

DOI: 10.15825/1995-1191-2026-1-206-211

## ТЕХНОЛОГИЯ УДАЛЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО МАТЕРИАЛА ИЗ РОГОВИЧНЫХ ЛЕНТИКУЛ ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕЙ КЕРАТОПЛАСТИКИ

*А.А. Долбилкин<sup>1, 2</sup>, А.Г. Щуко<sup>1-3</sup>, Т.Н. Юрьева<sup>1-3</sup>, Ю.В. Курсакова<sup>1</sup>, О.В. Писаревская<sup>1</sup>, И.А. Шурыгина<sup>4</sup>*

<sup>1</sup> Иркутский филиал ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Минздрава России, Иркутск, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России, Иркутск, Российская федерация

<sup>3</sup> Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования, филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Иркутск, Российская федерация

<sup>4</sup> ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» Минобрнауки, Иркутск, Российская федерация

В статье рассматриваются методы снижения частоты отторжения пересаженных тканей роговицы и поиск альтернатив полнослойным трансплантатам роговицы. Цель исследования заключается в разработке технологии удаления клеточного материала из роговичных лентикул человека, полученных в ходе рефракционных операций, для использования в качестве биоматериала при кератопластике. Предложена процедура децеллюляризации, в ходе которой лентикулы погружаются в 1% водный раствор лаурилсульфата натрия (SLS) на сутки, после чего очищаются от детергента с использованием забуференного раствора 0,9% NaCl в течение 5 дней. Эффективность децеллюляризации оценивалась по отсутствию генетического материала, определяемого методами окраски по Ноеchst и гематоксилином с эозином. Проведен гистологический анализ биоматериала после консервации на различных сроках хранения, что подтвердило отсутствие биодеградации бесклеточных лентикул, которые оставались стерильными не менее 12 недель. Экспериментальное сравнительное исследование на кроликах продемонстрировало эффективность и безопасность предложенного метода.

*Ключевые слова:* кератопластика, роговичная лентикула, кролик, эксперимент, гистология.

**Для корреспонденции:** Долбилкин Александр Александрович. Адрес: 664033, Иркутск, ул. Лермонтова, д. 337. Тел. (3952) 56-41-82. E-mail: fair.nous@gmail.com, nauka@mntk.irkutsk.ru

**Corresponding author:** Aleksandr Dolbilkin. Address: 337, Lermontova str., Irkutsk, 664033, Russian Federation. Phone: (3952) 56-41-82. E-mail: fair.nous@gmail.com; nauka@mntk.irkutsk.ru

# TECHNIQUE FOR DECELLULARIZATION OF CORNEAL LENTICULES FOR SUBSEQUENT KERATOPLASTY

A.A. Dolbilkin<sup>1, 2</sup>, A.G. Shchuko<sup>1-3</sup>, T.N. Iureva<sup>1-3</sup>, Yu.V. Kursakova<sup>1</sup>, O.V. Pisarevskaya<sup>1</sup>, I.A. Shurygina<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Irkutsk Branch of Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Irkutsk, Russian Federation

<sup>2</sup> Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russian Federation

<sup>3</sup> Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education, Irkutsk, Russian Federation

<sup>4</sup> Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, Irkutsk, Russian Federation

This article addresses strategies for reducing corneal graft rejection and explores alternatives to full-thickness corneal transplantation. The objective of the study is to develop a technique for removing cellular material from human corneal lenticules obtained during refractive surgery for use as a biomaterial in keratoplasty. A decellularization procedure was developed in which lenticules were immersed in a 1% aqueous solution of sodium lauryl sulfate for 24 hours, followed by detergent removal using a buffered 0.9% NaCl solution for 5 days. Decellularization effectiveness was confirmed by the absence of genetic material using Hoechst staining and hematoxylin & eosin staining. Histological analysis of the biomaterial after preservation for various periods demonstrated no signs of biodegradation of the acellular lenticules, which remained sterile for at least 12 weeks. A comparative experimental study in rabbits demonstrated the efficacy and safety of the proposed technique.

*Keywords:* keratoplasty, corneal lenticule, rabbit, experiment, histology.

## ВВЕДЕНИЕ

Спрос на донорские ткани роговицы остается высоким, что служит причиной исследования способов снижения частоты отторжения пересаженных тканей роговицы и поиска альтернатив полнослойным трансплантатам [1, 2]. Целью нашего исследования является разработка технологии удаления клеточного материала из роговичных лентикул человека, полученных в ходе рефракционных операций, для последующего применения в качестве биоматериала при кератопластике.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Была предложена процедура удаления клеточных элементов из операционного материала: лентикулы, полученные в ходе рефракционных лазерных операций, были погружены в 1% водный раствор лаурилсульфата натрия (англ. sodium lauryl sulfate, SLS) с соблюдением методов асептики и антисептики. Фрагменты стромы роговицы были выдержаны в растворе в течение суток, после чего лентикулы были очищены от SLS путем помещения в стерильную пробирку с забуференным раствором 0,9% NaCl – пятикратно с экспозицией по 24 ч. Все манипуляции с лентикулами осуществлялись в условиях ламинарного бокса второго класса защиты. Поскольку на текущий момент не существует общепринятых стандартов эффективности децеллюляризации, мы опирались на критерий отсутствия следов генетического материала при окраске по Hoechst и окраске гематоксилином и эозином [3].

Необходимая концентрация раствора SLS и период выдержки лентикул были определены в ходе

эксперимента. Фрагменты стромы роговицы подвергались удалению клеточного материала в 0,1% растворе с выдержкой 1 сутки (n = 10), в 0,1% растворе с выдержкой 2 суток (n = 10), в 1% растворе с выдержкой 1 сутки (n = 10), в качестве контроля использовались необработанные лентикулы (n = 10). Далее лентикулы были окрашены по Hoechst (Invitrogen, Cat. NH-3570, Lot 822389), 1 : 300, инкубировали 10 минут. Промывали в Трис-буфере с твином (pH = 7,6) 2 раза по 5 минут. Закрывали в Fluoromount (Diagnostic Biosystems, REF K024, Lot P 939-B). Визуализацию специфического свечения флюорохромных меток проводили на исследовательском микроскопе Nikon Eclipse 80i с приставкой для эпифлюоресценции DИH-M.

С целью исключения возможной биodeградации лентикул после удаления клеток был проведен их гистологический анализ после консервации в стерильных пробирках с забуференным физраствором на различных сроках. Биоматериал хранился в темном помещении при температуре 2–5 °С в течение 7, 16, 21, 42, 70, 86 дней. В контрольной группе (№ 7) исследовались свежие необработанные лентикулы. До проведения гистологического исследования содержимое пробирок было подвергнуто посеву на стерильность, положительных результатов получено не было. Материал (все роговичные лентикулы из флаконов), фиксированный в 10% растворе нейтрального формалина, промывали проточной водой, обезживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин, выполняли серии гистологических срезов с применением окраски гематоксилином и эозином. Препараты изучали под микроско-

пом фирмы Leica DM LB2 при  $\times 50$ ,  $\times 100$ ,  $\times 200$ ,  $\times 400$  увеличении с последующим фотографированием на слайдсканере Leica Aperio CS2.

Для оценки эффективности и безопасности предложенной технологии удаления клеточного материала было проведено сравнительное исследование трансплантации бесклеточных (первая группа,  $n = 10$ ) и необработанных лентикул (вторая группа,  $n = 10$ ) на животной модели – половозрелых самцах кроликов породы Советская шиншилла. В асептических условиях под внутривенным наркозом лабораторным животным наносилась хирургическая травма: поверхностная кератэктомия диаметром 4,5 мм, глубиной около 150 мкм. Пересадка лентикул осуществлялась согласно описанному нами ранее способу [4]. Животные получали стандартное офтальмологическое антимикробное (с учетом антибиотикорезистентности), противовоспалительное и кератопластическое лечение: трехкратные инстиллязии кап. моксифлоксацин 0,5% или тобрамицин 0,3% – 14 дней, дексаметазон

0,1% – 21 день, мазь офлоксацин 0,3% – двукратно – 10 дней. Кролики осматривались ежедневно и поэтапно выводились из эксперимента путем внутривенного введения наркотического препарата (золазепам гидрохлорид + тилетамин гидрохлорид) в передозировке с предварительной фоторегистрацией в сроки на 1, 4 и 8-й неделе. Энуклеированные глазные яблоки подвергались гистологической проводке и исследованию аналогично вышеописанной методике.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В рамках опытов по удалению клеток из роговичных стромальных лентикул получены следующие результаты: в необработанной лентикле (контроль) визуализировалось большое количество ядер кератоцитов, в остальных образцах определялось фоновое свечение и единичные ядерные элементы, что говорит о наличии резидуальных фрагментов нуклеиновых кислот (рис. 1). Среднее значение (Me) количества клеточных ядер в поле зрения в группе с

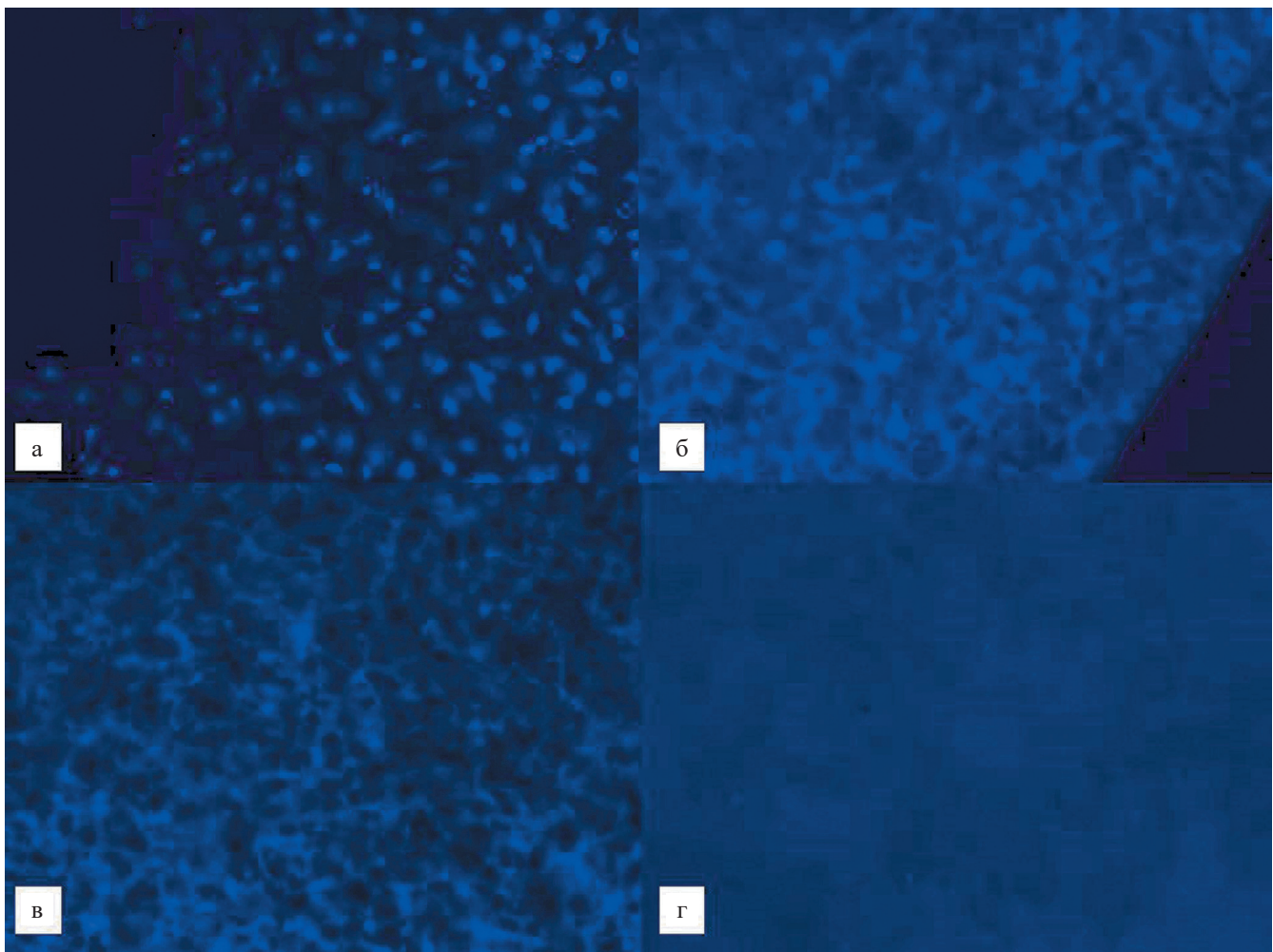


Рис. 1. Фрагменты стромы роговицы. Окраска по Hoechst ( $\times 100$ ): а – контроль; б – лентикла с выдержкой 1 сутки в 0,1% р-ре SLS; в – лентикла с выдержкой 2 суток в 0,1% р-ре SLS; г – лентикла с выдержкой 1 сутки в 1% р-ре SLS

Fig. 1. Fragments of the corneal stroma stained with Hoechst dye ( $\times 100$ ): а – control; б – lenticule exposed to a 0.1% SLS solution for 1 day; в – lenticule exposed to a 0.1% SLS solution for 2 days; г – lenticule exposed to a 1% SLS solution for 1 day

выдержкой 1 сутки в 0,1% растворе SLS составило 6,5 [6,0; 7,75], в группе с выдержкой 2 суток в 0,1% растворе SLS – 2,5 [2,0; 3,0], в группе с выдержкой 1 сутки в 1% растворе SLS – 1,0 [0,25; 1,0]. Различия между группами были статистически значимыми (U-критерий Манна–Уитни). Таким образом, применение 1% раствора SLS с экспозицией лентикул в течение суток было оптимальным.

При окраске гематоксилином и эозином лентикул, консервированных на различные временные периоды, вне зависимости от давности экспозиции роговичных лентикул в 1% растворе SLS, гистологическая картина стромы отличалась от необработанной ткани отсутствием клеток, равномерной гидротизацией и незначительным разволокнением краев лентикул. Так, образец № 7 был представлен ленти-

кулой стромы роговицы после Fs-лазерного удаления без дополнительного внешнего воздействия. Строма содержала соответствующее норме количество кератоцитов (базофильные тонкие веретеновидные клетки между волокон стромы). Строма с компактной упаковкой волокон и линейно срезанными краями, по сравнению с опытными образцами № 1–6, единичные щелевидные пространства – показатель неравномерного отека (рис. 2). Кроме того, в ней имелись округлые микрополости, иногда с тонкими перемычками, что может соответствовать явлению микрокавитации вследствие Fs-лазерного воздействия. Нельзя исключить, что пребывание лентикул в децеллюляризирующем растворе с последующей консервацией в 0,9% растворе NaCl с фосфатным буфером приводит не только к разрушению клеточного

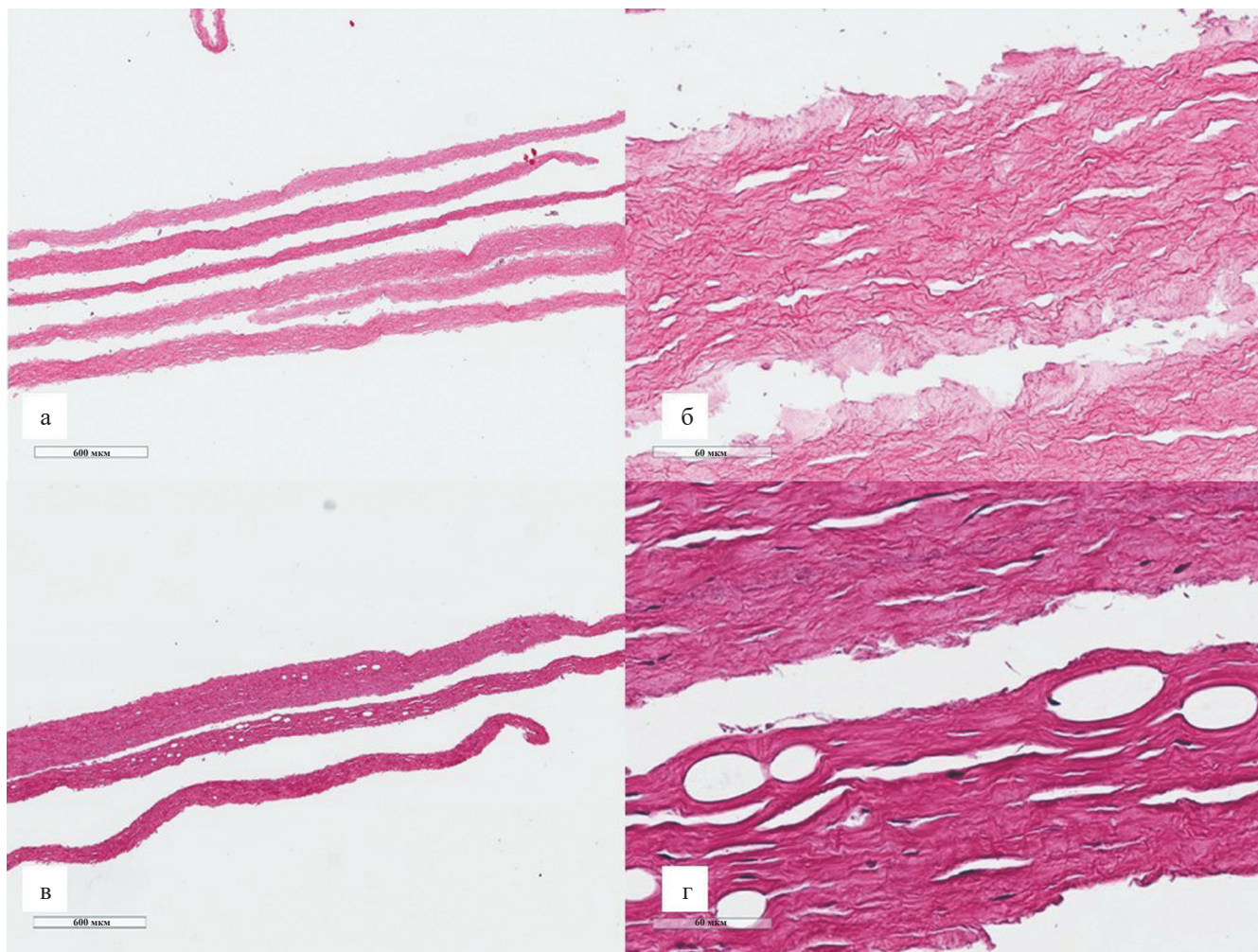


Рис. 2. Микропрепарат децеллюляризованного материала роговицы и интактной лентикулы (гематоксилин–эозин): а, б – лентикулы, подвергнутые удалению клеточного материала, наблюдаются умеренная гидротизация стромы вследствие пребывания в физиологическом растворе, заметны щелевидные пространства и микрополости; в, г – интактные лентикулы, содержащие нормальное количество кератоцитов, компактная строма содержит микрополости с перемычками

Fig. 2. Microslide of decellularized corneal material and intact lenticules (H&E stain): а, б – lenticules subjected to decellularization, showing moderate stromal hydration due to exposure to saline solution, with visible slit-like spaces and microcavities; в, г – intact lenticules containing normal keratocyte density, with compact stroma and microcavities connected by bridges

компонента стромы, но и равномерной гидротизации (отечности) стромы с умеренным разволокнением.

В эксперименте *in vivo* течение раннего послеоперационного периода у кроликов вплоть до 10–14 дней в обеих группах не отличалось и характеризовалось умеренной воспалительной реакцией: раздражением сосудов эписклеры, серозным отделяемым конъюнктивы, перифокальным отеком роговицы. Роговичные швы оставались состоятельными, трансплантаты были адаптированы к поверхности роговицы реципиента. Однако с 10–14 дней наблюдения у кроликов из II группы наблюдалось усиление воспаления: увеличение площади отека роговицы, васкуляризация, обильное смешанное отделяемое конъюнктивы, раздражение сосудов радужки, клеточная взвесь в передней камере. Противовоспалительное лечение было дополнено инстилляциями раствора бетадина, при

этом посевы с роговицы были стерильными. В период с 30-го по 60-й дни у данной группы животных формировалось васкуляризированное помутнение роговицы, наблюдались обширные передние синехии. Данные световой микроскопии свидетельствовали о расплавлении ксенотрансплантата, выраженной инфильтрации зоны имплантации воспалительными клетками (лимфоцитами, эозинофилами), что характерно для болезни трансплантата [5–6]. В то же время течение послеоперационного периода у животных из I группы оставалось благоприятным на протяжении всего эксперимента: трансплантаты оставались прозрачными, к 8-й неделе отек роговицы уменьшился, поверхность роговицы была полностью покрыта эпителием, ранее бесклеточная строма человеческих лентикул была рецеллюляризирована клетками реципиента (рис. 3).

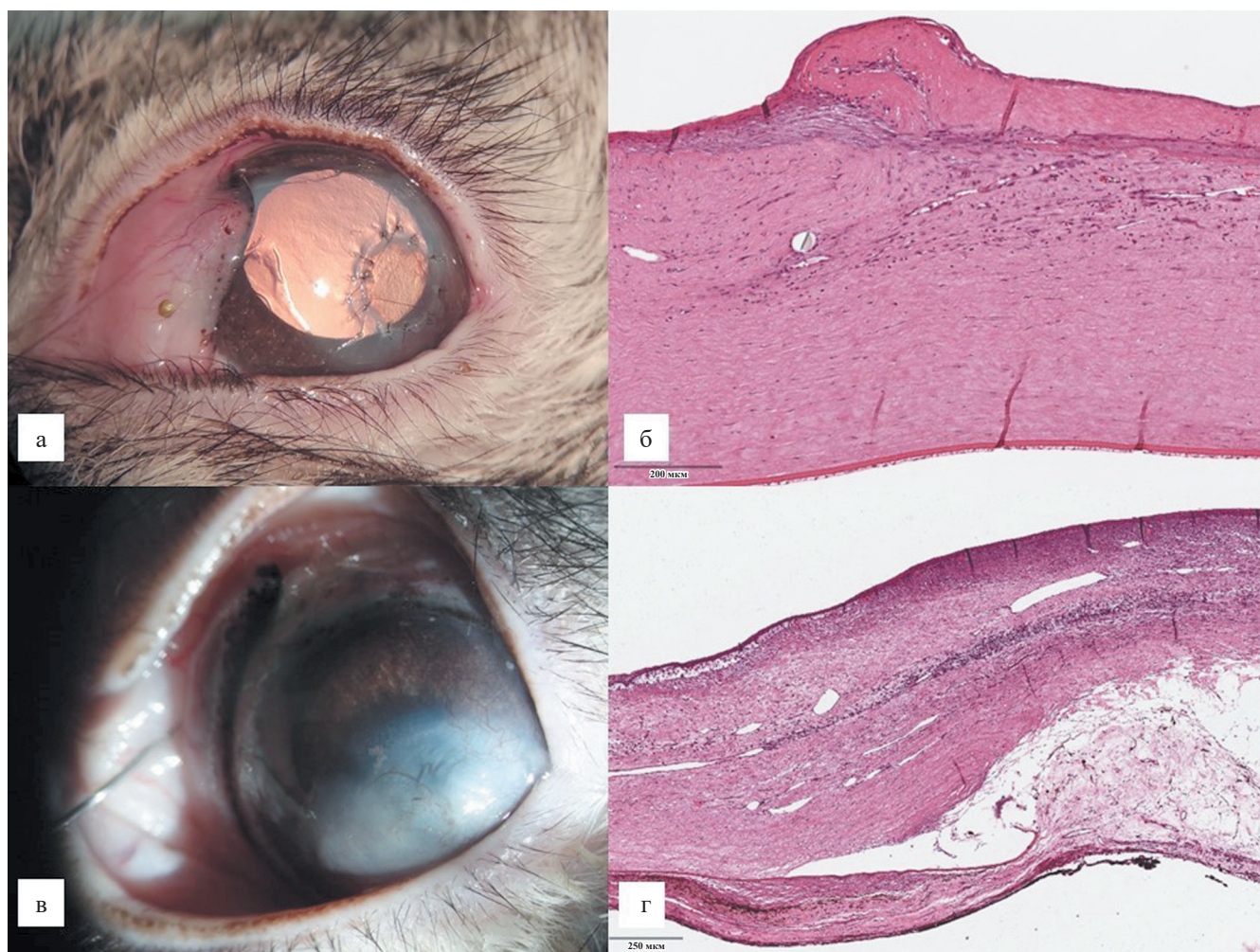


Рис. 3. Клинико-патологическая корреляция течения послеоперационного периода: а – фото переднего отрезка кролика из I группы, срок наблюдения – 8 недель; б – микропрепарат роговицы животного из I группы, окраска гематоксилином и эозином; в – фото переднего отрезка кролика из II группы, срок наблюдения – 8 недель; г – микропрепарат роговицы животного из II группы, окраска гематоксилином и эозином

Fig. 3. Clinical and pathological correlation during the postoperative period: а – photo of the anterior segment of a Group I rabbit, 8-week observation; б – corneal micropreparation from a Group I rabbit, H&E stain; в – photo of the anterior segment of a Group II rabbit, 8-week observation; г – corneal micropreparation from a Group II rabbit, H&E stain

## ВЫВОДЫ

Разработанная технология удаления клеточного материала из роговичных лентикул человека, полученных в ходе рефракционных операций, обеспечивает необходимый и достаточный уровень децеллюляризации, что подтверждено сравнительным экспериментом с пересадкой децеллюляризованных и интактных человеческих лентикул кроликам. Процедура децеллюляризации роговичных лентикул является технологически несложной, что позволяет оперативно осуществлять заготовку операционного материала непосредственно в медицинской организации и консервировать его по крайней мере до 3 месяцев без рисков деградации биоматериала, что в свою очередь позволяет сохранять запас материала для тектонической кератопластики в ургентных случаях.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Zhong W, Montana M, Santosa SM, Isjwara ID, Huang YH, Han KY et al. Angiogenesis and lymphangiogenesis in corneal transplantation – A review. *Surv Ophthalmol.* 2018; 63 (4): 453–479. doi: 10.1016/j.survophthal.2017.12.008.
2. Mandal S, Maharana PK, Kaweri L, Asif MI, Nagpal R, Sharma N. Management and prevention of corneal graft rejection. *Indian J Ophthalmol.* 2023; 71 (9): 3149–3159. doi: 10.4103/IJO.IJO\_228\_23.
3. Isaeva EB, Beketov EE, Arguchinskaya NB, Ivanov SA, Shegay PV, Kaprin AD. Децеллюляризованный внеклеточный матрикс для тканевой инженерии (обзор). *Современные технологии в медицине.* 2022; 14 (3): 57–69. Isaeva EV, Beketov EE, Arguchinskaya NV, Ivanov SA, Shegay PV, Kaprin AD. Decellularized Extracellular Matrix for Tissue Engineering (Review). *Modern technologies in medicine.* 2022; 14 (3): 57–69. doi: 10.17691/stm2022.14.3.07.
4. Долбилкин АА, Юрьева ТН, Лозовская ЕА, Никифоров СБ. Тектоническая кератопластика с применением децеллюляризованных стромальных лентикул при тканевых дефектах роговицы: предварительные результаты. *Офтальмохирургия.* 2025; 1 (143): 6–17. Dolbilkin AA, Iureva TN, Lozovskaya EA, Nikiforov SB. Tectonic keratoplasty using decellularized stromal lenticles in corneal tissue defects: preliminary results. *Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery.* 2025; 1 (143): 6–17. doi: 10.25276/0235-4160-2025-1-6-17.
5. Carreno-Galeano JT, Dohlman TH, Kim S, Yin J, Dana R. A Review of Ocular Graft-versus-Host Disease: Pathophysiology, Clinical Presentation and Management. *Ocul Immunol Inflamm.* 2021; 29 (6): 1190–1199. doi: 10.1080/09273948.2021.1939390.
6. Maharana PK, Mandal S, Kaweri L, Sahay P, Lata S, Asif MI et al. Immunopathogenesis of corneal graft rejection. *Indian J Ophthalmol.* 2023; 71 (5): 1733–1738. doi: 10.4103/IJO.IJO\_2866\_22.

*Статья поступила в редакцию 14.07.2025 г.*

*The article was submitted to the journal on 14.07.2025*