мезенхимальных клеток в хондрогенные и остеогенные клетки, а также способствует васкуляризации близлежащих тканей (Shan P. et al., 2012). В чистом виде rhBMP-2 практически не применяется, а наиболее распространенной системой доставки являются носители на основе коллагена. Однако в доступной литературе нами не обнаружено работ, посвященных изучению и применению этого фактора роста в офтальмологии.

Учитывая вышеизложенное, разработка имплантируемого материала на основе коллагена, содержащего rhBMP-2, и исследование возможностей его применения в офтальмологии с целью укрепления тканей бельма видится нам вполне перспективной. Актуальность проблемы послужила основанием к выбору цели исследования.

Цель исследования – обосновать в эксперименте применение коллагенового имплантата, содержащего фактор роста rhBMP-2, с целью улучшения биомеханических и трофических характеристик ткани роговицы и её бельма.

Задачи исследования:

1. Провести комплексное исследование биологических эффектов фактора роста rhBMP-2 на культуре клеток in vitro, а также оценить его системное влияние на иммунную систему в эксперименте in vivo.

2. Оценить возможность использования коллагена как носителя для доставки rhBMP-2 в ткань роговицы с подбором оптимальной концентрации, обеспечивающей максимальный период полувыведения этого фактора роста в окружающие ткани.

3. Исследовать клинические и морфологические эффекты rhBMP-2 в составе коллагенового носителя при его введении в строму роговицы и ткань бельма.

4. Отработать хирургическую методику интрастромального введения rhBMP-2 в составе носителя на роговице экспериментальных животных, а также адаптировать операцию к условиям кератопротезирования.

5. Изучить изменения биомеханических свойств нативной роговицы и

ожогового бельма экспериментальных животных после интрастромального введения фактора роста rhBMP-2.

Научная новизна исследования

1. Впервые установлена возможность применения фактора роста rhBMP-2 в составе коллагенового носителя для улучшения биомеханической характеристики ткани ожогового бельма роговицы.

2. Впервые разработан специализированный носитель для доставки факторов роста в ткани роговицы и бельма, состоящий из нативного, химически немодифицированного коллагена высокой концентрации, который является биосовместимым, биорезорбируемым и не цитотоксичным, способным к длительному удержанию в своём составе экстремально низких концентраций фактора роста и обеспечивающим локальность воздействия на таргетные ткани.

3. Впервые обоснованы и предложены новые подходы к изучению биомеханических характеристик тканей роговицы, подвергавшихся оперативным вмешательствам, позволяющие получать более точные показатели упругости тканей и силы механической нагрузки.

4. Впервые показано, что улучшение трофических характеристик тканей роговицы и бельма под влиянием rhBMP-2 в составе коллагенового носителя обусловлено, главным образом, выраженной неоваскуляризацией.

5. Впервые установлен характер связи между контракцией внеклеточного матрикса роговичной ткани и повышением конечной жесткости роговицы под действием rhBMP-2 в составе носителя из коллагена.

6. Впервые предложен новый подход лечения тяжелых ожоговых бельм, подлежащих кератопротезированию, позволяющий повышать биомеханические и трофические характеристики тканей, заключающийся в использовании фактора роста rhBMP-2 в составе коллагенового носителя.

Практическая значимость исследования

1. Показана возможность и обоснована эффективность использования фактора роста rhBMP-2 для укрепления ожоговых бельм роговицы и улучшения трофических характеристик тканей.

2. На основе полученных результатов разработан метод укрепления ожоговых бельм, позволяющий снять ограничения, связанные с применением аутологичных

тканей, применяемых на различных этапах кератопротезирования.

3. Показана эффективность использования высококонцентрированного, немодифицированного коллагена высокой очистки в качестве носителя для доставки факторов роста в ткани глаза. Материал позволяет длительно удерживать минимальные концентрации биологически активных соединений (способен поддерживать рабочую концентрацию в 1,5 мкг rhBMP-2 в течение 28 дней) и является биосовместимым по отношению к тканям глаза.

4. Методы, разработанные в ходе проведения данного исследования, могут быть применены в дальнейших экспериментальных и клинических исследованиях по укреплению ожоговых бельм с использованием коллагена и факторов роста.

5. На основе полученных данных о влиянии rhBMP-2 на клетки роговицы кролика, найдена и рекомендована к применению оптимальная концентрация фактора роста, составляющая 30 мкг.

6. Отработана методика хирургического вмешательства, позволяющая эффективно доставлять rhBMP-2 в составе коллагенового носителя в бельма высокой сложности.

7. Впервые предложена альтернативная методика создания экспериментальной модели ожогового бельма, заключающаяся в использовании щелочи малой концентрации, фиксированного её количества и длительного воздействия на ткани роговицы кролика, позволяющая получать стандартизированные бельма необходимой степени тяжести.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В ходе научного исследования выявлено, что применение фактора роста rhBMP-2 в составе коллагенового носителя увеличивает прочностные характеристики ткани бельма и улучшает его трофические свойства.

2. Использование коллагена в качестве системы для доставки rhBMP-2 в ткань роговицы и ожогового бельма удовлетворяет всем предъявляемым к носителю требованиям и учитывает особенности хирургической техники.

3. На защиту выносится содержащая элементы новизны идея о возможности морфологической перестройки собственной ткани бельма под влиянием фактора роста rhBMP-2.

Степень достоверности полученных результатов

Достоверность результатов научного исследования обеспечивается за счёт обращения к широкому кругу официальных источников, множеству экспериментальных данных, полученных в результате длительного наблюдения, использования современной аппаратуры и методов их регистрации, поэтапному плану работы и детальному описанию всего хода исследования, обеспечивающего повторяемость эксперимента.

Внедрение результатов исследования в практику

Данные полученные в результате проведенной работы нашли широкое применение в практической деятельности лаборатории фирмы «ИМТЕК» (3-я Черепковская ул., 15, Москва, 121500). Внедрена методика производства коллагенового имплантата, инициирована процедура государственной регистрации.

Результаты предложенного метода измерения биомеханических свойств роговицы нашли отражение в смежных дисциплинах и активно используются в построении экспериментов по изучению биомеханических свойств биологических тканей в НИЦ «Курчатовский институт».

Модифицированная техника создания модели ожогового бельма применяется в экспериментальных работах ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Апробация работы

Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на II Национальном Конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2015); Международной (XX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2015); XI Всероссийской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы офтальмологии» (Москва, 2016); ежегодном офтальмологическом обществе в г. Смоленске (Смоленск, 2016); 17-м Всероссийском научно-практическом конгрессе с международным участием «Современные технологии катарактальной и рефракционной хирургии» (Москва, 2016), IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2019).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ, из них 2 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ для опубликования основных результатов диссертационных исследований. По теме диссертации получен 1 патент РФ на изобретение № 2613417 от 11.06.2016 г.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 140 страницах, содержит 33 таблицы и 38 рисунков. Работа состоит из введения и четырех глав, включающих обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, заключения, выводов и практических рекомендаций. Список литературы состоит из 213 источников, из них 45 отечественных и 168 иностранных публикаций.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Общая характеристика работы

Работа выполнена с последовательным проведением серии экспериментов in vitro и in vivo согласно порядку поставленных задач. Решение каждой задачи последовательно позволяло перейти на следующий этап работы, аккумулировав полученные ранее результаты для решения новой. Таким образом, обеспечивался многоступенчатый и последовательный ход работы в целом.

Общий план работы выглядел следующим образом:

- оценка воздействия выбранного фактора и носителя на культуру клеток в эксперименте in vitro;
- исследование возможности контролируемого высвобождения фактора роста из носителя;
- оценка влияния на организм (иммунный ответ);
- проведение серии экспериментов по введению имплантата в строму роговицы и бельма in vivo;
- оценка биомеханических и морфологических характеристик тканей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена с последовательным и поэтапным проведением серии экспериментов in vitro и in vivo согласно порядку поставленных задач. В экспериментах in vivo использовались кролики-самцы породы шиншилла, средним весом 2,5-3 кг и возрастом 5-6 месяцев, а также крысы-самцы стока Wistar, весом от

300 до 350 г и возрастом 6-7 месяцев.

Для оценки полученных результатов использовались офтальмологические, гистологические, иммунологические и биофизические методы исследования.

Статистический анализ результатов проводился на персональном компьютере с использованием программ Statistica 7.0 («Statsoft», США) и GraphPad Prism 6.0 Demo («GraphPad Software», США).

Экспериментально-клеточные исследования in vitro

Первый этап - комплекс исследований in vitro на культуре клеток роговицы кролика. Для получения первичной культуры клеток роговицу вырезали из глаза без захвата лимбальной зоны, десцеметову мембрану с эндотелием отделяли физически пинцетом, эпителий соскабливали скребком. Оставшуюся строму нарезали ножницами на кусочки ~ 1-1,5 мм^2, которые в виде суспензии в культуральной среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ООО НПП «ПанЭко», Россия) помещали на поверхность жидкого коллагена, нанесенного тонким слоем на дно культуральной посуды. В результате происходило гелеобразование вокруг кусочков стромы роговицы, и они оказывались «впаянными» в коллагеновый гель. Вышедшие из кусочков стромы клетки снимали с поверхности коллагенового геля с помощью стандартной методики трипсинизации и использовали для оценки влияния препарата rhBMP-2 производства ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России на жизнеспособность окрашиванием флуоресцентными красителями Хехст 33342 (ядра всех клеток) и пропидий йодид (мертвые клетки). Пролиферативную активность оценивали при помощи МТТ-теста.

После обработки полученных in vitro результатов проводили серии экспериментов in vivo, целью которых явилось исследование возможности контролируемого высвобождения фактора роста из носителя и оценка местного иммунного ответа на введение носителя с фактором роста.

Для изготовления имплантата использовали коллоидный раствор коллагена («ИМТЭК», Россия), который титруя при постоянном перемешивании, доводили раствором 1 М NaOH (РЕАХИМ, Россия) до нейтральных значений pH. Инкубировали смесь при + 4°С в течение 2 часов, затем разливали по 1,0 мл в лунки 24-луночного планшета (Techno Plastic Products AG, Швейцария). Для формирования геля полученную смесь инкубировали при +37°С в течение 30 минут. Образованные коллагеновые гидрогели, извлеченные из планшета, отмывали в 500

мл фосфатного буферного раствора Рингера-Кребса (SigmaAldrich, США) 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°С. Полученные пленки регидратировали в 20 мл фосфатного раствора Рингера-Кребса при +37°С в течение 2 часов. В результате чего получали коллагеновую мембрану диаметром 12-15 мм сферической формы и толщиной 0,1 мм (Рисунок 1). Все манипуляции были проведены в асептических условиях.

Изготовление коллагенового имплантата, содержащего rhBMP-2, выполняли аналогично вышеприведенной методике, за исключением того, что в коллоидный раствор коллагена добавляли rhBMP-2 таким образом, чтобы в конечной смеси концентрация фактора роста была 30 мкг/мл. В работе использовался модифицированный с целью повышения растворимости и содержания активной димерной формы белка rhBMP-2, который получали микробиологическим синтезом в клетках Escherichia coli в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Гамалеи (Москва), биологическая активность фактора, протестированная in vitro и in vivo, полностью соответствует активности фирменного препарата rhBMP-2 (R@D Systems, Канада), полученного в клетках эукариот.

Экспериментальные исследования in vivo

Второй этап - определение возможности контролируемого высвобождения фактора роста rhBMP-2 из коллагенового имплантата. Для этого проводили его подкожную имплантацию крысам. Всего в эксперименте приняло участие 10 животных, которых выводили из эксперимента на 3, 7, 14, 28 и 42-е сутки по 2 особи. После выведения животных из эксперимента, для полной экстракции оставшегося rhBMP-2 коллагеновые имплантаты извлекали и помещали в 0,5 мл водного раствора 6 М мочевины (РЕАХИМ, Россия), 10 мМ ЭДТА (Kaiyue Chemicals, Россия), pH 6,5; при комнатной температуре (25°С) и постоянном перемешивании выдерживали до полного растворения матрикса. Затем при помощи метода иммуноферментного анализа «сендвич-типа» с использованием тест-системы «BMP2» производства «ИМТЭК» определяли концентрацию фактора роста.

Третий этап - оценка влияния имплантата с rhBMP-2 на иммунную систему. Эксперимент проводили на 30 крысах, животные были разделены на три группы, по

10 в каждой. Животных 1-й группы предварительно подвергали иммунизации препаратом rhBMP-2 с использованием адъюванта Фрейнда. Во 2-й группе проводили подкожную имплантацию коллагенового носителя, обогащенного 30 мкг rhBMP-2. Третью группу составили животные, не подвергавшиеся никакому воздействию. Сроки выведения животных из данного эксперимента и их количество, были аналогичны предыдущему. Титр антител к rhBMP-2 определяли методом иммуноферментного анализа, для этого перед выводом из эксперимента у крыс проводился забор крови в объеме 2 мл.

Четвертым этапом проводили две серии экспериментов in vivo. В первой серии объектом исследования была нативная роговица кролика. В зависимости от типа имплантируемого материала животных разделили на 2 группы по 22 кролика. В первой группе в нативную роговицу вводили коллагеновый имплантат в чистом виде, во второй – коллагеновый имплантат, содержащий 30 мкг rhBMP-2. Сроки наблюдения составили 9 месяцев, животных выводили из эксперимента через 1, 3, 6 и 9 месяцев по 4 особи из каждой группы для проведения биомеханических исследований и по 2 особи из каждой группы через 1, 3 и 6 месяцев для морфологических исследований.

Операцию выполняли под микроскопом M620 фирмы «Leica» (Германия) при увеличении в 15 раз, использовали расслаиватель и шовный материал фирмы «Mani» (Япония). В качестве анестезии выполняли ретробульбарную блокаду 0,5% новокаином. После производили надрез роговицы протяженностью 5 мм на 2/3 ее глубины концентрично лимбу и формировали интрастромальный карман по всей её площади «от лимба до лимба» в который проводили имплантацию материала. На разрез накладывали шов по Пирсу (нейлон 10-0), по окончании операции для профилактики инфекции под конъюнктиву вводили гентамицина сульфата 1,0% в объеме 0,5 мл.

Во второй серии эксперимента мы попытались приблизить будущую методику к реалиям кератопротезирования, для чего поставили зеркальный эксперимент (количество животных, группы и сроки наблюдения были аналогичны первой серии) на ожоговых бельмах роговицы кроликов.

Нанесение ожога выполняли под местной анестезией, за основу была принята методика, предложенная Е.В. Ченцовой, модифицированная следующим образом: предварительно подготовленные хлопчато-бумажные диски диаметром 8 мм пропитывали 0,2 мл 3%-го раствора NaOH каждый и выполняли их аппликации на

поверхность роговицы животных в течение 30 секунд. Глазное яблоко и конъюнктивальную полость обильно промывали 10,0 мл 0,9% NaCI. Затем в течение 14 суток животные получали антибактериальную терапию: Офлоксацин (Ofloxacin) 0,3% в виде мази закладывали в конъюнктивальную полость 2 раза в день.

В силу того, что визуальный контроль во время расслаивания непрозрачного бельма затруднён интраоперационный риск перфорации тканей значительно выше, поэтому технику операции оптимизировали следующим образом. После ретробульбарной блокады 0,5% новокаином производили несквозную трепанацию бельма трепаном диаметром 8 мм, затем расслаивателем отсепаровывали верхние ткани по трепанационному отверстию таким образом, что часть тканей оставалась на «ножке» в виде своеобразной «крышечки», оставшуюся периферическую часть расслаивали при помощи тупого шпателя, формируя при этом карман «от лимба до лимба» в строме. Далее коллагеновый имплантат вводили в полость сформированного кармана и накрывали ранее отсепарованной тканью бельма на «ножке», а затем накладывали непрерывный роговичный шов. По окончании операции для профилактики инфекции под конъюнктиву вводили гентамицина сульфата 1,0 % в объеме 0,5 мл.

Осмотр глаз кроликов с фокальным освещением выполняли, используя офтальмоскоп «Heine Beta 200S» («Heine», Германия). Биомикроскопию проводили с помощью офтальмологического биомикроскопа – щелевая лампа «SL-1800» («Nidek», Япония). Толщину роговицы и бельма измеряли методом ультразвуковой пахиметрии на приборе «Compact Touch» (Quantel Medical, Франция). Фоторегистрацию осуществляли путем фотографирования на фотощелевой лампе фирмы «Opton» (Германия).

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) модель 5982 с использованием датчика нагрузки ±50 Н серии 2530. По результатам испытаний определяли максимальную нагрузку (характеризует прочность образцов) и наклон упругой области кривой (характеризует упругость испытуемого образца).

По всем исследуемым показателям в каждой группе были подсчитаны параметры распределения (среднее значение, стандартное отклонение, частотный анализ). Оценка достоверности различий между исследуемыми группами

проводилась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Для оценки динамики изменений применялся критерий Фридмана.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

I этап – Комплексное исследование биологических эффектов rhBMP-2 на культуре клеток in vitro

Результаты первого этапа исследования продемонстрировали отсутствие цитотоксичности по отношению к клеткам роговицы кролика. Для наглядной демонстрации пролиферативного потенциала клеток под влиянимем rhBMP-2 использовали две концентрации сыворотки: 1% и 10%. Исследования показали, что оптическая плотность клеток при 10%-ной концентрации приблизительно в 2 раза выше, следовательно клетки обладают большим запасом пролиферативного потенциала и подходят для изучения. После добавления в среду препарата rhBMP-2 в концентрации 5, 10, 30 и 50 мкг/мл уровень пролиферации незначительно увеличивался. Однако наибольшим положительным эффектом обладает концентрация 30 мкг/мл, которая и является наиболее приемлемой для введения в строму роговицы.

Несмотря на то, что в литературе имеются данные о действии фактора роста на пролиферацию клеток, в своем исследовании выраженного эффекта на клетки интактной роговицы мы не отмечали. Это можно объяснить тем, что в условиях in vitro фактор роста не способен оказывать полноценного эффекта в силу своего механизма действия, включающего более сложную, многоступенчатую и взаимосвязанную последовательность биологических реакций и клеточных взаимоотношений. К тому же выяснилось, что клетки стромы роговицы не являются таргетными для rhBMP-2. Это подтверждается нашими последующими результатами экспериментов in vivo, где чётко видно образование новых структур (таких как сосуды и соединительная ткань), указывающих на высокую пролиферативную активность клеток, мигрирующих в строму в ответ на стимулы со стороны фактора.

II этап – Исследование возможности контролируемого высвобождения rhBMP-2 из коллагенового имплантата

Полученные на втором этапе экспериментов данные свидетельствуют о том, что разработанный нами носитель, обогащенный rhBMP-2 в объеме 30 мкг,

способен поддерживать минимально возможную действующую концентрацию (1,5 мкг) данного белка на протяжении 28 дней. Изучение динамики высвобождения rhBMP-2 из коллагеновых носителей показало постепенное и контролируемое (отсутствие резкого выхода в окружающие ткани) снижение его концентрации в зависимости от длительности его нахождения в теле животного.

Отдельно хочется отметить, что количество rhBMP-2, рекомендуемое к введению человеку, составляет от 400 до 1200 мкг фактора роста. Количество фактора, которое мы применяли для воздействия на роговицу кролика, было минимальным (всего лишь 30 мкг) по сравнению с тем количеством, которое применяется в клинической практике. Добиться этого удалось благодаря связыванию rhBMP-2 с нативным коллагеном на этапе изготовления имплантатов, а не пропитыванию коллагеновых губок непосредственно перед вмешательством.

III этап – Оценка иммунного системного ответа на введение имплантата с фактором роста rhBMP-2

В ходе решения поставленной задачи по оценке системного иммунного ответа со стороны организма экспериментального животного, в ответ на введение имплантата с rhBMP-2 было установлено, что титр антител к rhBMP-2 в сыворотке крови экспериментальных животных на протяжении всего эксперимента не превышал фонового значения интактной сыворотки крысы. Следует отметить, что при предварительной иммунизации крыс препаратом rhBMP-2 был получен титр атител 1: 100 000. Однако у крыс, которым проводилась имплантация 30 мкг rhBMP-2 в составе коллагенового носителя и не подвергавшихся предварительной иммунизации, титр антител не превышал значений интактной крысиной сыворотки.

Таким образом, по совокупности полученных данных следует считать, что коллагеновый имплантат способен обеспечивает такую скорость высвобождения rhBMP-2 из коллагенового имплантата, при которой не происходит выработки антител к данному рекомбинантному белку. Следовательно, применение rhBMP-2 в концентрации 30 мкг/мл на коллагеновом носителе не вызывает системного иммунного ответа со стороны организма.

IV этап – Результаты введения чистого коллагенового имплантата и обогащённого rhBMP-2 в строму роговицы и бельма кролика

Было проведено две серии экспериментов in vivo, первая включала изучение

воздействия на ткани нативной роговицы, вторая – непосредственно на ткани ожогового бельма.

Результаты первой серии экспериментов на нативной роговице

В результате предложенной хирургической техники введения коллагенового имплантата в формируемый интрастромальный карман удалось полностью нивелировать интраоперационные риски, связанные с возможностью перфорации нижних и верхних слоёв роговицы. В ходе всего эксперимента ни в одном случае подобных осложнений не возникало. Удалось обеспечить максимально полное по площади расслоение тканей «от лимба до лимба» через относительно небольшой доступ в 5 мм, что обеспечило высокую герметичность без необходимости накладывания длинных швов. Разработанная техника введения имплантата позволила быстро, в «два движения» имплантировать 10-миллиметровый диск в сформированный карман через малый доступ и обеспечить его ровное, центрированное положение без образования лишних складок материала, что выгодно более плотным его прилеганием к окружающим тканям. В раннем послеоперационном периоде не наблюдалось выраженных воспалительных процессов, края разреза были хорошо сопоставлены, швы состоятельны. По мере набухания имплантата в строме, края разреза не расходились на протяжении всего периода наблюдения.

Результаты первой серии экспериментов показали, что используемый нами коллагеновый носитель в чистом виде (без фактора роста) биосовместим и биорезорбируем, а также сохраняет прозрачность (рис. 1А). В то время как имплантат, обогащенный rhBMP-2, оказывает выраженное воздействие на неоангиогенез и приводит к помутнению тканей с формированием бельма (рис. 1Б).

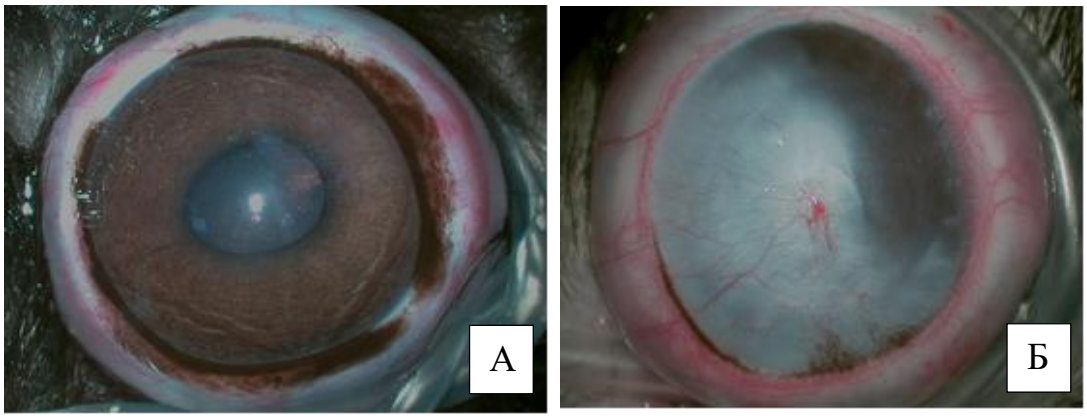

Рисунок 1 – Глаз кролика через 6 месяцев после операции
А – имплантирован чистый коллагеновый носитель;
Б – имплантирован коллагеновый носитель содежащий 30 мкг rhBMP-2

Это подтверждается гистологическим исследованием, в образцах роговицы через 1 месяц после имплантации коллагенового носителя с rhBMP-2 отмечается нарушение упорядоченности хода пучков коллагеновых волокон, а также очаговый рост молодой соединительной ткани с новообразованными сосудами микроциркуляторного русла (рис. 2).

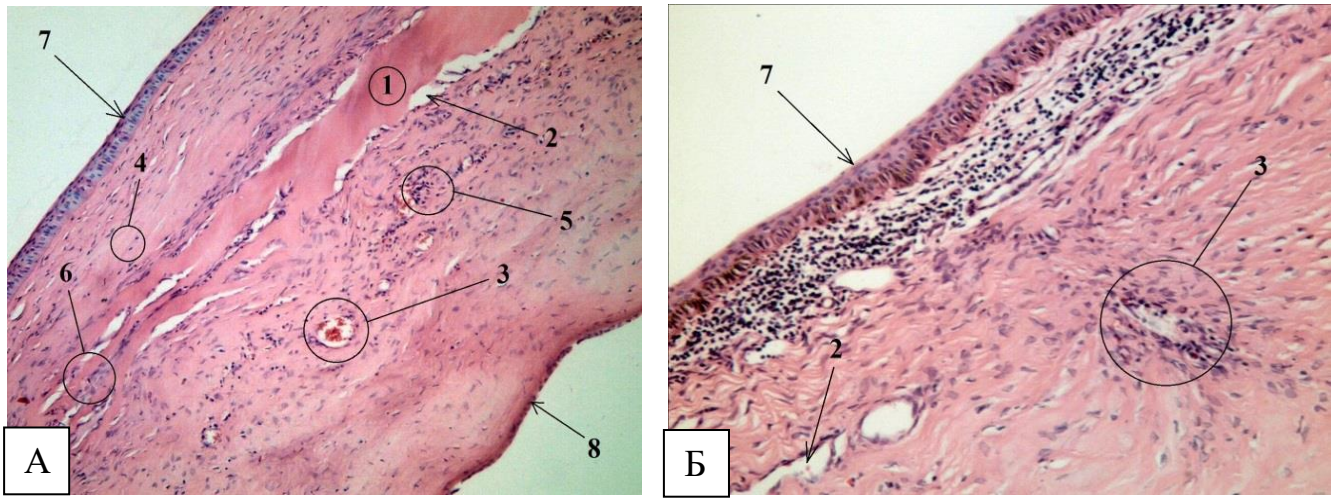

Рисунок 2 – Срез роговицы кролика через 1 месяц после имплантации коллагенового имплантата с rhBMP-2: 1– имплантат с rhBMP-2; 2 – полость; 3 – новообразованные сосуды; 4 – нарушение упорядоченности хода пучков коллагеновых волокон; 5 – созревающая соединительная ткань с выраженной неоваскуляризацией; 6 – разрастания грануляционной ткани, проникающие в имплантат; 7 – эпителий; 8 – десцеметова мембрана с эндотелием. Окраска гематоксилином и эозином; А – х100; Б – х200

К 6 месяцам наблюдения большая часть стромы роговицы замещалась молодой и местами зрелой соединительной тканью с разнонаправленными пучками плотно упакованных коллагеновых волокон и множеством новообразованных полнокровных сосудов разного калибра (рис. 3).

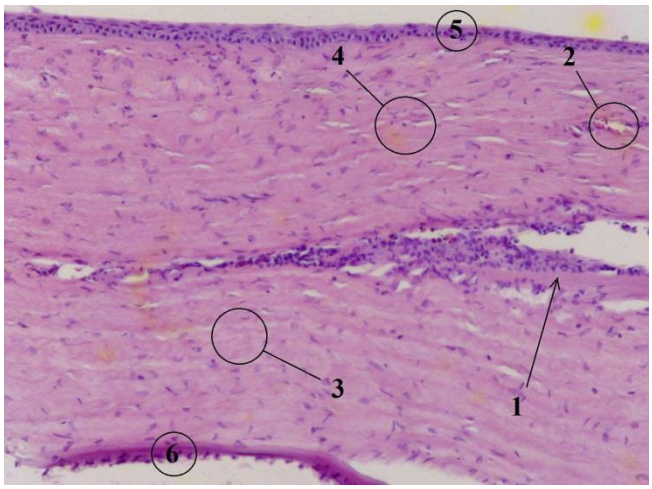

Рисунок 3 – Срез роговицы кролика через 6 месяцев после имплантации в роговицу коллагенового имплантата с фактором роста rhBMP-2: 1 – имплантат; 2 – новообразованные сосуды; 3 – зрелая соединительная ткань; 4 – разнонаправленность коллагеновых волокон стромы; 5 – эпителий; 6 – десцеметова мембрана с эндотелием. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение х 120

Результаты второй серии экспериментов на ожоговом бельме

Клинические изменения, наблюдаемые в послеоперационном периоде в тканях бельма где применялся коллагеновый имплантат без rhBMP-2, можно охарактеризовать как незначительные воспалительные реакции с дальнейшей стабилизацией клинической картины и постепенным запустеванием сосудов, а также снижением интенсивности помутнений (рис. 4).

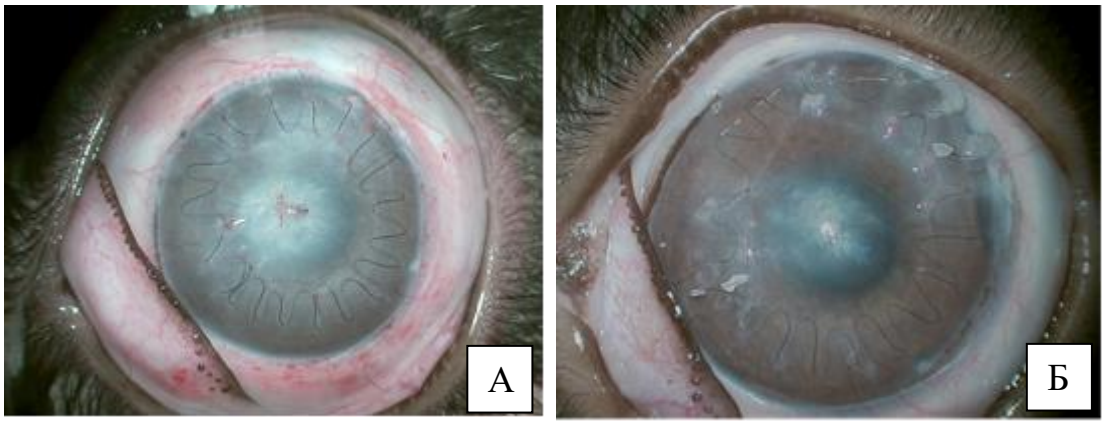

Рисунок 4 – Глаз кролика в различные сроки после введения в ожоговое бельмо коллагенового имплантата без добавления фактора роста: А –30 дней; Б – 6 месяцев

Клиническая картина, где в бельмо был имлантирован коллагеновый носитель с rhBMP-2 была более выраженная, к концу 6 месяцев после операции наблюдалось интенсивное бельмо роговицы (рис. 5), захватывающее преимущественно центральную и парацентральную зоны с выраженной неоваскуляризацией.

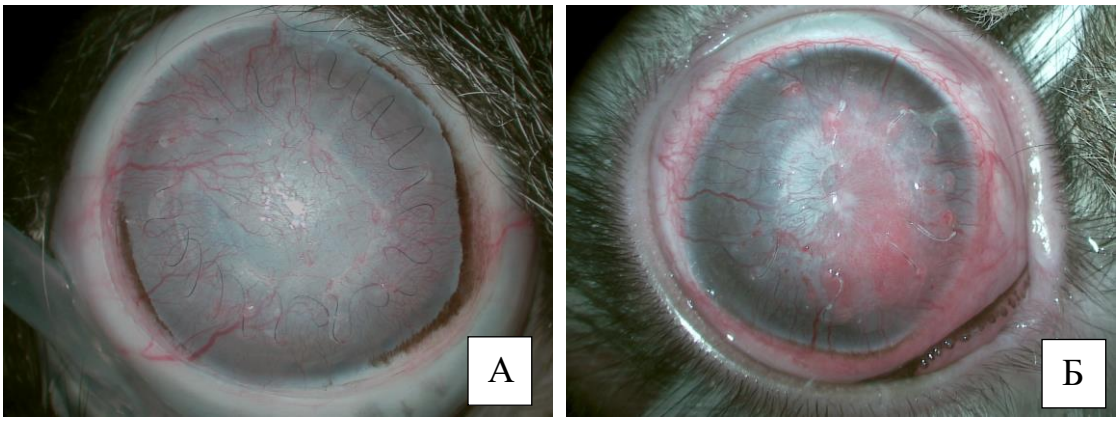

Рисунок 5 – Глаз кролика в различные сроки после введения в ожоговое бельмо роговицы коллагенового имплантата, содержащего 30 мкг rhBMP-2: А – 30 дней; Б – 6 месяцев

Гистологическое исследование позволило подтвердить наблюдаемые клинические эффекты, главным образом заключающиеся в выраженной неоваскуляризации и образовании соединительной ткани (рис. 6). Выраженный

неоангиогенез вызывал опасения, т.к. в теории мог приводить к развитию неоваскулярной глаукомы. Однако гистологические срезы цилиарных отростков, радужки и угла передней камеры позволили убедиться в безопасности метода (рис. 7), тем самым подтвердив локальность воздействия фактора роста за счёт применения удачной системы доставки, в основе которой лежит коллаген. Выраженная неоваскуляризация оказывает положительное трофическое действие на ткани бельма и, по всей видимости, может трактоваться позитивно.

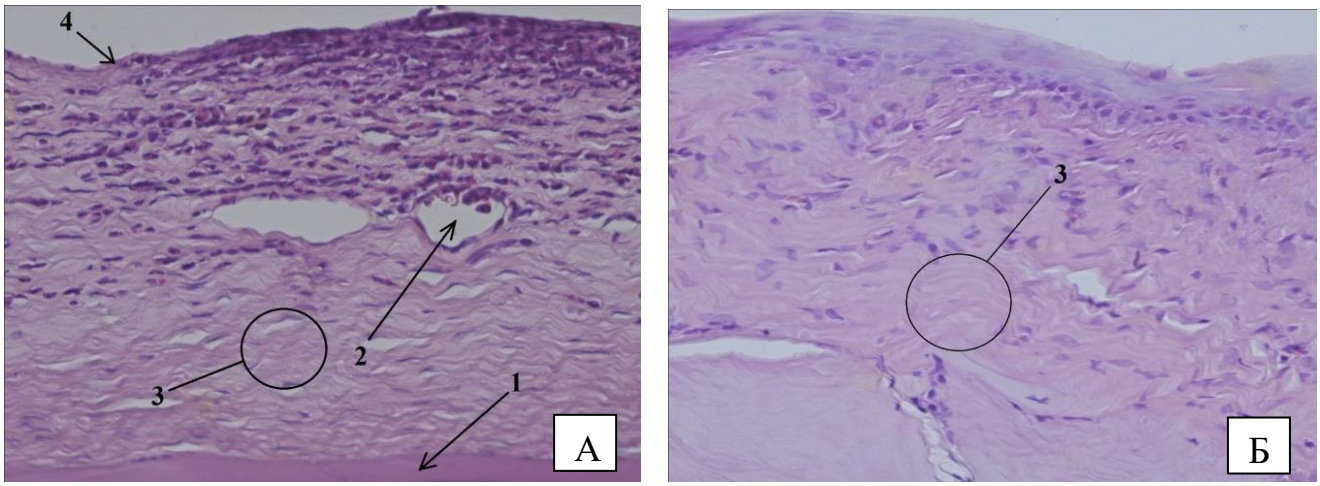

Рисунок 6 – Срез бельма кролика через 6 месяцев после имплантации коллагенового имплантата, содержащего 30 мкг rhBMP-2:
1 – имплантат; 2 – новообразованные сосуды;
3 – зрелая соединительная ткань; 4 – передний эпителий.
Окраска гематоксилином и эозином: А – увеличение х 120; Б – увеличение х 200

Гистологические срезы угла передней камеры с захватом радужки и цилиарных отростков показали нормальное строение на всех сроках наблюдения (рис. 7).

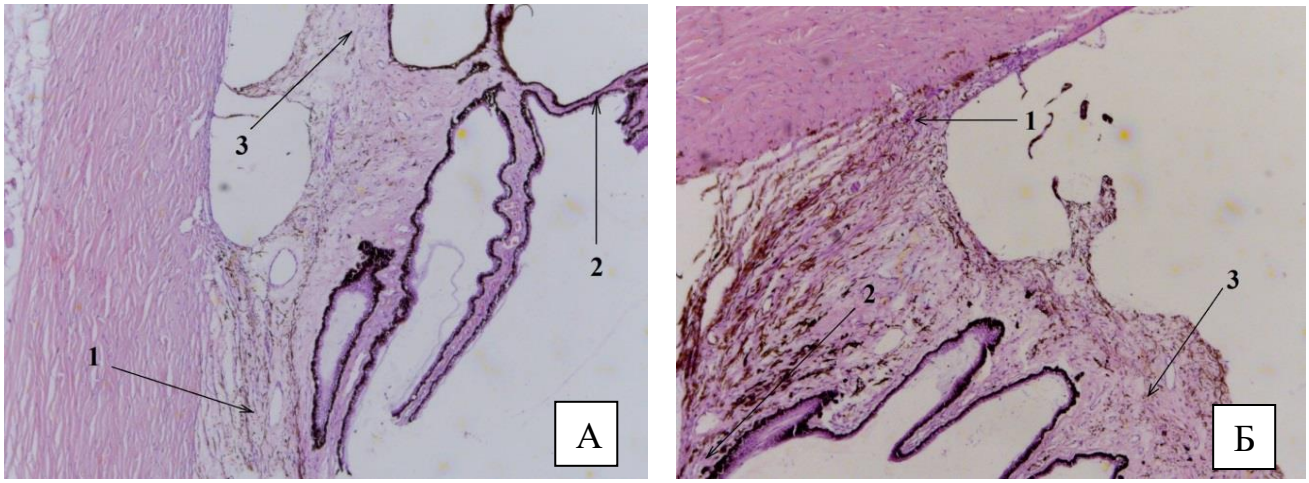

Рисунок 7 – Срез с захватом радужки и цилиарного тела после введения в роговицу кролика группы А коллагенового имплантата без rhBMP-2: А – 1 месяц, Б – 6 месяцев; 1 – цилиарное тело; 2 – цилиарные отростки; 3 – радужная оболочка. Окраска гематоксилином и эозином, х 120

Результаты биомеханических исследований нативной роговицы и ожогового бельма у экспериментальных животных

Результаты этих измерений получены вследствие проведения двух серий экспериментов. В первой исследовались нативная роговица и динамика её изменений после введения в строму коллагенового имплантата с rhBMP-2 и без него, во второй – аналогичным способом исследовалось ожоговое бельмо.

Первая серия – явным положительным эффектом явилось увеличение общей толщины роговицы (Таблица №1) и достоверное увеличение прочностных характеристик с 11,3 ± 0,7 до 43,5 ± 1,9 Н, а также повышение упругости с 5,6 ± 0,4 до 21,4 ± 1,6 Н/мм через 9 месяцев. Максимальный эффект наблюдался через 6 месяцев, тенденции к регрессу не выявляется.

Таблица №1 – Показатели толщины роговицы после имплантации коллагенового носителя с rhBMP-2 в сравнении с интактной роговицей, мкм.

Ме-сяц	Роговица после имплантации rhBMP-2			Нативная роговица			U - коэффициент	p - уровень
	сред-нее	меди-ана	ст. отклонение	сред-нее	меди-ана	ст. отклонение		
1	504,8	504,5	2,7	370,8	369,0	10,3	0,0	0,01
3	480,9	480,4	5,0	370,8	369,0	10,3	0,0	0,01
6	468,0	467,8	1,5	370,8	369,0	10,3	0,0	0,01
9	466,9	466,4	2,4	370,8	369,0	10,3	0,0	0,01

Вторая серия – проведенные эксперименты на бельмах показали схожие результаты, отличительной чертой явилось более быстрое нарастание эффектов, оказываемых rhBMP-2. Это объясняется исходно повышенной активностью биологических процессов, протекающих в сосудистом бельме, что в целом было ожидаемо. Важно подчеркнуть изначально низкую прочность бельма и наличие в нём хронического воспаления. Однако несмотря на это, после имплантации в него коллагенового носителя с rhBMP-2 итоговая прочность становилась сопоставима и даже превышала показатели экспериментов на нативной роговице. В данном случае максимальная нагрузка тканей изменилась с 9,9 ± 1,0 до 49,3 ± 2,2 Н, упругость – с 5,5 ± 0,1 до 24,3 ± 1,5 Н/мм за аналогичный промежуток времени (9 месяцев). Как и в случае с нативной роговицей наблюдалось достоверное увеличение толщины тканей бельма (Таблица №2).

Это делает предлагаемую нами методику акцентированной на укрепление

бельм, т.к. используемый rhBMP-2 имеет больше возможностей для взаимодействия с клетками. Изначальный потенциал высвобожденного фактора роста не расходуется в «ожидании» неоваскуляризации и притока большого числа клеток. К тому же, в подобных условиях, помутнение роговицы, вызываемое фактором роста, не оценивается как негативное воздействие.

Таблица №2 – Показатели толщины бельма после имплантации коллагеновго носителя с rhBMP-2 в сравнении с интактным бельмом, мкм.

Ме-сяц	Бельмо после имплантации rhBMP-2			Интактное бельмо			U - коэффициент	p - уровень
	сред-нее	меди-ана	ст. отклонение	сред-нее	меди-ана	ст. отклонение		
1	537,0	537,4	1,5	344,5	351,1	11,4	0,0	0,01
3	473,2	474,3	2,4	344,5	351,1	11,4	0,0	0,01
6	460,2	460,4	3,1	344,5	351,1	11,4	0,0	0,01
9	459,3	460,7	3,1	344,5	351,1	11,4	0,0	0,01

Таким образом, удалось доказать эффективность применения предлагаемого способа и в условиях ожогового бельма, что даёт почву для дальнейших исследований и проведения клинических испытаний.

Данный подход, по нашему мнению, позволит приблизиться к решению тяжелой проблемы профилактики протрузии кератопротезов. Существующие на данный момент способы, среди которых наибольшее распространение получили методики с использованием аутологичных тканей человека имеют ряд ограничений, таких как, часто возникающий недостаток аутологичных тканей, невозможность формирования равномерного трансплантата с заданными характеристиками и дополнительные операции по забору тканей.

Предложенный способ не сравнивался с существующими методиками в плане эффективности и, по всей видимости, это будет целью дальнейших исследований, однако уже сейчас можно с уверенностью говорить о перспективности данного подхода, лишенного вышеперечисленных недостатков и доказательно увеличивающего прочностные и трофические характеристики бельма.

ВЫВОДЫ

1. Проведенный комплекс исследований по изучению влияния rhBMP-2 на пролиферативную активность, цитотоксичность по отношению к клеткам стромы

роговицы кролика и воздействия на иммунную систему позволил выявить особенности ответных клеточных реакций, которыми явились: незначительная стимуляция пролиферативной активности клеток и отсутствие цитотоксичности, при этом препарат не оказывает системного воздействия на иммунную систему организма.

2. Разработан и апробирован носитель для доставки rhBMP-2 в ткани роговицы в виде диска диаметром 10 мм и толщиной 50 мкм. Носитель биосовместим, биорезорбируем, проницаем для клеток, материал пластичный, гладкий и легко имплантируется в строму роговицы и ткани бельма, способен удерживать швы и не разрушается при хирургических манипуляциях. Данный носитель способен надежно и длительно удерживать rhBMP-2, оптимальной концентрацией которого является 30 мкг, что обеспечивает поддержание действующей концентрации в 1,5 мкг в течение 28 дней. В чистом виде носитель не вызывает ответных реакций со стороны тканей роговицы, он остается прозрачным на протяжении всего периода наблюдения и постепенно биодеградирует.

3. Установлено, что фактор роста rhBMP-2 обладает выраженным стимулирующим воздействием на неоангиогенез, вызывает миграцию клеток в имплантат и окружающие его ткани, а также приводит к перестройке исходных тканей роговицы в соединительную ткань. Достигнутый эффект объясняется контракцией коллагена и окружающих его тканей активно мигрирующими клетками в ответ на стимулы со стороны фактора роста, сопровождающееся увеличением плотности коллагеновых волокон, а также естественным механизмом сшивки самого коллагенового имплантата.

4. Отработанная техника хирургического введения rhBMP-2 в составе коллагенового носителя в строму роговицы и ткани бельма позволяет безопасно проводить операцию на исходно тонких тканях (370 мкм) и не требовательна к прозрачности роговицы, что обеспечивает возможность проведения вмешательства на бельмах. Методика позволяет воздействовать на всю площадь тканей за счет образования интрастромального кармана от лимба до лимба, обеспечивая доставку фактора роста во все отделы роговицы и блокируя при этом свободный диффузный выход фактора роста в смежные ткани.

5. Измерение биомеханических характеристик роговицы показало увеличение максимальной нагрузки тканей с 11,3 ± 0,7 до 43,5 ± 1,9 Н, а также повышение упругости с 5,6 ± 0,4 до 21,4 ± 1,6 Н/мм через 9 месяцев. Отмеченный результат

повторяем на бельмах, в данном случае максимальная нагрузка тканей изменилась с 9,9 ± 1,0 до 49,3 ± 2,2 Н, упругость – с 5,5 ± 0,1 до 24,3 ± 1,5 Н/мм за аналогичный промежуток времени. Максимальный эффект наблюдается через 6 месяцев, тенденции к регрессу не выявляется.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Использование фактора роста rhBMP-2 в составе коллагенового имплантата для укрепления ожоговых бельм роговицы и улучшения их трофических характеристик показало свою высокую эффективность в экспериментах на животных, что может быть рекомендовано к дальнейшему изучению и продолжению работы с целью выхода к клиническим испытаниям.

2. В качестве носителя для доставки биологически активных веществ в ткани роговицы рекомендовано использование высококонцентрированного высокоочищенного коллагена I типа. Разработанный нами имплантат может выступать в роли носителя также для других препаратов и построения экспериментальных работ схожей тематики.

3. На основе полученных данных о влиянии rhBMP-2 на клетки роговицы кролика, рекомендована к применению оптимальная концентрация фактора роста, составляющая 30 мкг.

4. Для стандартизированного и контролируемого моделирования ожоговых бельм в экспериментальных целях рекомендуется применение низких концентраций (3%) NaOH и повышения длительности их воздействия до 30 секунд.

5. В качестве метода оценки биомеханических характеристик тканей роговицы рекомендуется использование методики прокола в жидкой среде, которая позволяет учитывать её кривизну и наличие имплантированного в неё материала.

6. Использование коллагенового имплантата в чистом виде способно повышать биомеханические характеристики роговицы, что может быть рекомендовано при патологии, требующей повышения механических характеристик с сохранением прозрачности.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Андреев А.Ю., Осидак Е.О., Карягина А.С., Зайратьянц О.В., Домогарский С.П., Захаров В.Д. Перспективы использования фактора роста костной ткани на

этапах подготовки бельм к кератопротезированию // Национального Конгресса по регенеративной медицине, 2-й: Сб. тез. – М., 2015. – с. 6.

2. Андреев А.Ю., Осидак Е.О., Захаров В.Д., Зайратьянц О.В., Борзенок С.А., Хубецова М.Х., Крашенинников С.В., Карягина А.С., Домогарский С.П. Применение фактора роста костной ткани в составе коллаген-содержащего носителя в целях укрепления роговицы /// Международная (XX Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых: Сб. тез. – М., 2015. – С. 464.

3. Андреев А.Ю., Захаров В.Д., Зайратьянц О.В., Борзенок С.А., Хубецова М.Х., Осидак Е.О., Крашенинников С.В., Карягина А.С., Домогарский С.П. Перспективы использования фактора роста костной ткани в составе коллагенового носителя в целях укрепления роговицы (экспериментальное исследование) // Современные технологии в офтальмологии. – 2016. – № 4. – С. 11-16.

4. Андреев А.Ю., Захаров В.Д., Зайратьянц О.В., Осидак Е.О., Борзенок С.А., Крашенинников С.В., Карягина А.С., Домогарский С.П. Морфологические изменения роговицы кроликов под влиянием фактора роста костной и хрящевой ткани rhBMP-2 в составе интракорнеального коллагенового имплантата // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2016. – Т. 20, № 4. – С. 36-42.

5. Андреев А.Ю., Захаров В.Д., Зайратьянц О.В., Осидак Е.О., Борзенок С.А., Крашенинников С.В., Карягина А.С., Домогарский С.П. Влияние фактора роста rhBMP-2 в составе коллагенового носителя на морфологические и биомеханические характеристики роговицы // Офтальмохирургия. – 2016. - № 4. – С. 20-28.

ПАТЕНТЫ РФ НА ИЗОБРЕТЕНИЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Лунин В.Г., Осидак Е.О., Домогатский С.П., Карягина-Жулина А.С., Андреев А.Ю., Борзенок С.А., Захаров В.Д., Зайратьянц О.В. Способ укрепления бельма роговицы в эксперименте. Патент РФ на изобретение № 2613417. Опубл. 11.06.2016 г.

БИОГРАФИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

Андреев Андрей Юрьевич, 1988 года рождения. В 2011 году закончил Смоленскую медицинскую академию по специальности «Лечебное дело». В период с 2011 по 2013 гг. проходил ординатуру по специальности «Офтальмология» на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней» Минобрнауки России. С 2013 по 2016 гг. обучался в очной аспирантуре по специальности «Глазные болезни» в ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. Автор 6 научных работ, из них 2 – в журналах, рекомендуемых ВАК РФ; 3 патентов РФ на изобретение.