DOI: 10.15825/1995-1191-2021-2-137-146

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОТОКОЛОВ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ ЛЕНТИКУЛЯРНОЙ ТКАНИ РОГОВИЦЫ

С.А. Борзенок^{1, 2}, С.В. Костенев¹, А.В. Дога¹, А.В. Шацких¹, В.Г. Ли¹, Д.С. Островский¹, М.Х. Хубецова¹

¹ ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Введение. Актуальной проблемой офтальмологии является дефицит донорских роговиц. Данный факт обусловливает поиск новых альтернативных путей для лечения патологий роговицы. Технологии децеллюляризации позволяют создавать роговичные тканеинженерные конструкции, которые могут решить проблему нехватки донорских роговиц. Цель. Провести сравнительный анализ эффективных методов обработки роговичной лентикулы и создать оптимизированный и стандартизированный протокол децеллюляризации. Материалы и методы. Для исследования были выбраны стромальные роговичные лентикулы, полученные после операции ReLEx SMILE. Параметры лентикул: толщина 77–120 мкм, диаметр 6,5 мм. Для обработки лентикулы использовали 3 протокола: 1) обработка 1,5 М хлоридом натрия с нуклеазами (NaCl); 2) 0,1% SDS (SDS); 3) обработка раствором Трипсин-ЭДТА с последующем двойным отмыванием в гипотоническом трис-буферном растворе с нуклеазами (Трипсин-ЭДТА). Оптические свойства лентикул определяли спектрофотометрически, где в качестве контроля служили образцы до децеллюляризации. Определение структуры стромы роговичной лентикулы после децеллюляризации происходило с помощью окрашивания гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону и альциановым синим. Также в качестве дополнительного метода оценки состояния внеклеточного матрикса, а именно коллагена I, III, V и VI типов, проводили иммуногистохимический анализ криосрезов нативных обработанных лентикул. Флуоресцентная визуализация ядерного материла в исходных криосрезах производилась с помощью красителя Hoechst. Состояние ультраструктуры коллагеновых волокон оценивалось с помощью сканирующего электронного микроскопирования. Производили анализ количественного содержания ДНК в свежих лентикулах и в лентикулах после обработки. Результаты. Все три протокола децеллюляризации эффективно удаляют ядерный и клеточный материал, остаточное содержание ДНК было <50 нг/мг. Однако протокол с Трипсин-ЭДТА приводит к значительному повреждению структуры внеклеточного матрикса, что отрицательно сказывается на прозрачности роговичных тканеинженерных конструкций. Прозрачность образцов для протокола NaCl была приближена к нативным лентикулам. Заключение. Для создания роговичной тканеинженерной конструкции протокол децеллюляризации NaCl представляется оптимизированным и может применяться для лечения различных патологий роговицы.

Ключевые слова: роговица, тканевая инженерия, децеллюляризация, лентикула.

Для корреспонденции: Ли Валерий Герасимович. Адрес: 127486, Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59а. Тел. (916) 071-38-80. E-mail: inferno_03@mail.ru

Corresponding author: Valeriy Li. Address: 59a, Beskudnikovsky Boulevard, Moscow, 127486, Russian Federation. Phone: (916) 071-38-80. E-mail: inferno_03@mail.ru

COMPARATIVE ANALYSIS OF PROTOCOLS FOR DECELLULARIZATION OF CORNEAL LENTICULAR TISSUE

S.A. Borzenok^{1, 2}, S.V. Kostenev¹, A.V. Doga¹, A.V. Shatskikh¹, V.G. Li¹, D.S. Ostrovskiy¹, M.K. Khubetsova¹

¹ Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow, Russian Federation
² Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation

Shortage of donor corneas is a burning issue in ophthalmology. That is why there is a search for new alternative ways for treating corneal diseases. Decellularization technologies make it possible to create corneal tissue-engineered constructs that can address the issue of donor corneal shortage. Objective: to conduct a comparative analysis of effective methods for treating the corneal lenticula and to create an optimized and standardized decellularization protocol. Materials and methods. Corneal stromal lenticules obtained after ReLEx SMILE surgery were chosen for the study. Lenticule parameters: thickness 77–120 microns, diameter 6.5 mm. We used 3 protocols for the treatment of lenticules: 1) treatment with 1.5 M sodium chloride with nucleases (NaCl); 2) 0.1% SDS (SDS); 3) treatment with Trypsin-EDTA solution, followed by double washing in a hypotonic Tris buffer solution with nucleases (Trypsin-EDTA). Optical properties of lenticles were determined spectrophotometrically, where the samples before decellularization served as a control. Fluorescence imaging of nuclear material in the original cryosections was performed using Hoechst dye. The state of collagen fiber ultrastructure was assessed by scanning electron microscopy. The quantitative DNA content in fresh lenticules and in lenticules after treatment was analyzed. **Results.** All three decellularization protocols effectively removed nuclear and cellular material; the residual DNA content was <50 ng/mg. However, the Trypsin-EDTA protocol led to significant damage to the extracellular matrix structure, which negatively affected the transparency of corneal tissue-engineered constructs. Transparency of samples for the NaCl protocol was close to native lenticules. Conclusion. To create a corneal tissue-engineered construct, NaCl decellularization protocols appear to be optimized and can be used to treat various corneal diseases.

Keywords: cornea, tissue engineering, decellularization, lenticula.

введение

Технический прогресс в рефракционной хирургии привел к разработке метода фемтосекундной лазерной коррекции зрения по технологии ReLEx SMILE (Refractive Lenticule Extraction & Small Incision Lenticule Extraction). В ходе операции в строме роговицы сначала лазером формируется часть роговицы в виде диска – лентикулы, извлекаемой затем через микроразрез. Такие параметры лентикулы, как ее толщина и диаметр, зависят от исходной корригируемой миопии либо миопического астигматизма [1].

Повторная имплантация лентикулы восстанавливает объем стромы и показатели аномалии рефракции после операции (экстракции рефракционной лентикулы), как было показано на моделях обезьян и кроликов [2, 3]. Также сообщалось о коррекции гиперметропии и кератоконуса с помощью имплантации интрастромальных линз [4–6].

Стоит отметить, что существующий на сегодня выраженный дефицит донорского материала обусловливает поиск новых направлений лечения патологий роговицы. Общепризнанно, что тканевая инженерия является альтернативой аллотрансплантации, в связи с чем применение лентикул представляется перспективной и эффективной методикой. Однако остаточные клеточные компоненты летикулы относят данный трансплантат к категории истинных, что, как известно, может привести к развитию реакции отторжения.

Современный взгляд на аллогенную трансплантацию подразумевает подготовку пригодных бесклеточных, неиммуногенных тканей для последующей пересадки реципиенту. Метод децеллюляризации является перспективным направлением в тканевой инженерии, позволяющим максимально удалить клетки и генетический материал, тем самым снизить риск развития реакции трансплантационного иммунитета. При этом следует отметить, что повреждения внеклеточного матрикса (ВКМ) должны быть минимизированы, поскольку именно сохранность каркасных и структурно-функциональных свойств ВКМ является основополагающей в эффективном применении децеллюляризованных органов и тканей [7, 8]. В различных протоколах децеллюляризации, описанных в литературе, применяются физические, ферментативные и химические методы освобождения ВКМ от клеток [9].

В исследованиях Gary Hin-Fai Yam и др. авторы использовали донорские роговицы как источник стромальных лентикул толщиной 70 мкм, которые нарезали с помощью фемтосекундного лазера [10]. Авторы сравнивали протоколы децеллюляризации как с изолированным применением 0,1% SDS, 0,1% Тритон X-100, 1,5 M NaCl, так и в сочетании с нуклеазами различной концентрации. По результатам спектрофотометрии коэффициент пропускания, схожий с контролем, был получен в группе с применением 1.5 M NaCl, за которым следовала группа 0,1% SDS. При оценке данных иммуногистохимии было установлено, что после обработки 0,1% SDS свечение ядер отсутствовало, а в группах с использованием 0,1% Тритон X-100, 1,5 M NaCl и 1,5 M NaCl с нуклеазами 2 Ед/мл сохранялось. Содержание ДНК в группе 0,1% SDS составляло $20,71 \pm 4,3$ нг ДНК на 1 мг сухого веса образца; длина фрагментов ДНК составляла <200 пар нуклеотидов, что соответствовало предложенным Сгаро и др. ориентировочным критериям эффективности децеллюляризации органов и тканей [11].

В другой работе китайские исследователи создавали конструкцию из склеенных между собой фибриновым клеем децеллюляризованных лентикул для проведения передней послойной кератопластики в эксперименте на кроликах [12]. Данные стромальные лентикулы были извлечены из роговицы человека в результате операции ReLEx SMILE (с толщиной ≥100 мкм и диаметром 6,6 мм). В качестве протокола обработки использовали 1,5 M NaCl с раствором ДНКазы 5 Ед/мл и РНКазы 5 Ед/мл. Данный протокол был заимствован из работы Shafiq et al., где авторы сообщили об успешном его применении на цельных донорских роговицах человека в отношении удаления клеток [13].

В недавнем исследовании М.І. Huh et al. использовали донорские роговицы, из которых извлекали стромальные лентикулы с помощью технологии ReLEx SMILE (толщина 100 мкм, диаметр 8 мм). Используемые протоколы децеллюляризации включали промывание в растворе Тритон X-100, SDS или трипсин-ЭДТА в различных концентрациях: 0,1; 0,25; 0,5%. Далее проводили промывание в гипотоническом, изотоническом и гипертоническом трис-буферных растворах с последующим отмыванием в растворе нуклеаз. В конце повторялся цикл отмывания в трис-буферных растворах [14].

Группы с 0,25 и 0,5% трипсин-ЭДТА с последующим промыванием в гипотоническом трис-буфере с нуклеазами показали самое низкое содержание ДНК по сравнению с другими группами. По результатам спектрофотометрии было выявлено, что группа с применением 0,5% трипсин-ЭДТА и гипотонического трис-буфера обладает наилучшей прозрачностью. По данным сканирующей электронной микроскопии в данной группе было выявлено, что ВКМ после обработки не нарушен.

Таким образом, можно заключить, что на сегодня существует множество протоколов децеллюляризации роговичной лентикулы, однако, несмотря на все многообразие, до сих пор отсутствует четкое понимание по предпочтительному использованию определенного протокола.

Цель исследования – в нашем исследовании мы провели сравнение эффективных методов обработки лентикулы с целью оптимизации и стандартизации протокола децеллюляризации

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Перед операцией SMILE у всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на дальнейшее использование донорской лентикулярной ткани. Средний возраст пациентов составлял 27,3 ± 5,4 года. Всем пациентам была выполнена операция SMILE по поводу миопии и сложного миопического астигматизма. Сферический эквивалент до операции SMILE составлял –4,72 ± 0,86 дптр. Для децеллюляризации использовали лентикулы толщиной 77–120 мкм и диаметром 6,5 мм.

Забор материала проходил в операционной на базе головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава РФ. Операция по технологии ReLex SMILE проходила под местной капельной анестезией с помощью фемтосекундного лазера VisuMax (частота исследования импульсов 500 кГц, энергия в импульсе 160 нДж), формировалось сначала дно лентикулы, а затем ее «крышка». Диаметр лентикулы составлял 6,5 мм, а диаметр крышки – 7,5 и 7,6 мм. Полученная лентикула переносилась в заранее подготовленный флакон, содержащий дисперсный вискоэластик (ДВ), содержащий 3,0% гиалуронат натрия и 4,0% хондроитин сульфат массой 600 000 Дальтон. Далее флакон с образцами переносили в контейнер и транспортировали в лабораторию на базе Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем головной организации МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова. В лаборатории выполнялись исследования в стерильных условиях in vitro (n = 145). В табл. 1 показано распределение лентикул в эксперименте.

Таблица 1

Pаспределение лентикул по видам работ Distribution lenticules by type of work

| Методы оценки лентикулы | Количество лентикул |
|-------------------------------------|---------------------|
| Спектрофотометрия | 45 |
| Гистология | 20 |
| Иммуногистохимия | 20 |
| Сканирующая электронная микроскопия | 20 |
| ДНК-анализ | 40 |
| Всего | 145 |

Децеллюляризация лентикулы

Перед началом децеллюляризации лентикулы отмывали от ДВ в растворе PBS (трехкратно) по 5 минут. Для децеллюляризации были использованы три варианта растворов, которые различались по компонентам, времени экспозиции и концентрации. В результате было сформировано четыре группы, где три группы были опытные, а одна являлась контрольной (табл. 2).

Прозрачность нативных и децеллюляризованных лентикул

Спектральное пропускание лентикулы в диапазоне длины волн от 380 до 780 нм определяли с помощью спектрофотометра Multiskan GO (Thermo Scientific, США), данные собирались с шагом 10 нм. Пропускание спектра для одних и тех же образцов производилось в два этапа. На 1-м этапе измеряли нативные лентикулы – контрольная группа. На втором этапе исследовали прозрачность трех опытных групп после обработки.

Согласно литературным данным, для устранения неспецифического отека лентикул после децеллюляризации используют глицерин. В данном исследовании с указанной целью использовался разрешенный к клиническому применению в офтальмологии ДВ. После дегидратации в ДВ в течение 1 часа образцы переносили в 96-луночный планшет, начиная со второй лунки, при этом первая лунка не содержала лентикулу. В каждую лунку был добавлен и равномерно распределен по ее дну ДВ в объеме 250 мкл. Далее 96-луночный планшет вставляли в камеру спектрофотометра для измерения коэффициента пропускания K_n (%). В качестве расчетного значения для статистического анализа данных использовали среднее для всей группы по 41 точке прозрачности полученного спектра. Для этого сначала был рассчитан K₀ следующим образом:

$$K_{o} = \frac{K_{1}}{K_{2}} \times 100 \%,$$

где K₀ – коэффициент пропускания для каждой из 41 точки спектра в пределах одного образца в группе; K₁ – коэффициент пропускания в лунке, содержащей образец; K₂ – коэффициент пропускания в лунке, не содержащей образец.

Затем был рассчитан К_с следующим образом:

$$K_c = \frac{\Sigma K_o}{N},$$

где K_c – средний коэффициент пропускания для каждой из 41 точки спектра всех образцов в группе; ΣK_o – суммарное значение измерений каждого образца в группе; N – общее количество образцов в группе.

Далее был рассчитан К $_{\! \pi}$ следующим образом:

$$K_{\Pi} = \frac{\Sigma K_c}{41},$$

где K_n – средний коэффициент пропускания для всех 41 точек спектра группы в целом; ΣK_c – суммарное значение среднего коэффициента пропускания; 41 – количество точек спектра, которое соответствует длине волны от 380 до 780 нм, с шагом 10 нм.

Таблица 2

| 10 | | | |
|----|--|--|--|
| N⁰ | Действующие компоненты | Описание методики | |
| 1 | Нативные лентикулы | | |
| 2 | 0,1% SDS (SDS) | Инкубация в растворе 0,1% додецилсульфата натрия (SDS) (Sigma-Aldrich) в течение 24 часов при комнатной температуре. Далее образцы промывали в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) при непрерывном встряхивании в шейкере и при температуре 4 °C, с заменой PBS каждые 24 часа | |
| 3 | 1,5 M NaCl + ДНКаза 5 Ед/мл и РНКаза 5 Ед/мл (NaCl) | Инкубация в 1,5 М растворе хлорида натрия в течение 48 часов, с заменой раствора NaCl каждые 24 часа Затем образцы инкубировали в растворе с ДНКазой 5 Ед/мл (Sigma-Aldrich) и РНКазой 5 Ед/мл (Sigma-Aldrich) в течение 48 часов. Далее образцы промывали в растворе PBS в течение 72 часов, с заменой каждые 24 часа. Процедура обработки проводилась при комнатной температуре и при непрерывном встряхивании в шейкере | |
| 4 | 0,25% Трипсин-ЭДТА (Thermo fisher) + гипотонический трис-бу- ферный раствор (рН 7,2) + ДНКаза 50 Ед/мл и РНКаза 1 Ед/мл + гипотонический трис-буферный раствор (Трипсин-ЭДТА) | Инкубация в растворе 0,25% Трипсин-ЭДТА в течение 48 часов. Затем 1 час в гипотоническом растворе трис-буфера (pH 7,2). Далее в растворе с ДНКазой 50 Ед/мл и РНКазой 1 Ед/мл в течение 24 часов. Затем образцы отмывали в гипотоническом трис-буферном растворе (pH 7,2) в течение 1 часа. Процедура децеллюляризации проводилась при температуре 37 °С и при непрерывном встряхивании в шейкере | |

Описание протоколов децеллюляризации Description of decellularization protocols

Гистологическая оценка нативных и децеллюляризованных лентикул

Лентикулы фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, затем промывали проточной водой, производили обезвоживание в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Далее выполняли серии гистологических срезов толщиной 2–3 мкм с применением окрасок гематоксилин-эозином, по методу Ван-Гизона, а также альциановым синим для оценки содержания в тканях гликозаминогликанов. Препараты изучали на инвертированном микроскопе ix81 (Olympus, Япония) при 40-кратном увеличении с последующим фотографированием.

Методом иммуногистохимического (ИГХ) исследования изучали экспрессию коллагена I, III, V и VI типов, характерных для стромы роговицы и являющихся основным компонентом ВКМ. Для этого нативные и обработанные образцы сначала помещали в среду Shandon Cryomatrix (Thermo scientific, Великобритания) и замораживали при температуре -30 °C в криостате HM525 NX (Thermo scientific, Великобритания). Затем были сделаны криостатные срезы толщиной 10 мкм и перенесены на слайды Polysine (Thermo scientific, Великобритания), из расчета четыре среза на один слайд. Использовали следующие первичные антитела: коллаген I типа (Rabbit 1:200, ab34710, Abcam), коллаген III типа (Mouse 1:100, ab6310, Abcam); коллаген V типа (Rabbit 1:100, ab114072, Abcam); коллаген VI типа (Rabbit 1:200, ab6588, Abcam). Для идентификации вышеперечисленных маркеров использовали вторичные антитела Alexa Fluor 488 (1:250, ab150077, Goat Anti-Rabbit IgG, Abcam) и Alexa Fluor 594 (1:250, ab150116, Goat Anti-Mouse IgG, Abcam). После удаления вторичных антител для оценки окрашивания ядер использовали краситель Hoechst (О150, ПанЭко). Оценку результатов проводили с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа «Fluo View FV10i» (Olympus, Япония) ×100.

Оценка ультраструктуры коллагенновых волокон методом сканирующей электронной микроскопии

Образцы обезвоживали в растворе ацетона по восходящей концентрации 10, 30, 50, 70, 90, 100% (трижды) по 10 минут в каждом. Далее образцы подвергались критической сушке с использованием осушителя (Critical Point Dryer Qurum k850, Quorum Technologies, Великобритания). Затем образцы напыляли золотом (толщина слоя 5 нм, проба 999) с помощью напылительной установки (Smart Coater SPI, SPI Supplies, США) и анализировали посредством сканирующего электронного микроскопа – 6000plus (Jeol, Япония). Анализ образцов производился в десяти случайно выбранных точках и осуществлялся в режиме высокого вакуума ×1000 (мощность 10 kV).

Измерение содержания ДНК

Выделение ДНК из образцов проводилось с использованием набора DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Подсчет содержания ДНК осуществлялся с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США) и набора для анализа Qubit dsDNA HS (High-Sensitivity) Assay Kit (Invitrogen, США). Процедура измерения производилась согласно инструкции производителя.

Статистический анализ

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.

Сравнение независимых выборок проводилось с помощью критерия Краскела–Уоллиса с последующим post-hoc-тестом Данна или t-критерием Уэлча для ненормально и нормально распределенных выборок (с гетерогенными дисперсиями) соответственно. Во всех случаях была использована поправка Холма на множественные сравнения. При оценке результатов статистически значимыми считали результаты при значениях p < 0,05.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием среды для статистических вычислений R версии 4.0.2. (R Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия), а визуализацию данных – при помощи программы GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Прозрачные свойства лентикулы

Проведенное исследование показало, что в группе Трипсин-ЭДТА прозрачность была значительно снижена по сравнению с контролем, а наиболее приближенными к контролю были результаты в группе с использованием NaCl (рис. 1). Были выявлены статистически значимые различия в группах SDS – контроль ($86,85 \pm 3,34$ против $90,39 \pm 5,11$; 87,46 (84,33-89,63) против 91,49 (86,64-93,80); р < 0,03); Трипсин-ЭДТА – контроль ($38,70 \pm 8,78$ против $90,39 \pm 5,11$; 43,74 (33,56-44,86) против 91,49(86,64-93,80); р < 0,0001); также при сравнении NaCl – Трипсин-ЭДТА ($88,63 \pm 2,56$ против $38,70 \pm$



Рис. 1. Среднее спектральное пропускание (%) на длинах волн от 380 до 780 нм

Fig. 1. Average spectral transmittance (%) at 380 to 780 nm wavelength

Гистологическое окрашивание лентикул

При гистологическом окрашивании гематоксилином и эозином, по методу Ван-Гизона и альциановым синим выявлено полное удаление клеток, клеточных ядер и отсутствие значительного повреждения структуры в полученном ацеллюлярном матриксе в группах SDS и NaCl. В группе Трипсин-ЭДТА заметно значительное повреждение структуры матрикса на фоне полного отсутствия клеток и клеточных ядер (рис. 2).



Рис. 2. Гистологическая картина нативных и децеллюляризованных лентикул. Окрашивание гематоксилин-эозином: а – контроль, б – NaCl, в – SDS, г – Трипсин-ЭДТА; окрашивание по Ван-Гизону: д – контроль, е – NaCl, ж – SDS, з – Трипсин-ЭДТА; окрашивание альциановым синим: и – контроль, к – NaCl, л – SDS, м – Трипсин-ЭДТА; ×40

Fig. 2. Histological picture of native and decellularized lenticules. H&E stain: a - control, $\delta - \text{NaCl}$, B - SDS, $\Gamma - \text{Trypsin-EDTA}$; Van Gieson's stain: $\pi - \text{control}$, e - NaCl, $\pi - \text{SDS}$, 3 - Trypsin-EDTA; Alcian blue stain: $\pi - \text{control}$, $\kappa - \text{NaCl}$, $\pi - \text{SDS}$, $\pi - \text{Trypsin-EDTA}$; Alcian blue stain: $\pi - \text{control}$, $\kappa - \text{NaCl}$, $\pi - \text{SDS}$, $\pi - \text{Trypsin-EDTA}$; Alcian blue stain: $\pi - \text{control}$, $\kappa - \text{NaCl}$, $\pi - \text{SDS}$, $\pi - \text{Trypsin-EDTA}$; Alcian blue stain: $\pi - \text{control}$, $\kappa - \text{NaCl}$, $\pi - \text{SDS}$, $\pi - \text{Trypsin-EDTA}$; Alcian blue stain: $\pi - \text{control}$, $\kappa - \text{NaCl}$, $\pi - \text{SDS}$, $\pi - \text{Trypsin-EDTA}$; Alcian blue stain: $\pi - \text{control}$, $\kappa - \text{NaCl}$, $\pi - \text{SDS}$, $\pi - \text{Trypsin-EDTA}$; Alcian blue stain: $\pi - \text{control}$, $\kappa - \text{NaCl}$, $\pi - \text{SDS}$, $\pi - \text{Trypsin-EDTA}$; Alcian blue stain: $\pi - \text{control}$, $\kappa - \text{NaCl}$, $\pi - \text{SDS}$, $\pi - \text{Trypsin-EDTA}$; Alcian blue stain: $\pi - \text{control}$, $\kappa - \text{NaCl}$, $\pi - \text{SDS}$, $\pi - \text{Trypsin-EDTA}$; Alcian blue stain: $\pi - \text{control}$, $\kappa - \text{NaCl}$, $\pi - \text{SDS}$, $\pi - \text{Trypsin-EDTA}$; Alcian blue stain: $\pi - \text{control}$, $\kappa - \text{NaCl}$, $\pi - \text{SDS}$, $\pi - \text{Trypsin-EDTA}$; Alcian blue stain: $\pi - \text{control}$, $\kappa - \text{NaCl}$, $\pi - \text{SDS}$, $\pi - \text{Trypsin-EDTA}$; Alcian blue stain: $\pi - \text{control}$, $\kappa - \text{NaCl}$, $\pi - \text{SDS}$, $\pi - \text{Trypsin-EDTA}$; Alcian blue stain: $\pi - \text{control}$, $\kappa - \text{NaCl}$, $\pi - \text{SDS}$, $\pi - \text{Trypsin-EDTA}$; Alcian blue stain: $\pi - \text{control}$, $\pi - \text{SDS}$, $\pi - \text{Trypsin-EDTA}$; Alcian blue stain: $\pi - \text{control}$, $\pi - \text{SDS}$, $\pi - \text{Trypsin-EDTA}$; Alcian blue stain: $\pi - \text{Control}$, $\pi - \text{Contro$

Иммунногистохимическое окрашивание лентикул

Флюорохромирование ядер красителем Hoechst показало, что лентикулы, которые подверглись обработке, окрашиваются негативно. При этом в контрольной группе определяется характерное свечение ядер. Также по данным ИГХ в контрольной и опытных группах отмечалась положительная экспрессия коллагена I, III, V и VI типов (рис. 3).

Результаты сканирующего электронного микроскопирования

При анализе толщины коллагеновых волокон образцов были выявлены различия как между опытными группами и контролем, так и при попарном сравнении опытных протоколов между собой. При сравнении пары NaCl – контроль толщина составила 1,96 \pm 0,46 против 2,30 \pm 0,40; 1,9 (1,69–2,21) против 2,26 (2,03–2,63); р = 0,00013; группы SDS – контроль 1,36 \pm 0,25 против 2,30 \pm 0,40; 1,36 (1,21–1,47) против 2,26 (2,03–2,63); р < 0,0001; для протоколов Трип-

син-ЭДТА – контроль 4,19 ± 0,56 против 2,30 ± 0,40; 4,13 (3,85–4,54) против 2,26 (2,03–2,63); р < 0,0001. Попарное сравнение протоколов для NaCl, SDS, Трипсин-ЭДТА между собой выявило статистически значимые различия (р < 0,0001). На рис. 4 видно, что группа SDS в основном представлена разволокненными фибриллами из-за отсутствия достаточного объема коллагеновых волокон. В группе Трипсин-ЭДТА отмечается заметное утолщение коллагеновых волокон, которое вызвано грубым нарушением их ультраструктуры. В группе NaCl выявлено незначительное изменение состояния коллагеновых волокон.

ДНК-анализ

При попарном сравнении групп t-критерием Уэлча (с поправкой Холма) было выявлено статистически значимое отличие как между опытными группами и контролем, так и опытными группами между собой: NaCl – контроль $39,34 \pm 8,65$ против $132,18 \pm$ 44,17; 41,99 (38,57-44,67) против 128,5 (102,02-154,48); p < 0,0002; SDS – контроль $37,07 \pm 6,19$ про-



Рис. 3. Иммуногистохимический анализ нативных и децеллюляризованных лентикул. Синяя флюоресценция – ядерный материал, зеленая – коллаген I, III и VI типов, красная – коллаген V типа. ×100

Fig. 3. Immunohistochemistry of native and decellularized lenticules. Blue staining – nuclear material, green staining – collagen types I, III and VI, red staining – type V collagen. $\times 100$

тив 132,18 ± 44,17; 39,74 (36,72–42,75) против 128,5 (102,02–154,48); p < 0,0001; Трипсин-ЭДТА – контроль 13,42 ± 7,4 против 132,18 ± 44,17; 11,45 (8,47–16,86) против 128,5 (102,02–154,48); p < 0,0001. При сравнении опытных групп между собой выявлены статистически значимые различия для групп NaCL – SDS (p < 0,002), SDS – Трипсин-ЭДТА (p < 0,0006), NaCl – Трипсин-ЭДТА (p < 0,0001).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящий момент происходит процесс активного поиска эффективной тканеинженерной роговичной конструкции (ТК) как альтернативы трансплантации донорских роговиц в условиях их выраженного дефицита.

Разработка протокола децеллюляризации является сложной и рутинной методикой. В литературе существует множество подробных описаний различных протоколов децеллюляризации для таких органов, как тонкий кишечник, перикард, клапаны сердца, печень, кожа, мочевой пузырь, роговица [15, 16]. Эффективность децеллюляризации в основном зависит от вида ткани. В отличие от более толстых органов или тканей ткань роговицы является более тонкой по толщине и имеет специфическую структурную организацию, сохранение которой является крайне важным условием децеллюляризации [17]. В данном исследовании мы использовали лентикулярную ткань роговицы, полученную в ходе операции ReLex SMILE. Для оценки децеллюляризации кроме предложенных Crapo et al. критериев децеллюляризации также дополнительно проводили оценку прозрачности стромы роговицы, состояния ультраструктуры коллагеновых волокон и основных компонентов ВКМ, таких как гликозаминогликаны и общий коллаген [11].

В данном исследовании, в рамках оценки прозрачности до и после обработки, группы SDS и NaCl показали лучшие результаты по сравнению с группой Трипсин-ЭДТА. Хотя группа SDS статистически от-



Рис. 4. Коллагеновая ультраструктура ВКМ: а – контроль, б – NaCl, в – SDS, г – Трипсин-ЭДТА. Сканирующая электронная микроскопия. ×1000

Fig. 4. Collagen ultrastructure of the ECM: a – Control, 6 – NaCl, B – SDS, r – Trypsin-EDTA. Scanning electron microscopy. ×1000

личалась от контроля (p < 0,005), в отличие от группы NaCl (p = 0,524), которая показала приближенные результаты прозрачности к контрольной группе. При гистологическом и иммуногистохимическом исследованиях все протоколы были эффективными в отношении удаления ядер. Однако в группе Трипсин-ЭДТА отмечалось значительное повреждение основных компонентов ВКМ, при сохранности данных компонентов ВКМ в группах SDS и NaCl.

При оценке ультраструктуры коллагеновых волокон наибольшая их толщина наблюдалась в группе Трипсин-ЭДТА, а наименьшая – при использовании протокола SDS. Наиболее близкий к контрольной группе результат продемонстрировали лентикулы, обработанные NaCl.

Содержание остаточного ДНК во всех группах обработки было меньше 50 нг/мг, что соответствует предложенным Crapo et al. требованиям [11]. В группе Трипсин-ЭДТА отмечалось самое низкое содержание остаточного ДНК.

Наше исследование не подтвердило данные М.І. Huh et al., где применялся 0,25 и 0,5% Трипсин-ЭДТА с нуклеазами и двойным отмыванием в гипотрис-буферном растворе [14]. Мы считаем, что суммарное действие сложных компонентов данного протокола хотя и приводит к лучшим результатам относительно снижения содержания остаточного ДНК, тем не менее, их же действие является разрушительным по отношению к ультраструктуре коллагеновых волокон и компонентам ВКМ. В литературе встречаются данные о разрушительном действии трипсина и нуклеаз на коллагеновую структуру тканей [18].

Отсутствие клеточного материала, сохранность коллагеновой структуры и основных компонентов ВКМ являются ключевыми предикторами для создания ТК. В нашем исследовании обработка 1,5 M NaCl с нуклеазами показала хорошие результаты по всем оценочным параметрам для разработки ТК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, сравнительная оценка эффективности различных протоколов децеллюляризации для создания матрицы из роговичной лентикулы привела к созданию оптимизированных и стандартизированных протоколов. Представленные результаты в данной работе открывают широкие возможности для использования ТК в будущем. Однако вопрос хранения данных ТК так и не решен и требует отдельных будущих исследований в этом направлении.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Ganesh S, Brar S, Arra RR. Refractive lenticule extraction small incision lenticule extraction: A new refractive surgery paradigm. *Indian J Ophthalmol.* 2018; 66 (1): 10–19. doi: 10.4103/ijo.IJO_761_17. PMID: 29283117.
- Angunawela RI, Riau AK, Chaurasia SS, Tan DT, Mehta JS. 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. doi: 10.1167/iovs.12-10170. PMID: 22743323.
- 3. *Riau AK, Angunawela RI, Chaurasia SS, Lee WS, Tan DT, Mehta JS.* 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. doi: 10.1371/journal.pone.0067058. PMID: 23826194.
- Pradhan KR, Reinstein DZ, Carp GI, Archer TJ, Gobbe M, Gurung R. 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. doi: 10.3928/1081597X-20131021-07. PMID: 24203809.
- Sun L, Yao P, Li M, Shen Y, Zhao J, Zhou X. The Safety and Predictability of Implanting Autologous Lenticule Obtained by SMILE for Hyperopia. *J Refract Surg.* 2015; 31 (6): 374–379. doi: 10.3928/1081597X-20150521-03. PMID: 26046703.
- Ganesh S, Brar S, Rao PA. Cryopreservation of extracted corneal lenticules after small incision lenticule extraction for potential use in human subjects. *Cornea*. 2014; 33 (12): 1355–1362. doi: 10.1097/ICO.000000000000276. PMID: 25343698.
- Bonvillain RW, Danchuk S, Sullivan DE, Betancourt AM, Semon JA, Eagle ME et al. A nonhuman primate model of lung regeneration: detergent-mediated decellularization and initial *in vitro* recellularization with mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2012; 18 (23–24): 2437–2452. doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0594. PMID: 22764775.
- Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. Nat Med. 2008; 14 (2): 213–221. doi: 10.1038/nm1684. PMID: 18193059.
- Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006; 27 (19): 3675– 3683. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.014. PMID: 16519932.
- Yam GH, Yusoff NZ, Goh TW, Setiawan M, Lee XW, Liu YC et al. Decellularization of human stromal refractive lenticules for corneal tissue engineering. Sci Rep. 2016; 6: 26339. doi: 10.1038/srep26339. PMID: 27210519.
- 11. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Bioma-

terials. 2011; 32 (12): 3233–3243. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057. PMID: 21296410.

- Yin H, Qiu P, Wu F, Zhang W, Teng W, Qin Z et al. Construction of a Corneal Stromal Equivalent with SMILE-Derived Lenticules and Fibrin Glue. *Sci Rep.* 2016; 6: 33848. doi: 10.1038/srep33848. PMID: 27651001.
- Shafiq MA, Gemeinhart RA, Yue BY, Djalilian AR. Decellularized human cornea for reconstructing the corneal epithelium and anterior stroma. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012; 18 (5): 340–348. doi: 10.1089/ten. TEC.2011.0072. PMID: 22082039.
- Huh MI, Lee KP, Kim J, Yi S, Park BU, Kim HK. Generation of Femtosecond Laser-Cut Decellularized Corneal Lenticule Using Hypotonic Trypsin-EDTA Solution for Corneal Tissue Engineering. J Ophthalmol. 2018; 2018: 2590536. doi: 10.1155/2018/2590536. PMID: 29805794.
- 15. *Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW*. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and func-

tion. *Acta Biomater*. 2009; 5 (1): 1–13. doi: 10.1016/j. actbio.2008.09.013. PMID: 18938117.

- Porzionato A, Stocco E, Barbon S, Grandi F, Macchi V, De Caro R. Tissue-Engineered Grafts from Human Decellularized Extracellular Matrices: A Systematic Review and Future Perspectives. Int J Mol Sci. 2018; 19 (12): 4117. doi: 10.3390/ijms19124117. PMID: 30567407.
- DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. J Cataract Refract Surg. 2011; 37 (3): 588–598. doi: 10.1016/j.jcrs.2010.12.037. PMID: 21333881.
- Oh JY, Kim MK, Lee HJ, Ko JH, Wee WR, Lee JH. Processing porcine cornea for biomedical applications. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009; 15 (4): 635–645. doi: 10.1089/ten.TEC.2009.0022. PMID: 19249963.

Статья поступила в редакцию 9.03.2021 г. The article was submitted to the journal on 9.03.2021