

О ВОЗМОЖНОСТИ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ КОНСЕРВАЦИИ ДОНОРСКИХ РОГОВИЦ ПУТЕМ ПРИМЕНЕНИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ

Борзенко С.А.¹, Ролик О.И.¹, Онищенко Н.А.², Комах Ю.А.¹

¹ ФГУ МНТК «Микрохирургия глаза им. акад. С.Н. Федорова» Росмедтехнологий, г. Москва

² ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ, г. Москва

В статье проанализированы традиционные и современные методы консервации трупных донорских роговиц, предназначенных для сквозной и задней послойной кератопластики. Обсуждается перспектива ослабления повреждающих эффектов гипотермии на ткани роговицы и повышения эффективности сохранения монослоя эндотелиальных клеток путем включения биорегуляторных пептидов в составы консервирующих сред. Подчеркивается важная роль использования пептидных препаратов – ревитализаторов нового поколения – для сохранения витальных свойств эндотелиальных клеток.

Ключевые слова: эндотелий роговицы, трансплантат роговицы, цитоплазматические пептиды, регуляторные пептиды, консервация роговицы.

ABOUT IMPROVEMENT OF CORNEAL GRAFT PRESERVATION BY USING REGULATORY PEPTIDES

Borzenok S.A.¹, Rolik O.I.¹, Onischenko N.A.², Komakh Y.A.¹

¹The Fedorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow

²Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

It was analyzed traditional and modern types of cadaveric donor corneas preservation for penetrating keratoplasty, descemet stripping endothelial keratoplasty and descemet membrane endothelial keratoplasty. It was described the possibility of corneal damage decreasing and increasing of efficient corneal endothelia cells preserving by using regulatory peptides into preserving medium. It was emphasized the main role of peptide drugs as new generation revitalizers for preserving viability of endothelial cells.

Key words: cornea endothelium cells, corneal graft, cytoplasm peptides, regulatory peptides, cornea preservation.

Проблема трупного тканевого донорства и трансплантации функционально полноценных роговиц является одним из наиболее сложных и актуальных аспектов офтальмологии [1, 3, 5, 6, 8, 15, 22, 33, 36, 39].

Для прозрачного приживления сквозного трансплантата роговицы необходима максимальная сохранность жизнеспособности его эндотелиальных клеток (ЭК), обеспечивающих нормальную гидратацию и прозрачность посредством транспортной и насосной функций этих клеток [6, 36]. ЭК роговицы

представляют собой высокодифференцированные клетки, имеющие нейроглиальное происхождение [2, 12, 13, 18, 31]. Поскольку ЭК не способны к митотической регенерации, то после сквозной и задней послойной кератопластики и их значительной потери в посттрансплантационном периоде возникает сначала функциональная декомпенсация роговицы, а затем необратимое помутнение трансплантата [6, 36]. В этой связи сквозную трансплантацию роговицы принято называть *искусством пересадки одного клеточного слоя* [6].

Статья поступила в редакцию 20.06.11 г.

Контакты: Онищенко Нина Андреевна, д. м. н., профессор, зав. лабораторией биотехнологии стволовых клеток.

Тел. 8 (499) 190 45 31, e-mail: illak@mail.ru

Выкраивание и фиксация роговичного трансплантата при сквозной и задней послойной кератопластиках сопровождаются потерей ЭК, и поэтому полагают, что исходная плотность эндотелиальных клеток должна быть не менее 2800–3000 кл/мм² [39]. Исходно высокая плотность ЭК важна еще и потому, что на этапе консервации в ЭК трупных донорских роговиц возникает ряд морфофункциональных перестроек, сопровождающихся десквамацией ЭК и снижением их жизнеспособности [29, 36].

В этой связи повышение жизнеспособности и стабилизация плотности ЭК трупных донорских роговиц на этапе их консервации и подготовки к трансплантации является крайне важной и актуальной задачей [1].

В современной офтальмологии исследуются возможности трех основных методов консервации роговиц – гипотермическая консервация, нормотермическое культивирование и криоконсервация. Разные возможности сохранения роговиц требуют индивидуальной оценки каждого из этих методов.

ДОСТОИНСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ТРАДИЦИОННЫХ МЕТОДОВ КОНСЕРВАЦИИ РОГОВИЦЫ

Гипотермическая консервация роговиц в жидких средах

В 1974 г. В.Е. McCarey и Н.Е. Kaufman предложили принципиально новый метод гипотермической консервации донорских роговиц для сквозной кератопластики, который основан на использовании питательной среды 199, высокомолекулярного декстрана, фосфатного буфера, индикатора pH и антибиотиков [38]. Было показано, что роговицы кроликов, консервированные в этой среде при +4 °С, сохраняют свою жизнеспособность до 14 дней. Однако дальнейшими исследованиями D.S. Hull и соавт. было установлено, что консервация кроличьих роговиц в среде МакКери–Кауфмана уже на 2–3-и сутки приводит к значительному отеку стромы, а к 7-м сут – к полной потере жизнеспособности ЭК и значительному снижению их плотности [30].

В 1985 г. Н.Е. Kaufman и соавт. усовершенствовали состав жидкой среды и включили в него осморегуляторные компоненты для снижения отека роговицы – K-Sol [34]. Морфологическими исследованиями было выявлено увеличение сроков полной структурной сохранности ЭК трупных донорских роговиц до 10 суток при гипотермической консервации, однако при этом функциональная активность ЭК роговиц и их жизнеспособность отсутствовали уже к 3–4-м сут [21, 27].

Немногим позже разработанные в США среды Dextsol и Optisol, а в Европе – Eusol, содержащие осморегуляторные компоненты, стали широко применяться в Глазных банках всего мира, так как позволяют сохранять жизнеспособность и пороговую плотность ЭК при гипотермической консервации роговиц до 4 сут [35, 40].

Дальнейшее совершенствование процесса консервации донорского материала, способствующего увеличению сроков сохранения и качества витальных свойств роговиц, привело к созданию консервирующих сред, основанных на новых принципах.

В 1990 г. впервые в России был предложен состав отечественной среды для консервации роговицы (пропись Борзенка–Мороз), который также содержал осмореактивные компоненты, но отличался от вышеперечисленных сред адекватным подбором аминокислотного состава и содержанием энергетически значимого субстрата – натрия γ -оксибутирата, способствующих пролонгированию энергетического метаболизма и оказывающих выраженное защитное действие на ЭК, обеспечивая стабилизацию клеточных мембран, их исходную плотность и достаточный уровень содержания в них макроэргических соединений по крайней мере до 6 сут [1]. В настоящее время среда Борзенка–Мороз применяется во всех Глазных банках и Лабораториях консервации роговиц Российской Федерации.

Анализ причин ограниченных сроков гипотермической консервации роговиц позволил констатировать невозможность дальнейшего увеличения сохранения донорского материала гипотермическими методами, так как сама гипотермия, снижающая энергетическую потребность тканей, постепенно из фактора защиты превращается в фактор клеточного и тканевого повреждения. [9]. В результате воздействия пониженных температур в клеточных структурах развиваются конформационные перестройки (в структуре мембранных липидов и белков, регулируемых энергией слабых связей), которые нарушают адекватность сниженного энергетического метаболизма, усиливают диффузионные процессы, становятся факторами повреждения клеток и деструкции тканей.

Для увеличения допустимых сроков применения метода гипотермической консервации донорских тканей, в том числе и в роговицах, необходимо использовать тканевые метаболиты и фармакологические препараты, которые бы встраивались в мембранные структуры и повышали бы эффективность внутриклеточных взаимодействий органелл, а также межклеточных взаимодействий в тканях для сохранения целостности и витальности тканевых структур [16].

Консервация роговиц методом органного культивирования

Еще в 70-х годах прошлого столетия D.J. Doughman и соавторы [25, 26] детально разработали, экспериментально доказали и предложили для клинического применения нормотермическую технику ($t = +34\text{ }^{\circ}\text{C}$) консервации донорских роговиц в культуральных периодически заменяемых средах для сквозной кератопластики сроком до 33 суток. Эту технику авторы назвали методом органного культивирования. S. Sperling и соавт. [42] трансплантировали в клинику роговицы, консервированные этим методом в течение нескольких суток, и получили обнадеживающие результаты, анализируя толщину и плотность эндотелиальных клеток роговицы. Однако W.M. Bourne и соавт. [22] позже установили, что в отдаленном посттрансплантационном периоде потеря ЭК роговиц после применения метода органного культивирования имела сходные результаты снижения плотности ЭК в роговицах, консервированных гипотермическим методом.

Тем не менее в силу ряда неоспоримых достоинств метод органного культивирования был признан альтернативным гипотермической консервации донорских роговиц в жидких средах [22]. Основным достоинством этого метода является так называемая «Восьмидневная система профилактики контаминации», обеспечивающая скрининг потенциально контаминированного донорского материала и устранение риска развития посттрансплантационного эндофтальмита. В настоящее время метод органного культивирования применяется только в некоторых Глазных банках Европы в связи с его высокой себестоимостью (использование и замена дорогостоящих культуральных сред и значительные трудозатраты на проведение культуральной работы).

Криогенная консервация донорских роговиц

В настоящее время криогенная консервация клеток и тканей в жидком азоте при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ широко применяется в биологии и некоторых областях медицины. Метод позволяет сохранять клетки в жизнеспособном состоянии практически бессрочно. К сожалению, попытки многих исследователей [17, 19, 33] детально разработать программу пошагового замораживания тканей трупных донорских роговиц, подобрать оптимальные составы вне- и внутриклеточных протекторов, а также и их концентрации для защиты ЭК от низкотемпературного повреждения с последующим хранением в жидком азоте, пока не дали положительных результатов в клинике [24]. Прежде всего это связано с неравномерной кристаллизацией внутриклеточной воды, наруша-

ющей белково-липидные взаимодействия клеточных мембран при воздействии криогенных температур и размораживании роговиц [9]. Морфологически это проявляется образованием множественных отверстий в цитоплазматических мембранах ЭК и значительной их потерей после размораживания – 11–33% [3, 4, 10].

В настоящее время метод криогенной консервации донорских роговиц находится на стадии поиска принципиально новых методологических подходов [23].

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРОЛОНГИРОВАННОГО СОХРАНЕНИЯ ВИТАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ДОНОРСКИХ РОГОВИЦ С ПОМОЩЬЮ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ

В процессе органного культивирования и гипотермической консервации изолированных донорских роговиц из-за воздействия неблагоприятных факторов консервации нарушаются прежде всего процессы синтеза тканевых пептидов и белков, что нарушает баланс процессов деструкции и регенерации сохраняемой ткани. Особенно тормозятся процессы регенерации при дефиците мембранозависимых пептидов в тканях и соответственно в консервационных средах. В ряде работ была показана принципиальная возможность активации синтеза ДНК, митотической и миграционной активности ЭК роговиц с помощью эпидермального фактора роста (EFG), фактора роста фибробластов (FGF), трансформирующего ростового фактора β (TGF- β), тромбоцитарного фактора роста (PGF), инсулиноподобного фактора роста – 1 (IGF-1), а также путем комбинации их с фетальной бычьей сывороткой, трансферином, гепарином, 3',5'-циклическим монофосфатом, селеном [36, 43–45]. При этом наиболее выраженный эффект оказывали FGF и EFG. В 2009 г. Y.J. Shin и соавт. опубликовали результаты исследований о защитном действии Кластерина (полипептида, регулирующего апоптоз) на ЭК роговицы [41]. По их мнению, применение этого регуляторного белка предотвращает апоптоз клеток, вызванный окислительным стрессом. Предотвращение апоптоза является, очевидно, результатом включения используемого пептида в процессы внутриклеточного структурного и информационного взаимодействия, результатом которого становится сохранение исходных витальных свойств клеток.

Показано, что одним из отличительных свойств цитоплазматических регуляторных пептидов, определяющих их регуляторные свойства в клетках, является эффект «наведения», или *органного тропизма*, эффект гомологичности [20]. Этот эффект был доказан при использовании меченых радионукли-

дами регуляторных пептидов, которые при введении животным подкожно кумулировались в тех тканях и органах, из которых они были выделены.

В основе реализации органного тропизма лежит органоспецифическая маркировка пептидов в процессе их синтеза на рибосомах, а за распределение в клетках вновь синтезированного пептида отвечает универсальная ZIP-система, обнаруженная во всех эукариотических клетках [20]. В процессе синтеза регуляторный пептид наделяется индивидуальным ZIP-кодом, своего рода почтовым индексом, благодаря которому белок, попав в системный кровоток или лимфу, находит своего адресата – гомологичную ткань или орган, в котором он был синтезирован. Специализированные рецепторы клетки считывают с пептида ZIP-код и определяют его дальнейшее участие в регуляции внутриклеточного гомеостаза и клеточного генома. Практическая значимость ZIP-системы заключается еще в том, что большинство регуляторных пептидов не имеют видовой специфичности: цитоплазматические пептиды, выделенные из тканей одного животного, кумулируются и регуляторно влияют на гомологичные ткани и органы другого животного и человека.

В целях восстановления и поддержания структуры и функции ЭК трупных донорских роговиц в процессе их консервации значительный интерес могут представлять фармакологические препараты на основе гомологичных клеточных пептидов, полученных из тканей глаза. К таким препаратам нового поколения относятся цитамини отечественного производства [7, 14] и тканевая панель препаратов NeyDIL импортного производства [11, 28]. К сожалению, отечественная фармакологическая промышленность не производит препаратов регуляторных пептидов, тропных к эндотелиальным клеткам роговицы. До настоящего времени единственным органотропным препаратом, полученным из регуляторных пептидов клеточной цитоплазмы эмбриональных роговиц промышленных животных, является препарат NeyDIL Nr.37 «Cornea», который выпускается немецкой фирмой «VitOrgan» и имеет Государственную регистрацию в Российской Федерации.

Препарат NeyDIL Nr.37 содержит регуляторные пептиды из цитоплазмы клеток фетальных и ювениальных роговиц животных, является основным регенераторным средством для роговицы, улучшающим процессы внутриклеточной репарации, диффузии, осмоса, стимулирующим метаболизм и восстанавливающим citoархитектонику различных клеток роговицы [11, 43]. Это дает нам основание полагать, что при введении оптимальных доз этого препарата в составы культуральных сред как при органном культивировании, так и особенно при гипотермической консервации роговиц, удастся по-

высить эффективность использования этих методов – увеличить допустимые сроки сохранения роговиц и сохранить их витальные свойства, способные обеспечить приживание донорских роговиц в посттрансплантационном периоде.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ современного состояния проблемы консервации трупных донорских роговиц позволяет прийти к заключению, что для дальнейшего повышения сроков и качества трансплантатов перспективно должно быть включение в составы консервирующих сред регуляторных пептидов, выделенных из тканей роговиц.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борзенко С.А. Медико-технологические и методологические основы эффективной деятельности Глазных тканевых банков России в обеспечении операций по сквозной трансплантации роговицы // Дис. ... д-ра мед. наук. М., 2008. С. 309.
2. Вит В.В. Строение зрительной системы человека. Одесса: АстроПринт, 2003. 655 с.
3. Гундорова Р.А., Бордюгова Г.Г., Травкин А.Г. Сохранность структур роговой оболочки при различных способах консервирования // Материалы межд. конф. по кератопластике и кератопротезированию. Одесса, 1978. С. 70–71.
4. Илатовская Л.В., Маслова-Хорошилова И.П., Деревянко В.П. Ультраструктура роговицы глаза человека после криоконсервации // Межд. конф. по кератопластике и кератопротезированию: Тез. докл. Одесса, 1978. С. 74–75.
5. Каспаров А.А., Ермаков Н.В., Раннопорт Ю.М. Эндотелий трансплантата донора после сквозной кератопластики // Вестн. офтальмол. 1990. Т. 106. № 5. С. 12–16.
6. Конаева В.Г. Современные аспекты сквозной субтотальной кератопластики. Дис. ... д-ра мед. наук. М., 1982. 435 с.
7. Максимов И.Б. Применение препарата ретиналамин в офтальмологии: Пособие для врачей. СПб., 2005. 20 с.
8. Мороз З.И., Тахчиди Х.П., Калинин Ю.Ю. и др. Современные аспекты кератопластики // Федоровские чтения «Новые технологии в лечении заболеваний роговицы». М., 2004. С. 280–288.
9. Онищенко Н.А., Кирпатовский В.И. Влияние низких температур на структурно-функциональную целостность изолированных органов // Очерки по физиологическим проблемам трансплантологии и применению искусственных органов / Под ред. В.И. Шумакова. Тула: Репроникс Лтд., 1998. 152. 179 с.
10. Попова З.С., Королев В.В. Ультраструктура роговой оболочки, консервированной криометодом // Вестн. офтальмологии. 1979. № 2. С. 32–36.

11. Ролик И.С. Фетальные органопрепараты: клиническое применение. М., РегБиоМед, 2003. С. 736.
12. Ронкина Т.И. Закономерности возрастных изменений эндотелия роговицы человека в норме и патологии, возможности активации пролиферации эндотелия и их назначение в офтальмологии: Дис. ... д-ра мед. наук в форме науч. доклада. М., 1994. 48 с.
13. Федоров С.Н., Ронкина Т.И., Явишева Т.М. Эндотелий роговицы человека. М.: МНТК «Микрохирургия глаза», 1993. 126 с.
14. Хавинсон В.Х., Трофимова С.В. Пептидные биорегуляторы в офтальмологии. СПб., 2003. 44 с.
15. Ченцова Е.В. Система патогенетически обоснованного лечения ожоговой травмы глаз: Дис. ... д-ра мед. наук. М., 1996. 304 с.
16. Шумаков В.И., Онищенко Н.А., Курпатовский В.И. Фармакологическая защита трансплантата. М.: Медицина, 1983. 232 с.
17. Юрченко Т.Н. Гипотермическая и низкотемпературная консервация роговицы и течение восстановительного периода после трансплантации: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Харьков, 1982. 37 с.
18. Явишева Т.М. Морфо-функциональные особенности эндотелия роговицы человека в норме и патологии и отбор донорского материала для кератопластики: Дис. ... канд. мед. наук. М., 1990. 198 с.
19. Armitage W.J., Juss B.K. The influence of cooling rate on survival of frozen cells differs in monolayers and in suspensions // *Cryoletters*. 1996. Vol. 17. P. 213–218.
20. Blobel G. 1999. www.nobel-laureates.com
21. Bourne W.M. Endothelial cell survival on transplanted human corneas preserved at 4 C in 2,5% chondroitin sulfate for one to 13 days // *Am. J. Ophthalmol.* 1986. Vol. 102. № 3. P. 382–386.
22. Bourne W.M. The endothelial cell assay method for the evaluation of corneal preservation // *The Cornea: Transactions of the World Congress on the Cornea III*. New York, 1988. P. 111–114.
23. Bredehorn-Mayr T., Duncker G.I.W., Armitage W.J. Eye Banking // *Developments in Ophthalmology*. 2009. Vol. 43. P. 63–69.
24. Brunette I., Le Francois M., Tremblay M.C., Guertin M.C. Corneal transplant tolerance of cryopreservation // *Cornea*. 2001. Vol. 20. P. 590–596.
25. Doughman D.J. Prolonged donor preservation in organ culture: long term clinical evaluation // *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 1980. Vol. 78. P. 567–628.
26. Doughman D.J., Van Horn D., Harris J.E. et al. The ultrastructure of human organ-cultured cornea. I. Endothelium // *Arch. Ophthalmol.* 1974. Vol. 92. P. 516–523.
27. Farge E.J., Fort R.A., Wilhelmus K.R. et al. Morphologic changes of K-Sol preserved human corneas // *Cornea*. 1989. № 8. P. 159–169.
28. Heine H. Wissenschaftliche Grundlagen der Organtherapie // *Tierärztliche Umschau*. 1996. Vol. 51. P. 71–73.
29. Hsu J.K.W., Cavanagh H.D., Jester J.V. et al. Changes in corneal endothelial apical junctional protein organization after corneal cold storage // *Cornea*. 1999. Vol. 18. № 6. P. 712–720.
30. Hull D.S., Green K., Thomas L. Effect of HEPES buffer on corneal storage in MK medium // *Acta ophthalmol.* 1984. Vol. 62. № 6. P. 900–910.
31. Hwang D.G. Proliferative Capacity of the Corneal Endothelium // *V. World Cornea Congress*. Washington, DC, 2005. P. 16.
32. Joseph K.W. Hsu, M.D., H. Dwight Cavanagh M.D. et al. Changes in Corneal Endothelial Apical Junctional Protein Organization After Corneal Cold Storage // *Cornea*. 1999. Vol. 18. Is.6. P. 712–720.
33. Kaufman H.E. Corneal cryopreservation and its clinical application // *Transplant. Proc.* 1976. Vol. 8. № 2. P. 149–152.
34. Kaufman H.E., Varnell E.D., Kaufman S. et al. K-Sol corneal preservation // *Am. J. Ophthalmol.* 1985. Vol. 100. № 2. P. 299–304.
35. Kaufman H.E., Beuerman R.W., Steinemann T.L. et al. Optisol corneal storage medium // *Arch. Ophthalmol.* 1991. Vol. 109. P. 864–868.
36. Krachmer J.H., Mannis M.J., Holland E.J. *Cornea. Fundamentals, Diagnosis and Management: 2nd Edition*. Elsevier-Mosby, 2005. Vol. 1. 1409 p.
37. Maria B. Grant, Peng T. Khaw, Gregory S. Schultz, Julie L. Adams, Robert W. Shimizu. Effects of Epidermal Growth Factor, Fibroblast Growth Factor, and Transforming Growth Factor-B on Corneal Cell Chemotaxis // *Invest Ophthalmol Vis. Sci.* 1992. Vol. 33. P. 3292–3301.
38. McCarey B.E., Kaufman H.E. Improved corneal storage // *Invest. Ophthalmol.* 1974. Vol. 13. P. 165–173.
39. Melles G.R., Eggink F., Lander F. A surgical technique for posterior lamellar keratoplasty // *Cornea*. 1998. № 17. P. 618–626.
40. Sato E.H. Current Status of Corneal Storage // *V. World Cornea Congress: Program abstracts*. Washington, DC, 2005. P. 16.
41. Shin Y.J., Kim J.H., Seo J.M., Lee S.M., Hyon J.Y., Yu Y.S., Wee W.R. Protective effect of clusterin on oxidative stress-induced cell death of human corneal endothelial cells. // *Mol Vis*. 2009. Vol. 16. № 15. P. 2789–2795.
42. Sperling S., Olsen T., Ehlers N. Fresh and cultured corneal grafts compared by post-operative thickness and endothelial cell density // *Acta ophthalmol.* 1981. Vol. 59. № 4. P. 566–575.
43. Theurer K.E. Patent BRD: DR 1040748. Verfahren zur Gewinnung organspezifischer Fraktion aus Organgeweben. 20.05.57. In: Theurer K.E. *Innovative Biotherapie: Fortschritte d. Zell-, Molekular- u. Immunobiologie*. Stuttgart: Hippokrates Verlag. 1987. P. 227–230.
44. Tripathi B.J., Kwait P.S., Tripathi R.C. Corneal growth factors: a new generation of ophthalmic pharmaceuticals // *Cornea*. 1992. Vol. 9. P. 2–9.
45. Vincent P.T. Hoppenreijds, Elisabeth Pels, Gijs F.J. M. Vrensen, W. Frits Treffers. Basic fibroblast growth factor stimulates corneal endothelial cell growth and endothelial wound healing of human corneas // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994. Vol. 35. № 3. P. 931–944.
46. Xin Gu, Eun Duck P. Kay. Distribution and Putative Roles of Fibroblast Growth Factor-2 Isoforms in Corneal Endothelial Modulation // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998. Vol. 39. № 12. P. 2252–2258.