

УСАНОВА ГАЛИНА ЮРЬЕВНА

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ
ТОКСИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ РОГОВИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ
В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

3.1.5 – офтальмология (медицинские науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2023

Диссертационная работа выполнена на базе Калужского филиала ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России и на базе Московского физико-технического института (МФТИ).

Научный руководитель: доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе Калужского филиала ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России
Трифаненкова Ирина Георгиевна

Научный консультант: доктор медицинских наук, заведующий лабораторией химического и биотехнологического синтеза, ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

Темнов Андрей Александрович
Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор, главный врач Глазного центра «Восток-прозрение»

Анисимова Светлана Юрьевна
доктор медицинских наук, профессор кафедры глазных болезней Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова, академик РАЕН

Калинников Юрий Юрьевич
Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России

Защита состоится «03» апреля 2023 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 «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Мушкова Ирина Альфредовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Стремительное развитие современной медицины, в том числе офтальмологии, привело к внедрению в клиническую практику широкого спектра лекарственных препаратов с высокой биологической активностью.

При назначении лекарственной терапии немаловажен аспект безопасности, токсичности и переносимости фармацевтических препаратов, что наряду с многочисленными дополнительными факторами формирует уровень приверженности пациентов к лечению, а также может влиять на клинико-функциональный результат терапии (Kastelan S.,2013; Mammo D.A. et al.,2020; Newman-Casey P.A. et al.,2015).

Многочисленные исследования демонстрируют цитотоксическое действие лекарственных средств, применяемых в офтальмологии, на структуры глазной поверхности. Токсическое влияние могут оказывать действующее вещество местных анестетиков (Patel M., Fraunfelder F.W.,2013), антибактериальных (Ayaki M. et al., 2012; Blavin J.,2012), противовоспалительных (Asai T. et al.,2006; Guidera A.C.,2001; Nagai N. et al.,2014), противогрибковых (Kimakura M. et al.,2014), гипотензивных препаратов (Aguayo Bonniard A.,2016). Однако, наибольший токсический эффект ассоциирован с прямым или опосредованным цитотоксическим действием консервантов, входящих в состав глазных капель (Goldstein M.H. et al.,2022).

В настоящее время самым распространенным консервантом является бензалкония хлорид. Многочисленные клинические и экспериментальные исследования подтверждают наличие токсического действия бензалкония хлорида на роговицу и другие структуры глазного яблока (Baudouin C.,2008,2017; Baudouin C. et al.,2021; Chung S.H. et al.2006; Debbasch C. et al.,2001; Goldstein M.H. et al.,2022; Tripathi V.J. Tripathi R.C.,1989;Ye J. et al.,2011). Для снижения риска реализации побочных эффектов со стороны глазной поверхности, закономерными являются рекомендации по подбору бесконсервантных аналогов

препаратов в схеме лечения у пациентов с хроническими заболеваниями глаз или с сопутствующей патологией роговицы.

В настоящее время активно ведутся поиски решения данной проблемы за счет создания бесконсервантных аналогов препаратов или создания новых менее токсичных консервантов, однако на современном фармацевтическом рынке диапазон препаратов, представленных в виде бесконсервантных форм, охватывает лишь единичные классы лекарственных средств (Антонова А.В., Николаенко В.П., Бржеский В.В. 2020). К тому же замена препарата на бесконсервантные аналоги повышает экономическую стоимость проводимого лечения (Goldstein M.H. et al.,2022).

Существует ряд нозологий офтальмологического профиля, когда отмена медикаментозного лечения или использование бесконсервантных аналогов не всегда представляется возможным, что определяет актуальность разработки новых подходов к лечению пациентов с патологией роговицы или пациентов, вынужденных находиться на длительной местной терапии офтальмологическими препаратами.

Приведенные выше положения определили актуальность и выбор цели данной диссертационной работы.

Цель настоящего исследования

Разработать технологию профилактики и лечения токсического повреждения роговицы с использованием сульфатированных гликозаминогликанов и оценить её эффективность в эксперименте.

Задачи исследования

1. Изучить жизнеспособность культуры клеток эпителия роговицы человека, выделенных из глаз трупов доноров и подтвердить эпителиальный фенотип клеток с использованием морфологического и иммуногистохимического анализа.

2. Исследовать пролиферативную активность клеток эпителия роговицы человека под влиянием различных концентраций сульфатированных гликозаминогликанов в эксперименте *in vitro*.
3. Определить наличие протекторного действия различных концентраций смеси сульфатированных гликозаминогликанов на культуру клеток эпителия роговицы человека в условиях токсического воздействия раствора бензалкония хлорида в эксперименте *in vitro*.
4. Оценить наличие местной токсичности смеси сульфатированных гликозаминогликанов и определить эффективность применения различных концентраций смеси сГАГ на репаративные процессы в роговице на модели механической эрозии в эксперименте *in vivo*, и определить наиболее эффективную концентрацию из диапазона исследуемых.
5. Разработать экспериментальную модель токсической эрозии роговицы кролика и изучить протекторное действие смеси сульфатированных гликозаминогликанов в условиях токсического воздействия бензалкония хлорида.

Научная новизна

1. На основании изучения пролиферативной активности клеток эпителия роговицы человека при воздействии различных концентраций смеси сульфатированных гликозаминогликанов в эксперименте *in vitro* впервые доказано стимулирующее влияние смеси на процессы деления клеток в исследуемой культуре.

2. Впервые выявлено наличие протекторных свойств смеси сульфатированных гликозаминогликанов на культуру клеток эпителия роговицы человека в условиях токсического воздействия раствора бензалкония хлорида в эксперименте *in vitro*.

3. На основании изучения репаративной активности клеток эпителия роговицы кролика при воздействии различных концентраций смеси сГАГ на

модели механической эрозии роговицы в эксперименте *in vivo*, определено стимулирующее влияние смеси на реэпителизацию эпителия роговицы.

4. Изучение функциональных свойств смеси сульфатированных гликозаминогликанов на клетки эпителия роговицы кролика в условиях токсического воздействия раствора бензалкония хлорида позволило обнаружить протекторное действие сульфатированных гликозаминогликанов в эксперименте *in vivo*.

Практическая значимость

В эксперименте обоснованы репаративные и протекторные свойства смеси сульфатированных гликозаминогликанов на культуре клеток в эксперименте *in vitro* и на различных экспериментальных моделях *in vivo*, что открывает перспективы для последующего внедрения в клиническую практику с целью профилактики и лечения сопутствующих заболеваний глазной поверхности у пациентов, находящихся на длительной медикаментозной терапии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработанная технология профилактики и лечения токсического повреждения роговицы, заключающаяся в инстилляции смеси сульфатированных гликозаминогликанов, позволяет ускорить репаративные процессы в роговице за счет наличия пролиферативной активности сульфатированных гликозаминогликанов на клетки эпителия роговицы.
2. Использование смеси сульфатированных гликозаминогликанов оказывает протекторное действие на клетки эпителия роговицы, что выражается в снижении клеточной гибели в культуре клеток при добавлении раствора бензалкония хлорида, а также замедлению клинико-морфологических изменений роговицы кролика при инстилляции раствора бензалкония хлорида.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены и обсуждены на X съезде Офтальмологов России (Москва 2015), на X Всероссийской научной конференции молодых ученых с участием иностранных специалистов "Актуальные проблемы офтальмологии" (Москва, 2015), научно-клинической конференции ФГАУ "МНТК "Микрохирургия глаза" им. акад. С.Н. Федорова (Москва 2016), 12th European Glaucoma Society Congress -2016 (Prague, Czech Republic), ESCRS 2016 Copenhagen Congress, XV Российском общенациональном офтальмологическом форуме (Москва 2022), 22-м Всероссийском научно-практическом конгрессе с международным участием «Современные технологии катарактальной, рефракционной и роговичной хирургии» (Москва 2022).

Внедрение результатов в практику

Результаты проведенных исследований внедрены в практику исследовательских работ в Калужском и Чебоксарском филиалах ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава РФ, в работе Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК Микрохирургия глаза», изложены в докладах на научно-практических конференциях, публикациях, кандидатской диссертации.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, из них 7 - в журналах, рецензируемых ВАК РФ.

Структура и объем диссертации

Текст диссертации изложен на 154 страницах, содержит 10 таблиц и иллюстрирована 15 рисунками. Работа состоит из введения и 4 глав, включающих обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты экспериментальных и морфологических исследований, содержит общее

заключение и выводы. Список использованной литературы включает 228 источников, из них- 51 отечественных и 177 иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Диссертационная работа представляет собой серию экспериментальных и морфологических исследований, которые направлены на изучение местной токсичности смеси сульфатированных гликозаминогликанов на структуры глазной поверхности (*in vivo*), изучению функционального влияния смеси сГАГ на культуру клеток эпителия роговицы человека (*in vitro*) и на различные экспериментальные модели глаз кроликов породы Шиншилла (*in vivo*). Смесь сГАГ состоит из хондроитин-4-сульфатов, хондроитин-6-сульфатов и кератансульфатов (ООО НЭП «Микрохирургия глаза»). Характеристики смеси сГАГ регламентированы регистрационным удостоверением ЛСР-008142/10-160810. Смесь сГАГ изучалась в виде образцов раствора различных концентраций (0,1%, 0,5% и 1%).

Серия экспериментальных исследований *in vitro*

Материалом для исследования *in vitro* послужили клетки переднего эпителия роговицы человека, выделенные из кадаверных глаз. Биоптат из лимба роговицы механически измельчали (1x1мм) и вносили в культуральные флаконы, дно которых было покрыто коллагеном 1 типа, и заливали ростовой средой. Клетки культивировались с использованием питательной среды DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки NuClone III, L-глутамин (4мМ) и антибиотиков пенициллин/стрептомицин (50 мкг/мл). Пассирование осуществляли с использованием раствора трипсина по достижению конфлюэнтности 92%.

Идентификация эпителиальных клеток. С ростом числа пассажей проводили идентификацию эпителиальных клеток и определение жизнеспособности по следующему протоколу: морфологическое исследование культуры методом световой микроскопии с фазовым контрастом (ФК) на инвертированном фазово-контрастном микроскопе Zeiss Axio Observer A1 (Zeiss, ФРГ); флуоресцентно-микроскопическое исследование с использованием флуоресцентного красителя DAPI (Invitrogen, США), окрашивающий А-Т регионы ДНК клеточных элементов; флуоресцентно-микроскопическое исследование со специфическим окрашиванием клеток моноклональными антителами на цитокератин 18 (СК18); фоторегистрация цифровой фотокамерой (Zeiss, ФРГ). В качестве контроля были использованы мезенхимальные стволовые клетки (МСК) жировой ткани. Посев клеток проводился аналогично с опытной группой.

Исследование пролиферативного и протекторного действия смеси сГАГ *in vitro*. Исследуемая клеточная культура эпителия роговицы человека 5-го пассажа была рассажена в лунки плоскодонного 24-луночного планшета в плотности $4,0 \cdot 10^4$ кл/лунка. Также, клеточная культура была рассажена в специальные планшеты для клеточного анализатора RTCA xCELLigence System в плотности $1,5 \cdot 10^4$ кл/лунка. Подсчет результатов производился (RTCA xCELLigence Software 2.0) в виде показателей клеточного индекса (КИ) через каждые 15 минут в автоматическом режиме. Через 48 часов проводилась смена среды с добавлением исследуемых растворов, согласно представленному дизайну исследования (Таб.1,2):

Таблица 1. Распределение опытных и контрольной групп в эксперименте *in vitro* при изучении пролиферативного действия смеси сГАГ

Экспериментальная группа	Раствор, добавляемый в культуральную среду
Опытная группа №1	сГАГ 0,1 %
Опытная группа №2	сГАГ 0,5 %
Опытная группа №3	сГАГ 1 %
Контрольная группа №1	Без добавления растворов

Таблица 2. Распределение опытных и контрольной групп в эксперименте *in vitro* при изучении протекторного действия смеси сГАГ

Экспериментальная группа	Раствор, добавляемый в культуральную среду
Опытная группа №4	сГАГ 0,1 % + БХ 0,01%
Опытная группа №5	сГАГ 0,5 % + БХ 0,01%
Опытная группа №6	сГАГ 1 % + БХ 0,01%
Контрольная группа №2	БХ 0,01%

Исследование пролиферативного и протекторного действия смеси сГАГ проводилось по следующему протоколу: морфологическое исследование культуры методом световой микроскопии с ФК (Zeiss, ФРГ); анализ клеточной пролиферации с помощью клеточного анализатора RTCA xCELLigence System (ACEA, США); фоторегистрация цифровой фотокамерой (Zeiss, ФРГ).

Серия экспериментальных исследований *in vivo*

Изучение местной токсичности смеси сГАГ, влияние смеси на ширину зрачка и уровень внутриглазного давления у кроликов. Изучение местной

токсичности смеси сГАГ проводили в хроническом опыте на 12 кроликах породы Шиншилла (24 глаз). У каждого кролика правый глаз был опытный, а левый глаз служил контролем. Все кролики были разделены и промаркированы на 3 опытные группы (12 глаз) и 1 группу контроля (12 глаз), согласно характеру проводимых инстилляций: В 1-ой опытной группе (4 глаза) инстиллировали 0,1% раствора смеси сГАГ 6 раз в день, во 2-ой опытной группе (4 глаза) - 0,5% раствора смеси сГАГ 6 раз в день, в 3-й опытной группе (4 глаза) - 1% раствора смеси сГАГ в 6 раз в день. В контрольной группе (12 глаз) - 0,9% раствора хлорида натрия. Срок наблюдения за животными составил 2 недели. Наблюдение за экспериментальными животными проводили на 1,3,7 и 14 сутки с использованием биомикроскопии переднего отрезка глаза с помощью щелевой лампы фирмы «Opton» (ФРГ) и окрашиванием 0,5% раствором флюоресцеина натрия «Novartis pharma» (Швейцария). На 1 и 14 сутки исследования проводили измерение диаметра зрачка (пупиллометрия), измерение уровня внутриглазного давления (ВГД).

Изучение влияние смеси сГАГ на модели тотальной механической эрозии роговицы в эксперименте in vivo. Экспериментальное исследование было выполнено на 60 кроликах (120 глаз) породы Шиншилла. Всем лабораторным животным под местной анестезией 0,3% раствора дикаина глазным шпателем проводилась скарификация переднего эпителия на всем протяжении роговицы. Все опытные животные были разделены на 3 опытные группы и группу контроля (парные глаза). В 1-ой опытной группе (20 глаз) выполняли инстилляцию 0,1% раствора сГАГ два раза в день, во 2-ой опытной группе (20 глаз) - 0,5% раствора сГАГ, в 3-й опытной группе (20 глаз) - 1% раствора сГАГ, в группе контроля физиологический раствор NaCl 0,9%. Клиническое наблюдение за животными проводилось ежедневно с интервалом 12 часов с использованием биомикроскопии переднего отрезка глаз животных (щелевая лампа «Opton», ФРГ) с окрашиванием 0,5% р-м флюоресцеина натрия и фоторегистрацией. Подсчет площади эпителиального дефекта проводился в программе Adobe Photoshop CS.

Изучение влияния смеси сульфатированных гликозаминогликанов на экспериментальной модели токсической эрозии роговицы.

Первый этап: изучение влияния 0,1% раствора бензалкония хлорида на клиничко-функциональное состояние роговицы у кроликов (моделирование токсической эрозии). Экспериментальное исследование было выполнено на 20 кроликах (40 глаз) породы Шиншилла. В опытной группе (20 глаз) ежедневно проводили 4-кратные инстилляции 0,1% раствора БХ; в контрольной группе (парные глаза каждого кролика - 8 глаз) - физиологического раствора NaCl 0,9% 4 раза в день. Динамическое наблюдение за животными проводили каждые 24 часа с использованием биомикроскопии переднего отрезка глаза с помощью щелевой лампы фирмы «Opton» (ФРГ), окрашивание роговицы 0,5% раствором флюоресцеина натрия «Novartis pharma» (Швейцария) и последующей фоторегистрацией, конфокальная микроскопия (КМ) роговицы на приборе Confoscan 4 (Nidek, Япония). Подсчет площади десквамированного эпителия проводился по полученным фотографиям в программе Adobe Photoshop CS.

Второй этап: изучение регенераторных и протекторных свойств сульфатированных гликозаминогликанов на экспериментальной модели токсической эрозии роговицы. Экспериментальное исследование было выполнено на 40 кроликах (80 глаз) породы Шиншилла. Для экспериментального моделирования токсической эрозии роговицы проводили инстилляции 0,1% раствора БХ 4 раза в день в течение 7 дней по отработанной ранее методике. После моделирования токсической эрозии роговицы все животные были разделены на 2 опытные и контрольную группы. В 1-ой опытной группе (20 глаз) продолжили инстилляцию 0,1% раствора БХ с добавлением инстилляций 0,5% раствора сГАГ. Во 2-ой опытной группе (20 глаз) - 0,5 % раствор сГАГ, инстилляцию раствора БХ были прекращены. В контрольной группе (40 глаз) инстиллировали физиологический раствор NaCl. Для клинической оценки зоны повреждения эпителия роговицы проводили биомикроскопию глаз животных (щелевая лампа «Opton», ФРГ) и окрашивание 0,5% р-м флюоресцеина натрия

(«Novartis pharma») с последующей фоторегистрацией. КМ роговицы проводили на приборе Confoscan 4 (Nidek, Япония), подсчет площади эпителиального дефекта проводился в программе Adobe Photoshop CS.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием компьютерных программ Statistica 13.3 («StatSoft», США) и Microsoft Office Excel 2007 («Microsoft», США). Характер распределения данных оценивали с помощью критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка, асимметрии и эксцесс. Данные с распределением отличным от нормального, представлены в формате Me (Q25; Q75), где Me – медиана, Q25, Q75 – нижний и верхний квартиль. Для количественных параметров для сопоставления двух групп использовали непараметрический критерий Манн-Уитни. Для сравнения данных в различные сроки наблюдения использовали критерий Уилкоксона. Статистически достоверными признавали различия, при которых уровень достоверности (p) $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты идентификации эпителиальных клеток

Культура клеток переднего эпителия роговицы формировала монослой, представленный популяцией округлых и полигональных клеток эпителиального фенотипа, плотно прилегающих друг к другу с единичными биполярными клетками фибропластического типа. В контрольной группе визуализировались гомогенные культуры клеток, характеризующиеся веретеновидной фибробластоподобной морфологией с четко различимым ядром, ядрышками и цитоплазматической перинуклеарной зернистостью. При флуоресцентно-микроскопическом исследовании с красителем DAPI визуализировалось равномерное распределение и идентичная интенсивность флуоресценции клеточных ядер в поле зрения во всех группах, при специфическом окрашивании на СК 18: в опытной группе у большинства клеток в поле зрения отмечалась позитивная реакция на Цитокератин 18, в группе контроля - негативная реакция.

Результаты исследования пролиферативного действия комплекса сГАГ на культуру эпителия роговицы человека в эксперименте *in vitro*

По истечении 48 часов от начала эксперимента показатели КИ во всех исследуемых культурах не имели статистического различия между собой. Через 2 часа после введения исследуемых растворов (50 часов от начала эксперимента) в опытной группе №1, №2, №3 отмечалось достоверное, статистически значимое увеличение показателей КИ по сравнению с группой контроля ($p=0,000003$, $p=0,000000$, $p=0,000000$, соответственно). Показатель КИ в опытной группе №2 был наибольшим- Ме 2,6454 (2,5813;2,7769), прирост показателей (ПП) составил 45,40%; в опытной группе №3 (сГАГ 1%) показатель КИ составлял Ме 2,5504 (2,5283;2,5782), ПП составил 39,17%, различия между показателями КИ в опытной группе №2 и опытной группе №3 были статистически значимыми ($p=0.001625$). В опытной группе №1(сГАГ 0,1%) и контрольной группе №1 показатели КИ и ПП были наименьшими и составляли Ме 2,3961(2,3530;2,4065), ПП -30,45% и Ме 2,1688(2,1567;2,1817); ПП- 17,67%, соответственно. При световой микроскопии с ФК во всех опытных группах были зафиксированы следующие изменения: клетки вытягивались, становились биполярными, приобретали фибробластоподобный фенотип, что свидетельствовало о вовлечении клеток в процесс эпителиомезенхимальной трансформации. Наличие делящихся клеток указывало на наличие пролиферативной активности в момент исследования, что подтверждает полученные результаты изменения КИ в различные сроки эксперимента. Через 3 часа от начала эксперимента в опытных группах №1, №2 и №3 показатели КИ последовательно повышались и оставались достоверно высокими в сравнении с контрольной группой ($p=0,000023$; $p=0,000001$; $p=0.000000$, соответственно). Наибольшие показатели КИ были отмечены в опытной группе с 1% сГАГ и составляли Ме 2,8578 (2,8419;2,8738), ПП составил -55,59%. В опытной группе №2 показатели КИ составляли Ме 2,6521 (2,5866;2,7921), ПП- 45,95%. Наименьшие показатели КИ были зарегистрированы в опытной группе №1 с 0,1% сГАГ и группе контроля №1, где данные показатели составляли Ме 2,5186 (2,4975;2,5922), ПП-38,37%, и Ме 2,3801 (2,3672;2,4084),

ПП -29,63%, соответственно. Во всех опытных группах через 51 час от начала эксперимента наблюдалось достижение пика пролиферативной активности и сохранность ее в течение последующих 1,5 часов наблюдения, вследствие чего эксперимент был прекращен.

Результаты изучения протекторного действия смеси сГАГ на культуру эпителия роговицы в условиях токсического воздействия раствора бензалкония хлорида в эксперименте *in vitro*

Через 1 час после введения исследуемых растворов (49 часов от начала эксперимента), в состав которых входил БХ, во всех опытных группах и группе контроля отмечалось резкое снижение показателей КИ. Показатели КИ в опытной группе №4, опытной группе №5 и опытной группе №6 были достоверно выше, чем в группе контроля ($p=0,000222$, $p=0,000148$ и $p=0,000148$, соответственно). Наибольшие показатели были в опытных группах №6 – Me 1,3534(1,3070;1,3720) (снижение показателей по сравнению с исходными данными на 26,62%) и опытной группе №5 – Me 0,9134 (0,8992;0,9250) (снижение показателей - 50,24%). В опытной группе №4 и контрольной группе №2 показатели КИ были наименьшими, а снижение показателей по сравнению с исходными данными – наибольшими: Me 0,8812 (0,8729;0,8814), (снижение показателей- 52,70%) и Me 0,7083 (0,6804;0,7388), (снижение показателей- 60,60%), соответственно. Показатели в опытной группе №4 и в опытной группе №5 не имели статистически значимых различий ($p=0.49954$). Через 2 часа после введения исследуемых образцов (50 часов от начала эксперимента) показатели КИ в опытной группе №6 оставались достоверно выше в сравнении с группой контроля ($p=0,000148$) и составляли Me 0,2830 (0,27810;0,2944) (снижение показателей по сравнению с исходными данными 84,83%). В опытной группе №5 (0,5% сГАГ) показатели КИ составляли Me 0,1587 (0,1477;0,1669) (снижение показателей - 91,59%). Наименьшие показатели КИ отмечались в опытной группе №4(0,1% сГАГ) и группе контроля №2, где данные показатели составляли Me 0,0749 (0,0699;0,0866) (снижение показателей- 95,92%) и Me 0,0749 (0,0700;0,0814) (снижение

показателей- 95,93 %) соответственно. Через 3,5 часа с момента введения исследуемых растворов в опытных и контрольной группах при световой микроскопии с ФК жизнеспособные клетки не визуализировались, вследствие чего эксперимент был прекращен.

Результаты изучения местной токсичности смеси сГАГ в эксперименте

Во всех опытных группах №1, №2, №3 и группе контроля за весь период наблюдения (2 недели) глаза оставались спокойные, признаков токсико-аллергической реакции со стороны переднего отрезка глаза выявлено не было. Конъюнктивка век и глазного яблока сохраняли нормальную окраску, гиперемии не отмечалось, роговица во все сроки сохраняла свою прозрачность, раствором флюоресцеина не окрашивалась, рисунок радужки не изменялся, хрусталик оставался прозрачный, рефлекс с глазного дна был розовый. Показатели пупиллометрии и уровня ВГД оставались без изменений.

Результаты изучения влияния смеси сГАГ на модели механической эрозии роговицы в эксперименте *in vivo*

Сразу после скарификации во всех экспериментальных группах глазная щель была сужена, глаза раздражены с явлениями перикорнеальной инъекции. Во всех опытных группах зона десквамации занимала всю площадь поверхности роговицы и прокрашивалась 0,5% раствором флюоресцеина натрия, площадь десквамации эпителия не имела статистически значимой разницы между группами. Через 12 часов в опытной группе №1 и опытной группе №2 площадь десквамации была наименьшей, и составляла Me 91,70 (88,26;95,66) мм² и Me 93,15 (89,02;96,03) мм², соответственно, статистически значимой разницы между группами выявлено не было ($p=0.60$). В опытной группе №3 площадь дезэпителизированной роговицы составляла Me 95,36 (94,08;98,64) мм², а в группе контроля Me 98,02 (96,99;98,94) мм² ($p=0.03$). Через 36 часов наибольшим по площади дефект эпителия сохранялся в опытной группе №3 и в контрольной группе и составлял Me 68,74 (67,01;70,22) мм² и Me 69,64 (68,01;70,17) мм²,

соответственно. Различия между показателями опытной группы №3 и контрольной группой статистически значимы не были ($p=0,45$). В опытной группе №1 и №2 зона эрозии сократилась по площади и составляла Ме 59,06 (57,18;63,24) мм² и Ме 61,12 (58,65;63,66) мм², соответственно, что достоверно отличалось от показателей площади зоны роговицы в опытной группе №3 и группой контроля ($p<0,05$), статистически значимой разницы между показателями опытной группы №1 и опытной группой №2 не отмечалось ($p=0.303$). Через 60 часов от начала эксперимента в группе контроля реэпителизация роговицы проходила концентрично лимбу, сохранялся дефект эпителия в центральной зоне роговицы и по площади составлял Ме 40,18 (39,15;41,02) мм². Дефект эпителия в контрольной группе был достоверно больше в сравнении со всеми опытными группами ($p<0,05$). Через 108 часов наблюдения площадь дефекта эпителия роговицы составляла Ме 1,83 (1,59;2,01) мм², полное восстановление прозрачности и целостности эпителия во всех контрольных глазах было отмечено через 5 суток от начала эксперимента (120 часов). В 3-й опытной группе через 60 часов отмечалось сокращение площади зоны десквамации до 29,26 (29,99;30,14) мм², полная эпителизация с восстановлением прозрачности роговицы наступила через 96 часов от начала эксперимента. В 1-ой опытной группе через 60 часов от начала эксперимента зона дезэпителизации составляла Ме 17,34 (16,21;19,85) мм², полная эпителизация наступила через 84 часа от начала эксперимента. Во 2-й опытной группе через 60 часов от начала эксперимента зона десквамации эпителия была наименьшей – Ме 12,45 (9,78;15.05) мм², полная эпителизация с восстановлением прозрачности роговицы была зарегистрирована через 84 часа.

Результаты экспериментального исследования влияния 0,1% раствора бензалкония хлорида на состояние роговицы у кроликов

Во все сроки наблюдения в группе контроля глаза оставались спокойные без признаков раздражения, раствором флюоресцеина натрия не окрашивались. При КМ отклонений от нормы выявлено не было. В опытной группе характер изменений глазной поверхности носили дозозависимый характер. Через 24 часа в

опытной группе глаза оставались спокойные, клинико-функциональных изменений роговицы выявлено не было. Через 96 часов от начала эксперимента в опытной группе у всех животных отмечались признаки умеренного раздражения, которые проявлялись в виде слезотечения и блефароспазма. При биомикроскопии отмечалась умеренная конъюнктивальная инъекция, прокрашивались единичные точечные очаги эпителия во всех опытных глазах. Площадь прокрашивания составляла $3,81 \pm 1,22$ мм². Через 120 часов при биомикроскопии переднего отрезка глаз отмечалась умеренная конъюнктивальная инъекция, шероховатость роговицы, в центральной зоне отмечались поверхностные очаги десквамации эпителия роговицы в виде мелкоточечных множественных очагов прокрашивания раствором флюоресцеина, суммарная площадь составляла $76,66 \pm 5,39$ мм². По данным КМ отмечалось появление в поверхностных слоях эпителия клеток с неполной прозрачностью цитоплазмы, единичные десквамированные эпителиоциты с гиперрефлекторными ядрами с некоторой размытостью межклеточных границ. В стромальных отделах и эндотелиальном слое роговицы морфологическая картина не имела существенного отличия от группы контроля. На 7 сутки эксперимента (144 часа) сохранялись слезотечение и блефароспазм у всех опытных животных. Конъюнктивa всех глаз была отечна, гиперемирована. Отмечалось снижение прозрачности, за счет умеренного отека поверхностных слоев стромы, при окраске раствором флюоресцеина роговица диффузно прокрашивалась в виде мелкоточечной диффузной эпителиопатии, площадь повреждения составляла $134,40 \pm 1,22$ мм², что занимало всю поверхность роговицы (показатели не имели статистически значимой разницы с площадью роговицы до начала эксперимента во всех опытных глазах и группе контроля, $p=0,507$). По данным КМ роговицы было зафиксировано наличие во всех опытных глазах повышенной десквамации эпителия и псевдокератинизации. В поверхностном слое эпителия роговицы отмечалась размытость межклеточных границ с повышенной рефлективностью ядер и цитоплазмы клеток, наблюдались единичные эпителиальные дефекты. В передних слоях стромы роговицы наблюдались явления клеточного стромального отека, что проявлялось в виде

повышения рефлективности ядер и цитоплазмы кератоцитов и визуализации их отростков, отмечалось снижение прозрачности экстрацеллюлярного матрикса и увеличение количества активных кератоцитов. Морфологическая картина глубоких стромальных и эндотелиального слоев роговицы не имела существенного отличия от группы контроля. Отмена раствора БХ после 7-дневных инстилляций приводило к полному восстановлению морфологической структуры роговицы и купированию видимых признаков воспаления через 144 часа. Продолжение инстилляций раствора БХ более 7 суток вызывало нарастание клинической симптоматики повреждения глазной поверхности. На 14-е сутки наблюдения во всех опытных глазах отмечался выраженный хемоз конъюнктивы, диффузный отек всех слоев роговицы, концентрично лимбу отмечается рост поверхностных сосудов по направлению к оптической зоне на 2мм, изменения глазной поверхности приобретали характер необратимых, эксперимент был прекращен.

Результаты изучения влияния смеси сГАГ на экспериментальной модели токсической эрозии роговицы кролика в эксперименте *in vivo*

При моделировании токсической эрозии роговицы проводили двукратные инстилляциии 0,1% раствора БХ в течение 7 дней по отработанной ранее методике. Через 24 часа от начала эксперимента во всех экспериментальных группах отмечались признаки раздражения, сохранялось слезотечение, светобоязнь. Наименьшая по площади зона дезэпителизированной роговицы наблюдалась в 1-ой и 2-ой опытной группах и составляла Me 46,50 (43,75;48,39) мм² и Me 15,00 (14,15;15,93) мм², соответственно. Различие между показателями опытной группы №1 и опытной группой №2 были статистически значимы (p<0.05). Через 36 часов наблюдения в 1-ой опытной группе зона дезэпителизированной роговицы составляла Me 34,07 (33,04;36,53) мм², через 48 часов зона дезэпителизации составляла Me 26,08 (25,02;27,44) мм. Во все сроки наблюдения показатели площади дезэпителизации роговицы были достоверно ниже в сравнении с группой

контроля ($p < 0,05$). Полная эпителизация с восстановлением прозрачности роговицы наступила через 120 часов. Во 2-й опытной группе через 24 часа от начала эксперимента зона десквамации эпителия была наименьшей, и составляла $Me\ 15,00\ (14,15;15,93)$ мм², достоверно ниже в сравнении с группой контроля ($p < 0,05$), полная эпителизация наступила через 48 часов от начала эксперимента, на КМ через 48 часов наблюдения отмечалось восстановление морфологической структуры переднего эпителия роговицы, визуализировались клетки правильной формы, с четкими границами без патологической рефлексивности ядер и цитоплазмы. При изучении поверхностных слоев стромы отмечалось восстановление прозрачности экстрацеллюлярного матрикса, снижение количества активированных кератоцитов, сохранялась визуализация отростков единичных кератоцитов. В задних стромальных отделах и эндотелиальном слое роговицы изменений выявлено не было. При наступлении полной эпителизации роговицы и восстановления её морфологической структуры эксперимент был прекращен. В контрольной группе во все сроки наблюдения площадь дезэпителизации роговицы была достоверно больше, чем во всех опытных группах ($p < 0,05$). Через 24 часов сохранились признаки умеренного раздражения, которые проявлялись в виде смешанной инъекции конъюнктивы, отека поверхностных слоев стромы роговицы, зона дезэпителизации сократилась до $95,59\ (94,60;97,22)$ мм². На КМ сохранялись признаки повышенной десквамации эпителия роговицы, отмечалось количественное снижение эпителиальных клеток, остальные эпителиоциты были с гиперрефлексивной цитоплазмой и ядром. В передних отделах стромы сохранялась низкая прозрачность экстрацеллюлярного матрикса с повышенным скоплением активированных кератоцитов. Через 48 часов наблюдения зона десквамации сократилась до $Me\ 78,76\ (76,21;80,60)$ мм², полное восстановление прозрачности роговицы с закрытием эпителиальных дефектов наступило через 132 часа.

По результатам 4 главы была последовательно проанализирована эффективность влияния инстилляций раствора смеси сГАГ на инертную роговицу лабораторных животных, проведено комплексное клинико-функциональное

исследование по определению токсичности смеси и влиянию смеси сГАГ на репаративные свойства роговицы кролика. На основании полученных данных была определена наиболее эффективная концентрация смеси сГАГ с наиболее выраженными регенераторными свойствами, которая последовательно была применена в следующей серии экспериментального исследования. На разработанной модели токсической эрозии роговицы по данным клинко-функционального исследования установлено, что помимо выраженного репаративного действия, возможен механизм протекторного действия сГАГ в условиях воздействия токсических веществ.

ВЫВОДЫ

1. Клетки культуры эпителия роговицы, культивированные с использованием питательной среды DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки NuClone III, L-глутамина (4мМ) и антибиотиков пенициллин/стрептомицин (50 мкг/мл) жизнеспособны, имеют эпителиальный фенотип и положительную реакцию на СК 18, что изучено с использованием морфологического исследования методом световой микроскопии с фазовым контрастом, флуоресцентно-микроскопического исследования с использованием флуоресцентного красителя DAPI и со специфическим окрашиванием клеток моноклональными антителами на цитокератин 18 (СК18).

2. Введение смеси сГАГ в культуральную среду вызывает достоверное увеличение пролиферативной активности эпителиальных клеток во всех опытных группах по сравнению с группой контроля. Сравнительный анализ показателей клеточного индекса в разных опытных группах указывает на более выраженное пролиферативное действие сГАГ в концентрации 0,5% и 1% из диапазона исследуемых.

3. Введение сульфатированных гликозаминогликанов в культуральную среду может оказывать протекторное действие на клетки эпителия роговицы человека в условиях токсического действия, что выражается в снижении клеточной гибели. При сравнительном анализе полученных данных выявлено,

что достаточное протекторное действие в условиях клеточной культуры оказывает исследуемый раствор сульфатированных гликозаминогликанов в концентрации 1%.

4. Смесь сГАГ в концентрации 0,1%, 0,5% и 1% не оказывает токсико-аллергического воздействия на роговицу, не оказывает влияния на ширину зрачка, уровень внутриглазного давления и не обладает цитотоксичностью. Инстилляцией сГАГ в диапазоне исследуемых концентраций ускоряют реэпителизацию роговицы, а сроки полной эпителизации и восстановления прозрачности роговицы позволяют предположить, что использование раствора сГАГ в концентрации 0,5% является наиболее эффективным в эксперименте *in vivo*.

5. Разработанная экспериментальная модель токсической эрозии роговицы, заключающаяся в инстилляцией 0,1% раствора БХ 4 раза в день в течение 7 дней в конъюнктивальную полость кролика, позволяет в короткие сроки получить устойчивые во временных параметрах изменения роговицы обратимого характера. Изучение регенераторных и протекторных свойств сГАГ на разработанной модели токсической эрозии роговицы показало, что раствор смеси сГАГ в концентрации 0,5% стимулирует репаративную регенерацию в клетках эпителия роговицы, а сроки эпителизации позволяют предположить наличие выраженного протекторного действия смеси сГАГ, так как эпителизация на фоне инстилляций сГАГ в условиях токсического воздействия БХ наступила в более короткие сроки, чем в группе контроля.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Использование питательной среды DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки NuClone III, L-глутамин (2,5мМ) и антибиотиков пенициллин/стрептомицин (50 мкг/мл) при культивировании клеток возможно, но требует дополнительного этапа идентификации перед основным

экспериментом, включающим изучение морфологического фенотипа клеток, определение их жизнеспособности и флуоресцентно-микроскопическое исследование со специфическим окрашиванием клеток моноклональными антителами на СК18, так как эпителиальные клеточные линии имеют слабую сохранность фенотипа и могут вовлекаться в процесс эпителиально-мезенхимальной трансформации.

2. Использование прибора RTCA xCelligence при изучении протекторных свойств и влияния различных растворов на пролиферацию клеток позволяет в режиме реального времени, без использования красителей и других дополнительных методов оценивать жизнеспособность клеточных культур, а также производить точный расчет показателей числовых значений клеточного индекса для дальнейшего статистического анализа, полученных результатов.

3. Разработанная экспериментальная модель токсической эрозии роговицы, заключающаяся в 4-кратных инстилляциях 0,1 % раствора бензалкония хлорида в течение 7 дней, легко воспроизводима, неинвазивна, не требует выведения животных из эксперимента и позволяет обосновать применение различных растворов для лечения и профилактики токсического повреждения роговицы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Терещенко А.В., Белый Ю.А., Петерсен Е.В., Тахчиди Е.Х., Новиков С.В., Усанова Г.Ю. Исследование воздействия комплекса сульфатированных гликозаминогликанов на культуру эпителия роговицы человека *in vitro* //Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. –2016. –Т. 21.–№4.–С. 1672-1677.

2. Терещенко А.В., Белый Ю.А., Тахчиди Е.Х., Новиков С.В., Майчук Н.В., Усанова Г.Ю. Лечение токсической эрозии роговицы с применением раствора сульфатированный гликозаминогликанов (сГАГ) в эксперименте //

Вестник Тамбовского университета. – Серия: Естественные и технические науки. – 2016. – Т. 21. – № 4. – С. 1686-1691.

3. Терещенко А.В., Белый Ю.А., Тахчиди Е.Х., Новиков С.В., Майчук Н.В., Усанова Г.Ю. Экспериментальное обоснование применения раствора сульфатированных гликозаминогликанов (сГАГ) в лечение токсической эрозии роговицы у кролика // Практическая медицина. – 2016. – № 2-1 (94). – С. 108-112.

4. Терещенко А.В., Белый Ю.А., Петерсен Е.В., Тахчиди Е.Х., Новиков С.В., Усанова Г.Ю. Изучение протекторного действия комплекса сульфатированных гликозаминогликанов на культуру клеток эпителия роговицы человека при токсическом воздействии раствора бензалкония хлорида в эксперименте *in vitro* // Катарактальная и рефракционная хирургия. – 2016. – Т. 16. – № 1. – С. 51-56.

5. Тахчиди Е.Х., Новиков С.В., Усанова Г.Ю. Определение репаративной активности раствора сульфатированных гликозаминогликанов в эксперименте (предварительные результаты) // В книге: X Съезд офтальмологов России. – 2015. – С. 100-101.

6. Мушкова И.А., Майчук Н.В., Тахчиди Е.Х., Васютин П.Ю., Усанова Г.Ю. Оценка состояния глазной поверхности (ГП) у пациентов с компенсированной первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ) // В книге: X Съезд офтальмологов России. – 2015. – С. 93а.

7. Терещенко А.В., Белый Ю.А., Тахчиди Е.Х., Новиков С.В., Майчук Н.В., Усанова Г.Ю. Экспериментальное исследование влияния 0,1% раствора бензалкония хлорида на состояние роговицы у кроликов // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2015. – № 12 (187). – С. 238-243.

8. Тахчиди Е.Х., Новиков С.В., Усанова Г.Ю. Динамика репаративных процессов в роговице на фоне применения липосомальной эмульсии сульфатированных гликозаминогликанов в эксперименте (предварительные результаты) // Новости глаукомы. – 2015. – № 1 (33). – С. 160-162

9. Трифаненкова И.Г., Петерсен Е.В., Новиков С.В., Усанова Г.Ю. Изучение воздействия комплекса сульфатированных гликозаминогликанов на

пролиферацию клеток эпителия роговицы человека в эксперименте *in vitro* // Аспирантский вестник Поволжья.- 2022;22 (2):56-61

10. Трифаненкова И.Г., Темнов А.А., Новиков С.В., Усанова Г.Ю. Сравнительный анализ пролиферативной активности клеток эпителия роговицы при воздействии различных концентраций смеси сульфатированных гликозаминогликанов (сГАГ) в эксперименте *in vitro*// В книге: XV Российский общенациональный офтальмологический форум.-2022.- Том №2.- С.441-445

11. Трифаненкова И.Г., Тахчиди Е.Х., Темнов А.А., Новиков С.В., Усанова Г.Ю. Сравнительный анализ протекторного действия сульфатированных гликозаминогликанов на клетки эпителия роговицы в условиях токсического воздействия в эксперименте *in vitro* // Патогенез. –2023 – Т. 21. –№1. –С. 25-30

12. A.V. Tereshenko, Y.A. Belyu, E.K. Takhchidi, E.V. Petersen, S.V. Novikov, G.Y. Usanova Cytoprotective effect of sulfated glycosaminoglycans (sGAGs) on human corneal epithelial cells exposed to benzalkonium chloride (BAK) *in vitro*// 12th European glaucoma society (EGS) congress.- Prague, 2016. (электронный ресурс)

13. Y.A. Belyu, A.V. Tereshenko, E.K. Takhchidi, S.V. Novikov, G.Y. Usanova (Russia) Study of reparative processes in the rabbit corneal epithelium during treatment with sulfated glycosaminoglycans (sGAGs) *in vivo* // 12th European glaucoma society (EGS) congress.- Prague, 2016. (электронный ресурс)

14. A.V. Tereshenko, Y.A. Belyu, E.K. Takhchidi, E.V. Petersen, S.V. Novikov, G.Y. Usanova The effect of sulfated glycosaminoglycans (sGAG) on human corneal epithelial cells proliferation // XXXIV Congress of the European Society of Cataract and Refractive Surgeons (ESCRS). – Copenhagen, 2016. (электронный ресурс)

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БХ – бензалкония хлорид

ВГД – внутриглазное давление

ДНК- дезоксирибонуклеиновая кислота

КИ – клеточный индекс

КМ – конфокальная микроскопия

ПП – прирост показателей

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

сГАГ – сульфатированные гликозаминогликаны

ФК – фазовый контраст

ЦК (англ. СК) 18 – цитокератин 18

БИОГРАФИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

Усанова Галина Юрьевна, 1988 года рождения, в 2011 г. окончила Московский государственный медико-стоматологический университет (МГМСУ) им Е.А. Евдокимова по специальности «Лечебное дело». В период с 2011-2013 гг. проходила обучение в ординатуре по специальности «Офтальмология» на базе МГМСУ им. Е.А. Евдокимова. В период с 2013-2016 гг. проходила обучение в очной аспирантуре на базе ФГАУ «НМИЦ «МНТК Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Федорова». С 2015 г. работала врачом-офтальмохирургом в АО «Клиника К+31», с 2019 г. работала в ООО «Центр Микрохирургия глаза» врачом-офтальмохирургом, зав. отделением. В настоящее время является младшим научным сотрудником отдела хирургии глаукомы ФГАУ «НМИЦ «МНТК Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова». Автор 20 научных работ, 7 из которых опубликованы в журналах ВАК РФ, имеет 3 публикации в зарубежных изданиях и 3 патента РФ на изобретение.