

С.И. Анисимов

*Глазной центр  
«Восток-Прозрение», Москва*

модуляторами роста соединительной ткани, способствующими клеточной адгезии и специфическому связыванию факторов роста и молекул, необходимых для тканевой реконструкции [1, 4, 15, 18]. Благодаря высокому отрицательному заряду сГАГ хорошо связывают воду и таким образом регулируют водно-солевой обмен в тканях [8, 19]. Активно связывая молекулы коллагена

I типа, выделенный из твердой мозговой оболочки свиней [14, 19].

Полученный кислоторастворимый коллаген диализовали против дистиллированной воды и в концентрации 2%, pH 7,3 (10 мл) помещали в пластиковые плашки, после чего в каждую из них добавляли хондроитин сульфат в дозе 5,0 мкг/мл и инкубировали в течение 24 ч в термостате «Division Lab

## ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРОТЕКЦИИ ТКАНЕЙ ГЛАЗА С ПРИМЕНЕНИЕМ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

**П**роблемы изучения способов защиты и репарации тканей глаза остаются наиболее актуальными и до конца не изученными [2, 5].

Результаты клинических исследований, проведенных до 70-х гг. прошлого столетия, показали необходимость разработки способов защиты и усиления репарации поврежденных в результате операций или медикаментозного лечения тканей глаза, так как во время этих вмешательств происходят изменения во всех слоях роговицы, фиброзные изменения конъюнктивы, склеры и других структур глаза [6, 9].

Делались попытки применять для защиты роговицы растворы гиалуроновой кислоты, фибронектина или аутосыворотки [6, 10, 11, 13, 15]. Однако от их применения в широкой клинической практике быстро отказались из-за неоднозначности результатов и слишком высокой стоимости [20].

Исследования последних лет показали, что перспективными для защиты тканей глаза являются растворы, содержащие сульфатированные гликозаминогликаны (сГАГ) [11]. Известно, что сГАГ являются

на, сГАГ роговицы формируют ортогональную ламеллярную структуру стромы роговой оболочки [3]. Они же играют важную роль в организации экстрацеллюлярного матрикса, а именно процесса связывания протофибрилл коллагена I и II типа [19]. В комплексе с коллагеном, эластином и неколлагеновыми белками они определяют такие ее свойства, как прочность и эластичность [1, 7].

Цель настоящей работы – изучение механизмов воздействия сГАГ на процессы защиты и репарации тканей глаза в эксперименте.

### Материал и методы

В работе использовали разработанный ООО «Дубна-Биофарм» (Россия) протектор тканей глаза «Оквис» 0,3% на основе хондроитин сульфата (ХС), сбалансированного солевого раствора и гидроксизтилцеллюлозы (регистрационное удостоверение № ФС 01262006/3576-06).

Для исследования биологического воздействия сГАГ – ХС в составе препарата «Оквис» на солибилизированный коллаген в системе *in vitro* использовали коллаген

Со» (США). Контрольные образцы инкубировали без добавления сГАГ.

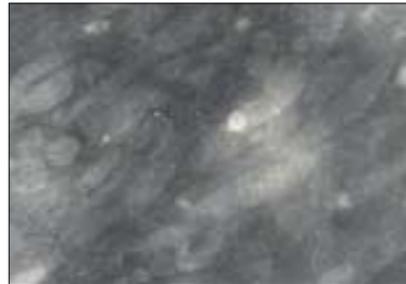
Через 24 ч все образцы (по 0,1 мл каждый) помещали в стеклянные пробирки и проводили в восходящем ряду раствора хлорида натрия (от 0,5 до 1,5 моль), спирта, окрашивали осмием и фиксировали в 0,25% глутаральдегиде.

Электронно-микроскопические исследования проводили на электронном микроскопе «JEOL MX-100» (Япония).

Далее, с целью изучения влияния протектора на репарацию роговицы, *in vivo* кроликам породы шиншилла (10 подопытных животных и 10 животных контрольной группы) наносили радиальные несквозные надрезы на роговицу. В течение семи дней после операции животным опытной группы инстиллировали 0,3% раствор «Оквис» один раз в сутки. Животным контрольной группы делали инстилляции физиологического раствора. Надрезы наносили после внутримышечной инъекции 0,5 мл 5-процентного раствора кетамина, эпibuльбарной инстилляции однопроцентного раствора дикаина, после чего дополнительно ретробульбарно вводили 0,5 мл дву-



**Рис. 1.** Электронно-микроскопическая картина фрагмента твердой мозговой оболочки. Волокна коллагена с характерной поперечной исчерченностью, плотно упакованы. Межуточное вещество свободно от включений. Ув.  $\times 12000$



**Рис. 2.** Электронно-микроскопическая картина фрагмента фиксированного раствора коллагена I типа, после 24-часовой инкубации в 0,15 М фосфатном буфере. Ув.  $\times 12000$



**Рис. 3.** Электронно-микроскопическая картина фрагмента фиксированного раствора коллагена I типа, после 24-часовой инкубации в 0,15 М фосфатном буфере, с добавлением ХС. Коллагеновое волокно в стадии сборки, с характерной исчерченностью 64-68 нм, плотно упаковано. Ув.  $\times 20000$

процентного раствора лидокаина. Через 7, 14 и 21 день животных выводили из эксперимента высокими внутривенными дозами однопроцентного раствора тиопентала натрия и воздушной эмболией (в соответствии с приказом МЗ РФ).

Роговицы вырезали ножницами, отступив на 2-3 мм от края лимба, промывали фосфатным буфером (0,01 моль, pH 7,0), проводили в восходящем ряду спиртов и фиксировали. Кусочки ткани иссекали блоками в области насечек. После этого готовили рутинные гистологические препараты. Препараты изучали и фотографировали на фото-микроскопе «Mild-Leitz» (Германия).

## Результаты и обсуждение

Исследования *in vitro* показали, что ХС прямо влияет на процесс сборки коллагеновых фибрилл.

На рис. 1 представлен фрагмент нативной твердой мозговой оболочки. Видна структура стромы с характерно очерченными волокнами коллагена. Через 24 ч после выделения и растворения коллагена в 0,005% уксусной кислоте, забуференной фосфатами, картина резко меняется.

На рис. 2 показан результат электронно-микроскопического исследования растворенного коллагена на твердой мозговой оболочке I типа. Видно, что коллаген стромы

твердой мозговой оболочки разволокнен, полностью потерял свою характерную исчерченную структуру и упаковку волокон. Такой коллаген традиционно называют деструктурированным или телопептидным тропоколлагеном. Часть волокон сохраняет структурную целостность, но без характерной плотности и исчерченности.

В то же время препараты с добавлением ХС отличаются от препаратов раствора коллагена. Так, на рис. 3 показан результат добавления ХС к раствору телопептидного тропоколлагена.

На другом поле (рис. 4) этого же образца, но ближе к поверхностным слоям, пучки коллагена формируют плотную структуру, подобную нативной ткани. Часть волокон полностью собрана в пучки, другая часть – в стадии сборки. Наиболее интенсивное образование волокон и пучков отмечается в поверхностных слоях образцов, что свидетельствует о высокой скорости их формирования и дозозависимом эффекте ХС.

Таким образом, при исследовании биологической активности ХС в данной серии экспериментов было выяснено, что ХС оказывает прямое воздействие на раствор тропоколлагена I типа, формируя волокна коллагена и собирая их в плотные пучки.

Под действием физико-химической обработки нативная ткань де-

структурирует, и волокна коллагена раскручиваются. Деструкция неколлагеновых белков, расположенных на волокнах, приводит к открытию активных сайтов на поверхности коллагенового волокна, например, при повреждении ткани, когда под действием протеолитических ферментов разрушается строма ткани, и в ране появляются свободные сГАГ и остатки коллагеновых волокон, которые могут спонтанно собираться и связываться путем электростатического взаимодействия. Данный механизм сборки может иметь место при процессах фибрилlogenеза в системе *in vivo*, при репарации соединительной ткани.

Сформированный комплекс коллаген-сГАГ является биологически активным и проявляет следующие свойства. Во-первых, сГАГ, взаимодействуя с коллагеном, формирует огромное рецепторное поле, что создает условия для защиты волокон коллагена от действия ферментов. Во-вторых, такой комплекс способен индуцировать продукцию факторов роста, модулировать клеточный ответ синтезом новых белков и протеогликанов и таким образом сформировать новый временный матрикс межтучного вещества или экстрацеллюлярного матрикса, что особенно важно при повреждениях тканей глаза.

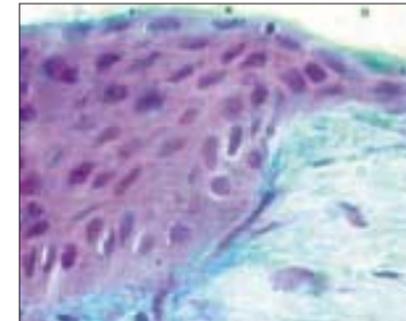


**Рис. 4.** Электронно-микроскопическая картина фрагмента фиксированного раствора коллагена I типа, после 24-часовой инкубации в 0,15 М фосфатном буфере, с добавлением ХС. Коллагеновое волокно в стадии сборки, с характерной исчерченностью 64-68 нм, плотно упаковано. Ув.  $\times 20000$

Особенно показательно влияние протектора на заживление эпителиальной раны и стромы роговицы, что было выявлено в следующей серии экспериментов.

На рис. 5 – рубец роговицы кролика через 7 дней после операции и инстилляций 0,3% раствора «Оквис». Эпителий и строма роговицы не отечны, явлений воспаления нет. Все среды глаза оставались прозрачными. Аллергических реакций или высыпаний на коже животных не выявляли. Рана заполнена плотным активным эпителием, который в виде пробки закрывает строму поврежденной роговицы. Фибробласты стромы также активны, мигрируют в зону повреждения и располагаются параллельно базальной мембране эпителия.

На рис. 6 – лимбальная зона роговицы того же животного через 7 дней. Видно, что в лимбальной зоне эпителий, строма роговицы и часть склеры активны, что выражается в миграции фибробластов стромы к центру роговицы. Базальный слой эпителия активен, что способствует контракции роговичной раны. Сосуды лимба умеренно расширены. Явления воспаления отсутствуют. У животных контрольной группы в этот срок наблюдения

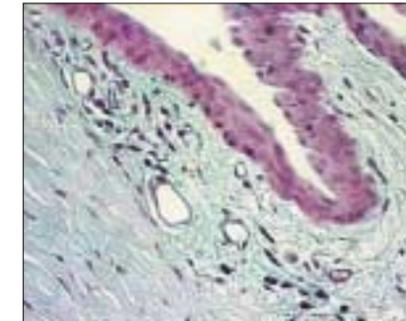


**Рис. 5.** Гистологическая картина участка разреза роговицы через 7 дней после операции по краю раны. После инстилляций 0,3% р-ра «Оквис» над поверхностью эпителия видна тонкая пленка протектора. Сформированная эпителиальная пробка плотная, фибробласты стромы активны. Воспалительные клетки в эпителии и строме отсутствуют. Окраска по Крейбергу, ув.  $\times 240$

(рис. 7) также отмечается высокая активность эпителиальной ткани. На гистологическом срезе виден участок разреза роговицы через 7 дней после операции. Под эпителиальной пробкой располагается слой фибробластов, которые активно мигрируют в зону повреждения.

В лимбальной зоне роговицы (рис. 8) видна миграция клеток эпителия и стромы в центральную часть роговицы, сосуды лимбальной зоны расширены. Такая картина заживления является типичной для эпителиальных ран роговицы и характерна для данного срока наблюдения.

На 14-й день в роговичной ране картина заживления и активности эпителия изменялась (рис. 9). Роговицы животных опытной группы оставались спокойными, невоспаленными и неотечными, эпителий не пролиферирующего типа (базальный слой столбчатый). Под эпителиальной пробкой фибробласты в большом числе располагаются параллельно базальной мембране эпителия. Сразу под пробкой имеется специфически окрашенная зона. Данная окраска (по Крейбергу) является специфичной для протеогликанов, свидетельствует об активных синтетических процессах, происхо-



**Рис. 6.** Гистологическая картина участка лимбальной зоны роговицы через 7 дней после операции. Видны сосуды переходной зоны склеры, с незначительным увеличением в диаметре. В эпителии, особенно в базальной части, видны активные клетки. Воспалительные клетки в строме роговицы единичные или отсутствуют. Окраска по Крейбергу, ув.  $\times 240$

дящих в фибробластах стромы роговицы на данный срок наблюдения.

На рис. 10 – результат травмы роговицы через 14 дней после операции в контрольной группе. К этому сроку наблюдения эпителий активен, базальные клетки вытянутые или округлые. Строма роговицы рыхлая.

Анализ гистологических срезов препаратов эпителия в опытной и контрольной группах показывает, что снижение интенсивности пролиферации клеток у подопытных животных, по сравнению с животными контрольной группы, к данному сроку наблюдения, можно объяснить действием экзогенного ХС, входящего в состав 0,3% раствора «Оквис». Этот препарат оказывает модулирующее действие на эпителий роговицы, которое выражается в торможении митотической активности эпителия и повышении синтетической активности фибробластов стромы роговицы. Эти выводы согласуются с результатами других авторов, которые изучали действие экзогенных ГАГ на эпителиальную ткань роговицы [12].

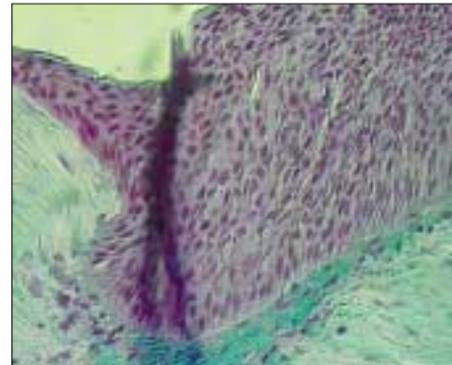
Высокая активность эпителия у животных контрольной группы может приводить к замедлению процессов синтеза базальной мембра-



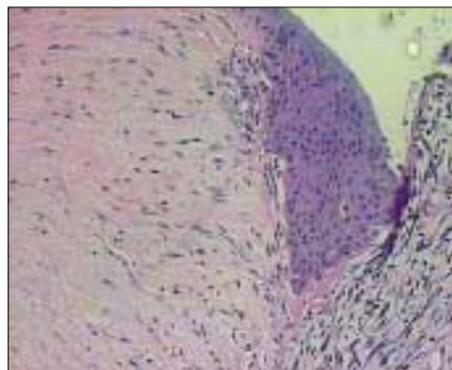
**Рис. 7.** Гистологическая картина участка разреза роговицы животного из контрольной группы через 7 дней после операции. Сформированная эпителиальная пробка плотная, фибробласты стромы активны. В эпителии и строме встречаются воспалительные клетки. Строма слегка отекает. Окраска по Крейбергу, ув.  $\times 240$



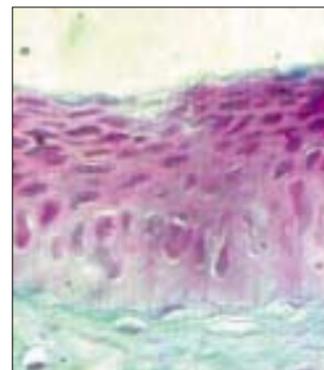
**Рис. 8.** Гистологическая картина участка лимбальной зоны роговицы животного из контрольной группы через 7 дней после операции. Видны расширенные сосуды переходной зоны склеры, увеличенные в диаметре. В эпителии много активных клеток. В роговицу мигрирует много фибробластов и клеток воспалительного ряда. Окраска по Крейбергу, ув.  $\times 240$



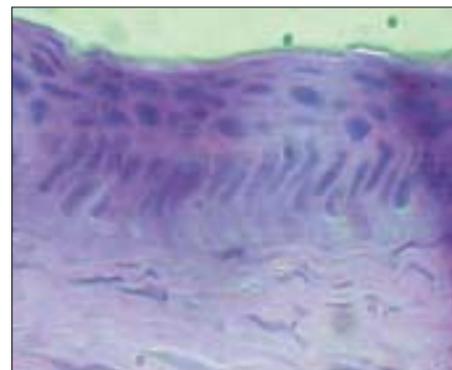
**Рис. 9.** Гистологическая картина участка разреза роговицы через 14 дней после операции. После инстилляций 0,3% р-ра «Оквис» над поверхностью эпителия видна тонкая пленка протектора. Базальный слой эпителия столбчатого типа. Под эпителиальной пробкой видна окрашенная зона синтеза протеогликанов. Воспалительные клетки в эпителии и строме отсутствуют. Окраска по Крейбергу, ув.  $\times 240$



**Рис. 10.** Гистологическая картина участка разреза роговицы животного из контрольной группы через 14 дней после операции. Эпителиальная пробка плотная, с неровным базальным слоем. Воспалительные клетки в эпителии и строме. В строме видны разрывы и пустоты. Окраска по Крейбергу, ув.  $\times 200$



**Рис. 11.** Гистологическая картина участка разреза роговицы подопытного животного на 21-й день после операции и инстилляций протектора тканей глаза 0,3% р-ра «Оквис». Базальный слой эпителия столбчатого типа, эпителиальная пробка уплотненная. Базальная мембрана практически сформирована. Воспалительные клетки в эпителии и строме отсутствуют. Окраска по Крейбергу, ув.  $\times 240$



**Рис. 12.** Гистологическая картина участка разреза роговицы животного из контрольной группы на 21-й день после операции. Окраска по Крейбергу, ув.  $\times 240$

ны и снижению синтеза экстрацеллюлярного матрикса стромы роговицы.

Через 21 день после операции гистологическая картина роговиц в опытной группе была следующей (рис. 11). Роговица в зоне разреза с уплотненной эпителиальной пробкой. Активность клеток эпителия,

особенно в его поверхностных слоях, остается высокой. Базальная мембрана в виде тонкой очерченной линии практически сформиро-

вана. Фибробласты под базальной пластинкой лежат параллельно. Роговица неотечная, прозрачна. Среды глаза прозрачны.

У животных контрольной группы через 21 день после операции – базальный слой эпителия столбчатого типа, эпителиальная пробка уплотненная. Базальная мембрана неровная, фрагментарная, строма роговицы местами с разрывами. Воспалительные клетки в эпителии и строме отсутствуют (рис. 12).

Таким образом, выявлено, что при моделировании взаимодействия коллагена и сГАГ хондроитин сульфат прямо влияет на формирование коллагеновых фибрилл и волокон в системе *in vitro*. При взаимодействии растворимого коллагена и ХС в геле формируются коллагеновые фибриллы с характерной исчерченностью 60-80 нм.

Данное взаимодействие объясняется действием электростатических сил и pH раствора. Аналогичное явление, по нашему мнению, может иметь место и в системе *in vivo* на ранних стадиях повреждения тканей, когда в ране определяются свободные сГАГ. Возникающие при этом комплексы коллаген-сГАГ могут формировать «временный матрикс» и способствовать контракции раны и ее заживлению.

У животных опытной группы под действием протектора тканей глаза с 7-го по 14-й день после операции снижается пролиферативная активность эпителиальной ткани и увеличивается синтетическая активность стромы роговицы. Данный факт свидетельствует о реципрокном действии сГАГ и, в частности, ХС на синтетическую активность и пролиферацию клеток.

Отсутствие или минимальная воспалительная реакция на операционную травму после имплантации комплекса коллаген-сГАГ, говорит о его возможном ингибирующем действии на развитие воспаления и фиброза.

## Литература

1. Birk D.E., Trelstad R.L. Extracellular compartments in matrix morphogenesis: collagen fibril, bundle, and lamellar formation by corneal fibroblasts // *J. Cell. Biol.* – 1984. – Vol. 99. – P. 2024–2033.
2. Böhmer T.G., Lagreze W.A., Funk J. Intraocular pressure rise after phacoemulsification with posterior chamber lens implantation: effect of prophylactic medication, wound closure, and surgeon's experience // *Br. J. Ophthalmol.* – 1995. – Vol. 79. – P. 809–813.
3. Burke J.M., Foster S.J. Corneal stromal fibroblasts from adult rabbits retain the

capacity to deposit an orthogonal matrix // *Dev. Biol.* – 1985. – Vol. 108. – P. 250–253.

4. Cohen S., Carpenter G., Lembach K.J. Interaction of epidermal growth factor (EGF) with cultured fibroblasts // *Adv. Metab. Disord.* – 1975. – Vol. 8. – P. 265–284.
5. Dua H.S., Gomes J.A.P., Singh A. Corneal epithelial wound healing // *Br. J. Ophthalmol.* – 1994. – Vol. 78. – P. 401–408.
6. Fitzsimmons T.D., Fagerholm P., Harstrand A., Schenholm M. Hyaluronic acid in the rabbit cornea after excimer laser keratotomy // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1992. – Vol. 33. – No. 11. – P. 3011–3016.
7. Funderburgh J.L., Funderburgh M.L., Mann M.M. et al. Synthesis of corneal keratan sulfate proteoglycans by bovine keratocytes *in vitro* // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271. – P. 314–316.
8. Kato T., Nakayasu K., Ikegami K. et al. Analysis of glycosaminoglycans in rabbit cornea after excimer laser keratotomy // *Br. J. Ophthalmol.* – 1999. – Vol. 83. – P. 609–612.
9. Lane S.S., Naylor D.W., Kullerstrand L.J. et al. Prospective comparison of the effects of Occucoat, Viscoat, and Healon on intraocular pressure and endothelial cell loss // *J. Cataract. Refract. Surg.* – 1991. – Vol. 17. – P. 21–26.
10. Lemp M.A. Artificial tear solutions in the tear film and dry eye syndromes // *Int. Ophthalmol. Clin.* – 1973. – Vol. 13. – P. 221–229.
11. Limberg M.B., McCaa C., Kissling G.E., Kaufman H.E. Topical application of hyaluronic acid and chondroitin sulfate in the treatment of dry eyes // *Am. J. Ophthalmol.* – 1987. – Vol. 103. – P. 194–197.
12. Meier S., Hey E. Stimulation of extracellular matrix synthesis in developing cornea by glycosaminoglycans // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1974. – Vol. 71. – No. 6. – P. 2310–2313.
13. Nishida T. Fibronectin: a new therapy for corneal trophic ulcer // *Arch. Ophthalmol.* – 1983. – Vol. 101. – P. 1046–1048.
14. Obrink B., Wasterson A. Nature of interaction of chondroitin 4 sulphate and chondroitin sulphate – proteoglycan with collagen // *Biochem. J.* – 1971. – Vol. 121. – P. 227–233.
15. Percival S.P.B. Complications from use of sodium hyaluronate (Healon) in anterior segment surgery // *Br. J. Ophthalmol.* – 1982. – Vol. 66. – P. 714–716.
16. Rainer G., Menapace R., Findl O. et al. Intraocular pressure after small incision cataract surgery with Healon 5 and

Viscoat // *J. Cataract. Refract. Surg.* 2000. – Vol. 26. – No. 2. – P. 271–276.

17. Saika S., Shiraiishi A., Liu C.Y. et al. Role of lumican in the corneal epithelium during wound healing // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 2607–2612.
18. Sand R.B., Marner K., Norm M.S. Sodium hyaluronate in the treatment of keratoconjunctivitis sicca // *Acta Ophthalmol.* – 1989. – Vol. 67. – P. 181–183.
19. Scott J.E. Proteoglycan – fibrillar collagen interactions // *Biochem. J.* – 1988. – Vol. 252. – No. 2. – P. 313–323.
20. Weiner A.L. Polymeric drug delivery systems for the eye. Polymeric Site-Specific Pharmacotherapy / Ed. by A.J. Domb. – NY: John Wiley & Sons, 1994. – P. 316–327.

## Abstract

S.I. Anisimov

### Main mechanisms of eye tissue protection with sulphated glycosaminoglycans. Experimental work

*Methods of protection and influence on the eye tissue reparation is a significant problem world-wide.*

*Eye protectant Okvis 0,3% on base of chondroitin sulphate, BSS and hydroxietilcellulose (sertificte of registration n FS 012b2006/3576-06) had been used in this investigation.*

*The results showed that Chondroitin sulphate of this protectant had influenced directly on the process of collagen fibrilles construction. Analyze of histological slices showed decreasing of the proliferation of epithelial cells in experimental group after 2 weeks of instillation of Okvis that was a result of exogenous chondroitin sulphate action. This influence manifested as a modulation of corneal tissue activity by depression of mitotic activity of epithelium and increasing of synthetic activity of corneal fibroblasts. Absence or minimal inflammatory reaction as a response on operation trauma after implantation of collagen – GAGs complex show the inhibition of inflammation and fibrosis.*

Поступила в печать 24.10.2006