

Софія-Евеліна СТРЕТОВИЧ, студент,

Олена БЕСПАЛОВА, канд. біол. наук, доц.

Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», м. Київ, Україна,
e-mail: e.bespalova25.05@gmail.com

БІОМАТЕРІАЛИ ТА ЇХ РОЛЬ У ПРОЦЕСАХ РЕГЕНЕРАЦІЇ РОГІВКИ

Анотація. Патологічні стани рогівки є поширеною проблемою, яка потребує клінічних рішень. З огляду на дефіцит донорського біоматеріалу, набувають поширення дослідження у галузі тканинної інженерії, які б змогли покращити стан пацієнтів, а в ідеалі і повністю відновити функціональність органу. У цій роботі описано основні типи полімерів синтетичного та природного походження, які використовуються у процесах регенерації рогівки, зазначені їх переваги та недоліки.

Ключові слова: рогівка, синтетичні полімери, полімери природного походження, тканинна інженерія, колаген, фіброїн, амніотична оболонка, хітозан, децелюляризована рогівка, фактори росту, РНЕМА, лікування рогівки.

Актуальність дослідження

Захворювання рогівки, як інфекційні, так і неінфекційні, є однією з ключових причин погіршення зору у світі. Вказується, що приблизно 6 мільйонів людей страждають від порушень зору різного ступеня тяжкості саме через цю причину. За даними ВООЗ помутніння рогівки входить до переліку п'яти найбільш популярних причин сліпоти [1]. Крім того ВООЗ зазначає що з усіх пацієнтів, що потребують трансплантації рогівки, 15...20% залишаються без лікування через брак донорського матеріалу [2]. Таким чином постає важлива задача – створити доступні методи та засоби лікування деструктивних станів рогівки, або ж альтернативні способи її заміни.

Мета дослідження

Описати основні типи біоматеріалів, що використовуються для регенерації рогівки. Проаналізувати переваги та недоліки кожного типу біоматеріалу. Визначити перспективні напрямки досліджень у цій галузі.

Основні матеріали досліджень

Рогівка – це прозора куполоподібна передня структура ока, яка не містить судин. Вона бере участь у фокусуванні і несе приблизно дві третини загальної оптичної сили ока. Також функцією рогівки є захист внутрішнього середовища ока від зовнішнього впливу. Її особливими характеристиками є механічна міцність, що забезпечується колагеновими пластинками, та прозорість [2]. Товщина структури в центрі, в середньому, сягає 0,550 мм, але значення є залежним від багатьох факторів: етнічна приналежність, стать, вік, стан здоров'я. Міцність на розрив рогівки становить 3,8 МПа [3].

Налічується шість шарів, з яких складається рогівка: епітеліальний, Боуменова мембрана, строма, шар Дюа, десцеметова мембрана та ендотеліальний. Шар Дюа має товщину лише 15 мікрон, був відкритий у 2013 році і досі є причиною суперечок щодо його існування [4]. Місце переходу рогівки у склеру – лімба – містить стовбурові клітини, що дозволяє регенерацію. Саме тому, більшість дослідників зосереджена на використанні біоматеріалів, що допомогли б організму самооновитися, імітуючи архітектуру рогівки.

Пошкодження рогівки можна розділити за причиною їх отримання та в залежності від того, якого шару вони сягають. Ці ж фактори впливають на час відновлення, можливі ускладнення та допустимі методи лікування. Так, наприклад, загоєння травм базальної мембрани триває до шести тижнів. Якщо вражається шар Боумена, то можливе утворення рубців, а у випадку розривів десцеметової мембрани значно збільшується вірогідність розвитку гострого набряку.

За способом (причиною) отримання травми рогівки можна розділити на розриви, перфорації, застрягання чужорідних тіл, хімічні опіки, а також патологічні зміни (кератоконус, ендотеліальна дистрофія Фукса) та наслідки від інших захворювань, наприклад від цукрового діабету [4].

Як вже зазначалося вище, для кожного випадку використовується свій спосіб терапії. У разі перфорації або розриву необхідне водонепроникне закриття рогівки в місці пошкодження. Це можна зробити за допомогою нитки або адгезивів, таких як ціаноакрилатний клей. Проблеми, які необхідно

вирішити, специфічні для строми рогівки, полягають у досягненні правильної орієнтації пластинчастих листів і підтримці функціонування кератоцитів [4].

З іншого боку, існує процедура кератопротезування. На сьогодні існує чотирьох дозволених у клінічній практиці протезів рогівки: В-KPro, ООКР, AlphaCor і KeraKlear Artificial Cornea [2]. Попри все, штучні рогівки все ще мають високий відсоток відторгнення, що є не тільки не бажаним, але і небезпечним для пацієнта, адже несе потенційну 100% сліпоту без можливості виправлення ситуації. Саме тому, стимулювання механізмів відновлення в організмі зараз вважається золотим стандартом функціонального загоєння пошкоджених тканин і органів. На біоматеріалах які використовуються для цього і буде зосереджена надалі дана наукова робота.

Ідеальний матеріал для відновлення рогівки повинен бути біосумісним, біодеградованим, високопрозорим, клінічно простим у застосуванні та створенні; відповідати вимогам до механічної міцності, стабільності, жорсткості; мати хорошу адгезивну властивість, здатність протистояти ферментативному гідролізу, можливість підтримувати клітини та регенерацію ендогенної тканини.

Зазвичай, використовувані біоматеріали включають природні та синтетичні полімери. У той час як природні полімери, як правило, мають відмінну біосумісність, синтетичні полімери дозволяють налаштувати бажані властивості. Розглянемо основні їх типи.

Фіброїн це нерозчинний білок з класу фібрилярних білків, отримується з волокон шовку. Є гідрофобним і приймає β -пластинчасту вторинну структуру. Широко використовується в галузях тканинної та регенеративної інженерії завдяки механічним властивостям, відсутності імуногенної відповіді, а також контрольованій швидкості біодеградації [5]. У 2017 році була спроба оцінити вплив фіброїну на міграцію, проліферацію та адгезію епітеліальних клітин. Результати показали, що білок здатний безпосередньо покращувати загоєння ран шляхом стимуляції наведених вище процесів, а також позитивно впливаючи на швидкість міграції клітин [2].

Матеріал характеризується потрібною прозорістю і його мембрани були запропоновані як субстрат для культивування ендотеліальних клітин рогівки. Така мембрана здатна підтримувати утворення злитого багат шарового епітелію та ріст клітин лімбального епітелію рогівки людини [3]. Адгезія та проліферація клітин покращувалась шляхом додавання інших компонентів, наприклад, амінокислот. Очні плівки, виготовлені з *Antheraea mylitta*, особливого виду фіброїну, з додаванням амінокислотної послідовності Arg-Gly-Asp, продемонстрували високу проникність для метаболітів і поживних речовин [6].

Обмеження фіброїну шовку полягають у відсутності специфічних мотивів зв'язування з клітинами, а також у тому, що цей матеріал відноситься до ксеногенних. Наразі дослідження зосереджені на модифікації та оптимізації шовкових каркасів з метою покращення адгезивних властивостей [7].

Застосування *желатину* для інженерії рогівки, в основному, передбачає створення мембран для клітин рогівки шляхом зшивання. Желатин отримується завдяки гідролізу колагену і є досить розповсюдженим матеріалом. Зшивають желатиновий гідрогель двома способами – дегідротермічно та хімічно. Перший варіант забезпечує кращу прозорість, модуль еластичності та проникність для альбуміну порівняно з колагеном. Включення хондроїтинсульфату сприяють зростанню первинних кератоцитів рогівки кролика, у порівнянні з дослідами, де фігурував лише чистий желатин. Однак гібридний желатин-хондроїтинсульфатний гель мав нижчий модуль пружності та стійкість до розщеплення протеазами. Все більшої популяризації набуває використання напівсинтетичного желатинметакрилату. Це пов'язано з його високим ступенем біосумісності та, що більш важливо, регульованим фізичним характеристикам, отриманим шляхом радикальної полімеризації в присутності фотоініціатора [8].

Завдяки останнім дослідженням *поліаргінін* став новою стратегією для прискорення загоєння ран. Результати оцінки новорозроблених поліаргінінових наноканкул показали, що поліаргінін має внутрішню здатність сприяти загоєнню ран рогівки через сигнальний шлях трансформуючого фактора росту- β /SMAD (TGF- β /SMAD) [2].

Амніотична оболонка – внутрішній шар плаценти, що захищає плід під час вагітності, є однією з найтовстіших базальних мембран, які існують в організмі людини [2, 9]. Її особливість полягає в здатності сприяти загоєнню епітеліальних клітин, окрім інгібування проліферації фібробластів і диференціювання міофібробластів. Крім того, вона містить кілька антиангіогенних, протизапальних і нейротрофічних факторів. Схожість структур рогівки та амніотичної оболонки лише сприяє активному використанню біоматеріалу в контексті даної галузі. Перші спроби були ще у 1940-х роках

для лікування опіків очей, однак популярності набуло це лише в 1990-х і наразі існує кілька препаратів схвалених для використання FDA [7].

Недоліки стосуються неповної прозорості амніотичної оболонки та недостатньої механічної міцності матеріалу. Той факт, що матеріал надто легко піддається згинанню може призводити до розривів або утворення зморшкуватої поверхні під час накладання швів. Крім того, існує етична проблема донорства, шанс відторгнення та можливість передачі захворювань через біоматеріал при недостатньому обстеженні донора [7].

Хітозан – ще один природний полімер, синтезується шляхом деацетилювання хітину – азотовмісного полісахариду. Для біоінженерії рогики хітозан в основному використовувався як замітник амніотичної мембрани. Механізм стимулювання загоєння епітеліальних ран за участю хітозану частково опосередкований через активацію позаклітинного сигнально-регульованого шляху кінази. Передача даних сигналів відіграє ключову роль у клітинній проліферації, міграції та диференціації [2]. У зв'язку з поганою розчинністю хітозану у природних розчинниках подальші дослідження стали фокусуватися на його водорозчинній похідній – гідроксиетилхітозані (HECTS). Попри все, дані матеріали більше підходять для використання у суміші, а не чистому вигляді [8].

Альгірати є біосумісними, нетоксичним, неімунотенним і біологічно розкладаним – усі ці властивості сприяють застосуванню цього класу речовин у процесах терапії рогики та клітинній інженерії загалом. Цей природний гетерополісахарид можна отримати з бурих водоростей та за допомогою деяких бактерій, наприклад, *Pseudomonas aeruginosa*.

Посилити адгезію, проліферацію та життєздатність клітин дозволяє поєднання альгіратних мереж з білком, похідним від синтезу позаклітинного матриксу (наприклад, колагеном). А щоб надати гідрогелям міцності та пружності, водночас, зберігаючи потрібне співвідношення заломлення та пропускання світла, проводять кон'югацію альгірату з синтетичними полімерами у формі нановолокнистого фотозшиваючого матеріалу. З іншого боку альгірат і сам може виступати у ролі доповнюючого агенту для покращення матеріалу, якому не вистачає біосумісності та прозорості.

Нова перспектива альгіратних гідрогелів пов'язана з універсальністю їх виготовлення за допомогою електроспінінгу, 3D-біодруку та легкого процесу формування клітинного листа. Хоча багатообіцяючі результати вже отримані, можливість використання альгірату для створення каркасу для клітин у великому масштабі потребує подальшого підтвердження [6].

Поліметилметакрилат (ПММА) та деякі інші *синтетичні полімери* (поліетилен з надвисокою молекулярною масою (UHMWPE) і поліефірний ефіркетон (PEEK)) характеризуються біоінертністю, у зв'язку з чим, їх клінічне застосування у регенерації рогики є досі обмеженим. Ця проблема вирішується шляхом модифікації матеріалу різними, переважно, хімічними методами. Наприклад, у 2019 році з поверхні ПММА видалили метильні групи і додали L-DOPA, що дало змогу підвищити проліферацію клітин (як для фібробластів, так і для епітеліальних клітин рогики) і в результаті призвело до покращення біосумісності та позитивної адгезії [9].

Незважаючи на негативний аспект щодо адгезії, полімери, зокрема полі(вініловий спирт) (PVA), полі(2-гідроксіетилметакрилат) (PHEMA), поліетилен (гліколь)діакрилат (PEGDA) дуже легко піддаються контролю, що дозволяє отримати потрібні механічні та оптичні властивості. Таким чином важливо зосередити увагу на способах модифікації цих матеріалів. Штучна рогика, виготовлена з використанням гідрогелю ZnS/PHEMA/РАА, продемонструвала високий показник заломлення, а гідрогель PEG/РАА продемонстрував високу проникність для глюкози, залишаючись оптично прозорою *in situ* протягом 2 тижнів [8].

Основна перевага використання *децелюляризованої рогики* перед іншими біоматеріалами полягає в тому, що отриманий каркас має фізичну структуру позаклітинного матриксу і механічні властивості, які повинні підтримувати належні оптичні властивості та функцію рогики [7]. Джерелом біоматеріалу для процесу децелюляризації може бути безклітинна (ацелюлярна) свиняча, рідше бичача, рогика, або людська рогика, якій зазвичай надається перевага. Отже, використання даного матеріалу не вирішує проблему недостатньої кількості донорів та ризику відторгнення [7]. Децелюляризована рогика може забезпечувати чудову функціональність із подібними оптичними та механічними властивостями до нативної рогики, здатна підтримувати ріст епітелію рогики, кератоцитів і ендотелію, а також повільно деградувати під час злиття з навколишньою строю під час регенерації епітелію рогики та росту нервів [8].

Фактори росту виявляють свою необхідність шляхом сприяння клітинній проліферації, адгезії, активності, диференціації та згодом посилюють регенерацію тканин. Факторами росту особливо наповнена збагачена тромбоцитами плазма. Лікування за допомогою крапель збагаченої

тромбоцитами плазми усуває необхідність інвазивних процедур, займає мінімум часу та витрат. Крім того, твердий згусток збагаченої тромбоцитами плазми в поєднанні з іншими біоматеріалами, такими як амніотична оболонка мали багатообіцяючий результат для загоєння перфорації рогівки. Єдиним недоліком про який повідомляють є тривалий час приготування засобу. Окрім клінічного лікування збагачену тромбоцитами плазму використовують як замітник накладання швів [3].

Недавні дослідження показали, що інгібітор ROCK може бути інноваційним терапевтичним засобом для різних очних захворювань, зокрема для декомпенсації ендотелію рогівки. Rho-асоційована протеїнкіназа являє собою кіназу, що належить до сімейства AGC серин-треонін-специфічних протеїнкіназ. Вона бере участь головним чином у регуляції форми та руху клітин, впливаючи на цитоскелет. Експериментальне дослідження показало, що інгібітор ROCK полегшує проліферацію ендотеліальних клітин рогівки шляхом модуляції цикліну та p27; обидва є регуляторами переходу G1/S [10]. Інші дослідження виявили, що вплив інгібітора ROCK був значущим лише в рогівках молодих донорів, що свідчить про те, що ендотеліальні клітини зі старих рогівок можуть втратити потенціал проліферації, який міг бути активований цим інгібітором. Інгібітор ROCK може бути альтернативою трансплантації рогівки при ендотеліальній дистрофії рогівки Фукса (FECD) [10].

Основним компонентом рогівки є *колаген*, переважно першого типу (COL1), на який припадає $\approx 71\%$ її сухої маси. У менших кількостях присутні колагени третього та п'ятого типів. Саме тому, колагени та матеріали на їх основі є поширеними при лікуванні рогівки – він сумісний з усіма клітинами рогівки. Трипептид аргінін-гліцин-аспарагінова кислота (RGD), що розпізнається рецепторами інтегрину клітинної поверхні, є важливим для клітинної адгезії, міграції та проліферації. Широке застосування колагену у тканинній інженерії частково пояснюється простотою та відносною дешевістю його виробництва [8]. Джерелами COL1 можуть бути тканини, наприклад, шкірні покриви різних тварин: щурів, свиней, биків тощо. Обмеження використання колагенів стосуються недостатньої для накладання швів механічної міцності матеріалу [7, 9]. Тому дослідження зосередились на виправленні цієї ситуації за допомогою різних механізмів: хімічних, фізичних та ферментативних підходів.

Одним із способів підвищення міцності гідрогелів COL1 є видалення більшої частини води та посилення взаємодії полімерного ланцюга, що дослідники в літературі називають пластичним стисненням. Отриманий гель має покращені характеристики обробки та, як було показано, покращує ріст клітин лімбального епітелію порівняно з неспресованими гідрогелями. Це може бути пов'язано з тим, що при повній гідратації волокна COL1 в нестисненому гелі були більш дезорганізованими та нерівномірними, а в стиснутих гелях волокна були більш щільно та рівномірніше упаковані, що призводило до поверхні з меншим середнім розміром пор. У другому підході до стиснення гелів COL1 вода видаляється шляхом розміщення гідрофільних пористих абсорберів поверх гідрогелів для більш м'якого видалення води. Третій спосіб стиснення гелів COL1 полягає в тому, щоб дати гелям стиснутися під дією власної ваги, що спричиняє м'яке виштовхування надлишку води, у результаті чого гель стає більш щільним і тонким [7].

Іншим популярним методом підвищення як міцності, так і прозорості гідрогелів COL1 є зшивання. Найбільш поширеним методом, який вважався ідеальним, є зшивання на основі карбодіміду. Чотирикратно збільшення міцності та жорсткості COL1 в порівнянні з раніше створеними конструкціями без зшивання, було досягнуто за допомогою цього методу, однак ці результати все ще на порядок нижчі, ніж жорсткість рогівки людини. Однією з переваг зшивання на основі перед іншими методами є те, що COL1 можна легко функціоналізувати іншими біомолекулами, такими як лимонна кислота або ванкоміцин, під час процесу зшивання.

Для вирішення інфекційних проблем післяопераційного відновлення, у гелі COL1 шляхом зшивання був включений антибіотик ванкоміцин. Таким чином було подолано обмежену ефективність очних крапель і створено антибактеріальний матеріал. Варто зазначити, що додавання ванкоміцину до COL1 не змінило прозорість або модуль пружності матеріалу, і при імплантації *in vivo* в здорову рогівку він продемонстрував хорошу біосумісність і вивільнення ванкоміцину протягом 10 днів.

Колаген типу III відрізняється за структурою від COL1 тим, що це гомотример, що складається з трьох ланцюгів $\alpha 1(III)$, які утворюють дисульфідні зв'язки один з одним, що робить його більш стійким до колагеназ. Імплантам з COLIII так само не вистачає механічної міцності, а також цей матеріал погано затримує УФ-промені, тому велика частина спектру випромінювання пропускається, що негативно впливає на внутрішні структури ока і може їх пошкодити. Неоваскуляризація ще один

недолік використання рогівкових імплантів з COLIII, однак він коректується шляхом додавання 2-метакрилоїлоксиетилфосфорилхоліну (MPC) у зшитий COLIII. MPC — це схвалений FDA синтетичний фосфоліпід [7].

Висновки

Усі біоматеріали, що використовуються в процесах регенерації рогівки можна розподілити на синтетичні полімери та полімери природного походження. Кожен біоматеріал має унікальні властивості та обмеження, що сприяє загальному прогресу в розробці ефективних стратегій регенерації рогівки. Біоматеріали, які використовуються для розробки замінників рогівки, повинні відтворювати структурні та функціональні вимоги нативної рогівки людини.

Одним з найпоширеніших матеріалів є колаген першого типу завдяки своїй сумісності з усіма типами клітин рогівки. Його недолік – низьку міцність – виправляють різними шляхами. Основні з них це пластичне стиснення та зшивання. Колаген третього типу теж використовується, але менш інтенсивно ніж COLI. До його дефектів, окрім міцності, відносять ще надмірну УФ-проникність та сприяння неоваскуляризації. Іншим застосовуваним білком є фіброїн. Він неімуногенний та біодеградуваний, характеризується потрібною прозорістю, але не має специфічних мотивів зв'язування з клітинами. До офіційно схвалених FDA препаратів для лікування пошкоджень рогівки відносять амніотичну оболонку. Даний матеріал має схожу структуру до рогівки ока, що сприяє використанню. Негативний аспект стосується недостатньої прозорості та міцності матеріалу, а також того факту, що його використання не вирішує проблему нестачі донорів. Децелюляризована рогівка також не вирішує проблеми донорства, але через чудові функціональні та оптичні властивості, здатність підтримувати ріст епітелію, кератоцитів та ендотелію, вона продовжує фігурувати у використанні та дослідженнях. Альгінати можуть виступати як у ролі самостійного матеріалу, чий властивості покращують, так і бути додатковим агентом, що забезпечує матеріал прозорістю та біосумісністю. Поліаргінін здатний прискорювати процеси загоєння, а природний полімер хітозан, хоч і здатний виступати у ролі замінника амніотичної оболонки, більше використовується у вигляді суміші з іншими матеріалами. Желатин досить розповсюджений у застосуванні, але його похідний матеріал – желатинметакрилат набуває більшої популярності завдяки регульованим фізичним характеристикам при тому ж високому ступені біосумісності. Застосування синтетичних полімерів не набуло поширення у клінічному застосуванні у регенерації рогівки. Це пов'язано з їх біоінертністю. Однак модифіковані матеріали, такі як штучна рогівка, виготовлена з використанням гідрогелю ZnS/PHEMA/РАА мають високий потенціал у застосуванні і потребують більше досліджень.

Таким чином, не існує ідеального матеріалу для використання у сфері регенерації рогівки. Два основних типи недоліків: або недостатня біосумісність, надмірна біоінертність, або відсутність потрібних фізико-механічних властивостей таких як прозорість та механічна міцність. З огляду на це, варто зосередити дослідження на створення оптимального матеріалу, що міг би усунути обидва типи проблем.

Література

1. Big data in corneal diseases and cataract: Current applications and future directions / D. S. J. Ting et al. *Frontiers in Big Data*. 2023. Vol. 6. URL: <https://doi.org/10.3389/fdata.2023.1017420> (date of access: 01.04.2024).
2. Corneal Repair and Regeneration: Current Concepts and Future Directions / M. Mobaraki et al. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2019. Vol. 7. URL: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00135> (date of access: 01.04.2024).
3. Bioengineering Approaches for Corneal Regenerative Medicine / S. S. Mahdavi et al. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2020. Vol. 17, no. 5. P. 567–593. URL: <https://doi.org/10.1007/s13770-020-00262-8> (date of access: 01.04.2024).
4. Corneal injury: Clinical and molecular aspects / B. Barrientez et al. *Experimental Eye Research*. 2019. Vol. 186. P. 107709. URL: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107709> (date of access: 01.04.2024).
5. Application of Silk-Fibroin-Based Hydrogels in Tissue Engineering / Y. Lyu et al. *Gels*. 2023. Vol. 9, no. 5. P. 431. URL: <https://doi.org/10.3390/gels9050431> (date of access: 01.04.2024).
6. Alginate-Based Composites for Corneal Regeneration: The Optimization of a Biomaterial to Overcome Its Limits / M. Tarsitano et al. *Gels*. 2022. Vol. 8, no. 7. P. 431. URL: <https://doi.org/10.3390/gels8070431> (date of access: 01.04.2024).
7. Palchesko R. N., Carrasquilla S. D., Feinberg A. W. Natural Biomaterials for Corneal Tissue Engineering, Repair, and Regeneration. *Advanced Healthcare Materials*. 2018. Vol. 7, no. 16. P. 1701434. URL: <https://doi.org/10.1002/adhm.201701434> (date of access: 01.04.2024).

- 8.** Biomaterials for corneal bioengineering / Z. Chen et al. *Biomedical Materials*. 2018. Vol. 13, no. 3. P. 032002. URL: <https://doi.org/10.1088/1748-605x/aa92d2> (date of access: 01.04.2024).
- 9.** Application of biomaterials and nanotechnology in corneal tissue engineering / M. Soleimani et al. *Journal of International Medical Research*. 2023. Vol. 51, no. 7. URL: <https://doi.org/10.1177/03000605231190473> (date of access: 01.04.2024).
- 10.** Application of Novel Drugs for Corneal Cell Regeneration / S. B. Han et al. *Journal of Ophthalmology*. 2018. Vol. 2018. P. 1–9. URL: <https://doi.org/10.1155/2018/1215868> (date of access: 01.04.2024).