



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.13.2.013>
УДК 616-089.844



Хурай А.Р.¹, Шустеров Ю.А.²✉, Сидоренко Е.И.¹

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

² Медицинский университет Караганды, Караганда, Казахстан

Экспериментальное исследование имплантов ногтевой пластины для кератопластики

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: техническое исполнение – Хурай А.Р.; написание статьи и редактирование – Шустеров Ю.А.; концепция исследования – Сидоренко Е.И.

Подана: 17.04.2023

Принята: 10.05.2023

Контакты: yshusterov@mail.ru

Резюме

Введение. Одним из основных недостатков искусственных материалов является то, что они могут инкапсулироваться, отторгаться и нарушать трофику роговицы. В связи с этим представляется оправданным использование фрагмента ногтевой пластинки, которая близка по химическому составу и физическим свойствам к ткани роговицы.

Цель исследования. Оценить биосовместимость имплантов из ногтевой пластины со стромальной тканью роговицы.

Материалы и методы. Для аналитической работы было использовано 5 образцов фрагментов ногтевой пластины, из них 4 образца – обработанные механическим способом, 5-й – с помощью лазерной шлифовки. Были применены следующие методы исследования: метод культивирования образцов с клеточной линией кератоцитов, метод исследования раннего апоптоза, метод исследования «ДНК-комет», метод сканирующей электронной микроскопии.

Результаты. Выявлен значительный рост клеточных культур в присутствии исследованных образцов фрагментов ногтевых пластин, обработанных механическим и лазерным способами. Образцы фрагментов ногтевых пластин, обработанных механическим и лазерным способами, как объекты имплантации не запускают в кератоцитах роговицы механизмы апоптоза по каспазному и митохондриальному путям. Мутагенность фрагментов, обработанных обоими способами, не превышает допустимых физиологических значений. Поверхности образцов фрагментов ногтевой пластины, обработанные лазерным способом, ультраструктурно отличаются от таковых, обработанных механическим путем: имеют более гладкую поверхность, отсутствие борозд от механического воздействия.

Выводы. Проведенные исследования выявили отсутствие токсического действия имплантов ногтевой пластинки, они являются биосовместимыми со стромальной тканью роговицы.

Ключевые слова: роговица, кератопластика, ногтевая пластина, эксперимент

Khurai A.¹, Shusterov Yu.²✉, Sidorenko E.¹

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Karaganda Medical University, Karaganda, Kazakhstan

Experimental Study of Nail Plate Implants for Keratoplasty

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: technical execution – Khurai A.; article writing and editing – Shusterov Yu.; the concept of the study – Sidorenko E.

Submitted: 17.04.2023

Accepted: 10.05.2023

Contacts: yshusterov@mail.ru

Abstract

Introduction. One of the main disadvantages of artificial materials is that they can encapsulate, reject and disrupt the trophism of the cornea. In this regard, it seems justified to use a fragment of the nail plate, which is close in chemical composition and physical properties to the corneal tissue.

Purpose of the study. To evaluate the biocompatibility of nail plate implants with corneal stromal tissue.

Materials and methods. For analytical work, 5 samples of fragments of the nail plate were used; 4 of them were mechanically processed, the 5th – with the help of laser grinding. The following research methods were used: the method of culturing samples with a keratocyte cell line, the method of studying early apoptosis, the method of studying "DNA comets", the method of scanning electron microscopy.

Results. A significant growth of cell cultures was revealed in the presence of the studied samples of fragments of nail plates treated by mechanical and laser methods. Samples of fragments of nail plates treated by mechanical and laser methods, as implantation objects, do not trigger mechanisms of apoptosis in corneal keratocytes along the caspase and mitochondrial pathways. The mutagenicity of fragments treated by both methods does not exceed acceptable physiological values. The surfaces of the samples of fragments of the nail plate treated by laser method are ultrastructurally different from those treated by mechanical means: they have a smoother surface, no furrows from mechanical action.

Conclusions. The conducted studies revealed the absence of toxic effects of nail plate implants and they are biocompatible with corneal stromal tissue.

Keywords: cornea, keratoplasty, nail plate, experiment

■ ВВЕДЕНИЕ

Известно, что интрастромальная кератопластика с имплантацией роговичных сегментов используется для лечения пациентов с близорукостью [1, 2], идиопатическими и ятрогенными формами эктазии, при которых сегмент выполняет ортопедическую функцию. Однако одним из основных недостатков искусственных материалов является то, что они могут инкапсулироваться, отторгаться и нарушать трофику роговицы [3]. В связи с этим представляется оправданным использование фрагмента



ногтевой пластинки, которая близка по химическому составу и физическим свойствам к ткани роговицы.

Было проведено исследование возможности применения сегментов из ногтевой пластины для интрастромальной кератопластики [4]. На основании проведенных морфологических исследований было выявлено, что ногтевая пластинка (ауто, алло и ксено) является перспективным пересадочным материалом для интерламеллярной кератопластики в связи с хорошей биосовместимостью. Изменения со стороны структурных образований роговицы в ответ на введение ногтевой пластинки были минимальны, что говорило об отсутствии нарушений метаболизма роговицы как в ранние, так и в поздние сроки наблюдения.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить биосовместимость имплантов из ногтевой пластины со стромальной тканью роговицы.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для аналитической работы было использовано 5 образцов фрагментов ногтевой пластины, из них 4 образца – обработанные механическим способом, 5-й – с помощью лазерной шлифовки.

Образцы, обработанные механическим способом

Первый образец был поделен на 2 части для исследования обеих сторон под сканирующим электронным микроскопом. Образцы 2, 3 и 4 культивировались с клеточной линией кератоцитов в течение 3 суток. Клетки, культивированные со 2-м образцом, снимались с культуральной поверхности, далее подсчитывалось в автоматическом счетчике количество размножившихся клеток. Кератоциты, культивированные с 3-м образцом, исследовались на апоптоз по каспазному (Caspasa 7, 8) и митохондриальному (BAX) путям. Исследование было проведено со стандартной пробоподготовкой для проточного цитофлуориметра. Кератоциты с 4-го образца исследовались методом «ДНК-комет». Контрольными образцами служили клетки, инкубированные на культуральном пластике.

Образец, обработанный лазером

Пятый образец был разделен на 3 части, из них 2 части исследовались под сканирующим электронным микроскопом (СЭМ), а 1 часть культивировалась с кератоцитами с последующим исследованием на апоптоз методом проточной цитофлуориметрии и методом «ДНК-комет».

При этом пробоподготовка и метод электронно-микроскопического исследования были аналогичны таковым для первого образца с механической обработкой.

Были применены рассмотренные далее методы исследования.

Метод культивирования образцов с клеточной линией кератоцитов

Культивирование всех полученных образцов в ходе исследования проводилось в инкубаторе при стандартных условиях – $t +37^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , в полной питательной среде DMEM/F12 с добавлением 5% эмбриональной бычьей сыворотки, 1% раствора антибиотиков и 1% раствора глутамакса. Визуальный контроль роста клеток

осуществлялся при помощи инвертированного светового фазово-контрастного микроскопа Olympus IX-81. Через 3 суток культуральная поверхность промывалась трехкратно раствором Версена, добавлялся 0,25% раствор трипсина-Версена 1:1 с последующим инкубированием при $t + 37^{\circ}\text{C}$ в течение 10 минут. Полученная суспензия клеток собиралась в конические пробирки 15 мл, они центрифугировались при 1100 об/мин и $t + 37^{\circ}\text{C}$ в течение 5 минут. Супернатант удалялся при помощи аспиратора, осадок ресуспендировался в полной питательной среде, далее проводился подсчет клеток в автоматическом счетчике клеток Luna II.

Метод исследования раннего апоптоза

Для определения характера влияния материала на способность к переживанию клеточной культуры использовались флуоресцентные маркеры каспазного (Caspasa 7, 8) и митохондриального (BAX) путей, которые связываются с клеточными белками при запущенных патофизиологических путях апоптоза. С этой целью к суспензии клеток с концентрацией 1×10^3 добавлялись: 2 мкл красителя Caspasa 8, конъюгированного с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 488 (Ex. 495; Em. 519), 2 мкл Caspasa 8 с флуоресцентным цианиновым красителем Cy3 (Ex550; Em570), 2 мкл BAX с флуоресцентным цианиновым красителем Cy3 (Ex550; Em570). Вышеперечисленные субстраты инкубировались 10 минут при комнатной температуре в темноте, далее анализировались с использованием проточного цитофлуориметра Cyto Flex.

Метод исследования «ДНК-комет»

Метод «ДНК-комет» позволяет определить повреждение ДНК и изучить компенсаторную репарацию на уровне одиночно взятой клетки. Метод основан на регистрации в постоянном электрическом поле различной подвижности поврежденной ДНК и/или фрагментов ДНК индивидуальных лизированных клеток, заключенных в агарозный гель. При этом ДНК мигрирует к аноду, формируя электрофоретический след, визуально напоминающий хвост кометы, параметры которого зависят от степени поврежденности ДНК. Подготовительный этап включал в себя подготовку предметных стекол с нанесением слоя агарозы. Фиброин шелка с 2D или 3D клеточной культурой промывался раствором Версена, добавлялся 0,25% раствор трипсина-Версена 1:1, и проводилось инкубирование при $t + 37^{\circ}\text{C}$ в течение 10 минут. Полученная суспензия центрифугировалась на 1100 об/мин 5 минут, осадок ресуспендировался в фосфатно-солевом буфере с pH 7,4; проба объемом 10 мкл (с концентрацией клеток 1×10^4) переносилась в пробирки типа Эппендорф с 1%-ным раствором легкоплавкой агарозы в объеме 75 мкл. Полученная суспензия помещалась на предметные стекла с агарозным покрытием и охлаждалась в течение 10 минут при $t + 4^{\circ}\text{C}$, переносилась в лизирующий раствор (10 mM трис-буфера, 2,5 mM NaCl, 100 mM ЭДТА), инкубировалась при $t + 4^{\circ}\text{C}$ в течение 60 минут. Полученные препараты переносились в щелочной раствор с pH 12 для проведения электрофореза в режиме 1В на 1 см, 20 минут. Далее проводилась нейтрализация в фосфатно-солевом буфере с pH 7,4. Для окрашивания использовался раствор этидиума бромид в дистиллированной воде при $t + 4^{\circ}\text{C}$ и экспозиции 120 минут в темноте. Исследование препаратов проводилось на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Olympus FV 10i. Полученные изображения анализировались с помощью инсталлированного программного обеспечения.



Для получения количественных данных изображения «ДНК-комет» подразделялись на 5 условных типов. С использованием математической формулы рассчитывался индекс «ДНК-комет» (индекс):

$$I_{dc} = \frac{(0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4)}{\Sigma},$$

где I_{dc} – индекс «ДНК-комет»;

n_0 до n_4 – количество «ДНК-комет» каждого типа;

Σ – общая сумма «ДНК-комет».

Метод сканирующей электронной микроскопии

В качестве фиксажа для ногтевых пластин использовался 10%-ный раствор формалина. Для проведения оптимальной дегидратации применялся раствор ацетона в восходящих концентрациях 10, 20, 30, 50, 70, 90, 100 ×3% по 30 минут в каждом с последующей вакуумной сушкой в критической точке. После сушки образцы монтировались на алюминиевом столике с помощью карбонового клея, напылялись золотом с толщиной слоя 5 нм для обеспечения электронно-проходящего слоя на поверхности образца, помещались в камеру сканирующего электронного микроскопа и исследовались в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 5 кВ.

Данные исследования были проведены на базе ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» под руководством профессора Борзенко С.А.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ результатов культивирования клеточных культур

С помощью автоматического счетчика клеток проводился подсчет полученных клеточных культур. Количественные значения полученных клеток в контрольной группе и образцах № 1 и № 2 были достаточными для проведения дальнейших аналитических исследований (рис. 1).

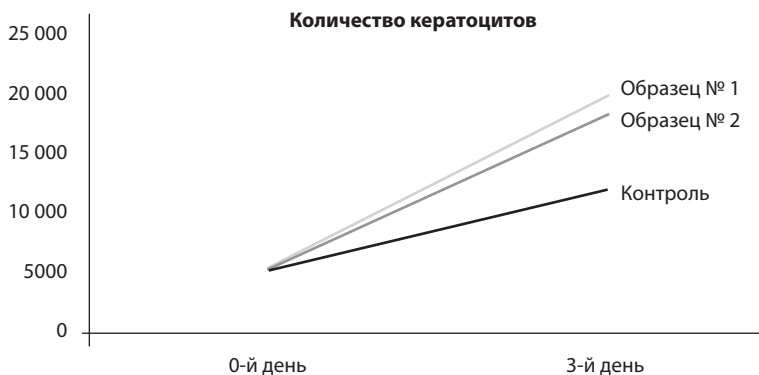


Рис. 1. Сравнительный анализ количества культивированных клеток. Образец № 1 – ногтевая пластинка, обработанная механически. Образец № 2 – ногтевая пластинка, обработанная лазером. Контроль – клетки, культивированные на культуральном пластике

Fig. 1. Comparative analysis of the number of cultured cells. Sample No. 1 – mechanically processed nail plate. Sample No. 2 – a nail plate treated with a laser. Control – cells cultured on culture plastic

Анализ результатов исследования на апоптоз

В контрольном образце была детектирована небольшая доля экспрессии каспазы 7 и 8 и митохондриального маркера BAX, что является естественным процессом старения клеточной культуры, не зависящей от типа обработки ногтевых фрагментов (рис. 2).

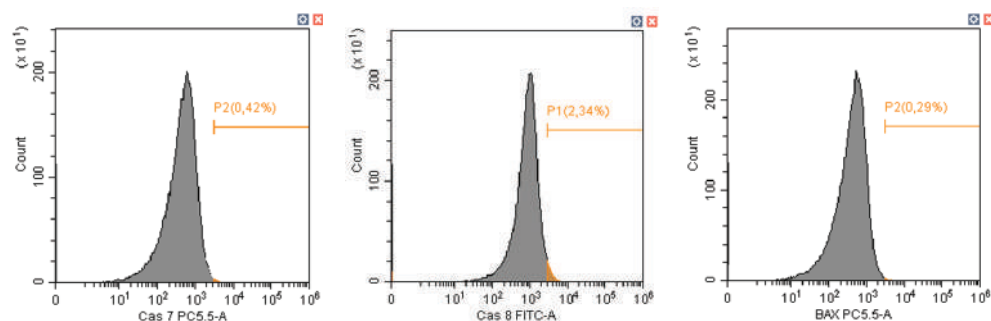


Рис. 2. Исследование раннего апоптоза методом проточной цитофлуориметрии в контрольном образце

Fig. 2. Study of early apoptosis by flow cytofluorimetry in a control sample

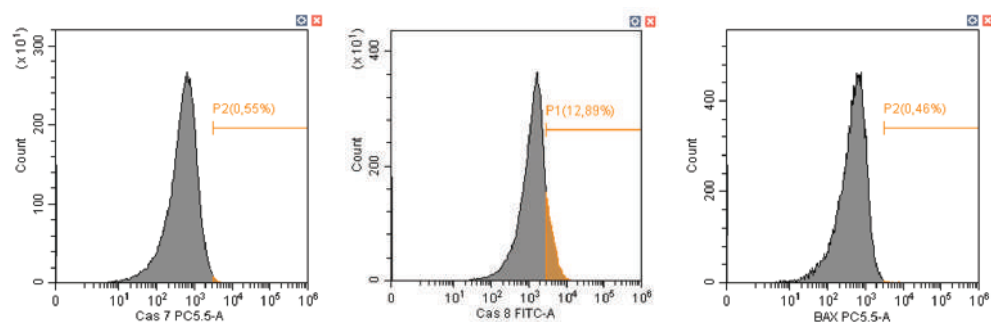


Рис. 3. Исследование раннего апоптоза методом проточной цитофлуориметрии в образце № 1

Fig. 3. Detection of early apoptosis by flow cytofluorimetry in sample № 1

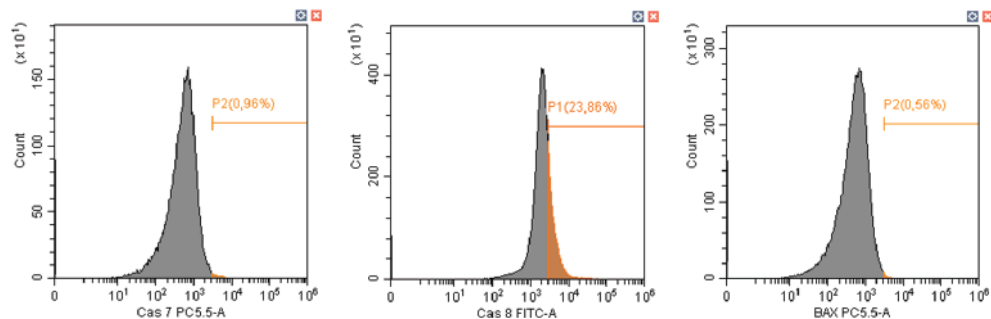


Рис. 4. Исследование раннего апоптоза методом проточной цитофлуориметрии в образце № 2

Fig. 4. Study of early apoptosis by flow cytofluorimetry in specimen № 2



Рис. 5. Сравнительный анализ индексов «ДНК-комет» в исследуемых образцах
Fig. 5. Comparative analysis of "DNA comets" indices in the examined samples

В образце № 1 не выявлено различия между каспазой 7 и митохондриальным маркером BAX, однако экспрессия каспазы 8 имела 5-кратное увеличение (рис. 3).

В образце № 2 не выявлено различия между каспазой 7 и митохондриальным маркером BAX. Однако экспрессия каспазы 8 увеличилась в 10 раз по сравнению с контрольным образцом (рис. 4).

Анализ результатов исследования «ДНК-комет»

Анализ данных «ДНК-комет» показал, что ногтевая пластинка не является токсичным материалом. Для сравнения использовалась культура клеток, культивированная на пластике, положительным контролем служили клетки после 10-минутного УФ-повреждения. Помимо этого, показано уменьшение индекса в образце № 2 по сравнению с образцом № 1, но также имело место незначительное увеличение индекса, не превышающее пороговых значений нормы, в контрольном образце (рис. 5).

Анализ результатов сканирующей электронной микроскопии

При сканирующем электронно-микроскопическом исследовании образца № 1 были выявлены незначительные различия между торцевыми сторонами. При этом собственное вещество ногтя представлено сохранной волокнистой структурой, состоящей из разноориентированных коллагеновых волокон, упакованных в отдельные пластинки. На поверхности ногтевой пластинки детектировались достаточно глубокие продольные борозды, возможно, образованные в результате механической обработки (рис. 6, 7).

Электронно-микроскопическое сканирование образца № 5 выявило ультраструктурное отличие от образца № 1: волокнистая структура ногтевой пластинки (образец № 2) более гладкая, без наличия борозд на первой и второй сторонах образца (рис. 8, 9).

■ ВЫВОДЫ

1. Значительный рост клеточных культур в присутствии исследованных образцов фрагментов ногтевых пластин, обработанных механическим и лазерным способами, свидетельствует об отсутствии токсического действия биологического материала как объекта имплантации на переносимость тканей жизнеспособной роговицы в условиях *in vitro*.

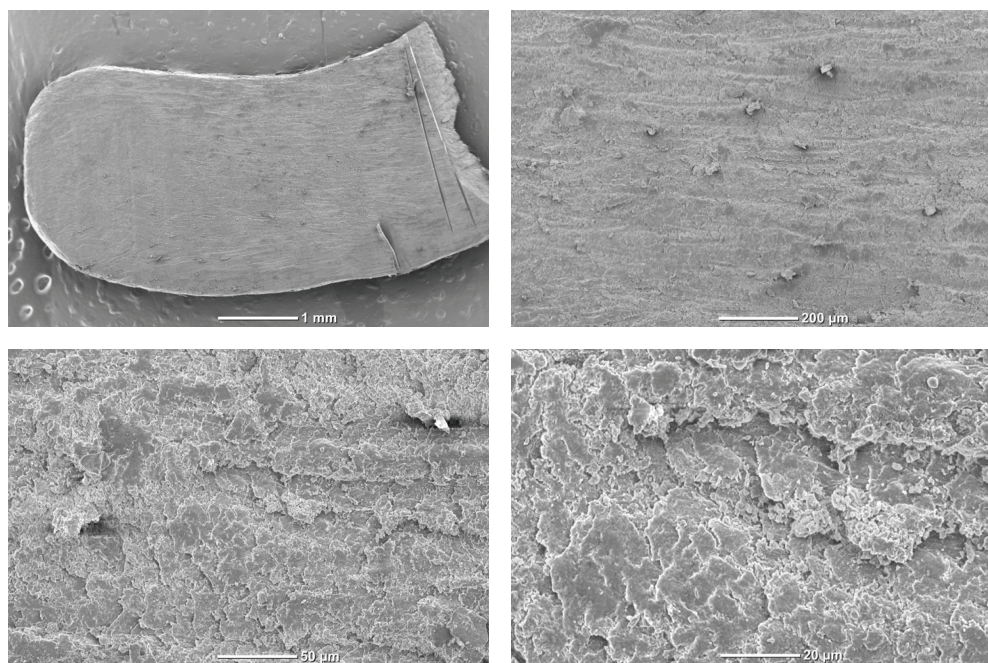


Рис. 6. Фрагмент поверхности ногтевой пластинки, образец № 1, первая сторона (ув. $\times 20$, $\times 100$, $\times 400$, $\times 1000$)
Fig. 6. Fragment of nail plate, sample № 1, first side ($\times 20$, $\times 100$, $\times 400$, $\times 1000$)

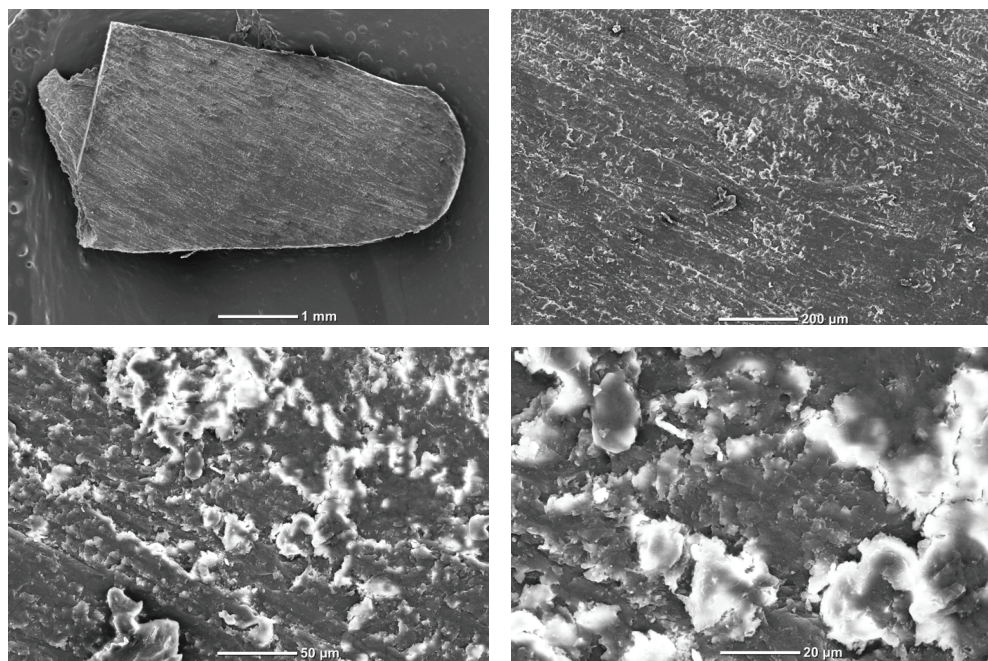


Рис. 7. Фрагмент поверхности ногтевой пластинки, образец № 1, вторая сторона (ув. $\times 20$, $\times 100$, $\times 400$, $\times 1000$)
Fig. 7. Top surface of nail plate, specimen № 1, second side ($\times 20$, $\times 100$, $\times 400$, $\times 1000$)

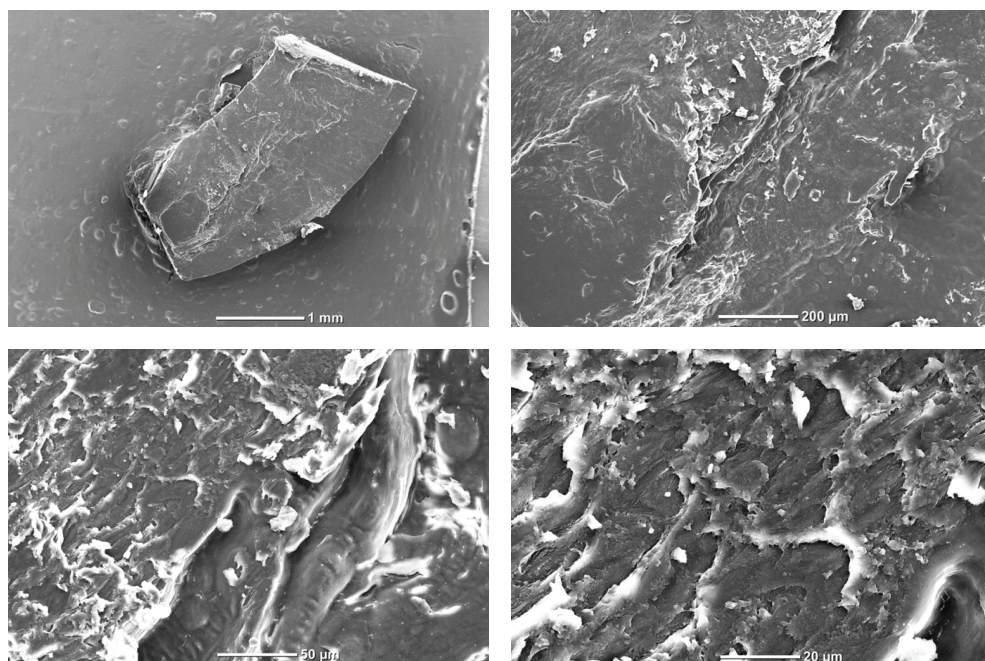


Рис. 8. Фрагмент поверхности ногтевой пластинки, образец № 5, первая сторона (ув. $\times 20$, $\times 100$, $\times 400$, $\times 1000$)
Fig. 8. Nail plate surface, specimen № 5, first side ($\times 20$, $\times 100$, $\times 400$, $\times 1000$)

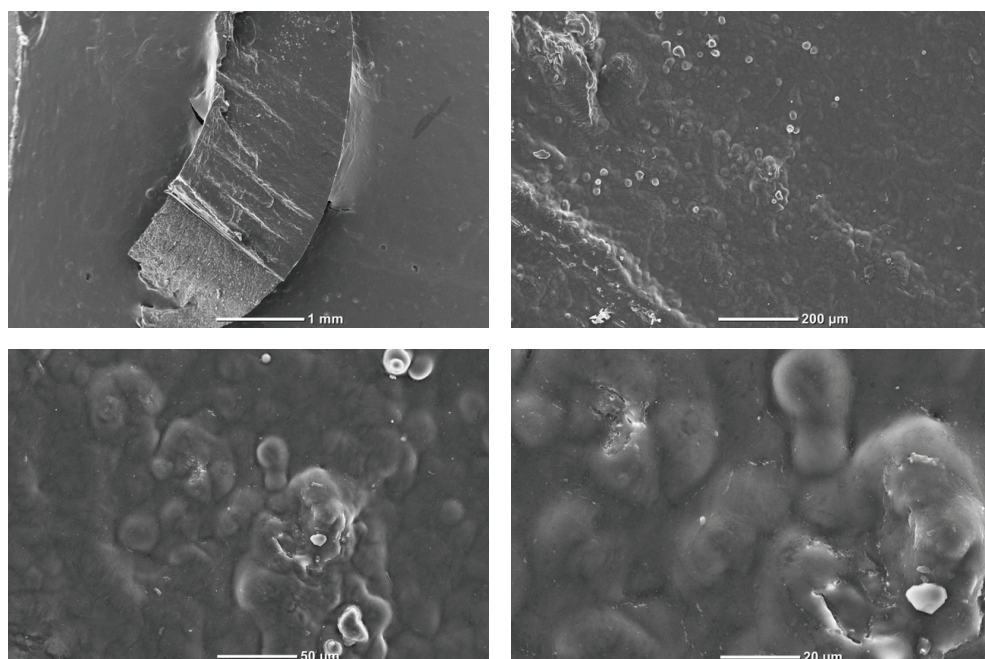


Рис. 9. Фрагмент поверхности ногтевой пластинки, образец № 5, вторая сторона (ув. $\times 20$, $\times 100$, $\times 400$, $\times 1000$)
Fig. 9. Nail plate surface fragment, specimen № 5, second side ($\times 20$, $\times 100$, $\times 400$, $\times 1000$)

2. Образцы фрагментов ногтевых пластин, обработанные механическим и лазерным способами, как объекты имплантации не запускают в кератоцитах роговицы механизмы апоптоза по каспазному и митохондриальному путям и являются биосовместимыми со стромальной тканью роговицы.
 3. Образцы фрагментов ногтевой пластины, обработанные механическим способом, обладают более выраженным влиянием на мутагенность кератоцитов по сравнению с таковыми, обработанными лазерным способом. При этом мутагенность фрагментов, обработанных обоими способами, не превышает допустимых физиологических значений, а оба биоматериала могут быть использованы для роговичной имплантации.
 4. Поверхности образцов фрагментов ногтевой пластины, обработанных лазерным способом, ультраструктурно отличаются от таковых, обработанных механическим путем: имеют более гладкую поверхность, отсутствие борозд от механического воздействия; таким образом, они могут вызывать менее значительную травматизацию интактных кератоцитов при роговичной имплантации.
-

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Shusterov Yu.A. Selected results of interlamellar refractive keratoplasty: 25 years of experience. *Modern technologies of cataract and refractive surgery – 2012: Sat. scientific. Articles. FGBU "MNTK" Eye Microsurgery*. 2012:311–316.
2. Shusterov Y.A., Bragin V.E., Bykanov A.N., Eliseeva E.V. Refractive tunnel keratoplasty with synthetic implants modified by a gas-discharge plasma. *Artif Organs*. 2001;25(12):983–93.
3. Assil K.K., Quantock A.J., Barret A.M., Schanzlin D.J. Corneal iron lines associated with the intrastromal corneal ring. *Am. J. Ophthalmol*. 1993;116(3):350–356.
4. Shusterov Yu.A., Khurai A.R., Tusupbekova M.M., Akhmadyarova B.S. Interlayer keratoplasty using a nail plate. *Ophthalmology. Eastern Europe*. 2021;11(2):155–161.