

В.Ф. Смирнова<sup>1</sup>, И.О. Гаврилюк<sup>1</sup>, О.И. Александрова<sup>2</sup>,  
А.С. Васильев<sup>1</sup>, Т.В. Машель<sup>2,3</sup>, С.В. Чурашов<sup>1</sup>,  
В.Ф. Черныш<sup>1</sup>, М.И. Блинова<sup>2</sup>, А.Н. Куликов<sup>1</sup>

## Исследование биodeградации термополимеризующегося коллагенового геля

<sup>1</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург

**Резюме.** Рассматривается возможность биodeградации термополимеризующегося коллагенового геля (без культивируемых стволовых клеток) в различных концентрациях. В эксперименте неполимеризованный коллагеновый гель вводился в конъюнктивальную полость при предварительной блефарорафии. Полимеризованный коллагеновый гель получали путем инкубации термополимеризующегося коллагенового геля при 37°C в течение 30 мин до полной полимеризации, затем гель укладывался на глазную поверхность и фиксировался путем блефарорафии. Биodeградацию коллагенового геля оценивали на 1-й и 4-й ч после операции. Критерии оценки – визуально по изменению объема тампонированной конъюнктивальной полости, просачиванию жидкости через межшовные промежутки, а также через 12 ч после операции по оставшемуся в конъюнктивальной полости объему коллагенового геля (после снятия блефарорафических швов). Выявлено, что биodeградация термополимеризующегося коллагенового геля осуществляется по механизму его дегидратации независимо от состояния имплантированного геля (неполимеризованный/полимеризованный). При этом объем дегидратированного коллагенового каркаса прямо пропорционален его концентрации. Для увеличения времени биodeградации термополимеризующегося коллагенового геля целесообразна разработка способа удержания жидкости внутри коллагенового каркаса.

**Ключевые слова:** реконструктивная хирургия, коллагеновый скаффолд, биodeградация, ожоги, лимбальная недостаточность, роговица, блефарорафия, стволовые клетки, регенерация, глазная поверхность.

**Введение.** На сегодняшний день одним из актуальных направлений развития отечественной офтальмологии представляется реконструктивная хирургия глазной поверхности, результатом которой является зрительная реабилитация пациентов, в том числе с тотальными сосудистыми помутнениями [1]. Перспективные для достижения такого результата способы основаны на восстановлении нормального эпителиального покрова глазной поверхности [2]. Для этого в мировой офтальмологии с успехом применяется трансплантация культивированных эпителиальных стволовых клеток: лимбальных эпителиальных стволовых клеток (ЛЭСК) и стволовых клеток эпителия полости рта [2–4]. Такая трансплантация осуществляется на различных подложках-носителях клеток. В качестве последних особого внимания заслуживает скаффолд, изготовленный из термополимеризующегося коллагенового геля [5]. Ввиду своих физико-химических свойств он позволяет культивировать стволовые клетки в 3D-условиях. Однако существенным его минусом является быстрая биodeградация, несмотря на длительное сохранение в *in vitro* условиях. Так, в проведенном ранее исследовании было установлено, что полимеризованный коллагеновый скаффолд (с концентрацией 2 мг/мл), заселенный культивируемыми ЛЭСК и трансплантированный на роговичную поверхность, биodeградирует в течение 3 суток [3].

Этого, как оказалось, недостаточно для приживания культивированных стволовых клеток. Поэтому создание депо культивированных клеток, достаточного для восстановления эпителия роговичного фенотипа, становится возможным только после повторной трансплантации ЛЭСК на данный скаффолд. В связи с этим представляется перспективной разработка более устойчивого к биodeградации в *in vitro* условиях носителя культивированных эпителиальных стволовых клеток (СК) на основе коллагена.

**Цель исследования.** Определить время биodeградации термополимеризующегося коллагенового геля без культивируемых стволовых клеток в различных концентрациях.

**Материалы и методы.** Исследование выполнено на 15 половозрелых кроликах (30 глаз) породы шиншилла массой 2,5–3,5 кг. Для достижения поставленной цели в эксперименте изучалась биodeградация термополимеризующегося коллагенового геля в концентрациях 2, 3, 4 мг/мл в неполимеризованном (полимеризующегося в условиях *in vivo*) и полимеризованном (в условиях *in vitro*) состояниях. Объем вводимого в конъюнктивальную полость коллагенового геля составлял 3,5–4,5 мл, что соответствует объему конъюнктивальной полости кролика. Для этого глаза

были разделены на две группы по 15 глаз в каждой. В 1-ю группу вошли правые глаза животных, на которых предварительно выполняли временную блефарорафию с герметизирующей целью, после чего в конъюнктивальную полость при помощи инсулинового шприца имплантировали неполимеризованный коллагеновый гель в концентрациях 2 мг/мл (1-я подгруппа, 5 глаз), 3 мг/мл (2-я подгруппа, 5 глаз) и 4 мг/мл (3-я подгруппа, 5 глаз). Во 2-ю группу вошли левые глаза животных, в конъюнктивальную полость которых имплантировали предварительно полимеризованный в условиях *in vitro* коллагеновый гель в концентрациях 2 мг/мл (4-я подгруппа, 5 глаз), 3 мг/мл (5-я подгруппа, 5 глаз) и 4 мг/мл (6-я подгруппа, 5 глаз) с последующим выполнением временной блефарорафии с герметизирующей целью.

Все оперативные вмешательства выполняли под местной инфильтрационной (2% раствором лидокаина) и инстилляционной (0,5% раствором алкаина) анестезией.

Для приготовления термополимеризующегося коллагенового геля использовали препарат «Коллаген I типа желирующий», являющийся раствором интактного нативного коллагена I типа. Препарат был получен в Институте цитологии Российской академии наук (Санкт-Петербург) в процессе кислотной экстракции из сухожилий крысиного хвоста. Для приготовления геля

смешивали «Коллаген I типа желирующий», концентрированную (10х) среду 199 фирмы «Gibco» (Соединенные Штаты Америки – США) и стерильный 0,34 Н раствор NaOH фирмы «Sigma» (США). Конечная концентрация коллагена достигала 2, 3 и 4 мг/мл и транспортировалась в клинику офтальмологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (ВМА) в условиях гипотермии (при 2–4°C) в неполимеризованном состоянии.

Для полимеризации полученного геля в условиях *in vitro* использовали чашки Петри диаметром 30 мм, в которые помещали термополимеризующийся коллагеновый гель и инкубировали его при 37°C в течение 30 мин до полной полимеризации. Конечная концентрация коллагена достигала 2, 3 и 4 мг/мл и транспортировалась в клинику офтальмологии ВМА в полимеризованном состоянии.

Техника выполнения операции по имплантации неполимеризованного коллагенового геля основана на введении его через инсулиновый шприц (без канюли) в предварительно герметизированную конъюнктивальную полость (рис. 1).

Техника выполнения операции по имплантации полимеризованного коллагенового геля основана на помещении его в конъюнктивальную полость с последующим наложением герметизирующей блефарорафии (рис. 2).

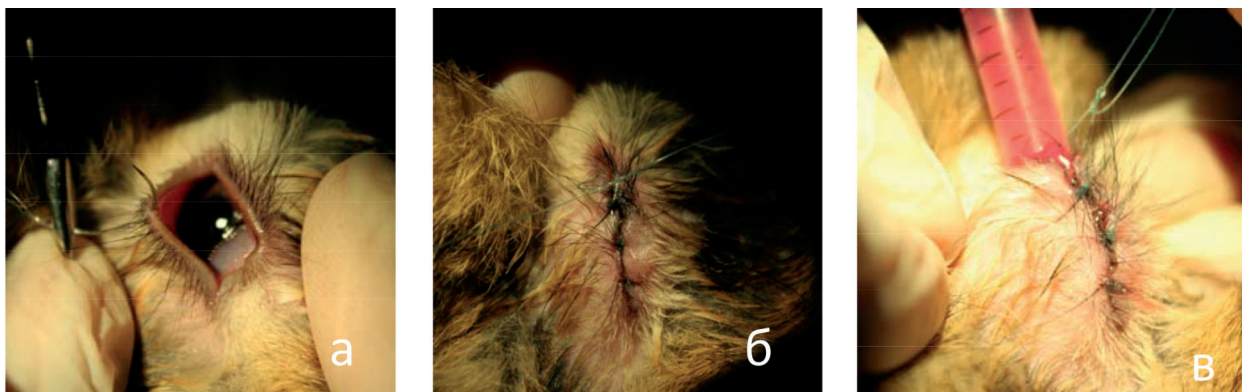


Рис. 1. Техника выполнения операции по имплантации неполимеризованного коллагенового геля: а — наложение блефарорафических швов; б - герметизирующая блефарорафия; в — введение неполимеризованного коллагенового геля в конъюнктивальную полость

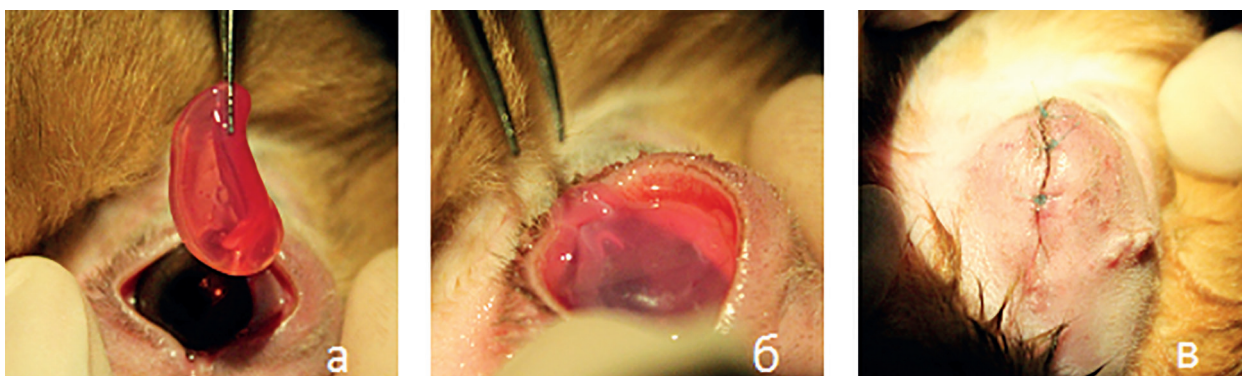


Рис. 2. Техника выполнения операции по имплантации полимеризованного коллагенового геля: а — укладка полимеризованного коллагенового геля на глазную поверхность; б — гель расправлен по глазной поверхности; в — герметизирующая блефарорафия



Биодеградацию коллагенового геля на 1-й и 4-й ч после операции оценивали визуально по изменению объема тампонирующей конъюнктивальной полости и просачиванию жидкости через межшовные промежутки, а также через 12 ч после операции по оставшемуся в конъюнктивальной полости объему коллагенового геля (после снятия блефарорафических швов).

**Результаты и их обсуждение.** Через 1 час после операции объемы тампонирующей конъюнктивальной полости во всех подгруппах были одинаковы, веки при пальпации плотноэластической консистенции, герметичны, просачивания жидкости через межшовные промежутки не наблюдалось.

На 4-м ч после операции в 1-й группе на всех глазах отмечалось уменьшение объема тампонирующей конъюнктивальной полости, наблюдалось просачивание жидкости через блефарорафические швы. При этом веки теряли упругость, при пальпации имели мягкоэластическую консистенцию. Вместе с тем во 2-й группе на всех глазах веки оставались плотноэластической консистенции, были герметичны, не имели признаков просачивания жидкости через межшовные промежутки.

Спустя 12 ч во всех группах имело место уменьшение объема тампонирующей конъюнктивальной полости. Поэтому для оценки биодеградации коллагенового геля ревизия конъюнктивальных полостей была выполнена после снятия блефарорафических швов.

Оказалось, что в 1-й и 2-й подгруппах 1-й группы коллагеновый гель полностью биодеградировал. При этом в 3-й подгруппе определялась частичная деградация имплантированного геля. В конъюнктивальных полостях глаз этой подгруппы обнаруживался обезвоженный коллагеновый каркас, что свидетельствует о биодеградации, протекающей преимущественно по механизму дегидратации (рис. 3).

Во 2-й группе биодеградация полимеризованного в условиях *in vitro* коллагенового геля также происходила по механизму потери жидкости. Во всех подгруппах в конъюнктивальных полостях обнаруживался дегидратированный коллагеновый каркас, объем которого коррелировал с концентрацией исходного имплантированного геля (рис. 4).

### Выводы

1. Биодеградация термополимеризующегося коллагенового геля независимо от состояния имплантированного геля (неполимеризованный/поли-



Рис. 3. Биодеградация непотимеризованного коллагенового геля (1-я группа): а – 1-я подгруппа (2 мг/мл); б – 2-я подгруппа (3 мг/мл); в – 3-я подгруппа (4 мг/мл). Белой стрелкой показан дегидратированный коллагеновый каркас

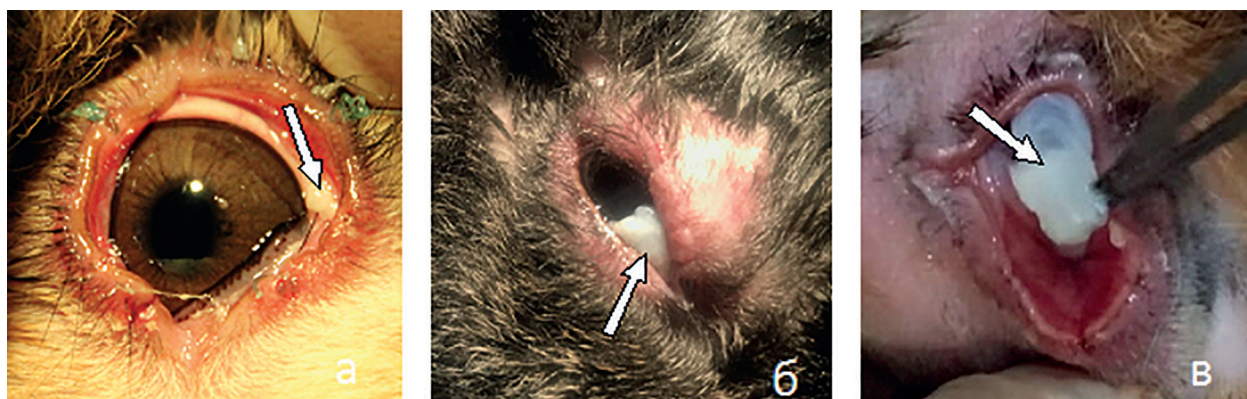


Рис. 4. Биодеградация полимеризованного коллагенового геля (2-я группа): а – 4-я подгруппа (2 мг/мл); б – 5-я подгруппа (3 мг/мл); в – 6-я подгруппа (4 мг/мл). Белой стрелкой показаны дегидратированные коллагеновые каркасы

меризованный) осуществляется по механизму его дегидратации.

2. Объем дегидратированного коллагенового каркаса, обнаруженного через 12 ч после имплантации термополимеризующегося коллагенового геля, прямо пропорционален его концентрации.

3. Для увеличения времени биodeградации термополимеризующегося коллагенового геля целесообразна разработка способа удержания жидкости внутри коллагенового каркаса.

## Литература

1. Безушко, А.В. Исследование возможности применения культивированных аутологичных лимбальных эпителиальных стволовых клеток на коллагеновом скаффолде для устранения лимбальной недостаточности в эксперименте / А.В. Безушко [и др.] // Практ. мед. – 2017. – Т. 2, № 110. – С. 32–37.
2. Гаврилюк, И.О. К вопросу о заборе, выделении и культивировании стволовых клеток эпителия слизистой полости рта / И.О. Гаврилюк [и др.] // Современ. технол. в офтальмол. – 2018. – № 4. – С. 60–63.
3. Горбачев, Д.С. Особенности реконструктивной хирургии вспомогательных органов глаза при боевых повреждениях органа зрения / Д.С. Горбачев [и др.] // Современ. технол. в офтальмол. – 2016. – № 3. – С. 99–101.
4. Дубовиков, А.С. Лимбальная недостаточность: этиология, патогенез, принципы и перспективы хирургического лечения / А.С. Дубовиков [и др.] // Росс. офтальм. журн. – 2019. – Т. 12, № 1. – С. 103–111.
5. Nakamura, T. Ocular surface reconstruction using stem cell and tissue engineering / T. Nakamura [et al.] // Prog. Retin. Eye Res. – 2016. – Vol. 5. – P. 187–207.

V.F. Smirnova, I.O. Gavrilyuk, O.I. Aleksandrova, A.S. Vasiliev,  
T.V. Mashel, S.V. Churashov, V.F. Chernysh, M.I. Blinova, A.N. Kulikov

## The study of biodegradation of thermo-polimerized collagen gels

**Abstract.** The possibility of biodegradation of thermopolymerizable collagen gel (without cultured stem cells) in various concentrations is considered. In an experiment, an unpolymerized collagen gel was injected into the conjunctival cavity during preliminary blepharography. A polymerized collagen gel was obtained by incubating a thermopolymerizing collagen gel at 37°C for 30 min until complete polymerization, then the gel was placed on the ocular surface and fixed by blepharography. Collagen gel biodegradation was evaluated at the 1st and 4th hours after surgery. Evaluation criteria: visually by the change in the volume of the plugged conjunctival cavity, leakage of fluid through the intershoot spaces, and also 12 hours after the operation according to the volume of collagen gel remaining in the conjunctival cavity (after removal of blepharographic sutures). It was revealed that biodegradation of thermally polarizable collagen gel is carried out by the mechanism of its dehydration regardless of the state of the implanted gel (unpolymerized/polymerized). The volume of the dehydrated collagen framework is directly proportional to its concentration. To increase the biodegradation time of a thermopolarizable collagen gel, it is advisable to develop a method for retaining fluid inside the collagen frame.

**Key words:** reconstructive surgery, collagen scaffold, biodegradation, burns, limbal deficiency, corneal, blepharoraphy, stem cells, regeneration, eye surface.

Контактный телефон: 8-911-029-93-81; e-mail: vmada-nio@mail.ru