

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc655846>

EDN: USBLTL



Эквивалент конъюнктивальной ткани на основе коллагена: исследование биосовместимости и биомеханических свойств *in vitro*

Д.А. Криволапова¹, А.Ю. Андреев^{1,2,3}, А.М. Суббот¹, С.Э. Аветисов^{1,3}, Е.О. Осидак^{2,4},
П.Н. Ильина¹, А.Д. Панова¹

¹ Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова, Москва, Россия;

² ООО Фирма «Имтек», Москва, Россия;

³ Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

⁴ Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Создание эквивалента конъюнктивы, способного замещать дефекты ткани и предотвращать патологическое рубцевание, — ключевая задача разработки биоматериалов, для изготовления которых часто используется коллаген, в реконструктивных вмешательствах. Оценка биосовместимости и биомеханических свойств таких биоматериалов способствует развитию перспективных хирургических методик устранения дефектов конъюнктивы.

Цель. Оценить биосовместимость эпителиальных клеток конъюнктивы (ЭКК) человека и коллагеновой мембраны (КМ) оригинальной технологии *in vitro*; отсутствие её цитотоксичности для ЭКК; морфологию и паттерн характерных белков ЭКК на КМ; охарактеризовать биомеханические свойства КМ в сравнении с нативной конъюнктивой.

Методы. Первичная культура ЭКК получена эксплантным методом и верифицирована путём окрашивания на маркёры цитокератин 7 и муцин 5АС. Исследовали КМ с концентрацией коллагена 10 и 30 мг/мл. Цитотоксичность КМ 30 мг/мл оценивали при высевании ЭКК в плотности 50 тыс./см², проведя MTS-тест и оценку на выживаемость путём окраски кальцеином АМ и Hoechst. Морфологию ЭКК оценивали по фазово-контрастным снимкам культуры клеток после посева на КМ и иммуноцитохимического окрашивания на цитокератин 7 и муцин 5АС. Биомеханические показатели КМ 30 мг/мл и конъюнктивы исследованы статическими и динамическими тестами на машине-инденторе.

Результаты. По результатам фазово-контрастной микроскопии, в течение недели после посева на КМ 10 мг/мл отмечена миграция ЭКК во внутренние слои носителя, на КМ 30 мг/мл выявлен рост сливным монослоем по поверхности мембраны. Тест на метаболическую активность не установил значимого различия между группами контроля и КМ 30 мг/мл. В тесте live/dead и в группе контроля, и в группе КМ 95% клеток были положительно окрашены кальцеином. Иммуноцитохимический профиль ЭКК не изменялся: как и в группе контроля, на КМ клетки экспрессировали характерные для конъюнктивы цитокератин 7 и муцин 5АС. Показатели модуля Юнга КМ и бульбарной конъюнктивы оказались сопоставимыми: $0,0008739 \pm 0,0004332$ и $0,0009472 \pm 0,001323$ ГПа соответственно ($p=0,0549$). Показатель твёрдости КМ оказался выше конъюнктивы ($p < 0,0001$), а показатель вязкости — ниже показателей нативной ткани ($p < 0,0001$).

Заключение. ЭКК сохраняли жизнеспособность после посева на исследованные КМ, подтверждая отсутствие её цитотоксичности. Миграция ЭКК вглубь матрикса свидетельствует о способности материала создавать благоприятную среду для эпителизации конъюнктивы и резорбироваться после заселения клетками. Сохранение молекулярного паттерна ЭКК свидетельствует о высокой биосовместимости КМ с клетками конъюнктивального эпителия. КМ 30 мг/мл обладают упругостью, аналогичной конъюнктиве; имеют большую жёсткость и меньшую вязкость. Перспективна оптимизация биомеханических свойств КМ под конкретные клинические задачи.

Ключевые слова: конъюнктивa; реконструкция конъюнктивы; тканевая инженерия; эпителий конъюнктивы; коллаген; биополимеры; индентирование.

Как цитировать:

Криволапова Д.А., Андреев А.Ю., Суббот А.М., Аветисов С.Э., Осидак Е.О., Ильина П.Н., Панова А.Д. Эквивалент конъюнктивальной ткани на основе коллагена: исследование биосовместимости и биомеханических свойств *in vitro* // Гены и клетки. 2025. Т. 20, № 2. С. 130–140. DOI: 10.17816/gc655846 EDN: USBLTL

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc655846>

EDN: USBLTL

Collagen-Based Conjunctival Tissue Equivalent: *In Vitro* Evaluation of Biocompatibility and Biomechanical Properties

Diana A. Krivolapova¹, Andrey Yu. Andreev^{1,2,3}, Anastasia M. Subbot¹, Sergey E. Avetisov^{1,3}, Egor O. Osidak^{2,4}, Polina N. Ilina¹, Anna D. Panova¹

¹ M.M. Krasnov Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russia;

² Imtek Ltd., Moscow, Russia;

³ The First Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russia;

⁴ Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: The development of a conjunctival equivalent capable of repairing tissue defects and preventing pathological scarring is a critical goal in biomaterial design for reconstructive procedures, in which collagen is frequently employed. Evaluating the biocompatibility and biomechanical properties of such materials supports the advancement of effective surgical approaches for conjunctival reconstruction.

AIM: The work aimed to evaluate the biocompatibility of human conjunctival epithelial cells (hCECs) with a collagen membrane (CM) developed using an original technique *in vitro*; to confirm its noncytotoxicity toward hCECs; to characterize hCEC morphology and expression of specific proteins on CM; and to compare the biomechanical properties of CM with native conjunctiva.

METHODS: A primary culture of hCECs was obtained using the explant method and verified through staining for the markers cytokeratin 7 and mucin 5AC. Two CM formulations (collagen concentration 10 mg/mL and 30 mg/mL) were tested. Cytotoxicity of the 30 mg/mL CM was evaluated by seeding hCECs at 50,000 cells/cm² followed by MTS assay and viability testing with calcein-AM and Hoechst staining. hCECs morphology was analyzed using phase-contrast images of the cell culture after seeding on CM and immunocytochemical staining for cytokeratin 7 and mucin 5AC. Biomechanical properties of the 30 mg/mL CM and conjunctiva were assessed using static and dynamic tests on an indentation machine.

RESULTS: Phase-contrast microscopy revealed that within 1 week after seeding, hCECs migrated into the inner layers of the 10 mg/mL CM, whereas on the 30 mg/mL CM, the cells formed a confluent monolayer on its surface. The metabolic activity assay revealed no significant difference between the control groups and 30 mg/mL CM. In the live/dead assay, 95% of cells in both groups stained positive with calcein. The immunocytochemical profile of hCECs remained unchanged: as in the control group, cells cultured on the CM expressed conjunctiva-specific cytokeratin 7 and mucin 5AC. The Young's modulus values for the CM and bulbar conjunctiva were comparable: 0.0008739 ± 0.0004332 GPa and 0.0009472 ± 0.001323 GPa, respectively ($p = 0.0549$). The hardness of the CM was significantly higher than that of the conjunctiva ($p < 0.0001$), while its viscosity was significantly lower compared to native tissue ($p < 0.0001$).

CONCLUSION: hCECs remained viable after seeding on the tested CM, confirming its noncytotoxicity. The migration of hCECs into the matrix indicates the material's ability to create a favorable microenvironment for conjunctival epithelialization and to undergo resorption following cell colonization. Preservation of the molecular profile of hCECs indicates high biocompatibility of the CM with conjunctival epithelium. The 30 mg/mL CM exhibits elasticity comparable to that of conjunctiva, with higher hardness and lower viscosity. Optimization of CM biomechanical properties for specific clinical needs holds promise.

Keywords: conjunctiva; conjunctival reconstruction; tissue engineering; conjunctival epithelium; collagen; biopolymers; indentation.

To cite this article:

Krivolapova DA, Andreev AY, Subbot AM, Avetisov SE, Osidak EO, Ilina PN, Panova AD. Collagen-Based Conjunctival Tissue Equivalent: *In Vitro* Evaluation of Biocompatibility and Biomechanical Properties. *Genes & cells*. 2025;20(2):130–140. DOI: 10.17816/gc655846 EDN: USBLTL

Submitted: 19.02.2025

Accepted: 05.05.2025

Published online: 24.06.2025

ВВЕДЕНИЕ

Конъюнктивa, являясь тонкой прозрачной слизистой оболочкой, проходит от лимба над поверхностью склеры и образует верхний и нижний своды век, обеспечивая их плавное движение относительно глазного яблока [1, 2]. Конъюнктивa служит механическим и иммунологическим барьером глаза от внешних воздействий и обеспечивает секрецию муцинового компонента слёзной жидкости [3, 4].

Как и все барьерные ткани, конъюнктивa подвержена травматизации. Иногда регенерация в этой зоне идёт с формированием участков рубцевания, чаще всего это случается при обширном повреждении, присоединении инфекции или в результате системных аутоиммунных заболеваний [5, 6].

Длительный воспалительный процесс на глазной поверхности может также вызывать истощение популяции лимбальных эпителиальных стволовых клеток, что приводит к конъюнктивализации роговицы, неоваскуляризации, врастанию субэпителиальной фиброзной ткани и образованию роговичных стромальных рубцов [7, 8].

Для предупреждения хронизации воспалительных процессов и связанного с ними рубцевания проводятся реконструктивные вмешательства на конъюнктиве с использованием различных материалов [9]. В настоящее время распространённой методикой устранения дефектов в этой зоне является применение конъюнктивальных аутоотрансплантатов, однако в случае двусторонних заболеваний может возникнуть дефицит собственной ткани, требующейся для восстановления обширных дефектов [5].

Альтернативным способом реконструкции может стать использование биосовместимого материала с возможностью образования эпителиального слоя на его поверхности. Часто используемый материал — это коллаген, естественная составляющая конъюнктивальной стромы [10]. Коллаген является основным структурным белком внеклеточного матрикса, и эпителиальные клетки способны к нему адгезировать, а также пролиферировать на его поверхности, поэтому данный субстрат имеет положительный опыт применения в качестве биополимерного скаффолда для устранения дефектов конъюнктивы [10, 11].

Биомеханические характеристики коллагеновых мембран (КМ) определяют их пригодность к хирургическому применению, надёжность фиксации шовным материалом. В то же время биомеханика скаффолда должна поддерживать полный объём движений глазного яблока и осуществление акта моргания [12, 13], поэтому подходящая для хирургической реконструкции глазной поверхности КМ должна обладать свойствами, близкими к нативной ткани.

ЦЕЛЬ

Оценить биосовместимость эпителиальных клеток конъюнктивы (ЭКК) и КМ, произведённой по оригинальной технологии *in vitro*; отсутствие цитотоксичности КМ

для ЭКК; их морфологию и паттерн характерных белков после посева на КМ; а также охарактеризовать биомеханические свойства КМ в сравнении с нативной тканью конъюнктивы.

МЕТОДЫ

Изготовление коллагеновой мембраны

В соответствии с ранее опубликованным методом [14] изготавливали КМ. Для этого 0,2 мл стерильных растворов высокоочищенного нативного коллагена I типа, выделенного путём кислой экстракции из свиных сухожилий (Viscoll; ООО Фирмы «Имтек», Россия), в различной концентрации (10 и 30 мг/мл) были добавлены в лунки 24-луночного планшета. Для удаления пузырьков воздуха из раствора коллагена планшеты центрифугировали в центрифуге Avanti J-26XP (колебательный ротор JS-5.2; Beckman Coulter, Inc., США) при 3200 об./мин и 4 °C в течение 30 мин. Для индукции гелеобразования коллагена пластины инкубировали в парах аммиака в течение 12 ч при температуре 20 °C. После инкубации гидрогели коллагена собирали, погружали в воду для инъекций (Solopharm, Россия) и инкубировали в течение 24 ч при температуре 20 °C.

На следующем этапе гидрогели коллагена помещали между двумя тефлоновыми пластинами, одна из которых подвергалась постоянной нагрузке 3 кг до полной витрификации. Для длительного хранения полученные материалы регидратировали в воде для инъекций (Solopharm, Россия) в течение 5 мин. Затем КМ помещали на квадратную тефлоновую пластину и герметично упаковывали в стерильные первичные упаковки, соответствующие требованиям ISO 11607-1 («КЛИНИПАК», Россия). Материалы в первичной упаковке герметично запечатывали под вакуумом во вторичной вакуумной упаковке, что позволило хранить КМ при температуре от 4 до 10 °C в течение 12 мес с даты упаковки (рис. 1). Все манипуляции были проведены в асептических условиях.

Получение культуры эпителиальных клеток и её характеристика

Первичная культура ЭКК человека получена из кадаверного материала от шести доноров экплантным методом.

Из глазного банка ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова» были получены лоскуты бульбарной конъюнктивы (данный материал не востребован в ходе операции и обычно подлежит утилизации). Фрагменты конъюнктивы трижды промывали в растворе Хенкса («ПанЭко», Россия) с антибиотиками (пенициллин–стрептомицин) и антимикотиком (амфотерицин В), измельчали скальпелем до размера 1–2 мм и располагали на поверхности культурального пластика (в чашке Петри диаметром 35 мм) в капле



Рис. 1. Первичная (а) и вторичная (б) герметичная упаковка коллагенового материала; с — снимок изготовленной коллагеновой мембраны.
Fig. 1. Primary (a) and secondary (b) hermetic packaging of the collagen material; (c) image of the fabricated collagen membrane.

фетальной бычьей сыворотки (Global Kang Qinhuangdao Biotechnology Co., Китай); через сутки к ним добавляли питательную среду RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с 10% фетальной бычьей сывороткой, глутамином и антибиотиком–антимикотиком. Клетки культивировали в стандартных условиях: при 5% CO₂, температуре 37 °C и влажности 90%. Смену среды проводили каждые 2–3 дня.

Клетки начинали мигрировать из эксплантатов на 4–5-й день, после чего среду заменяли на DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) с 5% фетальной бычьей сывороткой, 2 мМ глутамин, антибиотиками пенициллином–стрептомицином, антимикотиком амфотерицином В, добавкой инсулин–трансферрин–селенит (Gibco, США) и 10 нг/мл эпидермального фактора роста (Sigma-Aldrich, США). Клетки достигали состояния конфлюэнтного монослоя на 2-й неделе, после чего их пересеивали с применением трипсина–ЭДТА («ПанЭко», Россия) в соотношении 1:3 (в концентрации 10 тыс./см²). Подсчёт клеток проводили на автоматическом счётчике C100 (RWD, Китай).

Разделение на группы

В контрольной группе ЭКК культивировали на культуральном пластике без обработки (12-луночный планшет (SPL, Корея), в экспериментальной группе — на фрагментах полученной мембраны из коллагена Viscoll с концентрацией 10 или 30 мг/мл (ООО Фирмы «Имтек», Россия) размерами 3×3 мм и толщиной 100 мкм. Перед внесением клеток фрагменты мембраны трижды промывали раствором Хенкса.

Оценка морфологии эпителиальных клеток

Наблюдение за ростом клеток в обеих группах проводили в режиме фазового контраста на микроскопе AxioVert A1 (Carl Zeiss, Германия). Фоторегистрацию культуры осуществляли на 1, 7, 13-е сутки после посева.

Иммуноцитохимическое окрашивание эпителиальных клеток

Для оценки сохранности белкового репертуара ЭКК после их засева на КМ в концентрации 10 мг/мл было

выполнено иммуноцитохимическое окрашивание на маркеры ЭКК: филаментообразующий белок цитokerатин 7 и компонент секреторного аппарата муцин 5AC [15]. Были использованы моноклональные антитела к цитокератину 7 (MA1-06315; Thermo Fisher Scientific, США) в разведении 1:100 и anti-Mucin 5AC antibody (ARG59705; Arigobio, Китай).

Вторичные антитела с меткой Alexa Fluor 594 (A-11032; Invitrogen, США) применяли в разведении 1:500. Вторичные антитела с меткой Cy2 (ab6940; Abcam, США) использовали в разведении 1:100, докрашивание ядер проводили красителем Hoechst 33342 («ПанЭко», Россия) в концентрации 1 мкг/мл. Детекцию осуществляли на интегрированной системе визуализации Celena X (Logos Biosystems, Южная Корея).

Тест live/dead

Для оценки выживаемости ЭКК после посева на КМ с концентрацией коллагена 30 мг/мл их окрашивали кальцеином АМ (Invitrogen, США) и ядерным красителем Hoechst («ПанЭко», Россия). На фотографиях производили подсчёт общего количества клеток: живых (цитоплазма которых окрашена в зелёный цвет) и мёртвых (ядра которых окрашены в ярко-синий цвет).

Оценка метаболической активности клеток

Для исследования активности митохондриальных клеточных процессов в контрольной группе и группе КМ с концентрацией коллагена 30 мг/мл был проведён колориметрический одноступенчатый формазановый MTS-тест, отражающий уровень метаболической активности исследуемых клеток. Принцип метода заключается в переводе живыми активными клетками реактива CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, США) из неокрашенной в окрашенную форму. Таким образом, светопропускание в лунке планшета после проведения теста пропорционально количеству живых активных клеток в ней. Клетки высевали в лунки 24-луночного планшета с кусочками мембраны и без неё (контроль) за сутки до тестирования в концентрации 10 тыс./см².

Чтобы учесть возможное взаимодействие MTS-реактанта с носителем, для выполнения теста в каждую лунку с клетками на носителе и без него, а также в пустые лунки (бланк) вносили по 300 мкл свежей среды и 60 мкл реактанта. Далее планшеты убрали для развития реакции в инкубатор на 3 ч. По прошествии этого времени выдерживали планшеты в течение 10 мин на орбитальном шейкере со скоростью вращения 250 г/мин для равномерного распределения окраски по объёму лунки. Затем переносили по 100 мкл из каждой лунки 24-луночного планшета в соответствующие лунки 96-луночного планшета для детекции коэффициента пропускания на планшетном фотометре Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 492 нм. Пробы были поставлены в трёх повторах.

Оценка биомеханических свойств бульбарной конъюнктивы и коллагеновой мембраны

Индентирование — метод исследования механических свойств материалов, основанный на вдавливании индентора (твёрдого наконечника известной геометрической формы) в поверхность исследуемого материала с контролируемой силой и/или скоростью и последующим анализом кривой «нагрузка–смещение».

В настоящем исследовании были выбраны нагрузки, наиболее часто используемые при исследовании биомеханических свойств методом наноиндентирования схожих коллагенсодержащих материалов [16–18].

Оценку биомеханических свойств фрагментов бульбарной конъюнктивы 10 доноров и 10 образцов КМ с концентрацией коллагена 30 мг/мл проводили при помощи машины-индентора Nanovea, оснащённой наномодулем (Irvine, США). Образцы располагали на поверхности предметного стекла и погружали в физиологический раствор для предотвращения высыхания во время тестирования. Измерения проводили при комнатной температуре. Радиус сферического наконечника индентора — 3000 мкм. Выполняли статический и динамический механический

анализ. В статическом режиме индентирование осуществляли при нагрузке 0,75 мН. Время выдержки при пиковой нагрузке составило 30 с. В динамическом режиме амплитуда составила 0,5 мН, частота 0,25 Гц. Было выполнено 5 измерений на образец. Поскольку конъюнктиву считают упругим и эластичным материалом, в ходе испытаний оценивали модуль Юнга (показатель упругости), значения твёрдости и параметр, характеризующий вязкость (тангенс дельта).

Статистический анализ

Статистическую обработку различий значений проводили в программе Prism 7.0 (GraphPad Inc., США). Для оценки различий между группами использовали критерий Манна–Уитни. В качестве уровня статистической значимости принимали $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Перед началом эксперимента мы визуально удостоверились, что клетки соответствуют эпителиальному морфотипу. Миграция из эксплантатов на культуральный пластик начиналась на 3–4-й день (рис. 2, а). Клетки заполняли поверхность культуральной чашки, формируя монослой плотно прилежащих друг к другу клеток. На 7-е сутки формировался субконфлюэнтный монослой, содержащий мелкие эпителиальные клетки в виде «булыжной мостовой» с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением (рис. 2, б). На этом этапе клетки пассивировали на поверхность исследуемых мембран.

На 3-и сутки после посева клеток на мембрану с концентрацией коллагена 10 мг/мл ЭКК продемонстрировали способность к активной миграции в толщу коллагенового слоя (рис. 3, с). На мембране с концентрацией коллагена 30 мг/мл клетки располагались только на её поверхности. Можно отметить более плотное прилегание клеток друг к другу при засеивании их на КМ с концентрацией коллагена 30 мг/мл (рис. 3, б).

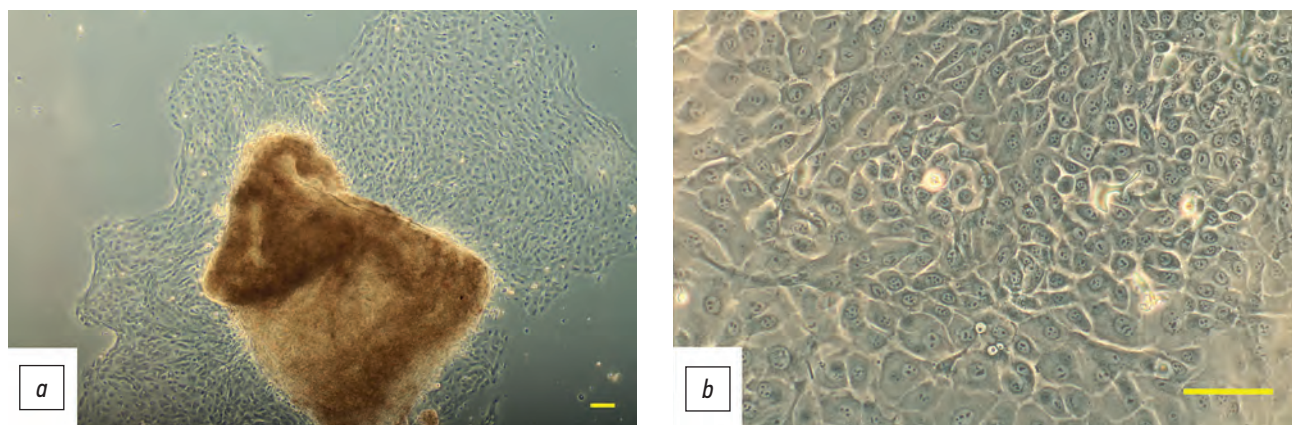


Рис. 2. Первичная культура эпителиальных клеток конъюнктивы при миграции из экспланта: а — эпителиальные клетки на поверхности культурального планшета на 4-й день; б — эпителиальные клетки на поверхности культурального планшета на 7-й день, монослой клеток в виде «булыжной мостовой» с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением. Бар 100 мкм.

Fig. 2. Primary culture of conjunctival epithelial cells during migration from the explant. Scale bar: 100 µm.

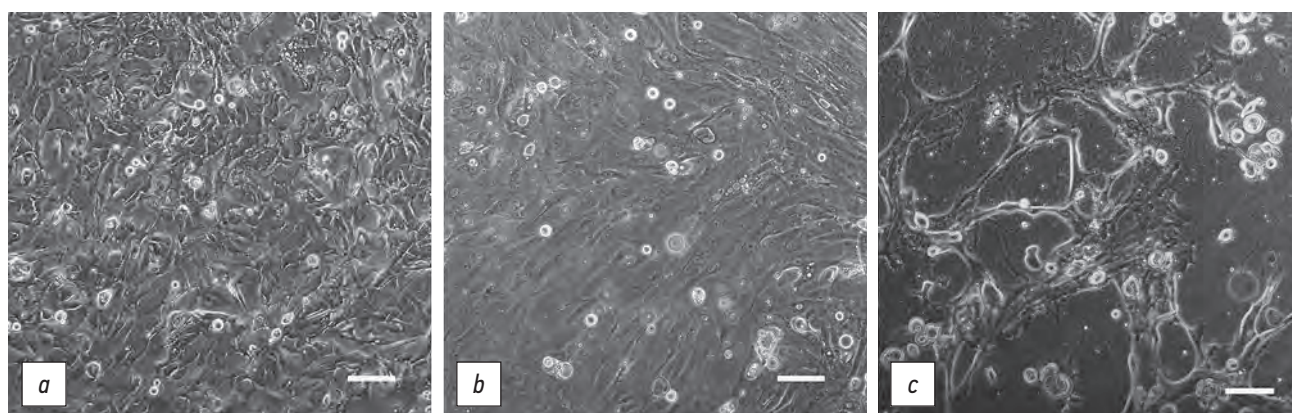


Рис. 3. Первичные культуры эпителиальных клеток конъюнктивы (фазово-контрастная микроскопия): *a* — контрольная группа (пластик); *b* — посев на коллагеновую мембрану в концентрации 30 мг/мл; *c* — в концентрации 10 мг/мл. Бар 100 мкм.

Fig. 3. Primary cultures of conjunctival epithelial cells (phase contrast microscopy). Scale bar: 100 μ m.

Окрашивание на цитокератин 7 и муцин 5AC показало сохранность молекулярных маркёров ЭКК после посева на КМ с концентрацией коллагена 30 мг/мл (рис. 4).

При окрашивании кальцеином АМ клеток, засеянных на КМ с концентрацией коллагена 30 мг/мл (опыт) и на культуральный пластик (контроль), не выявлено различий в количестве живых клеток (окрашенных в зелёный цвет). Данный факт позволяет заключить, что исследуемый материал не цитотоксичен для ЭКК (рис. 5).

Сравнительный тест на метаболическую активность не выявил значимого различия между группами контроля и КМ с концентрацией коллагена 30 мг/мл (рис. 6). Иными словами, культивирование на исследованной КМ не вызывает снижения метаболической активности клеток и подтверждает биосовместимость этого материала и его потенциал для использования в тканевой инженерии.

В результате сравнительного анализа биомеханических характеристик бульбарной конъюнктивы и КМ установлено, что модуль Юнга, характеризующий упругость КМ с концентрацией коллагена 30 мг/мл, сопоставим

с аналогичным показателем бульбарной конъюнктивы, его значение составляет $0,0008739 \pm 0,0004332$ и $0,0009472 \pm 0,001323$ ГПа соответственно. Статистически значимых различий между ними не обнаружено ($p=0,0549$), что позволяет сделать вывод о сходстве упругих свойств обоих исследуемых материалов (рис. 7).

При оценке твёрдости значительно более высокие значения данного параметра были зафиксированы у КМ с концентрацией коллагена 30 мг/мл по сравнению с бульбарной конъюнктивой ($p < 0,0001$). И наоборот, вязкость КМ оказалась существенно ниже, чем у естественной ткани ($p < 0,0001$) (рис. 8).

Данные результаты показывают, что упругость КМ с концентрацией коллагена 30 мг/мл сопоставима с аналогичным показателем бульбарной конъюнктивы. При этом КМ обладает повышенной жёсткостью и уменьшенной вязкостью по сравнению с естественной тканью. Эти параметры потенциально могут быть скорректированы в дальнейшем посредством изменения технологии изготовления мембраны в зависимости от конкретных целей применения.

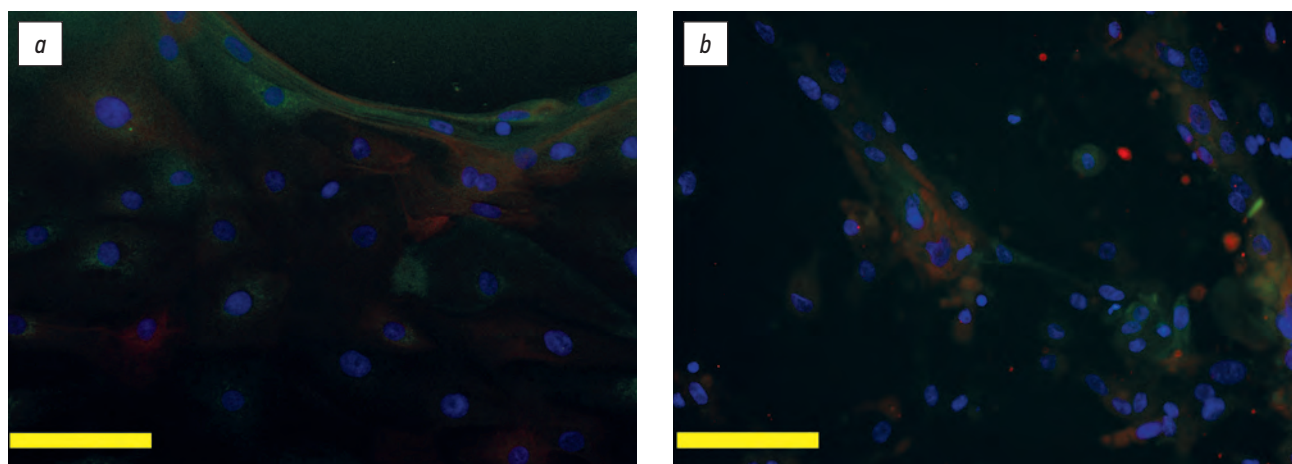


Рис. 4. Репрезентативные поля зрения при окрашивании культуры эпителиальных клеток конъюнктивы на пластике (*a*) и на коллагеновой мембране с концентрацией коллагена 30 мг/мл (*b*) на 3-и сутки после посева. Красное окрашивание — цитокератин 7; зелёное окрашивание — муцин 5AC; синее окрашивание — ядра, меченные красителем Hoechst. Бар 100 мкм.

Fig. 4. Representative fields of immunostained conjunctival epithelial cell cultures on plastic (*a*) and on a collagen membrane with 30 mg/mL collagen concentration (*b*) on day 3 post-seeding. Scale bar: 100 μ m.

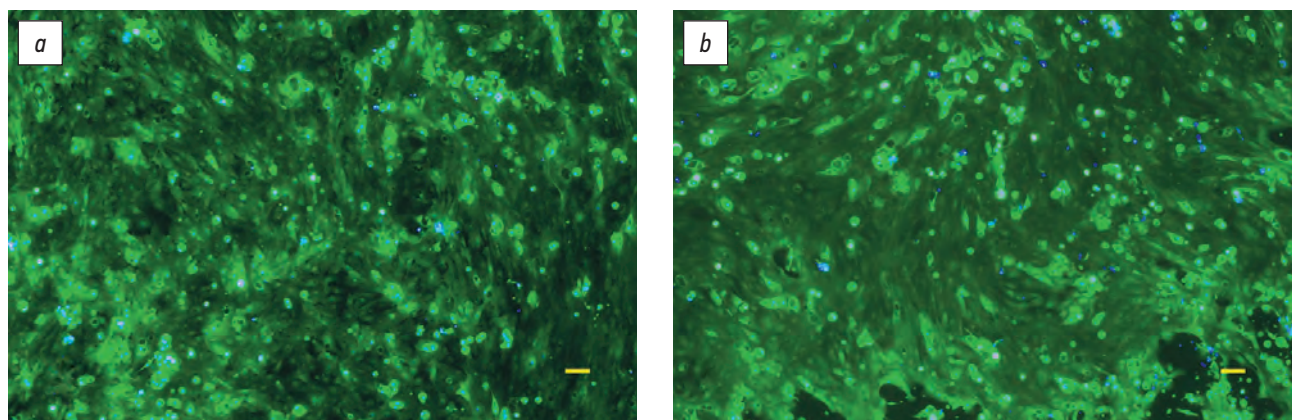


Рис. 5. Культура эпителиальных клеток конъюнктивы 3-го пассажа на 13-е сутки культивирования (эпифлуоресцентная микроскопия). Живые клетки окрашены зелёным цветом (окраска кальцеином AM): *a* — в группе контроля, *b* — после посева на коллагеновую мембрану с концентрацией коллагена 30 мг/мл. Бар 100 мкм.

Fig. 5. Third-passage conjunctival epithelial cell culture on day 13 (epifluorescence microscopy). Scale bar: 100 μm .

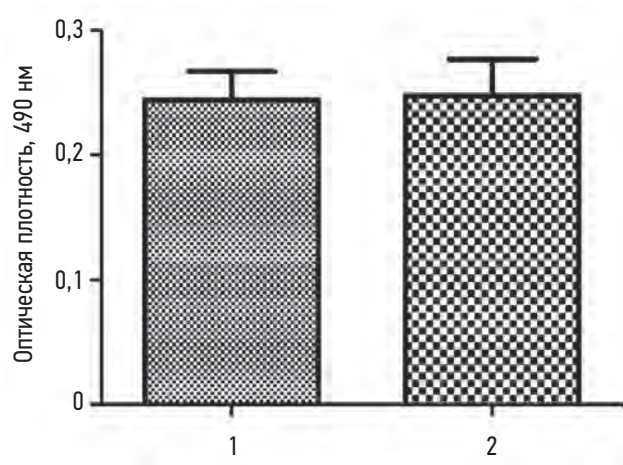


Рис. 6. Графическое отображение результатов колориметрического формазанового теста: 1 — метаболическая активность клеток на пластике; 2 — метаболическая активность клеток на коллагеновой мембране с концентрацией коллагена 30 мг/мл.

Fig. 6. Graphical representation of the formazan colorimetric assay results.

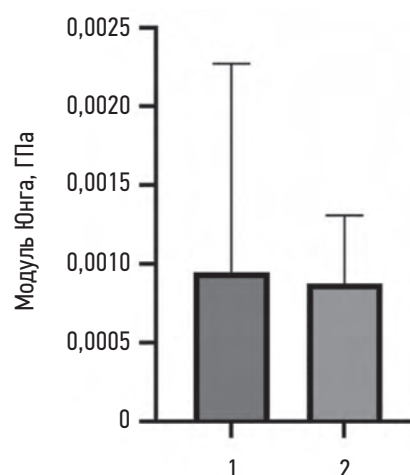


Рис. 7. Графическое отображение результатов наноиндентирования в статическом режиме: 1 — показатели модуля Юнга бульбарной конъюнктивы при нагрузке 0,75 мН; 2 — модуль Юнга коллагеновой мембраны с концентрацией коллагена 30 мг/мл при нагрузке 0,75 мН.

Fig. 7. Graphical representation of static mode nanoindentation results.

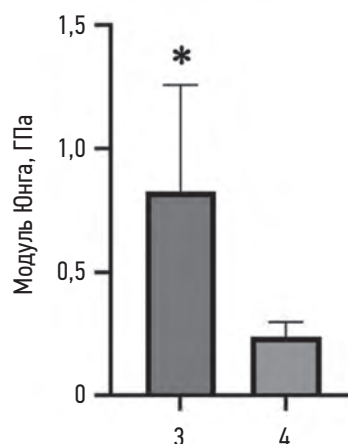
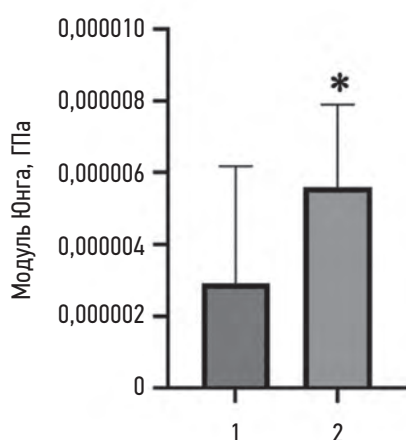


Рис. 8. Графическое отображение результатов наноиндентирования в динамическом режиме: *a*: 1 — показатели твёрдости бульбарной конъюнктивы при нагрузке 0,75 мН; 2 — показатели твёрдости коллагеновой мембраны с концентрацией коллагена 30 мг/мл при нагрузке 0,75 мН; *b*: 3 — показатели вязкой составляющей бульбарной конъюнктивы при нагрузке 0,75 мН, 4 — показатели вязкой составляющей коллагеновой мембраны с концентрацией коллагена 30 мг/мл при нагрузке 0,75 мН. * — статистически значимые отличия.

Fig. 8. Graphical representation of dynamic mode nanoindentation results.

ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из основных осложнений хронического воспалительного процесса глазной поверхности являются рубцевание и контрактура тканей конъюнктивы. Такая ситуация нередко наблюдается у пациентов с лимбальной недостаточностью, и это служит фактором, снижающим успешность трансплантации лимбальных стволовых клеток [19]. У данной группы пациентов восстановление одной лишь роговицы не будет эффективным без полноценного восстановления глубокого и подвижного свода конъюнктивы.

В клинической практике для замещения рубцового дефекта используются аутологичные и аллогенные конъюнктивы, слизистые оболочки носа и рта, амниотическая мембрана, а также биосинтетические материалы. Аутологичные ткани предпочтительны благодаря отсутствию риска отторжения, но их применение ограничено при необходимости больших по площади трансплантатов или при поражении тканей ввиду аутоиммунных заболеваний [20, 21]. В таких случаях используют слизистые оболочки носа и рта, хотя и их эффективность снижается при иммунопатологических состояниях [22]. Амниотическая мембрана человека часто применяется для замещения дефектов ткани, после химических ожогов, при пемфигоиде слизистых оболочек и синдроме Стивенса–Джонсона [23, 24]. Однако эта мембрана подвергается быстрому лизису и имеет тенденцию к формированию рубцовой ткани после трансплантации [25].

Проведённое нами исследование перекликается с аналогичными, выполненными ранее. Так, в работе С.С. Drechsler и соавт. ЭКК также рассеивали на КМ, изготовленную из раствора коллагена с концентрацией 3 мг/мл [10]. Различие мембран заключалось в концентрации, источнике коллагена и способе изготовления. В основе нашего подхода лежит технология изготовления стерильного высококонцентрированного раствора коллагена — Viscoll. Это позволяет создавать прочные коллагеновые биоматериалы без использования технологии химических сшивок, которые ухудшают клеточную совместимость материала.

Известно также, что при повышении концентрации коллагена наблюдается уменьшение миграции клеток во внутренние слои субстрата и происходит формирование эпителиального монослоя, тогда как с уменьшением концентрации в коллагеновом гидрогеле происходит интеграция клеток в структуру биополимерного материала [26], что мы и увидели при посеве на мембрану с концентрацией коллагена 10 мг/мл. Результаты, похожие на наши, наблюдаются в работах с фибробластами, засеянными на КМ, где клетки принимали звёздчатую форму в течение нескольких часов, а позже становились веретенообразной формы, агрегировали, но данная тенденция уменьшалась с увеличением концентрации коллагена [27–29]. С учётом того, что в нашей работе и работе С.С. Drechsler и соавт. при концентрации раствора

10 мг/мл получены сходные результаты — морфология клеток и их молекулярный профиль после посева на КМ оставались характерными для конъюнктивы, можно сделать вывод о том, что плотность матрикса не оказывает определяющего влияния на биосовместимость исследуемого материала. С другой стороны, использование более концентрированных растворов коллагена для изготовления КМ позволяет фиксировать их швом в зоне операции [14]. Поэтому для определения биомеханических свойств были взяты КМ с концентрацией коллагена 30 мг/мл.

В работе Н. Zhou и соавт. исследовали 3 вида материала — витрифицированный коллаген, обычный коллагеновый гель и культуральный пластик в качестве контроля [11]. На всех трёх субстратах ЭКК кролика показали высокий уровень жизнеспособности (>95%) через 5 дней культивирования, что было подтверждено окрашиванием live/dead. Авторами также отмечено, что на витрифицированном коллагене плотность клеток превышала таковую на пластике более чем в два раза. Это свидетельствует о высокой пролиферативной активности клеток на исследуемом материале. Мы не определяли колониеобразующую способность, как предыдущие исследователи, но провели тесты на цитотоксичность (путём окрашивания live/dead и в метаболическом тесте), показавшие её отсутствие и, следовательно, высокий потенциал для использования в тканевой инженерии.

Выбор материала на основе коллагена I типа в ряде исследований обусловлен тем, что он является наиболее распространённым структурным белком интерстициального матрикса стромы конъюнктивы [30]. Коллаген I типа также участвует в процессах регенерации тканей, что особенно важно для применения в биоматериалах, направленных на восстановление конъюнктивы и создание условий для её нормального функционирования. Кроме того, биосовместимость и низкий риск иммунного отторжения делают его предпочтительным материалом для создания носителей в тканевой инженерии.

Совсем недавно внеклеточный матрикс считался обычным инертным скаффолдом, поддерживающим клетки. Однако за последние два десятилетия была доказана его фундаментальная роль в ключевых аспектах клеточной биологии [31, 32]. Важным событием стало открытие явления регуляции дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток и других типов стволовых клеток в соответствии с заданными физическими свойствами окружающего их внеклеточного матрикса [33, 34].

В связи с вышесказанным необходимо учитывать биомеханические свойства материала при разработке матриксов для трансплантации клеток. В работе В. Tgarrmann и соавт. отмечено, что при увеличении модуля упругости полиакриламидных гидрогелей, ковалентно связанных с коллагеном I типа, увеличивалось распространение эпидермальных стволовых клеток и уменьшалась их дифференциация в кератиноциты [35]. В нашем исследовании не изучались оптимальные биомеханические свойства,

обеспечивающие поддержание стволовых клеток и дифференциацию бокаловидных клеток конъюнктивы, так как основной фокус был направлен на предварительный анализ механических характеристик КМ, рассматриваемых с точки зрения их пригодности для применения в реконструктивных операциях.

В работе С.С. Drechsler и соавт. сравнивали эластичность прессованного коллагена, амниотической мембраны и нативной конъюнктивы, и пришли к выводу, что разница между коллагеновым носителем и конъюнктивой была значительной: прессованный коллаген оказался менее эластичным, в то время как статистически значимой разницы между амниотической мембраной и конъюнктивой почти не было [10].

Результаты нашего исследования показывают, что в сравнении с бульбарной конъюнктивой исследуемая КМ обладает схожей упругостью, но большей твердостью, что в перспективе позволит КМ противостоять деформации и сохранять заданную форму. Исследуемая КМ может успешно применяться для устранения дефектов конъюнктивы, а её биомеханические свойства могут подвергаться дальнейшей адаптации под индивидуальные клинические задачи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тканевая инженерия предлагает множество новых подходов к реконструкции конъюнктивы, многие из которых ещё предстоит оценить в клинической практике. В настоящее время для реконструкции конъюнктивы доступны различного рода материалы, но ни один из них не лишён недостатков. Существует клиническая потребность в создании универсальной замены ткани, особенно для лечения больших по площади дефектов конъюнктивы. При разработке биоматериала для восстановления и регенерации поврежденной ткани, в том числе конъюнктивы, необходимо учитывать несколько критериев. К ним относятся максимальная биосовместимость с окружающими тканями с минимальной воспалительной реакцией, возможность адгезии и пролиферации клеток на поверхности трансплантата, а также сходство биомеханических характеристик. В настоящем исследовании показано, что исследуемая КМ обеспечивает необходимые условия для роста ЭКК: культивирование на КМ не вызывает снижения метаболической активности клеток, сохраняются пролиферативная активность и молекулярный репертуар белков ЭКК. Кроме того, биомеханические свойства изготовленной КМ сопоставимы с нативной конъюнктивой, что позволяет данной КМ быть перспективной альтернативой биологической ткани в реконструктивных целях. В перспективе для каждого патогенетически обусловленного случая можно подобрать различные характеристики материала, что обеспечит адаптацию субстрата к уникальным условиям и требованиям терапии.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Д.А. Криволапова — обзор литературы, сбор и анализ литературных источников, сбор и обработка материала, подготовка и написание текста, редактирование статьи; А.Ю. Андреев, А.М. Суббот — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, редактирование статьи; С.Э. Аветисов, Е.О. Осидак — концепция и дизайн исследования, редактирование статьи; П.Н. Ильина и А.Д. Панова — обработка материала.

Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Благодарности. Неприменимо.

Этическая экспертиза. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института глазных болезней имени М.М. Краснова (протокол № 46/2 от 08.11.2022).

Источники финансирования. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (№24-15-00387, <https://rscf.ru/project/24-15-00387/>). Препараты Viscoll с концентрацией коллагена 10 или 30 мг/мл для изготовления коллагеновых мембран предоставлены компанией ООО Фирмы «Имтек».

Раскрытие интересов. А.Ю. Андреев и Е.О. Осидак являются сотрудниками ООО Фирмы «Имтек» (Москва, Россия). Данная работа выполнена в рамках диссертационного исследования Д.А. Криволаповой.

Оригинальность. При создании настоящей работы авторы не использовали ранее опубликованные сведения (текст, иллюстрации, данные).

Доступ к данным. Все данные, полученные в настоящем исследовании, доступны в статье.

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали три члена редакционной коллегии и научный редактор издания.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contributions: D.A. Krivolapova: investigation, data collection, formal analysis, writing—original draft, writing—review & editing; A.Yu. Andreev, A.M. Subbot: conceptualization, methodology, data collection, formal analysis, writing—review & editing; S.E. Avetisov, E.O. Osidak: conceptualization, methodology, writing—review & editing; P.N. Ilina, A.D. Panova: investigation. All the authors approved the version of the manuscript to be published and agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Acknowledgments: Not applicable.

Ethics approval: The study was approved by the local Ethics Committee of the M.M. Krasnov Research Institute of Eye Diseases (Protocol No. 46/2, dated November 8, 2022).

Funding sources: This study was supported by a grant from the Russian Science Foundation (No. 24-15-00387, <https://rscf.ru/project/24-15-00387/>). Viscoll preparations with collagen concentrations of 10 or 30 mg/mL, used for the fabrication of collagen membranes, were provided by Imtek LLC (Moscow, Russia).

Disclosure of interests: A.Yu. Andreev and E.O. Osidak are employees of Imtek LLC (Moscow, Russia). This study was conducted as part of the thesis research of D.A. Krivolapova.

Statement of originality: No previously published material (text, images, or data) was used in this work.

Data availability statement: All data generated during this study are available in the article.

Generative AI: No generative artificial intelligence technologies were used to prepare this article.

Provenance and peer review: This paper was submitted unsolicited and reviewed following the standard procedure. The review process involved three members of the editorial board, and the in-house scientific editor.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Nelson JD, Cameron JD. The conjunctiva: anatomy and physiology. *Cornea*. 2005;1:39–54.
2. Downie LE, Bamlitz S, Bergmanson JPG, et al. CLEAR — Anatomy and physiology of the anterior eye. *Cont Lens Anterior Eye*. 2021;44(2):132–156. doi: 10.1016/j.clae.2021.02.009 EDN: DZTEPQ
3. Gipson IK. Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp Eye Res*. 2004;78(3):379–388. doi: 10.1016/s0014-4835(03)00204-5
4. Stewart RM, Sheridan CM, Hiscott PS, et al. Human conjunctival stem cells are predominantly located in the medial canthal and inferior forniceal areas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(3):2021–2030. doi: 10.1167/iov.14-16266
5. Hatton MP, Rubin PA. Conjunctival regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2005;94:125–140. doi: 10.1007/b100002
6. Di Pascuale MA, Espana EM, Liu DT, et al. Correlation of corneal complications with eyelid cicatricial pathologies in patients with Stevens–Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis syndrome. *Ophthalmology*. 2005;112(5):904–912. doi: 10.1016/j.optha.2004.11.035
7. Schrader S, Notara M, Beaconsfield M, et al. Tissue engineering for conjunctival reconstruction: established methods and future outlooks. *Curr Eye Res*. 2009;34(11):913–924. doi: 10.3109/02713680903198045
8. Shapiro MS, Friend J, Thoft RA. Corneal re-epithelialization from the conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1981;21(1 Pt 1):135–142.
9. Makuloluwa AK, Hamill KJ, Rauz S, et al. Biological tissues and components, and synthetic substrates for conjunctival cell transplantation. *Ocul Surf*. 2021;22:15–26. doi: 10.1016/j.jtos.2021.06.003 EDN: CMBFXA
10. Drechsler CC, Kunze A, Kureshi A, et al. Development of a conjunctival tissue substitute on the basis of plastic compressed collagen. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017;11(3):896–904. doi: 10.1002/term.1991
11. Zhou H, Lu Q, Guo Q, et al. Vitified collagen-based conjunctival equivalent for ocular surface reconstruction. *Biomaterials*. 2014;35(26):7398–7406. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.05.024
12. Lu Q, Al-Sheikh O, Elisseeff JH, Grant MP. Biomaterials and tissue engineering strategies for conjunctival reconstruction and dry eye treatment. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2015;22(4):428–434. doi: 10.4103/0974-9233.167818
13. Witt J, Mertsch S, Borrelli M, et al. Decellularised conjunctiva for ocular surface reconstruction. *Acta Biomater*. 2018;67:259–269. doi: 10.1016/j.actbio.2017.11.054 EDN: WVOTEM
14. Andreev AY, Osidak EO, Grigoriev TE, et al. A new collagen scaffold for the improvement of corneal biomechanical properties in a rabbit model. *Exp Eye Res*. 2021;207:108580. doi: 10.1016/j.exer.2021.108580 EDN: BHUXPJ
15. Merjava S, Neuwirth A, Tanzerova M, Jirsova K. The spectrum of cytokeratins expressed in the adult human cornea, limbus and perilimbal conjunctiva. *Histol Histopathol*. 2011;26(3):323–331. doi: 10.14670/HH-26.323
16. Offeddu GS, Ashworth JC, Cameron RE, Oyen ML. Multi-scale mechanical response of freeze-dried collagen scaffolds for tissue engineering applications. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2015;42:19–25. doi: 10.1016/j.jmbbm.2014.10.015
17. Ahearne M, Yang Y, El Haj AJ, et al. Characterizing the viscoelastic properties of thin hydrogel-based constructs for tissue engineering applications. *J R Soc Interface*. 2005;2(5):455–463. doi: 10.1098/rsif.2005.0065
18. Dunphy SE, Bratt JA, Akram KM, et al. Hydrogels for lung tissue engineering: Biomechanical properties of thin collagen-elastin constructs. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2014;38:251–259. doi: 10.1016/j.jmbbm.2014.04.005
19. Ilari L, Daya SM. Long-term outcomes of keratolimbal allograft for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 2002;109(7):1278–1284. doi: 10.1016/s0161-6420(02)01081-3
20. Kantor NB, Tovar A, Wang T, Galor A. How does ocular graft-versus-host disease fit under the dry eye umbrella? A review. *Clin Exp Ophthalmol*. 2024;52(2):167–185. doi: 10.1111/ceo.14347 EDN: SVKPDW
21. Adewara B, Singh S. Severe cicatricial entropion repair using mucous membrane graft in Stevens–Johnson syndrome. *Indian J Ophthalmol*. 2022;70(12):4470. doi: 10.4103/ijo.IJO_1504_22 EDN: ADNWLJ
22. Mai C, Bertelmann E. Oral mucosal grafts: old technique in new light. *Ophthalmic Res*. 2013;50(2):91–98. doi: 10.1159/000351631
23. Fernandes M, Sridhar MS, Sangwan VS, Rao GN. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Cornea*. 2005;24(6):643–653. doi: 10.1097/01.icc.0000151501.80952.c5
24. Chen Z, Lao HY, Liang L. Update on the application of amniotic membrane in immune-related ocular surface diseases. *Taiwan J Ophthalmol*. 2021;11(2):132–140. doi: 10.4103/tjo.tjo_16_21 EDN: VVYTR
25. Zhao H, Qu M, Wang Y, et al. Xenogeneic acellular conjunctiva matrix as a scaffold of tissue-engineered corneal epithelium. *PLoS One*. 2014;9(11):e111846. doi: 10.1371/journal.pone.0111846
26. Chermnykh ES, Kalabusheva EP, Osidak EO, et al. Effect of high-density matrix on human skin dermal cell behavior in 3D constructs. *Genes & Cells*. 2019;14(3 Suppl.):253–253.
27. Kanta J. Collagen matrix as a tool in studying fibroblastic cell behavior. *Cell Adh Migr*. 2015;9(4):308–316. doi: 10.1080/19336918.2015.1005469
28. Dodd NJ, Schor SL, Rushton G. The effects of a collagenous extracellular matrix on fibroblast membrane organization. An ESR Spin Label Study. *Exp Cell Res*. 1982;141(2):421–431. doi: 10.1016/0014-4827(82)90230-0
29. da Rocha-Azevedo B, Grinnell F. Fibroblast morphogenesis on 3D collagen matrices: the balance between cell clustering and cell migration. *Exp Cell Res*. 2013;319(16):2440–2446. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.05.003
30. Eidet JR, Dartt DA, Utheim TP. Concise review: comparison of culture membranes used for tissue engineered conjunctival epithelial equivalents. *J Funct Biomater*. 2015;6(4):1064–1084. doi: 10.3390/jfb6041064
31. Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(8):2506–2519. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.01.010
32. Akhmanova M, Osidak E, Domogatsky S, et al. Physical, spatial, and molecular aspects of extracellular matrix of in vivo niches and artificial scaffolds relevant to stem cells research. *Stem Cells Int*. 2015;2015:167025. doi: 10.1155/2015/167025 EDN: UZWXLL
33. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006;126(4):677–689. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.044 EDN: XTVJIX
34. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science*. 2009;324(5935):1673–1677. doi: 10.1126/science.1171643
35. Trappmann B, Gautrot JE, Connelly JT, et al. Extracellular-matrix tethering regulates stem cell fate. *Nat Mater*. 2012;11(7):642–649. doi: 10.1038/nmat3339 Erratum in: *Nat Mater*. 2012;11(8):742.

ОБ АВТОРАХ

* Криволапова Диана Алексеевна;

адрес: Россия, 119021, Москва, ул. Россолимо, д. 11а;

ORCID: 0000-0001-6974-7872;

eLibrary SPIN: 4861-4771;

e-mail: dia.med94@gmail.com

AUTHORS' INFO

* Diana A. Krivolapova;

address: 11a Rossolimo st, Moscow, Russia, 119021;

ORCID: 0000-0001-6974-7872;

eLibrary SPIN: 4861-4771;

e-mail: dia.med94@gmail.com

Андреев Андрей Юрьевич, канд. мед. наук;
ORCID: 0000-0002-0267-9040;
eLibrary SPIN: 6410-7993;
e-mail: docandreev@gmail.com

Суббот Анастасия Михайловна, канд. мед. наук;
ORCID: 0000-0002-8258-6011;
eLibrary SPIN: 3898-2570;
e-mail: kletkagb@gmail.com

Аветисов Сергей Эдуардович, д-р мед. наук, профессор,
академик РАН;
ORCID: 0000-0001-7115-4275;
eLibrary SPIN: 9784-0459;
e-mail: s.avetisov@niigb.ru

Осидак Егор Олегович, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0003-2549-4011;
eLibrary SPIN: 9995-3951;
e-mail: eosidak@gmail.com

Ильина Полина Николаевна;
ORCID: 0009-0009-7926-7253;
e-mail: polinailina1107@mail.ru

Панова Анна Дмитриевна;
ORCID: 0000-0002-9322-6273;
e-mail: ainushgnomello@gmail.com

Andrey Yu. Andreev, MD, Cand. Sci. (Medicine);
ORCID: 0000-0002-0267-9040;
eLibrary SPIN: 6410-7993;
e-mail: docandreev@gmail.com

Anastasia M. Subbot, MD, Cand. Sci. (Medicine);
ORCID: 0000-0002-8258-6011;
eLibrary SPIN: 3898-2570;
e-mail: kletkagb@gmail.com

Sergey E. Avetisov, MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor,
Academician of the Russian Academy of Sciences;
ORCID: 0000-0001-7115-4275;
eLibrary SPIN: 9784-0459;
e-mail: s.avetisov@niigb.ru

Egor O. Osidak, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0003-2549-4011;
eLibrary SPIN: 9995-3951;
e-mail: eosidak@gmail.com

Polina N. Ilina;
ORCID: 0009-0009-7926-7253;
e-mail: polinailina1107@mail.ru

Anna D. Panova;
ORCID: 0000-0002-9322-6273;
e-mail: ainushgnomello@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author