

УДК 617.7-001.17

Механизмы влияния кондиционированной среды культивированных стволовых клеток на развитие патологического ангиогенеза роговицы глаза в эксперименте

Кодунов А.М.¹, Темнов А.А.², Терещенко А.В.¹, Трифаненкова И.Г.¹, Склифас А.Н.³, Шацких А.В.⁴

¹ Калужский филиал Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Фёдорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 248007, Калуга, ул. имени Святослава Фёдорова, д. 5

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)». 141701, Московская обл, Долгопрудный, Институтский пер, д. 9

³ Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

142290, Московская область, Пушкино, ул. Институтская, д. 3

⁴ Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Фёдорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

127486, Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59А

В связи с увеличением числа заболеваний, в основе которых лежит развитие новообразованных сосудов, в последние десятилетия возрос интерес к проблеме патологического ангиогенеза в различных тканях глаза. Традиционные консервативные методы лечения неоваскуляризации роговицы на данный момент недостаточно эффективны. Возможным путем решения проблемы неоваскуляризации роговицы может быть использование паракринных факторов, выделяемых мезенхимальными стволовыми клетками в процессе культивирования в кондиционированную среду (КС). Целью исследования является изучение влияния пептидов КС на сосудистое бельмо, которое сформировалось после химического ожога глаз крыс в эксперименте, и оценка влияния КС на функциональную активность нейтрофилов.

Методы исследования. Исследование было выполнено на 48 крысах (48 глаз) в несколько этапов. На первом этапе всем животным был смоделирован химический ожог роговицы. На втором этапе проводилось лечение ожогов роговицы. В зависимости от способа лечения на втором этапе была сформирована контрольная группа 22 крысы (22 глаза) и опытная группа 22 крыс (22 глаза). Опытная группа была разделена на 2 подгруппы. В первой подгруппе было 11 крыс (11 глаз), которым в качестве лечения применялись пептиды КС общей фракции. Во второй подгруппе также было 11 крыс (11 глаз), в качестве лечения применялся пептиды КС фракцией до 30 кДа. В контрольной группе для лечения ожогов мы применяли культуральную среду.

Результаты. По результатам офтальмоскопии и гистологических исследований на 14-е и 30-е сутки в контрольной группе животных динамики не наблюдалось. Выявлялись множественные новообразованные сосуды роговицы (преимущественно крупные сосудистые стволы) со стромальными помутнениями в их проекции. Эпителий роговицы был не изменен, однако, сама роговица была истончена. Наблюдалось сформированное васкуляризованное бельмо роговицы: субэпителиальная фиброплазия и неоваскуляризация роговицы. В опытной группе животных к 14-м суткам инстилляций в конъюнктивальную полость пептидов КС офтальмоскопически мы наблюдали уменьшение количества новообразованных сосудов, помутнения роговицы исчезли в проекции запустевших сосудов. На 30-е сутки лечения в опытных группах животных у большинства крыс новообразованных сосудов обнаружено не было, сохранялись лишь отдельные сосудистые стволы, которые ранее образовывали мощные анастомозы с другими новообразованными сосудами. По результатам хемолюминесцентного анализа показано, что фракция до 30 кДа угнетает функциональную активность нейтрофилов, в том числе за счет изменения активности внутриклеточных мембранных ферментов, отвечающих за передачу рецепторных сигналов внутрь клетки.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения препарата раствора пептидов для лечения такой сложной патологии, как неоваскуляризация роговицы.

Ключевые слова: крысы; роговица; химический ожог; пептиды; ангиогенез.

Для цитирования: Кодунов А.М., Темнов А.А., Терещенко А.В., Трифаненкова И.Г., Склифас А.Н., Шацких А.В. Механизмы влияния кондиционированной среды культивированных стволовых клеток на развитие патологического ангиогенеза роговицы глаза в эксперименте. Патогенез. 2021; 19(4): 41-52

DOI: 10.25557/2310-0435.2021.04.41-52

Для корреспонденции: Кодунов Алексей Михайлович, e-mail: 7alex72007@mail.ru

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 17.11.2021

Mechanisms of the influence of conditioned medium of cultured stem cells on the development of pathological angiogenesis in the eye cornea in experiment

Kodunov A.M.¹, Temnov A.A.², Tereshchenko A.V.¹, Trifanenkova I.G.¹, Sklifas A.N.³, Shatskikh A.V.⁴

¹ Kaluga Branch of S.N. Fedorov National Medical Research Center «Intersectorial Scientific and Technical Complex Eye Microsurgery», Svyatoslava Fiodorova St. 5, Kaluga 248007, Russian Federation

² Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskiy Pereulok 9, Dolgoprudnyi of Moscow Region 141701, Russian Federation

³ Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Institutskaya St. 3, Pushchino of Moscow Region 142290, Russian Federation

⁴ S.N. Fedorov National Medical Research Center «Intersectorial Scientific and Technical Complex Eye Microsurgery», Beskudnikovskiy Blvd. 59a, Moscow 127486, Russian Federation

In recent decades, due to increasing number of diseases associated with the development of newly formed vessels, the interest to pathological angiogenesis in eye tissues has been growing. Traditional, conservative methods for treatment of corneal neovascularization are not sufficiently effective. A possible solution may be the use of paracrine factors secreted by mesenchymal stem cells during cultivation in a conditioned medium (CW). The aim of this study was to assess the effect of CW peptides on vascular leukoma induced by chemical burn of rat eyes and to evaluate the effect of CW on the functional activity of neutrophils.

Methods. The study was performed on 48 rats (48 eyes) and included several stages. At the first stage, chemical corneal burn was modeled in all animals. At the second stage, corneal burns were treated. Based on the method of treatment at the second stage, a control group (22 rats, 22 eyes) and an experimental group (22 rats, 22 eyes) were formed. The experimental group was divided into 2 subgroups. The first subgroup rats ($n = 11$, 11 eyes) were treated with CW peptides of the entire fraction. The second subgroup rats ($n = 11$, 11 eyes) received a CW peptide fraction of up to 30 kDa. In the control group, the culture medium was used as a treatment.

Results. According to the results of ophthalmoscopy and histological studies on days 14 and 30, no changes were observed in the control group. Multiple newly formed corneal vessels (mainly large vascular trunks) with stromal opacities in their projection were detected. The corneal epithelium was unchanged; however, the cornea itself was thinned. A formed vascularized corneal leukoma was observed that was evident as subepithelial fibroplasia and corneal neovascularization. In the experimental group by the 14th day of CW peptide instillations into the conjunctival cavity, ophthalmoscopy showed a decrease in the number of newly formed vessels, and corneal opacities disappeared in the projection of the deserted vessels. In most of rats in the experimental groups on the 30th day of the treatment, newly formed vessels were not found; only individual vascular trunks remained, which had previously formed powerful anastomoses with other newly formed vessels. According to the results of chemiluminescence analysis, a fraction of up to 30 kDa inhibited the functional activity of neutrophils, including by changing the activity of intracellular membrane enzymes responsible for the transmission of receptor signals into the cell.

Conclusion. The results showed that the peptide solution is promising for the treatment of such a complex pathology as corneal neovascularization.

Key words: rats; cornea; chemical burn; peptides; angiogenesis.

For citation: Kodunov A.M., Temnov A.A., Tereshchenko A.V., Trifanenkova I.G., Sklifas A.N., Shatskikh A.V. [Mechanisms of the influence of conditioned medium of cultured stem cells on the development of pathological angiogenesis in the eye cornea in experiment]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2021; 19(4): 41-52 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2021.04.41-52

For correspondence: Kodunov Aleksey Mikhailovich, e-mail: 7alex72007@mail.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 17.11.2021

Введение

В настоящее время по оценкам экспертов 45 млн человек во всем мире страдают слепотой [1]. По данным эпидемиологического анализа, больные с патологией роговицы составляют от 10 до 50% среди общего числа слепых и слабовидящих [2]. В связи с увеличением числа заболеваний, в основе которых лежит развитие новообразованных сосудов, в последние десятилетия возрос интерес к проблеме патологического ангиогенеза в различных тканях глаза [3].

В основе роста новообразованных сосудов лежат сложные биохимические и иммунологические механизмы [4-7]. Нарушение баланса между проангиогенными и антиангиогенными медиаторами неоваскуляризации на местном уровне может обуславливать или сопровождать развитие различных патофизиологических процессов [7-13]. Такой сдвиг обеспечивает постоянную индукцию процесса неоваскуляризации.

Неоваскулогенез роговицы многие авторы рассматривают как защитную реакцию на воспалительный агент [14, 15]. Данный процесс является повторением физиологического ангиогенеза, и одной из задач современной офтальмологии является исследование индуцирующих процесс неоваскулогенеза роговицы факторов. Однако традиционные консервативные методы лечения неоваскуляризации роговицы на данный момент недостаточно эффективны [3, 4, 15-17].

В настоящее время существуют сведения о влиянии VEGF на развитие новообразованных сосудов роговицы при различных ее заболеваниях [11, 16, 18].

Одним из перспективных направлений в лечении неоваскуляризации роговицы может быть использование стволовых или прогениторных клеток, получаемых как из костного мозга, так из лимбальной области. Паракринные факторы, выделяемые стволовыми клетками, обладают противовоспалительным, антиапоптотическим и прорегенераторным действием [19]. Одна-

ко, в литературе отсутствуют данные об эффективности стволовых клеток для лечения уже сформированных сосудов в роговице.

Возможным путем решения проблемы неоваскуляризации роговицы может быть использование паракринных факторов, выделяемых мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) в процессе культивирования в кондиционированную среду (КС) [19].

Данные факторы оказывают противовоспалительное, иммуносупрессивное, антиапоптотическое действие. Также одним из возможных механизмов, влияющих на обратное развитие патологических сосудов роговицы, по данным литературы, может быть изменение функциональной активности нейтрофилов, участвующих в ангиогенезе на фоне воспаления.

Целью исследования стало изучение влияния пептидов КС на сосудистое бельмо, которое сформировалось после химического ожога глаз крыс в эксперименте, и оценка влияния КС на функциональную активность нейтрофилов.

Материалы и методы исследования

Исследование заключалось в лечении уже сформированного неоваскулярного помутнения роговицы. Проводилось сравнение влияния раствора пептидов КС (опыт) и культуральной среды (контроль), которая используется при культивировании МСК на процессы ангиогенеза в модели сформировавшегося постожогового неоваскулярного бельма роговицы крыс. Все процедуры с животными проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» Хельсинской декларации и рекомендациями Директив Европейского Сообщества (№ 86/609 ЕС).

Исследование было выполнено на 48 крысах (48 глаз) в несколько этапов.

На первом этапе всем животным был смоделирован химический ожог роговицы. Ожоговая модель формировалась на один глаз. Всего на первом этапе было задействовано 48 крыс (48 глаз). 4 животных выводились из эксперимента на 3-и, 7-е, 14-е и 30-е сутки для контроля формирования бельма.

На втором этапе проводилось лечение ожогов роговицы. Всего на этом этапе было задействовано 44 крысы (44 глаза). В зависимости от способа лечения была сформирована контрольная группа 22 крысы (22 глаза) и опытная группа 22 крысы (22 глаза). Опытная группа была разделена на 2 подгруппы. В первой подгруппе было 11 крыс (11 глаз), которым в качестве лечения применялись пептиды КС общей фракции. Во второй подгруппе также было 11 крыс (11 глаз), в качестве лечения применялись пептиды КС фракцией до 30 кДа. На 14-е и 30-е сутки животные выводились из эксперимента для проведения гистологического исследования.

Перед получением экспериментальной модели химического ожога роговицы выделяли стволовые клетки костного мозга крыс. В дальнейшем мы получали непо-

средственно препарат пептидов, который представляет собой прозрачную гомогенизированную жидкость малинового цвета.

Получение кондиционированной среды

Для выделения МСК костный мозг извлекали из бедренной кости крыс линии Wistar, массой 220–240 г, находящихся под общим наркозом. Мононуклеарную фракцию клеток костного мозга выделяли на градиенте плотности с использованием стандартного раствора Lympholyte-H (фирма Cedarlane, Canada). После получения суспензию мононуклеарных клеток высевали на чашки Петри и культивировали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco).

Культивирование МСК: клеточный монослой культивировали в условиях гипоксии (10% O₂ и 5% CO₂). После получения клеточного монослоя проводили полную смену культуральной среды и через 3 суток получали КС, которая была использована в эксперименте.

Получение фракций кондиционированной среды

Для разделения кондиционированной среды использовали метод ультрафильтрации по стандартной методике. В работе были получены нормализованные по объему фракции содержащие преимущественно белки от 0 до 30 кДа.

Первый этап эксперимента

В качестве экспериментальной модели химического ожога роговицы применяли метод Обенберга [4]. До нанесения ожога проводилась офтальмоскопия и оптическая когерентная томография (ОКТ, ОСТ) переднего отрезка глаза с определением средней толщины роговицы.

Химический ожог формировали под местной анестезией (0,4% инокаином) аппликацией фильтровальной бумаги (в виде круга диаметром 5 мм), смоченной 90% этанолом с экспозицией 60 с на роговицу и конъюнктиву. Предварительно перед моделированием ожога животных наркотизировали препаратом Золетил®100 (ВИРБАК, Франция). Площадь диска фильтровальной бумаги была достаточной для захвата роговицы и конъюнктивы подопытных животных. Данная модель химического ожога позволила уже к 7-м суткам получить обильное прорастание сосудов лимбальной сети в роговицу опытных животных, а к 14-м суткам получить формирование стойкого неоваскулярного бельма роговицы.

Продолжительность эксперимента составила 30 дней. Динамическое наблюдение за животными проводили ежедневно утром и вечером. На 3-, 7-, 14- и 30-е сутки выполнялась офтальмоскопия переднего отрезка глаза с последующей фоторегистрацией и проведением оптической когерентной томографии.

С целью оценки динамики развития неоваскулярного помутнения роговицы определяли площадь ее повреждения на 3-и, 7-е, 14-е и 30-е. Для этого использовалась программа IP Square. Первым шагом определя-

лась общая площадь роговицы на каждом конкретном снимке. Вторым шагом выделялась площадь пораженного участка. Данный процесс происходил вручную. Оценивалась зона помутнения поврежденной роговицы и очерчивалась ее граница. Третьим шагом программа высчитывала поврежденный участок роговицы и, с помощью алгоритмов, заложенных в ней, выдавался процент поврежденной зоны.

Для оценки морфологических изменений тканей роговицы на 3, 7, 14 и 30 сутки животных выводили из эксперимента для проведения гистологического исследования роговицы.

Второй этап эксперимента

В работе проводили лечение уже сформированного постожогового неоваскулярного помутнения роговицы путем ежедневной инстилляцией растворов в конъюнктивальную полость. Лечение начинали на 30-е сутки после нанесения ожога, когда по данным гистологических и инструментальных исследований формирование сосудистого бельма полностью завершено.

На данном этапе экспериментального исследования животным опытной и контрольной групп на 14-е и 30-е сутки проводилось ОСТ переднего отрезка глаза. Исследования проводились после предварительной наркотизации животных препаратом Золетил®100 (ВИРБАК, Франция). С целью оценки динамики изменения неоваскулярного помутнения роговицы определялась площадь ее повреждения на 14-е и 30-е сутки с помощью программы IP Square.

Животных обеих групп выводили из эксперимента на 14-е и 30-е сутки для оценки морфологических изменений в тканях роговицы.

Методика гистологического исследования

Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, промывали проточной водой обезживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин, выполняли серии гистологических срезов с применением окраски гематоксилин-эозином. Препараты изучали под микроскопом фирмы Leica DM LB2 (Германия) при $\times 50$, $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$, $\times 630$ кратном увеличении с последующим фотографированием.

Оценка влияния белково-пептидного комплекса на активность НАДФН-оксидазы

Влияние фракции пептидов до 30 кДа на функциональную активность нейтрофилов (активности НАДФН-оксидазы) оценивали, используя хемилюминесцентный анализ перитониальных нейтрофилов.

Перитониальные нейтрофилы получали при моделировании воспаления, путем внутрибрюшинной инъекцией суспензии зимозана (5 мг/мл, 150 мкл на животное). Через пять часов брюшную полость промывали 3 мл сбалансированного солевого раствора Хэнкса, не содержащего Ca^{2+} (HBSS, pH 7,4, 4°C), промывку центрифугировали в течение 5 мин (600 g при 4°C). Чистота популяции полиморфноядерных нейтрофилов

(PMN) превышала 95%, по оценке люминесцентной микроскопии (LeicaDM6500, $\times 40$) с окрашиванием акридиновым оранжевым. Выживаемость клеток составляла 97–99%.

Группе опытных животных одновременно с зимозаном подкожно вводили 0,5 мл фракции до 30 кДа. Группе контрольных животных одновременно с зимозаном подкожно вводили 0,5 мл культуральной среды.

Активность НАДФН-оксидазного комплекса оценивали по интенсивности генерации активных форм кислорода (АФК) в люминолзависимой хемилюминесценции.

После определения базового уровня интенсивности хемилюминесценции добавляли fMLF в концентрации 5 мкМ для инициирования респираторного взрыва. Запись велась последовательно для всех мини-чашек в течение 2,5 с и продолжалась 10–30 мин. Суммарную продукцию АФК рассчитывали, как площадь под кривой интенсивности хемилюминесценции во времени. Эффект БПК рассчитывали, как отношение параметров клеток обработанных животных к параметрам клеток контрольных животных. Каждый независимый эксперимент проводился с клетками отдельного животного.

Статистический анализ

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием непараметрических критериев: для сопоставления двух групп (основной и контрольной) использовался критерий Манна-Уитни, для сравнения групп до и в различные сроки после операции использовался критерий Вилкоксона. Данные представлены в виде медианы (Me), минимальных и максимальных значений.

Результаты исследования

Первый этап эксперимента

Перед описанием результатов отдельно стоит отметить, что моделирование неоваскулярного помутнения роговицы, играет большую роль в нашем эксперименте. Нашей целью было получение стойкого помутнения роговицы, значительно снижающего зрительные функции и не изменяющегося с течением времени.

В первые часы от повреждения у крыс наблюдалась выраженная инъекция сосудов конъюнктивы, блефароспазм, эпителиопатия в виде его выраженного отека.

На 1-е сутки (**рис. 1, А**) мы наблюдали усиление блефароспазма, светобоязнь и выраженную конъюнктивальную инъекцию сосудов. Эпителий роговицы был практически полностью слущен с сохранением отдельных «островков» в парацентральной зоне.

К 3-м суткам (**рис. 1, Б**) к сохраняющимся блефароспазму, конъюнктивальной инъекции и слущенному эпителию присоединялась расширенная сеть лимбальных сосудов с единичным прорастанием новообразован-

ных сосудов из этой сети по направлению к центральной зоне роговицы.

Гистологически это соответствовало следующей картине: процесс эпителизации поврежденного участка был уже завершен, однако в центральной зоне новообразованный эпителий отслоен от подлежащей стромы с формированием псевдокисты, заполненной прозрачной экссудативной жидкостью. В строме центральной зоны диффузный пластинчатый умеренный лимфоцитарно-плазмоцитарный инфильтрат. На периферии кле-

точный компонент инфильтрата перемещен в передние слои стромы (субэпителиально), в его составе обнаружены единичные эозинофильные гранулоциты, возможно эозинофилы (аллергический компонент), а также активный неоваскулогенез с тенденцией прорастания капилляров по направлению к центру. Задний эпителий роговицы (эндотелий) без особенностей.

На 7-е сутки (**рис. 1, В**) блефароспазм уменьшился, эпителий закрыл эрозированную поверхность, но у отдельных животных наблюдалось сохранение деэпите-

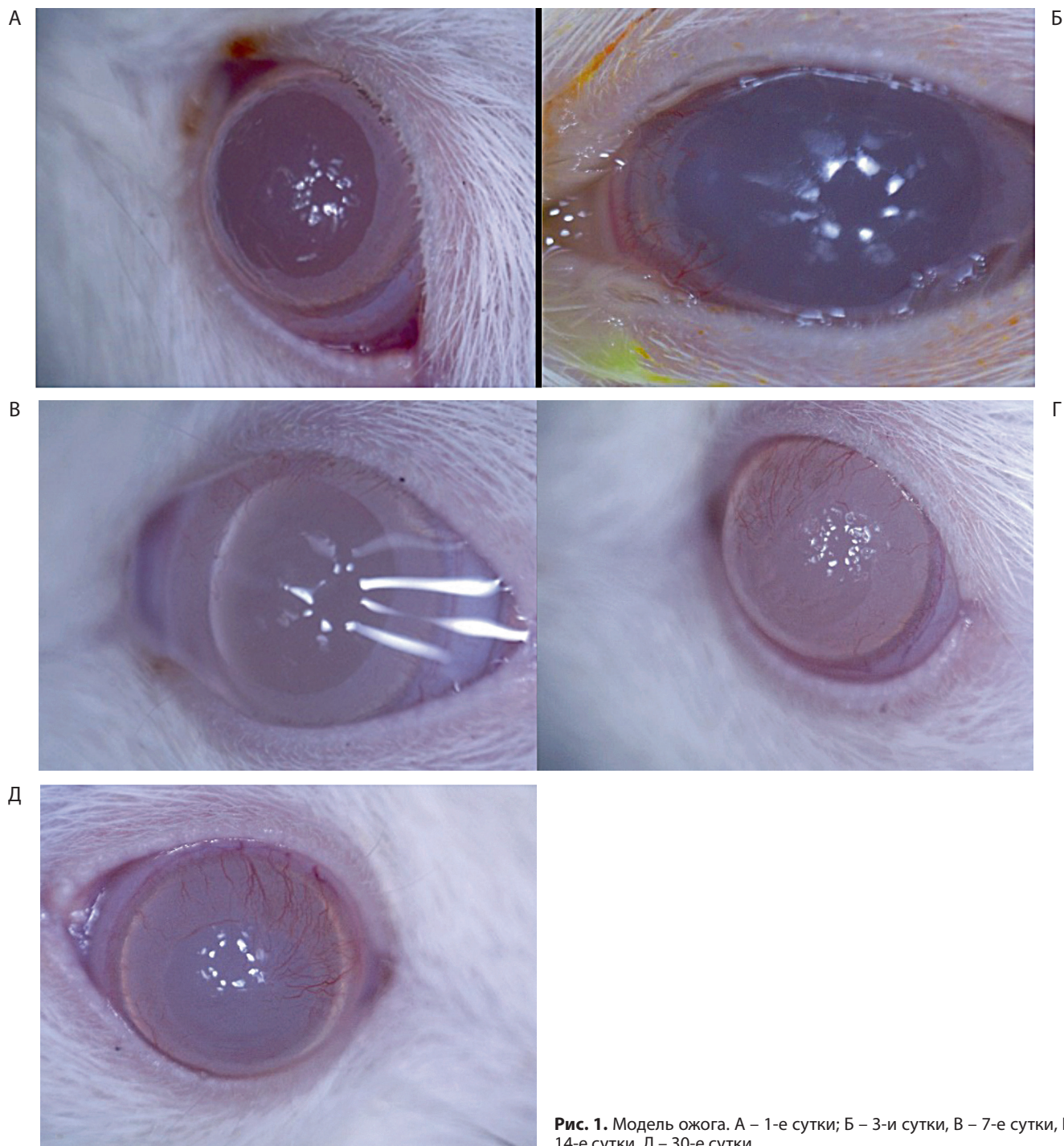


Рис. 1. Модель ожога. А – 1-е сутки; Б – 3-и сутки, В – 7-е сутки, Г – 14-е сутки, Д – 30-е сутки.

лизированных участков в центральной области, которые не превышали диаметром 1,5 мм. По всей паралимбальной зоне роговицы наблюдалось врастание паннуса из новообразованных сосудов в толщу стромы на 1–2 мм. По данным гистологии в центральной зоне под эпителием сохранялись псевдокисты, заполненные прозрачной экссудативной жидкостью, на фоне субэпителиальной фиброплазии. В строме наблюдался диффузный пластинчатый умеренный лимфоцитарно-плазмоцитарный инфильтрат на фоне неоваскуляризации с диапедезными кровоизлияниями. Задний эпителий роговицы (эндотелий) был без особенностей.

К 14-м суткам (рис. 1, Г) мы не наблюдали блефароспазма и конъюнктивальной инъекции сосудов. По результатам офтальмоскопии мы отмечали полную эпителизацию поверхности роговицы и формирование неоваскуляризованного помутнения роговицы. Сосуды, в свою очередь, имели различный ход. Отдельные стволы были направлены к центральной зоне с формированием анастомозов между собой, другие сосуды оканчивались в парацентральной зоне и имели меньший диаметр.

К 30-м суткам (рис. 1, Д) различий в офтальмологическом статусе животных по сравнению с 14 сутками мы не выявляли. По данным гистологии мы наблюдали истончение роговицы с признаками сформированного васкуляризованного бельма. Сосуды были эктазированы, полнокровны, строма умеренно отечна. Задний эпителий роговицы без особенностей.

По данным гистологического исследования (рис. 2) к 3-м суткам мы наблюдали отсутствие субэпителиальных кист, активной фиброплазии не наблюдалось. В строме обнаруживалась слабая клеточная инфильтрация в передних слоях, неоваскуляризация также затрагивала только передние слои роговицы, с единичными экстравазальными эритроцитами. Задний эпителий роговицы (эндотелий) также был без особенностей.

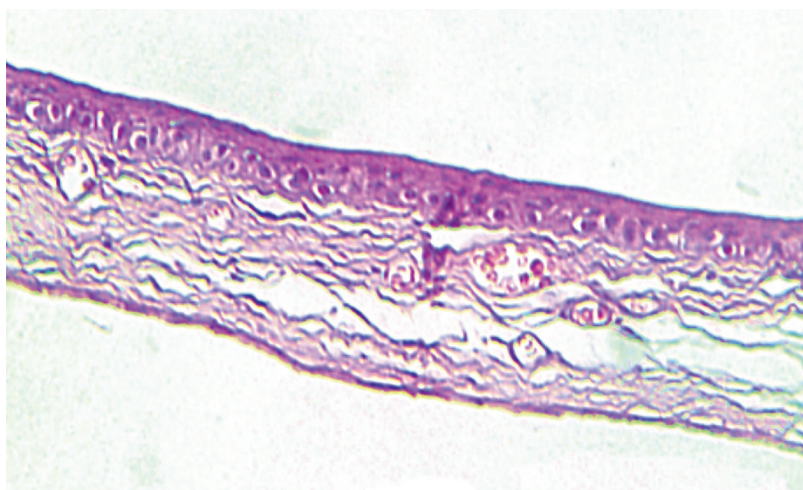


Рис. 2. Модель ожога, 30-е сутки. Гистологический препарат роговицы крысы. Окраска гематоксилин – эозин, ув. $\times 100$.

Данные оптической когерентной томографии переднего отрезка глаза

По данным ОСТ переднего отрезка к 3-м суткам мы наблюдали утолщение роговицы до 670,5 мкм [Min 647,0; Max 693,0] от исходных параметров интактных крыс, которые составляли в среднем 395 мкм.

В процессе дальнейшего наблюдения нами была проанализирована динамика толщины роговицы крыс в модели ожога роговицы. Оказалось, что с 14-х до 30-е сутки у всех животных мы обнаружили неравномерную толщину роговицы в зоне ожогового воздействия (формировалось центральное «плато», где роговица была истонченной). Данные ОСТ переднего отрезка глаза были систематизированы и представлены в табл. 1.

В итоге, к 30-м суткам (рис. 3) толщина эпителиального слоя была неравномерной, в назальном сегменте параоптической области, в толще стромы, определялось гиперрефлективное помутнение. В его проекции, преимущественно в поверхностных слоях стромы, визуализировались множественные гипорефлективные полости (кисты). УПК был тотально закрыт за счет плоскостной иридокорнеальной синехии.

Таким образом, было установлено, что, по данным оптической когерентной томографии, начиная с 14-х суток от момента нанесения ожога динамики по переднему отрезку глаза не наблюдается.

Исследование площади поражения роговицы

На данном этапе с помощью программы IP Square высчитывался поврежденный участок роговицы. Средние показатели площади пораженной роговицы на 3-и, 7-е, 14-е и 30-е сутки обследования представлены в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что на 7-е сутки наблюдалось статистически значимое ($p = 0,005$) увеличение пораженной площади роговицы на 38%. Однако, уже на 14-е сутки отмечалось статистически значимое уменьшение данного показателя на 10% ($p = 0,005$). Эта динамика

ка, вероятно, связана с уменьшением воспалительной реакции и снижением отека роговицы. На 30-е сутки площадь поражения не изменялась, сохраняя значения предыдущего периода наблюдения. Таким образом, полученные данные свидетельствовали об отсутствии динамики площади поражения роговицы уже с 14-х суток.

Второй этап эксперимента

По результатам офтальмоскопии на 14-е и 30-е сутки в контрольной группе животных динамики не наблюдалось. Мы выявляли множественные новообразован-

ные сосуды роговицы (преимущественно крупные сосудистые стволы) со стромальными помутнениями в их проекции (рис. 4).

По данным гистологии (рис. 5) наблюдалась аналогичная ситуация. Эпителий роговицы был не изменен, однако, сама роговица была истончена. Наблюдалось сформированное васкуляризированное бельмо роговицы, а именно субэпителиальная фиброплазия и неоваскуляризация роговицы. Причем в ее строме обнаруживались и запустевшие сосуды с признаками облитерации, и полностью функцио-

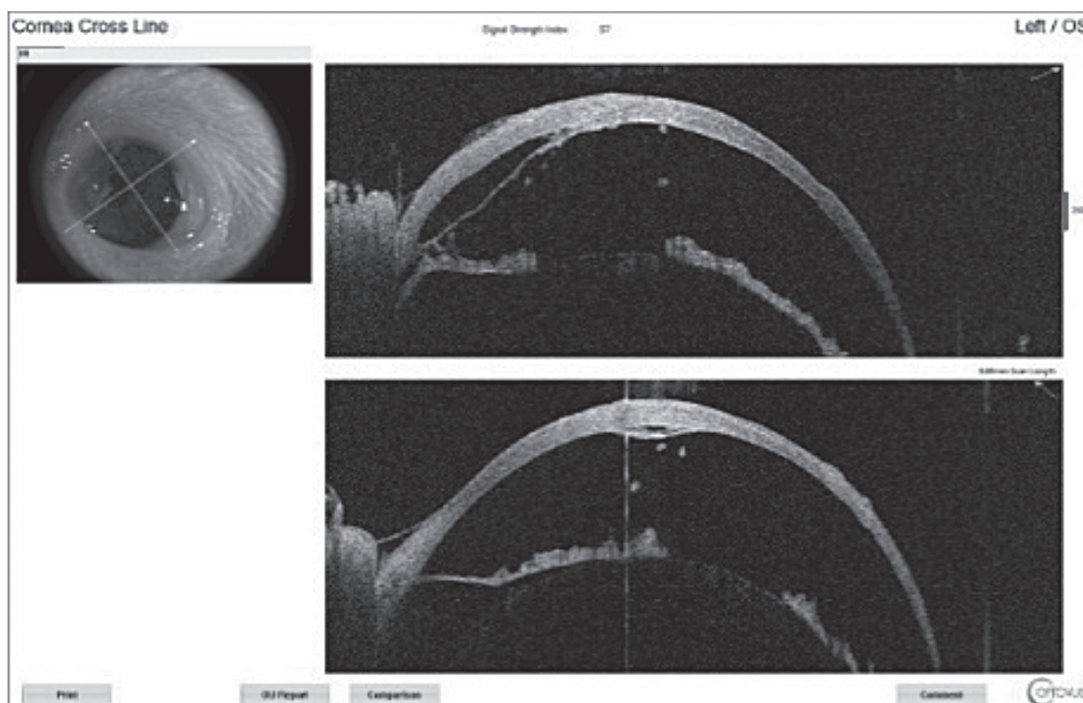


Рис. 3. Модель ожога. 30-е сутки. Оптическая когерентная томография.

Таблица 1

Данные OCT переднего отрезка. Модель химического ожога

	3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки	30-е сутки
Модель ожога роговицы	отек роговицы до 670,5 [647,0–693,0] мкм; отслойка десцеметовой мембраны	увеличение толщины роговицы (до 581,0 [569,0 – 593,0] мкм); увеличение площади отслойки десцеметовой мембраны; преципитаты	неравномерная толщина роговицы (до 501,0 [494,0 – 508,0] мкм), сохранение отслоек десцеметовой мембраны; фибриновая мембрана на эндотелии; иридокорнеальные синехии	неравномерная толщина роговицы (494,0 [486,0 – 503,0] мкм); кистозная дегенерация роговицы; фибриновая мембрана на эндотелии; иридокорнеальные синехии

Таблица 2

Средние показатели площади поражения роговицы на третьем этапе эксперимента, %

Срок наблюдения	3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки	30-е сутки
Площадь поражения роговицы, %	42,0 [38,0 – 51,0]	69,0 [65,0 – 70,0] #	61,5 [59,0 – 63,0] #	61,0 [61,0 – 62,0]

Примечание: # – $p < 0.05$ при сравнении с предыдущим сроком обследования.

нирующие. Задний эпителий роговицы (эндотелий) был без особенностей.

В опытной группе животных к 14-м суткам инстилляций в конъюнктивальную полость пептидов КС офтальмоскопически (рис. 6, А) мы наблюдали уменьшение количества новообразованных сосудов, помутнения роговицы исчезли в проекции запустевших сосудов. Сохранившиеся новообразованные сосуды имели меньший диаметр. Эпителий оставался сохранным, в передней камере патологии не наблюдалось. Гистологически это соответствовало следующей картине: в толще роговицы обнаруживались функционирующие и запустевшие сосуды с признаками облитерации. Задний эпителий роговицы (эндотелий) без особенностей.

На 30-е сутки лечения в опытных группах животных (рис. 6, Б) у большинства крыс новообразованных сосу-

дов обнаружено не было, сохранялись лишь отдельные сосудистые стволы, которые ранее образовывали мощные анастомозы с другими новообразованными сосудами. Отдельно стоит отметить, что помутнений в зонах сохранившихся новообразованных сосудов мы не наблюдали. Гистологически (рис. 7) это соответствовало следующей картине: эпителий был не изменен, строма так же без отека и малоклеточна, субэпителиально выявлялись единичные сосуды, капиллярного типа, которые были запустевшими и не содержали в себе эритроцитов. Задний эпителий роговицы (эндотелий) был без особенностей.

*Данные оптической когерентной томографии
переднего отрезка глаза*

В контрольной группе на протяжении всего срока наблюдения, то есть на 14-е и 30-е сутки существен-

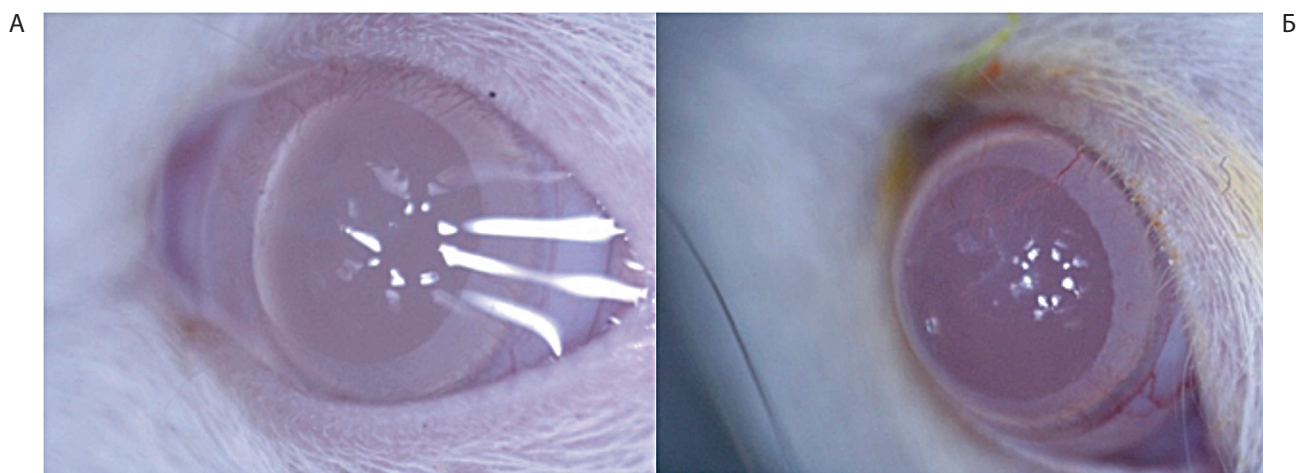


Рис. 4. Результаты лечения ожога в контрольной группе, где применяли культуральную среду. А – 14-е сутки лечения, Б – 30-е сутки лечения.

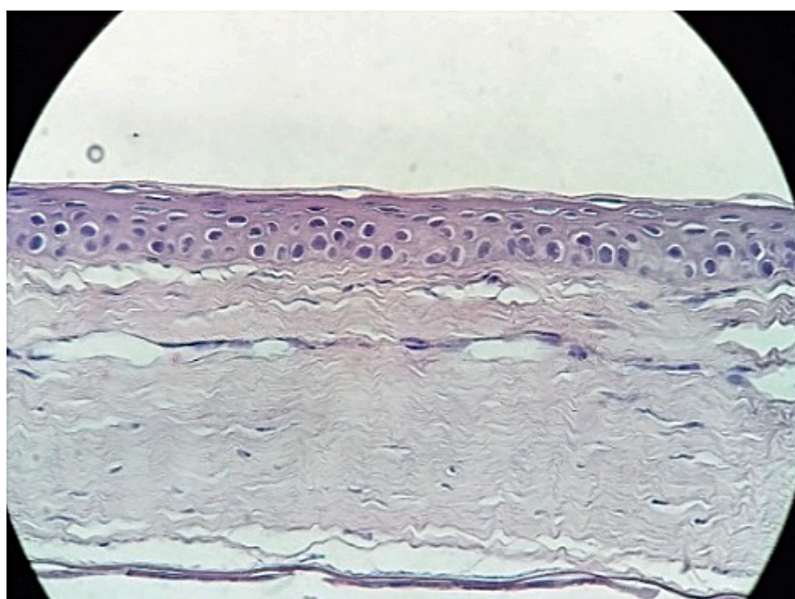


Рис. 5. Контрольная группа. 30-е сутки лечения. Гистологический препарат. Окраска гематоксилин – эозин, ув. × 200.

ных изменений по сравнению с данными, полученными по окончании третьего этапа работы выявлено не было.

В опытной группе по данным ОСТ переднего отрезка к 14-м суткам наблюдался выраженный эпителиально-стромальный отёк роговицы с множественными субэпителиальными кистами, а также неравномерным увеличением рефлексивности стромы на разных уровнях (преимущественно поверхностных ее слоев).

К 30-м суткам динамики относительно 14-х суток не наблюдалось. По данным ОСТ различий между двумя опытными подгруппами на всех сроках наблюдения выявлено не было.

Исследование площади поражения роговицы

Анализ площади поражения роговицы проводился по аналогии с первым этапом исследования. Данные по доле поражения роговицы в опытной и контрольной группах представлены в **табл. 3**.

На 14-е сутки наблюдалось незначительное, но статистически значимое снижение площади пораженной роговицы в контрольной группе ($p = 0,005$). На 30-е сутки площадь поражения роговицы уменьшилась ещё на 18,6% ($p = 0,005$). В опытных подгруппах на протяжении всех сроков наблюдения чётко прослеживалась тенденция к уменьшению площади поражения роговицы. На 14-е сутки значительное статистически достоверное уменьшение показателя составило 89,2% и 88,4% в 1-й и 2-й подгруппах соответственно ($p = 0,005$). На 30-е сутки объем поражения незначительно уменьшился на 29,9% ($p = 0,005$) и 29,8% ($p = 0,005$) в опытной подгруппе 1 и 2 соответственно.

Показатели контрольной группы на 14-е и 30-е сутки наблюдения были выше значений обеих опытных подгрупп. Так, на сроке 14 суток показатели контроля на 88,9 ($p < 0,001$) и 88% ($p < 0,001$) превышали показатели 1-й и 2-й опытных групп соответственно. К концу срока наблюдения разница с контролем продолжала увеличиваться и достигла 90,4 ($p < 0,001$) и 89,6%

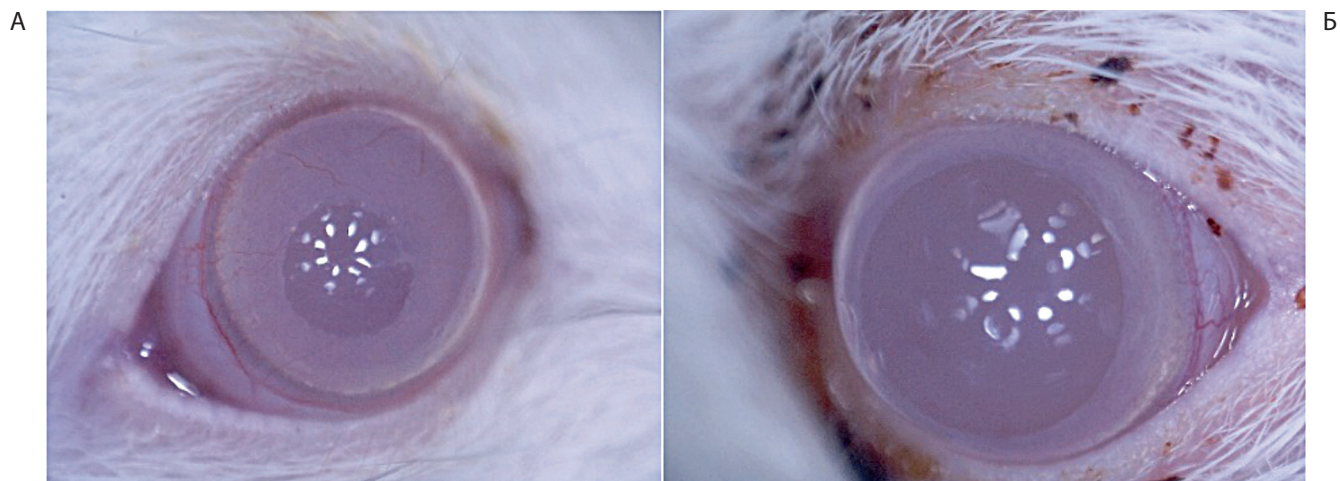


Рис. 6. Результаты лечения ожога в опытной группе, с инстилляциями в конъюнктивальную полость пептидов КС. А – 14-е сутки лечения, Б – 30-е сутки лечения

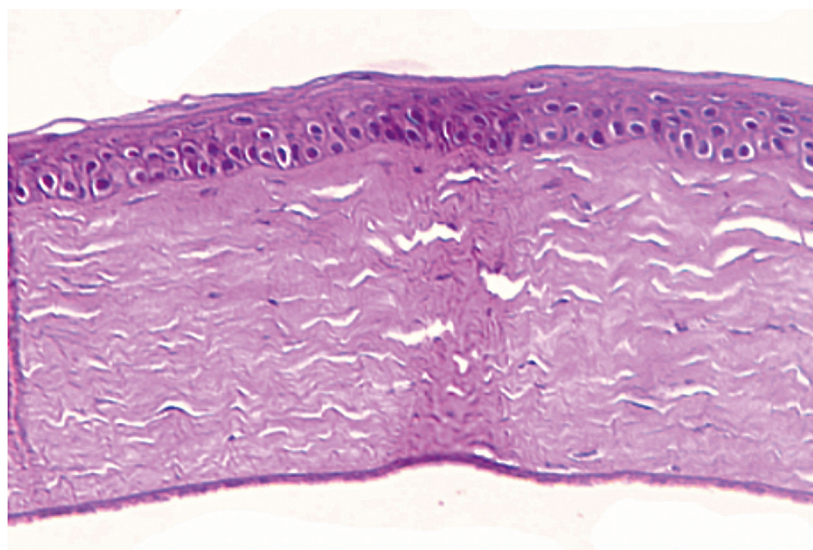


Рис. 7. Опытная группа. 30-е сутки лечения. Гистологический препарат. Окраска гематоксилин – эозин, ув. $\times 200$.

($p < 0,001$) соответственно. Между подгруппами статистически значимых различий не выявлено.

Хемилюминесценция нейтрофилов

Продукция активных форм кислорода (АФК) является одной из основных функций нейтрофилов, обеспечивающих их антибактериальный и ремоделирующий эффект. В работе было показано, что при использовании в качестве активатора формилового трипептида, воздействующего на инозитол-опосредованный рецептор, в опытной группе наблюдается резкое снижение продукции АФК. Наблюдаемое снижение уровня наклона кривой вероятно связано с изменением активности НАДФН-оксидазы ключевого фермента, участвующего в продукции кислородных радикалов.

Статистически значимые отличия были отмечены для спонтанной хемилюминесценции, активности протеинкиназы С, суммарной продукции АФК и амплитуды кривой (рис. 8).

Таким образом, фракция до 30 кДа угнетает функциональную активность нейтрофилов, в том числе за счёт

изменения активности внутриклеточных мембранных ферментов, отвечающих за передачу рецепторных сигналов внутрь клетки.

Обсуждение

В результате нашей работы с помощью данных гистологического исследования было выяснено, что роговица крыс при моделировании химического ожога претерпевала изменения, связанные с замещением дефекта тканей, сопровождаемые воспалительно-пролиферативными явлениями. Клеточная пролиферация была представлена воспалительным и фибробластическим звеном. Лимфоцитарно-плазмоцитаный клеточный инфильтрат за счёт присутствия возможного аллергического компонента на начальных сроках эксперимента равномерно распространялся между волокон стромы на всю ее толщину – в центре, и ближе к передним слоям – на периферии. Нейтрофилы и макрофаги были единичны, так как деструктивные явления к 3-м суткам завершились и, возможно, некротические массы с поверхности поврежденной роговицы элиминировались. К 14-м суткам

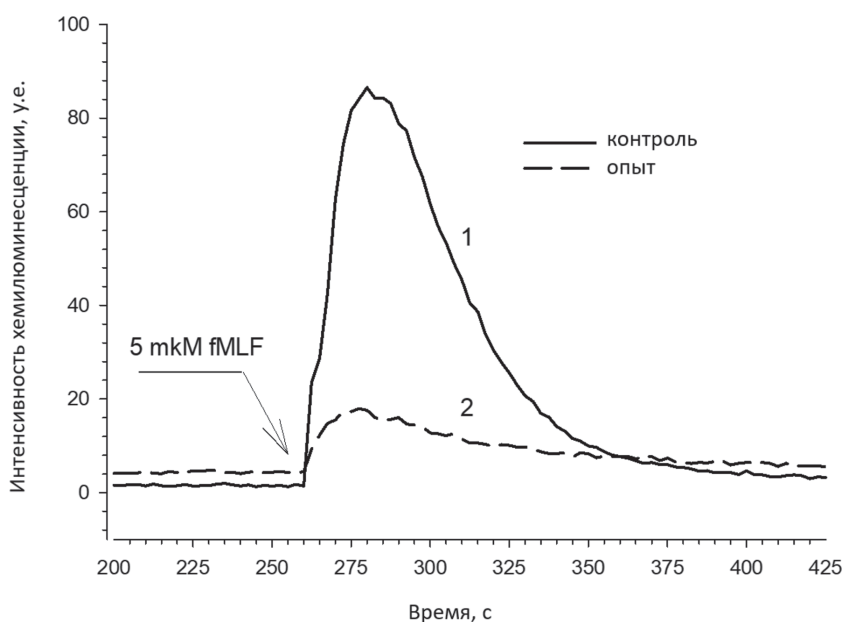


Рис. 8. Кривая хемилюминесценции нейтрофилов крови опытной и контрольной группы.

Таблица 3

Средние показатели площади поражения роговицы (этап 2), %

Группы	Срок наблюдения		
	1 сутки	14 сутки	30 сутки
Контрольная группа	61,0 [61,0 – 62,0]	59,2 [58,7 – 60,1] *	48,0 [48,0 – 49,0] *
Опытная подгруппа 1 (общая фракция)	61,0 [61,0 – 62,0]	6,6 [6,4 – 6,8] # **	4,6 [4,6 – 4,8] **
Опытная подгруппа 2 (фракция до 30 кДа)	61,0 [61,0 – 62,0]	7,0 [6,8 – 8,2] # **	5,0 [4,9 – 5,2] **

Примечание: # – $p < 0.05$ при сравнении с предыдущим сроком обследования; ** – $p < 0,001$ при сравнении с контрольной группой на том же сроке наблюдения.

воспалительный процесс при моделировании химического ожога был практически завершен.

Пролиферативный процесс был представлен в виде субэпителиальной фиброплазии проявляющейся к концу 1-й недели эксперимента, и неоваскуляризацией — на протяжении всех последующих сроков наблюдения. К 30-м суткам диагностировалось васкуляризированное бельмо с истончением роговицы.

Лечение химического ожога роговицы пептидным препаратом на втором этапе эксперимента имело ярко выраженный антиангиогенный эффект, что прослеживалось в отсутствии васкуляризации роговицы к 30-му дню инстилляций препарата. Этот факт подтверждается наличием субэпителиально единичных запустевших капилляров в опытных подгруппах. В контрольной группе, где применяли культуральную среду в качестве инстилляций, сформировалось бельмо, приведшее к истончению роговицы, в котором отмечены разные по функциональному состоянию сосуды (активные и с признаками облитерации).

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения препарата раствора пептидов для лечения такой сложной патологии, как неоваскуляризация роговицы. В нашей работе было показано, что пептидный препарат обладает противовоспалительным и ингибирующим ангиогенез эффектом.

Однако необходимо проведение дальнейших исследований с целью более точного отслеживания цепочки внутриклеточных взаимодействий *in vitro*. Все это в перспективе может повысить эффективность проводимого лечения.

Список литературы

1. Prokofyeva E., Zrenner E. Epidemiology of major eye diseases leading to blindness in Europe: A literature review. *Ophthalmic Res.* 2012; 47: 171–188. DOI: 10.1159/000329603
2. Майчук Ю.Ф. Новое в эпидемиологии и фармакотерапии глазных инфекций. *Клиническая офтальмология.* 2000; 1(2): 48–51.
3. Южаков А.М., Быков В.П., Зюрняева И.Д., Гогадзе М.Г. Новые перспективы в лечении внутриглазной инфекции. *Вестник офтальмологии.* 2000; 116(2): 20–22.
4. Azar D.T. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 2006; 104: 264–302.
5. Fossarello M., Peiretti E., Zucca I., Serra A. Photodynamic therapy of corneal neovascularization with verteporfin. *Cornea.* 2003; 22(5): 485–488. DOI: 10.1097/00003226-200307000-00018
6. Ma X., Ottino P., Bazan H.E., Bazan N.G. Platelet-activating factor (PAF) induces corneal neovascularization and upregulates VEGF expression in endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004; 45(9): 2915–2921. DOI: 10.1167/iavs.04-0128
7. Mazhdrakova I., Demerdjieva Z. Neovascularisation of the cornea. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 2005; 222(8): 623–629. DOI: 10.1055/s-2005-858449
8. Ecoiffier T., Yuen D., Chen L. Differential distribution of blood and lymphatic vessels in the murine cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010; 51(5): 2436–2440. DOI: 10.1167/iavs.09-4505
9. Edelman J.L., Castro M.R., Wen Y. Correlation of VEGF expression by leukocytes with the growth and regression of blood vessels in the

- rat cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999; 40(6): 1112–1123.
10. Liu G.Q., Lu P.R., Li L.B., Zhang X.G. Inhibited experimental corneal neovascularization by neutralizing anti-SDF-1 α antibody. *Int. J. Ophthalmol.* 2012; 5(1): 7–12. DOI: 10.3980/j.issn.2222-3959.2012.01.02
11. O'Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y., Chen C., Rosenthal R.A., Moses M., Lane W.S., Cao Y., Sage E.H., Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell.* 1994; 79(2): 315–328. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90200-3
12. Qazi Y., Maddula S., Ambati B.K. Mediators of ocular angiogenesis. *J. Genet.* 2009; 88(4): 495–515. DOI: 10.1007/s12041-009-0068-0
13. Usui T., Sugisaki K., Iriyama A., Yakoo S., Yamagami S., Nagai N., Ishida S., Amano S. Inhibition of corneal neovascularization by blocking the angiotensin II type 1 receptor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008; 49(10): 4370–4376. DOI: 10.1167/iavs.07-0964
14. Nikuei P., Malekzadeh K., Rajaei M., Nejatizadeh A., Ghasemi N. The imbalance in expression of angiogenic and anti-angiogenic factors as candidate predictive biomarker in preeclampsia. *Iran J. Reprod. Med.* 2015; 13(5): 251–262.
15. Zhao G., Yan W., Chen E., Yu X., Cai W. Numerical simulation of the inhibitory effect of angiostatin on metastatic tumor angiogenesis and microenvironment. *Bull. Math. Biol.* 2013; 75(2): 274–287. DOI: 10.1007/s11538-012-9805-2
16. Haep L., Britzen-Laurent N., Weber T.G., Naschberger E., Schaefer A., Kremmer E., Foersch S., Vieth M., Scheuer W., Wirtz S., Waldner M., Stürzl M. Interferon gamma counteracts the angiogenic switch and induces vascular permeability in dextran sulfate sodium colitis in mice. *Inflamm. Bowel Dis.* 2015; 21(10): 2360–2371. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000490
17. Egginton S. Physiological factors influencing capillary growth. *Acta. Physiol. (Oxf).* 2011; 202(3): 225–239. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2010.02194.x
18. Adair T.H., Montani J.P. *Angiogenesis.* San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, 2010. 82 p. DOI: 10.4199/C00017ED1V01Y-2010091SP009
19. Хубутия М.Ш., Темнов А.А., Вагабов А.В., Лебедев М.П., Склифас А.Н., Рогов К.А., Вострикова О.Ф., Фомина О.П. Низкомолекулярные пептидные препараты, полученные из культивированных стволовых клеток, при лечении острой почечной недостаточности. *Трансплантология.* 2011; 4: 20–25.

References

1. Prokofyeva E., Zrenner E. Epidemiology of major eye diseases leading to blindness in Europe: A literature review. *Ophthalmic Res.* 2012; 47: 171–188. DOI: 10.1159/000329603
2. Maychuk Yu.F. [New in the epidemiology and pharmacotherapy of eye infections]. *Klinicheskaya oftal'mologiya [Russian Journal of Clinical Ophthalmology]*. 2000; 1(2): 48–51. (in Russian)
3. Yuzhakov A.M., Bykov V.P., Zurnyayeva I.D., Gogadze M.G. [New perspectives in the treatment of intraocular infection]. *Vestnik oftal'mologii [Ophthalmology bulletin]*. 2000; 116(2): 20–22. (in Russian)
4. Azar D.T. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 2006; 104: 264–302.
5. Fossarello M., Peiretti E., Zucca I., Serra A. Photodynamic therapy of corneal neovascularization with verteporfin. *Cornea.* 2003; 22(5): 485–488. DOI: 10.1097/00003226-200307000-00018
6. Ma X., Ottino P., Bazan H.E., Bazan N.G. Platelet-activating factor (PAF) induces corneal neovascularization and upregulates VEGF expression in endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004; 45(9): 2915–2921. DOI: 10.1167/iavs.04-0128
7. Mazhdrakova I., Demerdjieva Z. Neovascularisation of the cornea. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 2005; 222(8): 623–629. DOI: 10.1055/s-2005-858449
8. Ecoiffier T., Yuen D., Chen L. Differential distribution of blood and lymphatic vessels in the murine cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010; 51(5): 2436–2440. DOI: 10.1167/iavs.09-4505
9. Edelman J.L., Castro M.R., Wen Y. Correlation of VEGF expression by leukocytes with the growth and regression of blood vessels in the rat cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999; 40(6): 1112–1123.

10. Liu G.Q., Lu P.R., Li L.B., Zhang X.G. Inhibited experimental corneal neovascularization by neutralizing anti-SDF-1 α antibody. *Int. J. Ophthalmol.* 2012; 5(1): 7–12. DOI: 10.3980/j.issn.2222-3959.2012.01.02
11. O'Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y., Chen C., Rosenthal R.A., Moses M., Lane W.S., Cao Y., Sage E.H., Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell.* 1994; 79(2): 315–328. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90200-3
12. Qazi Y., Maddula S., Ambati B.K. Mediators of ocular angiogenesis. *J. Genet.* 2009; 88(4): 495–515. DOI: 10.1007/s12041-009-0068-0
13. Usui T., Sugisaki K., Iriyama A., Yakoo S., Yamagami S., Nagai N., Ishida S., Amano S. Inhibition of corneal neovascularization by blocking the angiotensin II type 1 receptor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008; 49(10): 4370–4376. DOI: 10.1167/iovs.07-0964
14. Nikuei P., Malekzadeh K., Rajaei M., Nejatizadeh A., Ghasemi N. The imbalance in expression of angiogenic and anti-angiogenic factors as candidate predictive biomarker in preeclampsia. *Iran J. Reprod. Med.* 2015; 13(5): 251–262.
15. Zhao G., Yan W., Chen E., Yu X., Cai W. Numerical simulation of the inhibitory effect of angiostatin on metastatic tumor angiogenesis and microenvironment. *Bull. Math. Biol.* 2013; 75(2): 274–287. DOI: 10.1007/s11538-012-9805-2
16. Haep L., Britzen-Laurent N., Weber T.G., Naschberger E., Schaefer A., Kremmer E., Foersch S., Vieth M., Scheuer W., Wirtz S., Waldner M., Stürzl M. Interferon gamma counteracts the angiogenic switch and induces vascular permeability in dextran sulfate sodium colitis in mice. *Inflamm. Bowel Dis.* 2015; 21(10): 2360–2371. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000490
17. Egginton S. Physiological factors influencing capillary growth. *Acta. Physiol. (Oxf).* 2011; 202(3): 225–239. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2010.02194.x
18. Adair T.H., Montani J.P. *Angiogenesis*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, 2010. 82 p. DOI: 10.4199/C00017ED1V01Y-201009ISP009
19. Khubutiya M.Sh., Temnov A.A., Vagabov A.V. Lebedev M.P., Sklifas A.N., Rogov K.A., Vostrikova O.F., Fomina O.P. [Low-molecular-weight peptide drugs derived from cultured stem cells in the treatment of acute renal failure]. *Transplantologiya [The Russian Journal of Transplantation]*. 2011; 4: 20–25. (in Russian)

Сведения об авторах:

Кодунов Алексей Михайлович — врач-офтальмолог отделения лазерной хирургии «донной» патологии глаза Калужского филиала Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Фёдорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; <https://orcid.org/0000-0002-8989-3188>

Темнов Андрей Александрович — доктор медицинских наук, заведующий лабораторией специальных клеточных технологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»; <https://orcid.org/0000-0002-2141-1613>

Терещенко Александр Владимирович — доктор медицинских наук, директор Калужского филиала Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Фёдорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; <https://orcid.org/0000-0002-0840-2675>

Трифаненкова Ирина Георгиевна — доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе Калужского филиала Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Фёдорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; <https://orcid.org/0000-0002-7708-9782>

Склифас Алла Николаевна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории культуры клеток и клеточной инженерии Института биофизики клетки Российской академии наук — обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»; <https://orcid.org/0000-0003-0845-3007>

Шацких Анна Викторовна — кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией патологической анатомии и гистологии глаза Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Фёдорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; <https://orcid.org/0000-0002-3437-8162>