

**ВЛИЯНИЕ ВАКУУМА НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РОГОВИЦЫ  
В УСЛОВИЯХ КОНСЕРВАЦИИ**

Владимир Николаевич КАНЮКОВ<sup>1</sup>, Александр Абрамович СТАДНИКОВ<sup>2</sup>, Ольга Михайловна ТРУБИНА<sup>1</sup>, Раиса Николаевна ПОДОПРИГОРА<sup>1</sup>, Алексей Николаевич КАЗЕННОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Оренбургский филиал ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Росмедтехнологии»  
460047, г. Оренбург, ул. Салмышская, 17

<sup>2</sup>ГОУ ВПО Оренбургская ГМА Росздрава  
460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6

**Цель работы.** Морфофункциональное обоснование способа консервации трансплантатов роговицы в условиях вакуума при гипотермии для пластической офтальмохирургии.

**Материалы и методы.** Объектом исследования было глазное яблоко свиньи. Иссекался корнеосклеральный диск и помещался в специальный контейнер. Из контейнера откачивался воздух до 0,5 атм и он хранился при  $t + 2 \pm 4^\circ\text{C}$ . Сроки консервации составляли 3, 7, 10 и 30 суток. Исследуемый материал на 7 сутки был в последствии культивирован по методу Ф.М. Лазаренко. Выполнили послойную пересадку у кролика аллогенной роговицей на сроке консервации 4 суток.

**Результаты и обсуждения.** В сроки консервации 3 суток не выявили существенных структурных изменений. Через 7 суток нарастали явления деструкции и некробиоза. В сроки консервации 10-30 суток явления прогрессировали. Инкубированные в вакууме объекты на этапах культивирования сохраняли фибрило- и цито-архитектонику. Наблюдалось благоприятное послеоперационное течение на глазах кроликов в ходе экспериментальной послойной трансплантации.

**Выводы.** Отсутствие дестабилизирующих расстройств тканей роговицы, признаки иммунологической толерантности, благоприятное течение послойной пересадки роговиц на глазах кроликов оцениваются как доказательство возможности использования подобных аллотрансплантатов для целей офтальмохирургии.

**Ключевые слова:** экспериментально-гистологические исследования, кератопластика, вакуумная консервация роговицы.

**Актуальность**

В настоящее время наибольшее распространение в области трансплантологии получила сквозная кератопластика [1]. Реабилитация больных с поражением роговицы является одним из наиболее сложных разделов офтальмологии [2]. Высокая потребность в кератопластике приводит во всем мире к возрастанию потребности в пластическом материале и в совершенствовании методов его консервации [3, 4]. В связи с возросшим риском опасных инфекций и повышенных требований к качеству трансплантационного материала необходимо проведение исследований на сифилис, ВИЧ-инфекцию, вирусные гепатиты, что требует консервации трансплантационного материала с максимально возможным сохранением его жизнеспособности [5]. Учитывая тот факт, что существует множество методик консервации донорской роговицы, все же продолжает оставаться актуальным поиск и разработка новых способов консервации. Это вызвано тем, что имеющиеся методики не всегда отвечают необходимым требованиям (простота, эко-

номичность, универсальность). В этой связи, в процессе поиска методов длительного сохранения жизнеспособных тканей, в качестве альтернативного был предложен способ консервации донорской роговицы в условиях вакуума [6].

**Цель**

Морфофункциональное обоснование способа консервации трансплантатов роговицы в условиях вакуума при гипотермии для пластической офтальмохирургии.

**Материалы и методы**

Работа выполнена на системе, представляющей собой вакуумный насос для откачивания воздуха и контейнера для хранения материала. Контейнер представлен стеклянной емкостью, снабженной специальной сеткой из эластомера, при этом сетка выполняет не только функцию подставки для размещения донорских тканей, но и служит конденсатором остаточной влаги. Допустимое максимальное разрежение при использовании данной системы соответствует 0,5 бар (~0,5 атм). Контейнер герметичен, что обеспечено клапаном с силиконовой прокладкой.

Канюков В.Н. — директор, д.м.н., проф., заслуженный врач РФ

Стадников А.А. — зав. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, д.б.н., проф.

Трубина О.М. — зам. директора по научной работе, канд.м.н., доцент, e-mail: nauka@ofmntk.ru

Подопригора Р.Н. — зав. лаборатории глазного банка, канд.м.н.

Казеннов А.Н. — аспирант III года обучения

Оценка эффективности методики вакуумной консервации трупной роговицы (световая микроскопия) проведена в сроки 3, 7, 10 и 30 суток.

Экспериментальные и морфологические исследования выполнены с использованием свежезнуклеированных глаз свиней ( $n = 36$  глаз). Обработка глазного яблока для последующих морфологических исследований заключалась в следующем: после четырехкратного промывания его в стерильном 0,9% растворе NaCl, глазное яблоко погружали в 5,0% раствор йода поливинилпирролидона с последующей обработкой 2,0% раствором тиосульфата натрия (для нейтрализации), с последующим помещением глазного яблока в 0,9% раствор NaCl. После этого иссекался корнеосклеральный диск и содержался в условиях вакуума при гипотермии [7]. Емкость с консервированной роговицей хранилась в условиях бытового рефрижератора при  $t + 2 \pm 4^\circ\text{C}$ .

Для оценки гисто- и органотипических свойств трансплантатов роговицы консервированных в вакууме при гипотермии были проведены их гистологические исследования в условиях культивирования *in vivo* по Ф.М. Лазаренко [8]. Опыты проведены на 10 кроликах породы Schinschilla, которым с соблюдением правил асептики, под апоневроз передней брюшной мышцы производили имплантацию кусочков роговицы с целлюидиновым песочком (в пропорции 1:2). Для культивирования была использована роговица со сроком консервации—7 суток. У каждого животного было сформировано по 4 имплантата. Гистологические исследования имплантатов проводились в сроки 3, 6, 10, 15 суток.

Определение свойств трансплантатобельности консервированных аллогенных роговиц, было выполнено в условиях экспериментального исследования биологического приживления послойных трансплантатов у 6 кроликов. Срок консервации донорских роговиц составил 4 суток. Период послеоперационного наблюдения 1 месяц.

### Результаты и обсуждения

Гистологические исследования роговицы, подверженной экспозиции в вакууме в течение 3 суток не показали существенных структурных изменений ее эпителиальных и соединительнотканых элементов. Передний эпителий, собственное вещество роговицы, передняя и задняя пограничные мембраны, а также эндотелий сохраняли дефинитивную структурную организацию. На стадии консервации

7 суток установлены признаки дискомплексации десцеметовой мембраны, что проявилось в ее разрыхлении и локальной складчатости. Это сочеталось с эрозивными изменениями клеток эндотелия. Боуменова мембрана при этом сохраняла свою структуру на всем протяжении. В сроки консервации 10 суток отмечались более выраженные деструктивные изменения десцеметовой мембраны. К ним добавлялись процессы некробиоза и лизиса многослойного плоского неороговевающего эпителия, подлежащих участков боуменовой мембраны, а также разрыхления (с признаками лизирования соединительнотканых пластинок) собственного вещества роговицы. В своей совокупности эти процессы приводили к уменьшению толщины роговицы приблизительно на 25%. Это происходило, главным образом, за счет утраты деструктивно измененных волокнистых и аморфных компонентов. Данные процессы, происходившие в роговице, возрастали на стадии консервации 30 суток.

Гистологическими исследованиями, проведенными в условиях культивирования, установлено, что в очаге асептического воспаления возникали альтеративные процессы. Несмотря на это роговица, консервированная в условиях вакуума, все же сохраняла свою фиброархитектонику. Оценка консервированного донорского материала в культуральных условиях (на стадии эксперимента 3–6 суток), хотя и указывала на реактивные изменения клеток, может свидетельствовать о вероятной иммунологической толерантности организма реципиента к трансплантируемым объектам (рис. 1). Это важно с той позиции, что консервация роговицы имеет большое значение не только как метод хранения, но и как фактор увеличения биосовместимости тканей благодаря воздействию на иммунные свойства донорской роговицы [9–13].

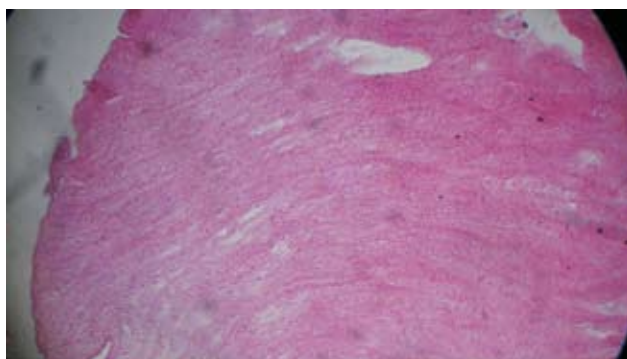


Рис.1. Имплантат срок 6 суток

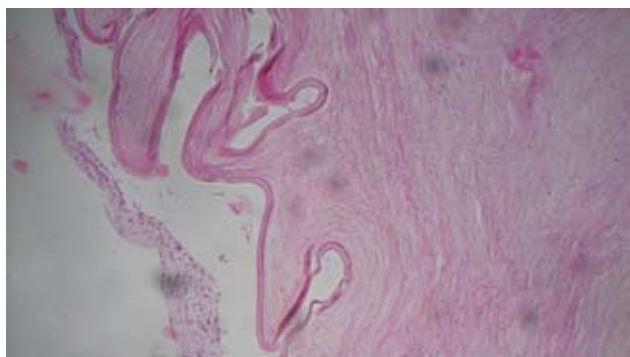


Рис.2. Имплантат срок 10 суток



Рис.3. Состояние после послойной кератопластики сроком 1 месяц

Исходя из цели работы, важным является то, чтобы в биомеханическом отношении материал был достаточно прочным, удобным для микрохирургических манипуляций, а также обладал необходимыми биологическими особенностями, позволяющими обеспечить конечный результат хирургической коррекции. В условиях культивирования роговицы, консервированной в вакууме, получены данные, свидетельствующие об инкапсуляции фрагментов роговицы малодифференцированной соединительной тканью (на стадии 10–15 суток). Это может явиться основанием для рекомендации использования предложенного нами способа для целей офтальмохирургии (т. е. для механического укрепления роговичного трансплантата). Фибриллоархитектоника роговицы и десцеметова мембрана были стабильно устойчивы к условиям имплантации, а консервация материала в условиях вакуума не давала эпителиальных пролифератов (рис. 2).

В ходе экспериментальной послойной трансплантации аллогенных роговиц консервированных в вакууме при гипотермии во всех случаях наблюдалось благоприятное течение послеоперационного периода. Послеоперационный отек стромы и эпителия сохранялся в течение 3–5 суток, явления воспаления были незначительными и стихали в течение 5–6 дней. Основными

видами приживления роговицы были прозрачное и полупрозрачное (рис.3). Сроки наблюдения за трансплантатами составили 1 месяц. В этот период воспалительных кризов, протекающих по типу острого отторжения роговичных трансплантатов, не наблюдалось.

### Выводы

1. Анализ морфофункционального состояния роговицы консервированной в условиях вакуума при гипотермии (в сроки 3–7 суток) свидетельствовал об отсутствии признаков деструктивных изменений в ней.

2. В результате культивирования роговицы, консервированной в вакууме при гипотермии, на ранних сроках эксперимента (3–6 сутки) отмечались признаки реактивных изменений, свидетельствующие об иммунологической толерантности организма реципиента к трансплантируемым объектам; на более поздних сроках культивирования (10–15 сутки) отмечались признаки указывающие на усиление биомеханических свойств роговицы.

3. Исходом экспериментальной послойной пересадки аллогенных роговиц было прозрачное и полупрозрачное приживление, что дает основание полагать о возможности применения аллотрансплантатов роговицы, консервированных в условиях вакуума при гипотермии, и данного способа консервации для целей офтальмохирургии.

### Литература

1. Плескова А.В., Хватова А.В. Отторжение трансплантата: общие вопросы патогенеза, диагностики и лечения // Вестн. офтальмологии. 2002. 6. 46–51.  
Pleskova A.V., Khvatova A.V. Rejection of graft: common questions of pathogenesis, diagnostics and treatment // Ophthalmology bulletin. 2002. 6. 46–51.
2. Борзенко С.А. Медико-биологические основы глазного банка ГУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова // 13 Рос. ежегодная науч.-практ. конф. «Новые технологии микрохирургии глаза»: Тез. докл. Оренбург, 2002. 14–16.  
Borzenok S.A. Medicobiological foundations of Eye bank in State institution MNTK «Eye microsurgery» named by acad. S.N. Fyodorov // 13 Russian annual scientific-practical conference «New technologies of eye microsurgery»: Abstracts of reports. Orenburg, 2002. 14–16.
3. Каспаров А.А., Магден Ю. Криокератопластика и кератопластика в лечении буллезной хронической кератопатии // Вестн. офтальмологии. — 2001. 2. 8–10.  
Kasparov A.A., Magden Yu. Kryokeratoplasty and keratoplasty in treatment of bullous chronic keratopathy // Ophthalmology bulletin. 2001. 2. 8–10.
4. Heck E. Structure and Function of Eye Banks // Krachmer J.H., Mannis M.J., Holland E.J. Cornea. Fundamentals, Diagnosis and Management, 2nd Edition. Elsevier-Mosby, 2005. 1. 96–100.
5. Сурков А.А. Применение перфторана для краткосрочной консервации роговицы: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. СПб., 2003. 18 с.  
Surkov A.A. Usage of perfloran for short-term cornea conservation: Author's abstract of dissertation ... candidate of medical science. St. Petersburg, 2003. 18 p.

6. Пат. 2310327 РФ Способ консервации донорских тканей для офтальмохирургии / Канюков В.Н.; опубл. 20.11.2007.

Patent 2310327 RF. A way of conservation of donor tissues for ophthalmosurgery / *Kanyukov V.N.*; published 20.11.2007

7. Мусина А.Д. Использование контейнеров и упаковочного материала с углеродсодержащим покрытием для хранения аллогенных трансплантатов: Автореф. дисс. канд. мед. наук. Уфа, 2006. 28 с.

*Musina A.D.* The usage of containers and packaging material with covering containing carbon for keeping of allogenic grafts: Author's abstract of dissertation ... candidate of medical science. Ufa, 2006. 28 p.

8. Лазаренко Ф.М. Закономерности роста и превращения тканей и органов в условиях культивирования их в организме. М.: Медицина, 1959. 400 с.

*Lazarenko F.M.* Regularities of growth and transformation of tissues and organs in conditions of their cultivation in the organism. Moscow: Medicine, 1959. 400 p.

9. Юрченко Т.Н., Шарлай Т.М., Волков В.В. и др. Кримоконсервация и трансплантация роговицы. Киев: Наук. думка, 1986. 152 с.

*Yurchenko T.N., Sharlai T.M., Volkov V.V. et al.* Cryoconservation and cornea transplantation. Kiev: 1986. 152 p.

10. Борзенко С.А., Кротова Е.В., Комах Ю.А. Сквозная кератопластика консервированным донорским материалом с низкой иммуногенностью // Вторая Всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых «Офтальмохирургия и применение лазеров в офтальмологии»: Тез. докл. М., 1991. 28–29.

*Borzenok S.A., Krotova E.V., Komakh Yu.A.* Through keratoplasty by preserved donor material with low immunogenicity // II All-Russian scientific-practical conference of young scientists «Ophthalmosurgery and usage of lasers in ophthalmology»: Abstracts of reports. Moscow, 1991. 28–29.

11. Борзенко С.А., Комах Ю.А. Сравнительные результаты консервации донорской роговицы для сквозной кератопластики в жидких средах // Вторая Всерос. науч.-практическая конф. молодых ученых «Офтальмохирургия и применение лазеров в офтальмологии»: Тез. докл. М., 1991. 27–28.

*Borzenok S.A., Komakh Yu.A.* Comparative results of conservation of donor cornea for through keratoplasty in liquid media // II All-Russian scientific-practical conference of young scientists «Ophthalmosurgery and usage of lasers in ophthalmology»: Abstracts of reports Moscow, 1991. 27–28.

12. Кротова Е.В. Клинико-иммунологические аспекты рекератопластики различными видами донорского материала: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М., 1994. 24 с.

*Krotova E.V.* Clinical-immunological aspects of rekeratoplasty by various kinds of donor material: Author's abstract of dissertation ... candidate of medical science. Moscow, 1994. 24 p.

13. Джавришвили Г.В. Современные аспекты хирургического лечения ожоговых бельм: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. М., 2004. 22 с.

*Dzhavrishvili G.V.* Modern aspects of surgical treatment of burn walleyes: Author's abstract of dissertation ... doctor of medical science. Moscow, 2004. 22 p.

## VACUUM INFLUENCE ON BIOLOGICAL AND MECHANICAL FEATURES OF CORNEA IN PRESERVED CONDITIONS

Vladimir Nikolaevich KANYUKOV<sup>1</sup>, Aleksander Abramovich STADNIKOV<sup>2</sup>, Olga Mikhlovna TRUBINA<sup>1</sup>, Raisa Nikolaevna PODOPRIGORA<sup>1</sup>, Aleksey Nikolaevich KAZENNOV<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal State Institution S.N. Fyodorov Eye Microsurgery Complex Orenburg Branch, 17, Salmishskaya st., Orenburg, 460047

<sup>2</sup>Orenburg State Medical Academy of Roszdrav 6, Sovetskaya st., Orenburg, 460000

**Purpose.** To prove the opportunity of donor cornea usage preserved in vacuum at hypothermia as a plastic material.

**Materials and methods.** The investigation object was pig's eyeball. Corneoscleral disc was cut all over and placed in a special container. The air from the container was pumped out up to 0,5 atmosphere and it was kept at  $+2 \pm 4^\circ\text{C}$ . The periods of preservation were 3, 7, 10 and 30 days. On the 7th day the investigated material was cultivated according to the method by F.M. Lazarenko. There have been carried out layer transplantation of allogenic cornea in rabbit on the 4th day of preservation period.

**Results and discussions.** During 3 days of preservation there were not revealed any essential cornea structural changes. In 7 days phenomena of destruction and necrobiosis were increasing. During 10-30 days of preservation period these phenomena had a progress. Incubated in vacuum objects were keeping fibrilo- and cytoarchitecture during preservation stages. There could be observed favorable postoperative tendency in rabbits' eyes during experimental layer transplantation.

**Conclusion.** The absence of destabilized cornea tissues, features of immunological tolerance, favorable tendency of layer cornea transplantation in rabbits' eyes can be estimated as the evidence of possible usage of like grafts for ophthalmosurgery purposes.

**Key words:** defeat of the cornea; keratoplasty; the vacuum preservation of the cornea.

*Kanyukov V.N.* — director, doctor of Medical sciences, professor

*Stadnikov A.A.* — head of Chair of histology, cytology and embryology, doctor of biological sciences, professor, Honoured Science Worker of Russian Federation

*Trubina O.M.* — deputy at research work, candidate of Medical sciences, senior lecturer

*Podoprighora R.N.* — head of Eye bank laboratory, candidate of Medical sciences

*Kazennov A.N.* — post graduate student of third year