

КОДУНОВ АЛЕКСЕЙ МИХАЙЛОВИЧ

**ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ПОСТОЖОГОВОЙ
НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ РОГОВИЦЫ У ЖИВОТНЫХ
В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

3.1.5. – Офтальмология (медицинские науки)

3.3.3. – Патологическая физиология (медицинские науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2022

Диссертационная работа выполнена на базе Калужского филиала ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России и на базе научной лаборатории «Института биофизики клетки» Российской академии наук

Научные руководители:

Терещенко Александр Владимирович – доктор медицинских наук, директор Калужского филиала ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России

Темнов Андрей Александрович – доктор медицинских наук, заместитель заведующего лабораторией специальных клеточных технологий ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

Официальные оппоненты:

Куликов Алексей Николаевич – доктор медицинских наук, начальник кафедры офтальмологии ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Астрелина Татьяна Алексеевна – доктор медицинских наук, руководитель Центра биомедицинских и аддитивных технологий ФГБУ «ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна» ФМБА России

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт глазных болезней»

Защита состоится «05» сентября 2022 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д.21.1.021.01 при ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России по адресу: 127486, г. Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59 А.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук

Мушкова Ирина Альфредовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Патологии роговицы являются одной из основных причин потери зрения. В настоящее время от заболеваний роговицы страдают более 10 миллионов человек в мире (Керимов К.Т., 2005; Куликов А.Н., Черныш В.Ф., Чурашов С.В., 2020). Возникновение патологических изменений роговицы может быть обусловлено различными этиологическими факторами: травматические повреждения, ожоги глаз, инфекции, ятрогенные причины, дефицит лимбальных стволовых клеток.

Ожоги относятся к одному из самых тяжелых повреждений органа зрения и составляют от 16,1% до 38% всех травм глаза (Черныш В.Ф., 2018). Тяжесть ожоговой травмы обуславливается характером изменений в тканях и нередким повреждением обоих глаз. Несмотря на огромный опыт лечения ожогов в отечественной и зарубежной офтальмологии, более 40% пострадавших становятся инвалидами (Керимов К.Т., 1997).

Борьба с последствиями ожогов трудна, требует сложных многократных пластических операций и далеко не всегда приводит к успеху. Одной из причин наиболее серьезных осложнений является неоваскуляризация роговицы (Керимов К.Т., Джафаров А.И., Гахраманов Ф.С., 2005).

Современные методы лечения неоваскуляризации роговицы включают местную противовоспалительную терапию (главным образом, кортикостероиды) и местное введение ингибиторов VEGF. Несмотря на то, что эти варианты лечения могут быть эффективными в некоторых случаях, они имеют существенные ограничения.

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 (Самойлов А.С., Астрелина Т.А., 2019). Однако существуют факторы, препятствующие клиническому применению данного метода. Так, в случае ожоговой травмы трансплантацию клеток в поврежденную область необходимо провести в течение первых 12 часов, а применение аллогенных клеток возможно только после предварительного криоконсервирования и последующей разморозки перед трансплантацией, что негативным образом влияет на их жизнеспособность и функциональную активность (Хубутя М.С., Вагабов А.В., Темнов А.А., Склифас А.Н., 2014). Кроме того, в литературе отсутствуют данные об эффективности стволовых клеток в лечении неоваскуляризации роговицы.

Возможным путем решения этой проблемы может быть использование пептидов (паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток), полученных из культивированных в условиях особого микроокружения стволовых клеток (Хубутя М.С., Вагабов А.В., Темнов А.А., Склифас А.Н., 2014).

Цель исследования

Обосновать применение паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса в профилактике и лечении постожоговой неоваскуляризации роговицы и оценить их эффективность в эксперименте.

Задачи исследования

1. На основании клинических и гистологических методов исследования на модели центральной термической ожоговой травмы роговицы оценить эффективность влияния паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса на репаративные свойства роговицы.
2. На основании клинических и гистологических методов исследования на модели периферической термической ожоговой травмы роговицы с захватом

лимбальной зоны оценить эффективность паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса в профилактике периферического постожогового ангиогенеза роговицы.

3. На модели хронической постожоговой неоваскуляризации роговицы, вызванной химическим повреждением, на основании клинических и гистологических методов исследования оценить эффективность применения паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса в достижении обратного ангиогенеза сосудов роговицы.

4. Провести сравнительный анализ эффективности применения разных фракций белково-пептидного комплекса на модели хронической постожоговой неоваскуляризации роговицы в достижении обратного ангиогенеза сосудов роговицы.

5. Обосновать применение паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса для профилактики и лечения постожоговой неоваскуляризации роговицы на основе оценки активности никотинамидадениндинуклеотидфосфат оксидазы.

Научная новизна

1. Впервые установлено, что применение паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса улучшает репаративные свойства и оказывает антиангиогенный эффект при центральном ожоге роговицы и периферическом ожоге с захватом лимбальной области с восстановлением прозрачности роговицы к 14-м суткам и толщины роговицы к 30-м суткам после термического воздействия за счет подавления воспалительной реакции.

2. Впервые показано, что паракринные факторы мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса приводят к обратному развитию патологических сосудов, восстановлению прозрачности и толщины роговицы в модели хронической постожоговой неоваскуляризации к 30-м суткам после химического воздействия.

3. Продемонстрировано, что фракция белково-пептидного комплекса до 30 кДа обладает основным антиангиогенным потенциалом, сопоставимым по своей активности с общей фракцией.

4. Впервые посредством хемилюминисцентного анализа обосновано, что общая фракция белково-пептидного комплекса и фракция до 30 кДа в соизмеримой степени подавляют активность никотинамидадениндинуклеотидфосфат оксидазы в очаге воспаления.

Практическая значимость

1. Разработана модель химического повреждения роговицы с захватом лимбальной области и конъюнктивы, которая является воспроизводимой, позволяет добиться устойчивой неоваскуляризации поврежденных тканей роговицы и может использоваться для дальнейшего изучения неоваскуляризации роговицы.

2. Доказана эффективность применения паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток путем инстилляций в конъюнктивальную полость белково-пептидного комплекса для профилактики постожоговой неоваскуляризации роговицы.

3. Доказана эффективность применения паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток путем инстилляций в конъюнктивальную полость белково-пептидного комплекса в лечении сформированного неоваскулярного бельма посредством запуска процесса инволюции новообразованных сосудов роговицы.

4. Доказана сопоставимая с общей фракцией белково-пептидного комплекса антиангиогенная активность фракции до 30 кДа в лечении постожоговой неоваскуляризации роговицы в эксперименте.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Разработанная технология профилактики и лечения постожоговой неоваскуляризации роговицы, заключающаяся в инстилляциях в

конъюнктивальную полость белково-пептидного комплекса, позволяет ускорить репаративные процессы в тканях роговицы при центральном термическом ожоге и предотвратить формирование неоваскулярного бельма роговицы при периферическом ожоге с захватом лимбальной области, а также стимулирует процессы обратного ангиогенеза в модели хронической постожоговой неоваскуляризации роговицы при использовании как общей фракции белково-пептидного комплекса, так и фракции до 30 кДа.

2. Использование паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса, по данным хемилюминисцентного анализа, подавляет хронический постожоговый воспалительный процесс посредством снижения активности никотинамидадениндинуклеотидфосфат оксидазы и запускает процессы обратного ангиогенеза патологических сосудов роговицы.

Внедрение в практику

Разработанные методы профилактики постожоговой неоваскуляризации роговицы при термическом ожоге и терапии при уже сформировавшемся неоваскулярном бельме при лечении постожоговой неоваскуляризации роговицы внедрены в практику исследовательских работ на экспериментальных животных в Калужском филиале ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России и в научной лаборатории «Института биофизики клетки» Российской академии наук.

Апробация работы

Основные материалы работы доложены и обсуждены на I Международном медико-биологическом конгрессе критических состояний (Москва, 2016); XV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Федоровские чтения-2018» (Москва, 2018); Международной конференции по офтальмологии «Восток-Запад-2019» (Уфа,

2019); XII Съезде Общества офтальмологов России (Москва, 2020); онлайн конференции «Лига молодых офтальмологов» (Уфа, онлайн, 2021); XXXII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Оренбургская Конференция Офтальмологов-2021» (Оренбург, онлайн, 2021).

Публикации

По теме диссертации опубликованы 13 работ, из них 7 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ, имеется 1 публикация в зарубежном издании, индексируемом в Web of Science; получен 1 патент на изобретение №2635540, приоритет от 22.11.2016.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 157 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, двух глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложения. Работа иллюстрирована 51 рисунком и 11 таблицами. Список литературы содержит 159 источников, из них 32 публикации отечественных и 127 – иностранных авторов.

Работа выполнена на базе Калужского филиала ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургии глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России под руководством директора филиала доктора медицинских наук Терещенко А.В. и на базе «Института биофизики клетки» РАН ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» под руководством доктора медицинских наук Темнова А.А.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В основу диссертационного исследования положены данные комплексного обследования 132 животных (132 глаза) с центральными и периферическими термическими повреждениями роговицы и тотальными химическими поражениями роговицы и конъюнктивы. Дизайн работы включал в себя обработку данных диагностических методов, морфологического и иммуногистохимического исследований.

В экспериментах использовали кроликов-самцов породы Шиншилла весом от 2,5 до 3 кг, а также крыс-самцов стока Wistar весом от 300 до 350 г. Все процедуры с животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» Хельсинской декларации.

Стволовые клетки костного мозга для изготовления двух фракций белково-пептидного комплекса получали и культивировали на базе научной лаборатории «Института биофизики клетки» Российской академии наук.

Выделение МСК из костного мозга животных. У кролика костный мозг получали из тазовой кости, у крысы – из бедренной. Мононуклеарную фракцию клеток костного мозга выделяли на градиенте плотности с использованием стандартного раствора Lympholyte-H (Cedarlane, Канада). Суспензию мононуклеарных клеток высеивали и культивировали в среде DMEM (ООО «ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, Канада).

Для подтверждения того, что используемые клетки обладают свойствами МСК, была проведена их остеогенная, хондрогенная и адипогенная дифференцировка по стандартной методике.

Культивирование МСК. У крыс клеточный монослой культивировали при условиях нормоксии (21% O₂, 5% CO₂) и гипоксии (10% O₂ и 5% CO₂). У кроликов – только в условиях гипоксии (10% O₂ и 5% CO₂).

Получение кондиционированной среды культивированных мезенхимальных стволовых клеток (кМСК). После получения клеточного монослоя проводили полную смену культуральной среды и через 3 суток кондиционированную культуральную среду объединяли с лизатом МСК.

Получение лизата кМСК. Для получения лизатов МСК клетки разрушали, используя метод замораживания-оттаивания.

Получение фракций кондиционированной среды лизата кМСК. Для разделения кондиционированной среды использовали метод ультрафильтрации. Затем проводили процедуру фильтрования. Таким образом были получены нормализованные по объему фракции, содержащие преимущественно белки с массами >30 и до 30 кДа.

Приготовление капельной формы белково-пептидного комплекса (БПК) для эксперимента. Стерильные фракции кондиционированной среды лизата кМСК растворяли в дистиллированной воде. Конечная концентрация белка составила 8 мг/мл. Готовый препарат пептидов представлял собой прозрачную гомогенизированную жидкость малинового цвета.

Для достижения поставленной цели работа была разделена на несколько последовательных этапов, соответствующих задачам исследования.

Первым этапом являлась оценка эффективности БПК на модели центрального термического ожога роговицы кроликов. *Опытная* (в качестве лечения применяли пептидный препарат общей фракции) и *контрольная* (применяли стандартные методы лечения, используемые при термических ожогах глаз) группы включали в себя по 20 кроликов (20 глаз).

Ожог роговицы моделировали путем термического воздействия на центральную зону роговицы посредством специального устройства в виде металлического цилиндра с плоским основанием диаметром 4 мм, подключенного к источнику переменного тока. Максимальный пик температуры составлял 210°C, время воздействия – 2 секунды.

На 0 сутки, до нанесения ожога, животных разделяли на опытную и контрольную группы, проводили офтальмоскопию и исследование на приборе

Pentacam HR Тип 70900 (Oculus, Германия) с определением средней толщины и прозрачности роговицы. На 3-, 7-, 14-, 30-е сутки выполняли фоторегистрацию на щелевой лампе HS (Haag-streit international) с адаптированным к оптической системе щелевой лампы фотоаппаратом Canon EOS 70D (она же использовалась для офтальмоскопии), биомикроскопию и исследование на Pentacam с определением минимальной и максимальной толщины и прозрачности роговицы. Для проведения гистологического исследования на 3-, 7-, 14-, 30-е сутки выводили из эксперимента по 2 особи.

Вторым этапом оценивали эффективность БПК на модели периферического термического ожога с повреждением лимбальной зоны роговицы кроликов. Материалы и методы были аналогичны первому этапу. Отличие заключалось в термическом повреждении роговицы, которое осуществляли двумя аппликатами, захватывающими на 1/3 диаметра лимбальную область и перекрывающимися друг друга также на 1/3 диаметра.

На **третьем этапе** разрабатывали модель постожогового неоваскулярного бельма роговицы крыс-самцов стока Wistar на базе научной лаборатории «Института биофизики клетки» Российской академии наук. В исследование были включены 52 крысы (52 глаза).

Химический ожог формировали под местной анестезией (0,4% инкаином) аппликацией фильтровальной бумаги (в виде круга диаметром 5 мм), смоченной 90% этанолом, с экспозицией 60 секунд на роговицу и конъюнктиву.

На 0 сутки, до нанесения ожога, проводили офтальмоскопию, исследование на Pentacam с определением прозрачности роговицы и оптическую когерентную томографию (ОКТ) роговицы на оптическом когерентном томографе RTVue-100 (Optovue, США). На 3-, 7-, 14-, 30-е сутки выполняли фоторегистрацию, биомикроскопию и ОКТ роговицы. Для проведения гистологического исследования на 3-, 7-, 14-, 30-е сутки из эксперимента выводили по 1 особи животных.

На **четвёртом этапе** проводили оценку эффективности БПК с разными молекулярными массами на процессы обратного ангиогенеза при лечении уже сформированного на 3-м этапе постожогового неоваскулярного бельма роговицы крыс. Для исключения влияния белковых комплексов культуральной среды на процессы ангиогенеза выполняли сравнительную оценку влияния БПК и культуральной среды.

Экспериментальное исследование выполнено на 48 крысах (48 глаз). Животные были разделены на две опытные подгруппы и контрольную группу по 16 крыс (16 глаз) каждая. В *первой подгруппе основной группы* в качестве лечения применяли пептидный препарат общей фракции, во *второй подгруппе* – пептидный препарат фракции до 30 кДа. В *контрольной группе* применяли культуральную среду.

На 1-е сутки наблюдения, которые на данном этапе эксперимента соответствовали концу периода наблюдения, то есть 30-м суткам, на третьем этапе работы, животных разделяли на группы и подгруппы. На 14-, 30-е сутки проводили фоторегистрацию, биомикроскопию и ОКТ роговицы. Для гистологического исследования на 14-, 30-е сутки выводили из эксперимента по 4 особи.

Влияние БПК на функциональную активность нейтрофилов (активность НАДФ-оксидазы) оценивали, используя ***хемилюминесцентный анализ перитониальных нейтрофилов***. Для этого моделировали перитониальное воспаление у 10 животных путем внутрибрюшинной инъекции суспензии зимозана (5 мг/мл, 150 мкл на животное). Опытным животным (5 особей) одновременно с зимозаном подкожно вводили 0,5 мл БПК. Контрольным животным (5 особей) одновременно с зимозаном подкожно вводили 0,5 мл культуральной среды.

Активность НАДФ-оксидазного комплекса оценивали по интенсивности генерации активных форм кислорода (АФК) в люминолзависимой хемилюминесценции. После определения базового уровня интенсивности хемилюминесценции добавляли бактериальный пептид N-формил-Met-Leu-Phe

(fMLF) fMLF в концентрации 5 мкМ для инициирования респираторного взрыва. 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 проводили с клетками отдельного животного.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием программы STATISTICA 13.3 («StatSoft», США). Для определения нормальности распределения использовали критерий Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Для количественных параметров для сопоставления двух групп использовали непараметрический критерий Манн-Уитни. Для сравнения групп использовали непараметрический критерий Уилкоксона. Статистически значимыми считали различия данных при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты применения белково-пептидного комплекса для лечения термического ожога центральной зоны роговицы кроликов (этап 1)

В контрольной и опытной группах сразу после нанесения ожога офтальмоскопически оценить состояние роговицы и глубжележащих сред не удавалось из-за наличия выраженного блефароспазма. Одновременно с осмотром на 1-е сутки животным обеих групп проводили скарификацию струпа роговицы. На 7-е сутки после применения БПК офтальмоскопически в опытной группе отмечалось восстановление структуры роговицы, а к 14-м – увеличение показателей прозрачности до нормальных значений. В отличие от основной, в контрольной группе животных наблюдали нарушение структуры и прозрачности роговицы на всем сроке наблюдения.

Показатели прозрачности роговицы до нанесения ожога и в различные сроки наблюдения в исследуемых группах представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Средние показатели прозрачности роговицы, по данным Pentacam, в основной и контрольной группах на первом этапе эксперимента, усл. ед.

Группы сравнения	Срок наблюдения					
	До ожога	1 сутки	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки
Контрольная группа	22,22± 0,22 ²	100,00± 0,00 ¹	100,00± 0,00 ²	99,50± 0,34 ^{1,2}	82,60± 0,83 ^{1,2}	24,00± 0,39 ¹
Основная группа	22,11± 0,20 ²	100,00± 0,00 ¹	83,40± 0,54 ^{1,2}	37,20± 0,70 ^{1,2}	20,10± 0,31 ^{1,2}	20,60± 0,22 ¹

Прим.: различия статистически достоверны при $p < 0,05$

¹ – различия внутри группы по срокам наблюдения

² – различия между группами исследования по срокам наблюдения

Сравнительная динамика восстановления прозрачности роговицы демонстрирует, что до нанесения ожога показатели в основной и контрольной группах не имели статистически значимых различий ($p=0,72$). К 14-м суткам показатели основной группы значительно превосходили контрольные ($p=0,005$). На 30-е сутки прозрачность роговицы в группах приблизилась к значениям, полученным до нанесения ожога.

Данные гистологического обследования соответствовали клинической и инструментальной картине на всех сроках наблюдения.

Таким образом, при лечении центрального ожога роговицы было показано, что применение БПК способствует восстановлению роговицы, подвергшейся ожоговому повреждению, до исходных параметров в более короткие сроки. Полученные данные позволили приступить к следующему этапу работы.

Результаты применения белково-пептидного комплекса для профилактики неоваскуляризации роговицы при термическом ожоге периферической зоны роговицы кроликов (этап 2)

На втором этапе эксперимента была поставлена задача проанализировать влияние БПК на более тяжелое повреждение роговицы с захватом лимбальной области, и, следовательно, с ответной сосудистой реакцией.

Применяемая модель термического ожога позволила оценить реакцию на повреждающее воздействие тканей роговицы и лимбальной сосудистой сети.

Офтальмоскопически в опытной группе животных на всем сроке наблюдения не было отмечено появления новообразованных сосудов роговицы, а последствия термического ожога проявлялись в виде поверхностного стромального помутнения в центре термического воздействия. Тогда как в контрольной группе наблюдали прорастание новообразованных сосудов в роговицу и формирование неоваскулярного бельма уже на 14-е сутки.

Показатели прозрачности роговицы в основной и контрольной группах в различные сроки наблюдения представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Средние показатели прозрачности роговицы, по данным Pentacam, в основной и контрольной группах на втором этапе эксперимента, усл. ед.

Группы сравнения	Срок наблюдения					
	0 сутки (до ожога)	1 сутки	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки
Контрольная группа	22,22± 0,22	100,00± 0,00 ¹	100,00± 0,00 ²	100,00± 0,00 ²	98,90± 0,71 ^{1,2}	97,70± 0,58 ^{1,2}
Основная группа	22,11± 0,20	100,00± 0,00 ¹	89,65± 0,39 ^{1,2}	87,60± 0,40 ^{1,2}	35,39± 0,47 ^{1,2}	31,90± 0,43 ^{1,2}

Прим.: различия статистически достоверны при $p < 0,05$

¹ – различия внутри группы по срокам наблюдения

² – различия между группами исследования по срокам наблюдения

До нанесения ожога показатели в основной и контрольной группах не имели статистически значимых различий ($p=0,72$). Сравнительная динамика восстановления прозрачности роговицы после ожога демонстрирует, что к концу срока наблюдения показатели основной группы значительно превосходили таковые в контроле ($p=0,007$).

Гистологическая картина у животных контрольной группы на 30-е сутки позволяла говорить о сформированном неоваскулярном помутнении роговицы в зоне ранее перенесенного термического воздействия, о чем свидетельствовало

наличие сосудов в передних слоях роговицы, в то время как у животных опытной группы в аналогичные сроки наблюдалась сохранная структура роговицы.

Таким образом, в результате данного этапа эксперимента удалось предупредить развитие неоваскулярного бельма роговицы в области ее термического повреждения с помощью применяемого в качестве лечения БПК. В контрольной группе, несмотря на противовоспалительную и корнепротекторную терапию, в аналогичные сроки наблюдения сформировалось неоваскулярное бельмо роговицы.

Результаты формирования и лечения постожоговой неоваскуляризации роговицы крыс

Задачей данного этапа эксперимента была оценка воздействия БПК общей фракции и фракции до 30 кДа на уже сформировавшееся сосудистое бельмо роговицы.

Этот этап эксперимента проводили на крысах. Использование другого вида животных позволило подтвердить положительное действие БПК независимо от видоспецифичности объекта лечения.

Разработка модели постожогового неоваскулярного бельма роговицы и характеристика этапов его течения (этап 3)

После химического повреждения роговицы и конъюнктивы офтальмоскопически уже к 14-м суткам наблюдали формирование неоваскуляризированного помутнения роговицы, которое оставалось без динамики вплоть до 30-х суток. Офтальмоскопическая картина согласовывалась с результатами инструментальных исследований. По данным ОКТ переднего отрезка глаза, к 14-м суткам наблюдалась неравномерная толщина роговицы от 526 до 588 мкм, ее кистозная дегенерация, фибриновая мембрана на эндотелии и иридокорнеальные синехии. Эти изменения сохранялись без динамики до 30-х суток.

Оценка площади поражения роговицы показала, что на 7-е сутки наблюдалось статистически достоверное увеличение пораженной площади роговицы на 61,2% ($p=0,005$). Однако уже на 14 сутки отмечалось статистически достоверное уменьшение данного показателя на 10% ($p=0,005$). Эта динамика, вероятно, связана с уменьшением воспалительной реакции и снижением отека роговицы. На 30-е сутки площадь поражения не изменялась, сохраняя значения предыдущего периода наблюдения.

Гистологическая картина подтверждала данные других методов исследования.

Таким образом, было установлено, что сформированное в результате химического повреждения неоваскулярное бельмо роговицы развивается к 14-м суткам и вплоть до 30-х суток не имеет никакой клинически, инструментально и гистологически значимой динамики.

Результаты применения белково-пептидного комплекса при лечении постожогового неоваскулярного бельма роговицы (этап 4)

На данном этапе эксперимента проводилось лечение сформированного на 3 этапе неоваскулярного помутнения роговицы крыс.

Офтальмоскопически на 30-е сутки лечения белково-пептидным комплексом в опытных подгруппах наблюдали регресс новообразованных сосудов роговицы. В группе контроля к 30-м суткам были выявлены множественные новообразованные сосуды роговицы со стромальными помутнениями в их проекции.

Показатели прозрачности роговицы в основной и контрольной группах в различные сроки наблюдения представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Средние показатели прозрачности роговицы, по данным Pentacam, в основной и контрольной группах на четвертом этапе эксперимента, усл. ед.

Группы сравнения	Срок наблюдения			
	До воздействия	1 сутки	14 сутки	30 сутки
Контрольная группа	32,19±0,101* ¹	100,00±0,000 ¹	100,00±0,000 ²	98,10±0,277 ^{1,2}
Опытная подгруппа 1 (общая фракция)	32,18±0,122*	100,00±0,000 ¹	65,10±0,458 ^{1,2}	33,10±0,277 ^{1,2}
Опытная подгруппа 2 (пептидный препарат фракцией до 30 кДа)	32,19±0,101*	100,00±0,000 ¹	66,50±0,373 ^{1,2}	33,60±0,305 ^{1,2}

Прим.: различия статистически достоверны при $p < 0,05$

* средние показатели прозрачности роговицы соответствуют данным, полученным на 3 этапе эксперимента

¹ – различия внутри группы по срокам наблюдения

² – различия между группами исследования по срокам наблюдения

Как видно из таблицы 3, прозрачность роговицы в опытных группах с 14-х суток лечения начинает поступательно увеличиваться, тогда как в группе контроля эти показатели остаются на уровне абсолютной непрозрачности. Статистически достоверная разница с нормальными значениями к концу срока наблюдения в контрольной группе составила 204,7% ($p=0,005$), для первой и второй подгрупп 2,8% ($p=0,017$) и 4,4% ($p=0,011$) соответственно.

По данным ОКТ переднего отрезка, в опытной группе к 30-м суткам наблюдался незначительный эпителиально-стромальный отек роговицы, а также неравномерное увеличение рефлексивности стромы на разных уровнях (преимущественно поверхностных ее слоев). Различий между двумя опытными подгруппами на всех сроках наблюдения выявлено не было. В контрольной группе на протяжении всего срока наблюдения изменений по сравнению с данными, полученными по окончании третьего этапа эксперимента, выявлено не было.

По данным гистологического исследования, в ткани роговицы опытных животных присутствовали или остатки новообразованных сосудов, или сами сосуды без признаков их кровенаполнения. На всех сроках наблюдения между

подгруппами опытной группы различий не было выявлено. В контрольной группе, по результатам гистологии, наблюдали сформированное неоваскулярное бельмо роговицы. В опытных подгруппах прослеживалась тенденция к обратному развитию сформированного сосудистого русла в тканях роговицы в то время, как в контрольной неоваскулярное бельмо роговицы оставалось неизменным.

Результаты влияния белково-пептидного комплекса на активность НАДФ-оксидазы

Анализ продукции АФК, являющейся одной из основных функций нейтрофилов, обеспечивающих их противовоспалительный эффект, показал, что в крови животных опытных подгрупп наблюдалось достоверное снижение суммарной продукции АФК и амплитуды хемилюминесцентного ответа по сравнению с показателями в контрольной группе. Различий между подгруппами опытной группы выявлено не было.

Производство АФК в нейтрофилах, изолированных из очага воспаления в перитонеальной полости, также различалась в опыте и контроле. Ответ на бактериальный пептид N-формил-Met-Leu-Phe (fMLF), действующий через рецепторы, сопряженные с ГТФ-связывающим белком, в клетках животных опытной группы был значительно ниже по сравнению с контрольной. Кинетические параметры ответа были значительно ниже в клетках животных опытных подгрупп по сравнению с показателями в контрольной группе (таблица 4). Различий между подгруппами опытной группы выявлено не было. Результаты дали основание предполагать, что в клетках животных опытных подгрупп изменилась активность НАДФ-оксидазы, катализирующей образование супероксид-анион радикала, предшественника других АФК.

Таблица 4 – Параметры кинетических кривых в опытной и контрольной группах

	Опыт (% относительно контроля)	p (относительно контроля)
Амплитуда	48,3±24,2	0,0004
Суммарная продукция АФК	51,0±24,0	0,00045
Угол наклона	54,0±18,0	0,01

На основе анализа результата влияния БПК на активность НАДФН-оксидазы было сделано заключение, что общая фракция и фракция до 30 кДа изменяют активность внутриклеточных ферментов, что приводит к достоверному снижению суммарной продукции АФК нейтрофилами, как в периферической крови, так и в очаге воспаления.

Таким образом, в результате четвертого этапа работы данными инструментальных и лабораторных исследований было подтверждено обратное развитие сформированного неоваскулярного русла в роговице опытных животных. БПК общей фракции и фракции до 30кДа показал одинаковую эффективность в процессе лечения постожогового неоваскулярного бельма роговицы. В контрольной группе, несмотря на применение культуральной среды, содержащей в своем составе биологически активные цитокины, новообразованное бельмо роговицы оставалось без существенной динамики.

ВЫВОДЫ

1. Оценка эффективности влияния паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса на репаративные свойства роговицы в лечении модели центральной термической ожоговой травмы по результатам клинических и гистологических исследований показала, что применение БПК при центральных ожогах роговицы ускорило эпителизацию, которая завершилась на 3-и сутки после термического воздействия, восстанавливало пахиметрические показатели и гистологическую структуру роговицы к 7-м суткам, восстанавливало прозрачность к 14-м суткам, в отличие от группы контроля, где эпителизация роговицы завершилась к 7-м суткам, восстановления пахиметрических показателей и гистологической структуры не происходило, а прозрачность роговицы восстановилась к 30-м суткам.
2. Оценка эффективности паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса в профилактике постожогового ангиогенеза роговицы на модели периферической термической ожоговой травмы с повреждением лимбальной зоны показала, что применение белково-пептидного комплекса по результатам офтальмоскопии и гистологического исследования препятствует росту новообразованных сосудов из поврежденной лимбальной области в течение срока наблюдения 30 суток, в отличие от группы контроля, где рост новообразованных сосудов из поврежденной лимбальной области наблюдался на 14-е сутки, а к концу срока наблюдения 30 суток формировалось неоваскулярное бельмо роговицы.
3. Оценка эффективности применения паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса на модели хронической постожоговой неоваскуляризации роговицы показала, что применение белково-пептидного комплекса позволяет достичь обратного ангиогенеза сосудов роговицы, что проявляется в восстановлении прозрачности, толщины и приближении гистологической структуры роговицы

к исходным до химического повреждения значениям в отличие от группы контроля, где к концу срока наблюдения новообразованные сосуды оставались без динамики.

4. Сравнительный анализ эффективности применения общей фракций белково-пептидного комплекса и фракции до 30 кДа на модели хронической постожоговой неоваскуляризации роговицы в достижении обратного ангиогенеза сосудов роговицы показал, что, по данным офтальмоскопии и гистологического исследования, процесс инволюции новообразованных сосудов роговицы протекает идентично; к 30-м суткам, по данным инструментальных исследований, разница в показателях толщины роговицы составляет 1,1%, прозрачности роговицы – 0,4%, площади остаточного повреждения – 0,1%, что достоверно отличается от показателей в группе контроля ($p < 0,05$) и свидетельствует о сопоставимой эффективности обеих фракций.

5. Оценка активности никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ) оксидазы методом хемилюминисцентного анализа показала, что в опытной группе наблюдалось значительное снижение кинетических параметров ответа по сравнению с показателями в контрольной группе (скорость развития ответа – на 54,0% ($p = 0,01$), амплитуда суммарного хемилюминисцентного ответа – на 48,3% ($p = 0,0004$), продукция активных форм кислорода – на 51,0% ($p = 0,0004$)), что указывает на снижение активности НАДФ оксидазы и подавление воспалительного процесса при использовании белково-пептидного комплекса и обосновывает его применение для профилактики и лечения постожоговой неоваскуляризации роговицы.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Использование паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса в лечении термических и химических ожогов роговицы центральной и периферической локализации показало свою высокую эффективность в экспериментах на животных по сравнению со стандартными методами медикаментозной терапии, что может быть рекомендовано к проведению дальнейших исследований по изучению отдаленных результатов лечения и возможной комбинации с другими лекарственными препаратами и последующему внедрению в клиническую практику.
2. Использование паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса в профилактике и лечении постожоговой неоваскуляризации роговицы показало свою высокую эффективность в экспериментах на животных в сравнении с культуральной средой, необходимой для производства белково-пептидного комплекса, что может быть рекомендовано к проведению дальнейших исследований по изучению механизмов действия и активности паракринных факторов МСК.
3. На основе полученных данных о сопоставимой эффективности общей фракции и фракции до 30 кДа белково-пептидного комплекса рекомендованы дальнейшие исследования антиангиогенной активности фракции до 30 кДа.
4. Разработанная модель патологического постожогового ангиогенеза роговицы является легковоспроизводимой, позволяет добиться появления неоваскулярных сосудов в роговице уже к 7-м суткам, а к 14-м суткам сформировать устойчивое неоваскулярное бельмо и может быть рекомендована для изучения других звеньев неоваскулогенеза с целью их исследования на патофизиологическом уровне, а также для изучения эффективности воздействия различных лекарственных средств на процессы ангиогенеза.
5. Измерение активности НАДФ-оксидазы с помощью хемилюминисцентного анализа позволяет определить выраженность

воспалительного процесса и может быть рекомендовано к использованию в качестве метода оценки степени воспалительной реакции в поврежденных тканях роговицы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1. Белый Ю.А., Терещенко А.В., Темнов А.А., Кодунов А.М., Нечеснюк С.Ю., Склифас А.Н., Новоселов В.И., Демьянченко С.К. Лечение термического ожога роговицы препаратом пептидов в эксперименте. Катарактальная и рефракционная хирургия. 2015; 15(4): 44-50.**
- 2. Белый Ю.А., Терещенко А.В., Кодунов А.М., Склифас А.Н., Темнов А.А. Сравнительный анализ лечения термического ожога роговицы препаратами раствора пептидов и раствора антиоксидантов. Катарактальная и рефракционная хирургия. 2016; 16(2): 41-45.**
- 3. Терещенко А.В., Карадулева Е.В., Трифаненкова И.Г., Кодунов А.М., Темнов А.А., Склифас А.Н. Изучение влияния раствора пептидов на ткани роговицы на модели токсического кератита, осложненного неоваскуляризацией роговицы. Катарактальная и рефракционная хирургия. 2017; 17(1): 36-41.**
- 4. Кодунов А.М., Терещенко А.В., Трифаненкова И.Г. Лечение васкуляризированного постожогового бельма роговицы препаратом раствора пептидов. Современные технологии в офтальмологии. 2017; 4 (17): 115-118.**
- 5. Терещенко А.В., Трифаненкова И.Г., Кодунов А.М., Сидорова Ю.А., Ерохина Е.В., Темнов А.А. Изучение влияния раствора пептидов на ткани роговицы в модели токсического кератита, осложненного неоваскуляризацией роговицы. Современные технологии в офтальмологии. 2018; 3(23); 227-229.**
- 6. Tereshenko A., Temnov A., Trifanenkova I., Kodunov A., Sklifas A. Methods of treating keratitis and thermal burns in the cornea at various locations and areas with ligand-based peptides. New Front Ophthalmol. 2018; 4(4): 1-9.**

7. Терещенко А.В., Трифаненкова И.Г., Кодунов А.М., Темнов А.А., Склифас А.Н. Влияние препарата пептидов на постожоговые воспалительные процессы повреждённых тканей роговицы в эксперименте. *Acta Biomedica Scientifica*. 2019;4(4):30-35.
8. Малюгин Б.Э., Терещенко А.В., Антонова О.П., Гелястанов А.М., Васильева Е.А., Трифаненкова И.Г., Кодунов А.М., Демьянченко С.К. Изучение процессов репопуляции роговицы кролика эндотелиальными клетками при экспериментальном моделировании частичной трансплантации эндотелия и десцеметовой мембраны. *Офтальмохирургия*. 2019;4: 7-15.
9. Плахотный М.А., Кодунов А.М., Горина Е.В., Бояринцев В.В., Трофименко А.В. Влияние условий культивирования мезенхимальных стволовых клеток на их жизнеспособность при трансплантации в субретинальное пространство. *Биофизика*. 2020; 65(6): 1126–1134.
10. Кодунов А.М., Терещенко А.В., Трифаненкова И.Г., Темнов А.А., Склифас А.Н., Ерохина Е.В. Изучение влияния раствора пептидов на сформированное неоваскулярное бельмо роговицы в эксперименте. *Современные технологии в офтальмологии*. 2020; 4 (35): 267.
11. Кодунов А. М., Терещенко А. В., Трифаненкова И. Г., Темнов А. А., Склифас А. Н., Ерохина Е. В., Демьянченко С. К., Шацких А. В. Влияние раствора пептидов на процессы ангиогенеза роговицы крыс. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2021; 17 (2): 314-318.
12. Темнов А.А., Кодунов А.М., Терещенко А.В., Трифаненкова И.Г., Демьянченко С.К., Шацких А.В. Механизмы влияния кондиционированной среды культивированных стволовых клеток на развитие патологического ангиогенеза роговицы глаза в эксперименте. Тезисы докладов юбилейной международной научно-практической конференции «ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И.Бурназяна ФМБА России: 75 лет на страже здоровья». М.: ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 16-17 ноября, 2021. С.273-280.

13. 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. 2022; 19(4): 41-52.

ПАТЕНТ РФ НА ИЗОБРЕТЕНИЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Патент №2635540 Российская Федерация. Способ лечения васкуляризированного бельма роговицы вследствие ожоговой травмы глаза: № 2016145642: заявл. 22.11.2016: опубл. 13.11.2017 / Терещенко А.В., Кодунов А.М., Склифас А.Н., Темнов А.А. Заявитель и патентообладатель ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздрава России (RU). – Бюл. № 32. – 2 с.

БИОГРАФИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

Кодунов Алексей Михайлович, 1987 года рождения, в 2010 г. окончил Смоленскую государственную медицинскую академию по специальности «Лечебное дело». В период с 2010 по 2011 г. проходил обучение в интернатуре по специальности «Офтальмология» на базе МГМСУ им. Евдокимова. В 2011 году принят на должность врача-офтальмолога отделения лазерной хирургии «донной» патологии глаза Калужского филиала ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова», где работает по настоящее время.

Автор более 20 научных работ, 14 из которых опубликованы в журналах, рецензируемых ВАК РФ, имеет 2 публикации в зарубежных изданиях и 1 патент Российской Федерации на изобретение.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БПК – белково-пептидный комплекс

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

АФК – активная форма кислорода

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

TNF – фактор некроза опухоли

кДа – килодальтон

мм – миллиметр

нМ – нанометр

ОКТ – оптическая когерентная томография

УПК – угол передней камеры