

<https://doi.org/10.21516/2072-0076-2023-16-4-113-121>



Регенераторные эффекты иммобилизованных ферментов гиалуронидазы и субтилизина на экспериментальных моделях химической и механической травмы роговицы

В.Е. Забанова^{1, 2, 3} ✉, К.И. Ершов^{1, 2}, Н.П. Леонов², А.Ж. Фурсова^{1, 3}, П.Г. Мадонов^{1, 2}

¹ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Красный пр-т, д. 52, Новосибирск, 630091, Россия

² Институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал Института цитологии и генетики СО РАН, ул. Тимакова, д. 2, Новосибирск, 630117, Россия

³ ГБУЗ Новосибирской области «Государственная Новосибирская областная клиническая больница», ул. Немировича-Данченко, д. 130, Новосибирск, 630087, Россия

Цель работы — в условиях эксперимента изучить регенераторный потенциал препаратов иммобилизованных ферментов гиалуронидазы и субтилизина на моделях химической и механической травмы роговицы. **Материал и методы.** Исследование выполнено на 28 беспородных кроликах массой 3,5–4,0 кг, разделенных на 4 группы для изучения моделей репарации при каждом виде травмы (химическая и механическая) в зависимости от препарата и метода его введения. Для исследований использованы пегелированные по технологии электронно-лучевого синтеза гиалуронидаза (ПЭГ-гиалуронидаза) и субтилизин (ПЭГ-субтилизин). Состояние роговицы оценивали через 24 ч после нанесения травмы, затем производилась энуклеация глаз с последующим гистологическим исследованием. **Результаты.** В группах химической травмы при аппликации ПЭГ-гиалуронидазы выявлено уменьшение площади раны в среднем на 36,6 мм², а при субконъюнктивальном введении — на 36,08 мм²; при аппликации ПЭГ-субтилизина зарегистрировано увеличение площади дефекта роговицы в среднем на 11,63 мм² (зарегистрирован один случай перфорации), а при субконъюнктивальном введении ПЭГ-субтилизина площадь уменьшилась на 27,42 мм². В группах механической травмы наблюдалась аналогичная картина: при инстиляции ПЭГ-субтилизина площадь раны составила в среднем 53,63 мм² и зарегистрирован один случай перфорации, а при субконъюнктивальном введении площадь раны сократилась до 28,76 мм²; при применении ПЭГ-гиалуронидазы в виде инстилляций зарегистрировано достоверное уменьшение площади раны на 36 мм², при субконъюнктивальном введении площадь раневой поверхности сократилась на 70,3%. Более высокие показатели прозрачности роговицы в оптической зоне и более слабая воспалительная реакция (по результатам гистологической оценки) наблюдались при применении ПЭГ-гиалуронидазы. **Заключение.** Показано благоприятное влияние ПЭГ-гиалуронидазы, а именно усиление регенеративных процессов в ране при химическом и механическом воздействии. ПЭГ-субтилизин не продемонстрировал положительных эффектов, что может быть связано с его высокой фибринолитической активностью.

Ключевые слова: травма роговицы; регенерация роговицы; пегелированные ферменты; пегелированная гиалуронидаза; пегелированный субтилизин

Конфликт интересов: отсутствует.

Прозрачность финансовой деятельности: никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Для цитирования: Забанова В.Е., Ершов К.И., Леонов Н.П., Фурсова А.Ж., Мадонов П.Г. Регенераторные эффекты иммобилизованных ферментов гиалуронидазы и субтилизина на экспериментальных моделях химической и механической травмы роговицы. Российский офтальмологический журнал. 2023; 16 (4):113–21. <https://doi.org/10.21516/2072-0076-2023-16-4-113-121>

Regenerative effects of immobilized hyaluronidase and subtilisin enzymes in experimental models of chemical and mechanical corneal trauma

Victoria E. Zabanova^{1, 2, 3} ✉, Konstantin I. Ershov^{1, 2}, Nikolay P. Leonov², Anzhella Zh. Fursova^{1, 3}, Pavel G. Madonov^{1, 2}

¹ Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny Prospekt, Novosibirsk, 630091, Russia

² Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 2, Timakov St., Novosibirsk, 630117, Russia

³ Novosibirsk State Regional Clinical Hospital, 130, Nemirovich-Danchenko St., Novosibirsk, 630087, Russia
vikazabanova@gmail.com

Purpose: to study the regenerative potential of immobilized hyaluronidase and subtilisin enzymes preparations in experimental models of chemical and mechanical corneal trauma. **Material and methods.** The study involved 28 mongrel rabbits weighing 3.5 to 4 kg, divided into 4 groups for separate studies of repair models according to different types of injury (chemical vs. mechanical), and different drugs and the methods of administration thereof. Hyaluronidase (PEG-hyaluronidase) and subtilisin (PEG-subtilisin) pegylated by electron beam synthesis technology were used. The condition of the cornea was assessed 24 hours after the injury had been inflicted, whereupon the eyes were enucleated and histologically examined. **Results.** The chemical trauma groups treated by PEG-hyaluronidase revealed a decrease in the wound area by an average of 36.6 mm², while those given a subconjunctival injection showed a 36.08 mm² decrease. If PEG-subtilisin was applied, the area of the corneal defect revealed an average increase of 11.63 mm² (with a case of perforation registered). In subconjunctival injection of PEG-subtilisin, the wound area decreased by 27.42 mm². In the mechanical trauma groups, a similar pattern was observed: with the instillation of PEG-subtilisin, the wound area averaged 53.63 mm² and 1 case of perforation was registered, whilst with subconjunctival administration, the wound area decreased to 28.76 mm². With PEG-hyaluronidase instillations, a significant wound area decrease of 36 mm² was noted, and with subconjunctival administration, the wound area decreased by 70.3%. A higher corneal transparency in the optical zone and a weaker inflammatory reaction with the use of PEG hyaluronidase were revealed by histological testing. **Conclusion.** A positive effect of PEG-hyaluronidase, specifically concerning the enhancement of regenerative processes in the wound in chemical and mechanical wounds could be seen. PEG-subtilisin showed no positive effects, which may be associated with high fibrinolytic activity.

Keywords: corneal injury; corneal regeneration; pegylated enzymes; pegylated hyaluronidase; pegylated subtilisin

Conflict of interests: there is no conflict of interests.

Financial disclosure: no authors have financial or property interest in any material or method mentioned.

For citation: Zabanova V.E., Ershov K.I., Leonov N.P., Fursova A.Zh., Madonov P.G. Regenerative effects of immobilized hyaluronidase and subtilisin enzymes on experimental models of chemical and mechanical corneal trauma. Russian ophthalmological journal. 2023; 16 (4): 113–21 (In Russ.). <https://doi.org/10.21516/2072-0076-2023-16-4-113-121>

Заболелания роговицы являются одной из наиболее распространенных, четвертой по значимости, причин слепоты в мире, на их долю приходится примерно 5% случаев. В мире около 2,2 млрд человек живут с той или иной формой нарушения зрения, из них 6,17 млн человек — с помутнением роговицы [1]. Спектр причин поражения роговицы достаточно широк и многообразен и включает инфекционные, воспалительные и дегенеративные состояния, часто приводящие к помутнению роговицы и тем самым к потере трудоспособности и инвалидности, что является тяжелым социально-экономическим бременем как для пациентов, так и для общества в целом.

Повреждения роговицы в основном лечат консервативно, а при неэффективности такого лечения или угрозе перфорации используют хирургические методы. В настоящее время в РФ наиболее широко используются препараты на основе декспантенола 5% и депротеинизированного диализата (ДД) крови здоровых молочных телят. Декспантенол 5% содержит пантотеновую кислоту, которая является компонентом коэнзима А, стимулирует митоз путем усиления пролиферативной активности эпителиальных клеток, ускоряет их миграцию, способствуя более быстрой эпителизации раневого дефекта [2]. Гель на основе ДД содержит

широкий спектр естественных низкомолекулярных веществ: нуклеозиды, нуклеотиды, гликолипиды, аминокислоты, олигопептиды, незаменимые микроэлементы, электролиты и промежуточные продукты углеводного и жирового обмена, за счет чего участвует в активизации аэробных метаболических процессов и окислительного фосфорилирования, активизирует транспорт глюкозы в клетки, находящиеся в условиях гипоксии, стимулирует пролиферацию и миграцию клеток, повышает синтез коллагена [3]. Перспективным направлением в изучении воздействия на регенерацию роговицы является использование обогащенной тромбоцитами плазмы с общепринятым в клинической практике названием PRP (Platelet-Rich Plasma). Показано, что PRP содержит цитокины (PF4 и CD40L), многочисленные факторы роста: PDGF (тромбоцитарный фактор роста), TGF (трансформирующий фактор роста) $\beta 1$ и $\beta 2$, IGF (инсулиноподобный фактор роста) 1, VEGF, EGF, FGF-2 и IGF [4]. Факторы роста стимулируют синтез коллагена и регенерацию, ускоряют пролиферацию эпителия роговицы и снижают активность апоптоза, в совокупности обеспечивая репарацию роговицы в случаях тяжелого ее повреждения. Одной из широко применяемых хирургических методик является трансплантация амниотической мембраны (АМ), обладающей антифибротическими

свойствами за счет содержания ингибиторов протеаз тяжелой цепи 1 интер- α -трипсина и гиалуронан/пентраксин-3 (НС-НА/ПТХ3), способствующих противовоспалительному, противорубцовому и антиангиогенному эффекту. Структура и коллагеновый состав базальной мембраны АМ очень схожи по структуре с базальной мембраной конъюнктивы и роговицы, что позволяет ей служить субстратом для деления эпителиальных клеток [5]. В последнее время показана эффективность лиофилизированного амниона, насыщенного обогащенной тромбоцитами плазмой, стимулирующими рост клеток без нарушения их структурной целостности. Для стабильной регенерации роговичного эпителия разработан ряд хирургических методов, основанных на пересадке ауто- и аллотрансплантатов из зоны лимба. Представляет интерес изучение влияния культивированных и некультивированных (минимально манипулированных) аутологических клеток буккального эпителия в составе комбинированной биоконструкции на процессы регенерации и репарации роговицы при лимбально-клеточной недостаточности [6].

Несмотря на приоритетность и эффективность хирургических методов, их проведение требует достаточной специализации хирурга и оснащенности медицинского учреждения. Консервативное лечение остается наиболее доступным и востребованным, что определяет актуальность поиска и разработки новых препаратов и лекарственных форм для эффективного лечения повреждений роговицы. Одним из важных и приоритетных направлений лечения является не только ускорение эпителизации дефектов роговицы, но и возможность сохранения ее прозрачности, в связи с чем изучение препаратов на основе ферментов представляет клинический интерес. В офтальмологической практике применение ферментных препаратов достаточно ограничено. Имея белковую структуру, ферменты несут потенциальную опасность в виде высокой иммуногенности и риска развития аллергических реакций. Для повышения эффективности, снижения иммуногенности и токсичности лекарственных препаратов белковой природы предложена их модификация на основе физико-химической трансформации за счет соединения белковой молекулы с полимерным носителем. Процесс присоединения молекулы полиэтиленгликоля к другой молекуле носит название «пегилирование» [7]. Преимуществами пегилированных препаратов являются повышенная водорастворимость, устойчивость к действию разрушающих агентов, возможность адресной доставки [8], увеличение длительности периода полувыведения. Интерес для изучения представляют два пегилированных препарата: гиалуронидаза и субтилизин. Гиалуронидаза — фермент, расщепляющий гиалуроновую кислоту путем ее распада до глюкозамина и глюкуроновой кислоты за счет разрушения гликозидной связи β 1,4 [9]. При этом эффект определяется молекулярной массой фрагментов гиалуроновой кислоты: высокомолекулярные полимеры обладают антиангиогенными свойствами, повышенной способностью связывать фибриноген, противовоспалительным и иммуносупрессивным действием, а низкомолекулярные фрагменты — провоспалительной активностью и способствуют ангиогенезу. Барьерная функция роговицы обеспечивается особенностями анатомического строения, а ее регенерация с формированием помутнения сопровождается избыточной экспрессией и миграцией в строму TGF- β и PDGF, активацией миофибробластов и формированием фибропролиферативного ответа.

В офтальмологии описано применение гиалуронидазы в сочетании с местными анестетиками с целью их лучшего проникновения в ткани и пролонгирования действия мест-

ной анестезии [10] в виде субконъюнктивальных инъекций с целью профилактики избыточного рубцевания, снижения воспаления и пролиферативной активности в зоне фильтрации после антиглаукомных операций [11]. В экспериментальном исследовании W. Zhi-Liang и соавт. изучались эффекты фармакологического витреолиза с использованием плазмина и гиалуронидазы у мышей с диабетом [12]. Субтилизин — фермент, производимый *Bacillus subtilis*, обладает протеолитической активностью. В настоящее время в РФ зарегистрирован лекарственный препарат Тромбовазим, содержащий пегилированный субтилизин, обладающий большой степенью тромболитической активности с высоким уровнем безопасности. Опубликованы данные о применении тромбовазима для лечения послеоперационного гемофтальма, как в виде монотерапии, так и в сочетании с лазерными методами [13], и фибриноидного синдрома после хирургии катаракты [14].

Высокая противовоспалительная, иммуномодулирующая, регенеративная и антифибротическая активность гиалуронидазы, возможность ее воздействия на сложный патофизиологический каскад деструктивных процессов и минимизация процесса рубцевания, протеолитическая и противовоспалительная активность субтилизина служат стимулом для более масштабных экспериментальных и клинических исследований по разработке новых методов лечения офтальмологических заболеваний с применением ферментных препаратов.

ЦЕЛЬ работы — в условиях эксперимента изучить регенераторный потенциал препаратов иммобилизованных ферментов гиалуронидазы и субтилизина на моделях химической и механической травмы роговицы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для исследований использованы пегилированные по технологии электронно-лучевого синтеза гиалуронидаза (ПЭГ-гиалуронидаза) и фибринолитический фермент субтилизин (ПЭГ-субтилизин) производства АО «СЦФБ» (Новосибирск, Россия). Электронно-лучевое пегилирование происходило на полиэтиленоксиде («Макрогол 1500») под пучком ускоренных электронов в дозе 1,5 МРад, создаваемым импульсным линейным ускорителем ИЛУ-10 (Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН, Новосибирск). ПЭГ-субтилизин представляет собой лиофилизированный порошок светло-желтого цвета с ферментативной активностью 5400 ЕД в грамме сухого вещества, легкорастворимый в кристаллоидных и коллоидных растворах, экспериментальная доза — 300 ЕД/мл. ПЭГ-гиалуронидаза представляет собой лиофилизированный порошок светло-серого цвета с ферментативной активностью 2800 ЕД в грамме сухого вещества, легкорастворимый в кристаллоидных и коллоидных растворах, экспериментальная доза — 150 ЕД/мл.

Исследование выполнено на 28 беспородных кроликах массой 3,5–4,0 кг. Содержание животных осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986) и ГОСТ 33216-2014 Межгосударственный стандарт, а также Руководства по содержанию и уходу за лабораторными животными, Правилами содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами от 2016-07-01; ГОСТ 33215-2014 Межгосударственный стандарт, Правилами оборудования помещений и организации процедур от 2016-07-01. Выведение животных из эксперимента осуществлялось через 24 ч в соответствии с современными методами эвтаназии лабораторных животных (согласно Директиве 2010/63/EU по охране животных, используемых в научных

целях, Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г.) с последующей энуклеацией обоих глаз.

Методология экспериментов. Выделено 4 группы животных для изучения моделей репарации при каждом виде травмы (химическая и механическая) в зависимости от метода введения и препарата. Первая группа (7 глаз, 12,5%) — инстилляций ПЭГ-субтилизины, 2-я группа (7 глаз, 12,5%) — инстилляций ПЭГ-гиалуронидазы, 3-я группа (7 глаз, 12,5%) — субконъюнктивальное введение (0,1 мл) ПЭГ-субтилизины, 4-я группа (7 глаз, 12,5%) — субконъюнктивальное введение (0,1 мл) ПЭГ-гиалуронидазы. В каждой группе правый глаз животного был исследуемым, а левый глаз использовался как контроль, где применялся 0,9% раствор NaCl в виде инстилляций или в виде субконъюнктивальных инъекций.

Химическую травму роговицы моделировали по методу J. Obenberger [15]. В экспериментах использовали диск фильтровальной бумаги диаметром 8 мм, пропитанный 2,5% раствором гидроксида натрия (NaOH), который посредством аппликации наносился на роговицу кролика. Время экспозиции составляло 5 с, после чего конъюнктивальная полость промывалась физиологическим раствором (0,9% NaCl). Все эксперименты проводили в условиях комбинированной анестезии телазолом 0,5 мг/кг, ксилазином 2 мг/кг внутримышечно и местной анестезии 0,4% раствором оксибупрокаина гидрохлорида. Изучение действия препаратов проводилось через 4 ч после травмы. Инстилляции на поверхность роговицы по 0,1 мл выполнялись 8-кратно с интервалом 2 ч, субконъюнктивальная инъекция 0,1 мл препарата выполнялась однократно. Механическую травму производили по методу C. Nappa и соавт. [16]. При помощи вакуумного регулируемого трепана One Morgia (Франция) (диаметр поршня — 8 мм) посредством его легкого прижатия к роговице наносили метку, окрашенную 0,1% раствором флюоресцеина натрия. В пределах метки лезвием проводили деэпителизацию роговицы до боуеновой мембраны. Дефект эпителия повторно окрашивали раствором флюоресцеина для четкой визуализации формы и размера эрозии роговицы. Манипуляции выполнялись под контролем непрямого бинокулярного налбного офтальмоскопа Heine Omega 100 (Германия). Дизайном эксперимента предусматривалось фиксирование летальных исходов и случаев полного повреждения глаза. При перфорации глазного яблока площадь раны роговицы не измеряли. Через 24 ч после нанесения травмы оценивали состояние роговицы: 1) площадь деэпителизированной поверхности роговицы (после инстилляций 1% раствора флюоресцеина натрия); 2) прозрачность роговицы в оптической зоне согласно 10-балльной шкале Войно-Ясенецкого: 1–2 балла — прозрачная, 3 балла — почти прозрачная, 4–5 балла — полупрозрачная, 6–10 баллов — мутная [17].

После энуклеации глаза выполнялось гистологическое исследование. Полученный биоматериал фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина, на ротационном микроскопе изготавливали срезы толщиной до 5 мкм и окрашивали их гематоксилином и эозином по стандартной методике. При гистологическом исследовании оценивали состояние эпителиального слоя роговицы, структуру коллагеновых волокон, наличие инфильтрации роговицы воспалительными клетками.

Для оценки изменения площади раны применен метод подсчета в программе Adobe Photoshop CC 2019 с помощью функций Histogram и Lasso Tool с использованием фотокамеры Sony α65 с объективом 18-55 SAM (Sony,

Япония). Диафрагма F5,0 была неподвижно закреплена штативом на дистанции 10 см до роговицы, постоянное фокусное расстояние — 18 см. Для отчетливой визуализации роговицы, определения формы и размера эрозии использовали направленный свет лампы с кобальтовым синим фильтром.

Статистический анализ данных проведен с использованием программ MedCalc v. 11.3.3 (MedCalc Software), STATISTICA версии 8 (StatSoft, Inc.) и Microsoft Office Excel 2007. Количественные данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение и как медиана (межквартильный диапазон). Проверка нормальности распределения количественных признаков проводилась с использованием критерия Шапиро — Уилка (для $p < 60$). Для данных, имеющих нормальное распределение, использовался F-тест для проверки предположения об однородности дисперсий. Для межгруппового сравнения повторных измерений использован дисперсионный анализ RM-ANOVA. Перед проведением дисперсионного анализа повторных измерений выполнена оценка коэффициента сферичности Гринхауса — Гейссера. Учитывая однородность дисперсий парных разностей сравниваемых подгрупп (коэффициент сферичности Гринхауса — Гейссера — более 0,75), применили поправочный коэффициент Хюина — Фельдта к степеням свободы для расчета р-значения для наблюдаемого значения F. Результаты RM-ANOVA представлены как межгрупповой эффект — BSE (разница между группами) и внутригрупповые эффекты — WSE (F — разница между измерениями и GF — разница между измерениями в зависимости от принадлежности к группе). После проведения RM-ANOVA при наличии значимых ($p < 0,05$) межгрупповых и внутригрупповых эффектов выполнен post-hoc-анализ с использованием поправки Бонферрони (р-значение). Т-тест (для парных выборок) применен для внутригруппового анализа повторных измерений. Для межгруппового анализа количественных показателей при нормальном распределении данных в подгруппах и гомогенности их дисперсий использован однофакторный дисперсионный анализ, при невыполнении данных условий — тест Крускала — Уоллиса. Post-hoc-анализ для теста Крускала — Уоллиса выполнен с помощью теста Коновера — Имана, для которого р-значения скорректированы с помощью процедуры коэффициента ложных открытий (FDR) Бенджамини — Хохберга.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе эксперимента летальных исходов у лабораторных животных не было. Зарегистрировано 2 случая перфорации роговицы после местного применения ПЭГ-субтилизины (по одному при каждом механизме травмы). Полученное осложнение может быть связано с высокой фибринолитической активностью субтилизины, воздействие которого на фибриновый сгусток, формирующийся в первые часы в зоне повреждения роговицы, блокирует репаративные процессы. При этом модификация формы фермента путем его пегилирования усиливает фибринолитический и противовоспалительный эффекты, реализация которых происходит активнее и быстрее за счет активного проникновения в ткани из-за высокой биодоступности.

Показатели площади раны роговицы в группах как при химической, так и механической травмах на этапах исследования имели нормальное распределение, различий показателей на первом этапе исследования по результатам однофакторного дисперсионного анализа подгруппы не выявлено ($F = 0,51$, $p < 0,001$), что является доказательством сравнимости групп и подгрупп исследования.

Химическая травма роговицы. Динамика площади химической раны роговицы представлена в таблице 1. По результатам дисперсионного анализа повторных измерений выявлены различия площади роговицы между группами исследования (BSE-G: $F = 126,04$, $p < 0,001$), внутри групп (WSE-F: $F = 3544,74$, $p < 0,001$), а также в зависимости от принадлежности к подгруппе (WSE-FG: $F = 148,84$, $p < 0,001$). На этапе анализа результатов экспериментального исследования выявлены различия площади раны роговицы между подгруппами ($df = 7$ $N = 37,61$ $p < 0,0001$).

Анализ результатов исследования не выявил положительного репаративного действия инстилляций ПЭГ-субтилизина, зарегистрировано увеличение площади дефекта роговицы в среднем на $11,63 \text{ мм}^2$ от исходной площади повреждения (наибольший размер составил $63,63 \text{ мм}^2$) ($p = 0,0006$). Применение ПЭГ-гиалуронидазы в виде инстилляций сопровождалось уменьшением площади раневой поверхности в среднем на $36,6 \text{ мм}^2$ ($72,85\%$), что статистически значимо отличалось от показателей контрольной группы (уменьшение на 29 мм^2 ($57,8\%$)). Средняя площадь повреждения была достоверно меньше и составила $13,65 \text{ мм}^2$ ($p < 0,0001$). При субконъюнктивальном введении ПЭГ-субтилизина площадь дефекта уменьшилась на $27,42 \text{ мм}^2$ ($54,55\%$), что было сопоставимо с контрольной группой ($55,4\%$). Субконъюнктивальное введение ПЭГ-гиалуронидазы сопровождалось результатом, аналогичным инстилляционному применению препарата: сокращением дефекта раневой поверхности на $36,08 \text{ мм}^2$ ($71,8\%$, $54,5\%$ в контрольной группе $p < 0,0001$). Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии преимуществ субконъюнктивального введения и биодоступности препарата при инстилляционном воздействии. Наименьшая площадь

раны роговицы на этапе 2 была в группах с введением ПЭГ-гиалуронидазы (рис. 1, табл. 1).

Более высокие показатели прозрачности роговицы в оптической зоне отмечены при применении ПЭГ-гиалуронидазы во 2-й и 4-й группах — 4 балла [3; 5], при использовании ПЭГ-субтилизина — в 1-й и 3-й группах — 6 баллов [5; 7].

При гистологическом исследовании как при применении ПЭГ-гиалуронидазы, так и ПЭГ-субтилизина выявлена воспалительная реакция различной степени выраженности. При аппликации ПЭГ-субтилизина наблюдался выраженный отек, диффузная клеточная инфильтрация, а также дезорганизация коллагеновых волокон в строме роговицы (рис. 2, А). При форсированных инстилляциях ПЭГ-гиалуронидазы признаки воспалительной реакции были значительно менее выражены: клеточная инфильтрация представлена единичными воспалительными клетками, архитектура коллагеновых волокон практически не нарушена.

При субконъюнктивальном введении исследуемых препаратов у всех животных выявлены сходные признаки экссудативного воспаления в виде отека, диффузно-очаговой воспалительной инфильтрации клеточных структур. В препаратах роговиц при субконъюнктивальном введении ПЭГ-субтилизина наблюдалась избыточная инфильтрация и отек всех слоев, преимущественно стромы, в одном из препаратов выявлен участок изъязвления роговицы с диффузной лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией с массивной имбицией эозинофилами (рис. 2, Б). При субконъюнктивальном применении ПЭГ-гиалуронидазы выявлены аналогичные изменения меньшей степени выраженности.

Механическая травма роговицы. По результатам дисперсионного анализа повторных измерений выявлены

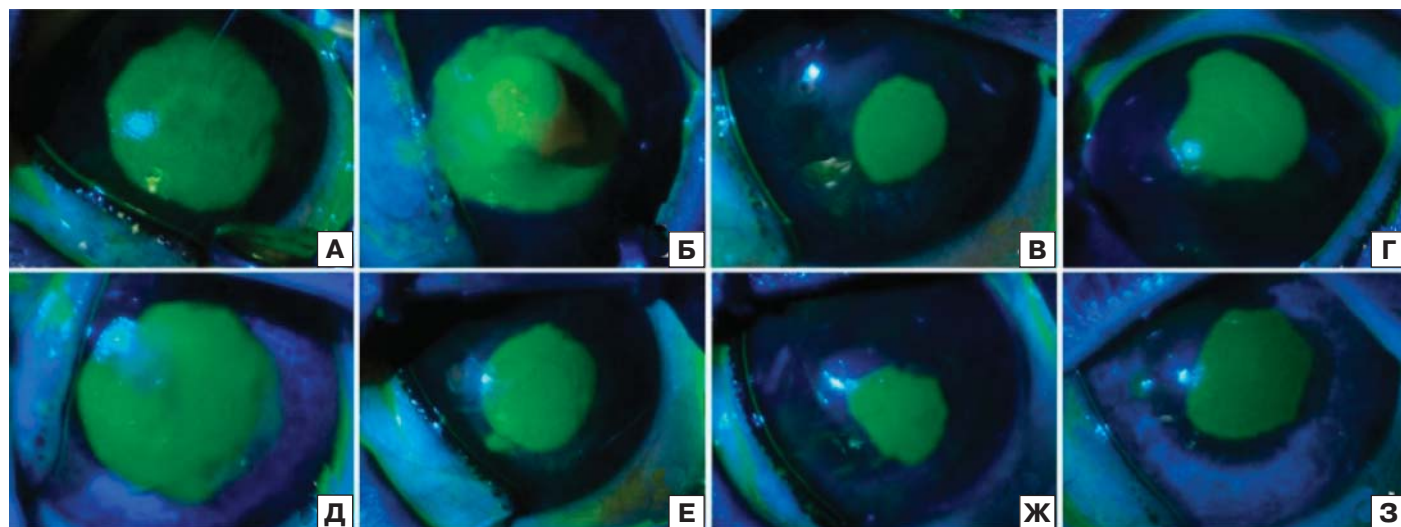


Рис. 1. А — окраска дефекта роговицы 1% раствором флюоресцеина сразу после нанесения химической травмы. Б — перфорация роговицы через сутки после травмы при инстилляциях ПЭГ-субтилизина. В — дефект роговицы через сутки после травмы при инстилляциях ПЭГ-гиалуронидазы. Г — дефект роговицы через сутки после травмы при инстилляциях 0,9% раствора NaCl. Д — окраска дефекта роговицы 1% раствором флюоресцеина сразу после нанесения химической травмы. Е — дефект роговицы через сутки после травмы при субконъюнктивальной инъекции ПЭГ-субтилизина. Ж — дефект роговицы через сутки после травмы при субконъюнктивальной инъекции ПЭГ-гиалуронидазы. З — дефект роговицы через сутки после травмы при субконъюнктивальной инъекции 0,9% раствора NaCl

Fig. 1. А — staining of a corneal defect with 1% fluorescein solution immediately after chemical trauma. Б — perforation of the cornea 1 day after injury in the case of instillation of PEG-subtilisin. В — corneal defect 1 day after injury in the case of instillation of PEG-hyaluronidase. Г — corneal defect 1 day after injury in the case of instillation of a 0.9% NaCl solution. Д — staining of the corneal defect with 1% fluorescein solution immediately after chemical trauma. Е — corneal defect 1 day after injury in the case of subconjunctival injection of PEG-subtilisin. Ж — corneal defect 1 day after injury in the case of subconjunctival injection of PEG-hyaluronidase. З — corneal defect 1 day after injury in the case of subconjunctival injection of 0.9% NaCl solution

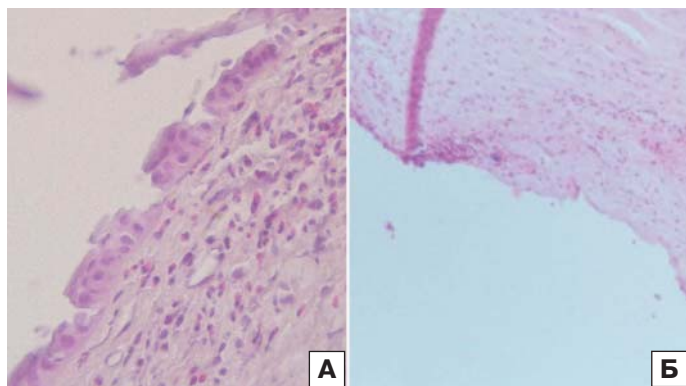


Рис. 2. А — аппликации ПЭГ-субтилизина (выраженный отек, диффузная клеточная инфильтрация, а также дезорганизация коллагеновых волокон в строме). Б — субконъюнктивальное при-
менение ПЭГ-субтилизина (изъязвление роговицы, диффузная воспалительная инфильтрация)

Fig. 2. A — applications of PEG-subtilisin (severe edema, diffuse cellular infiltration, as well as disorganization of collagen fibers in the stroma). Б — subconjunctival application of PEG-subtilisin (corneal ulceration, diffuse inflammatory infiltration)

Таблица 1. Площадь зоны химического повреждения роговицы на этапах исследования
Table 1. Area of cornea chemical injury at the stages of the study

Группа Group		Площадь раны роговицы, мм ² Corneal wound area, mm ²	
		этап 1 stage 1	этап 2 stage 2
1	Правый глаз — инстилляцией ПЭГ-субтилизина; этап 1: n = 7, этап 2: n = 6 Right eye — PEG-subtilisin instillation; stage 1: n = 7, stage 2: n = 6	50,264 мм ²	~ 61,9 мм ² (min 59,69, max 63,63)
2	Левый глаз — инстилляцией 0,9% NaCl; этап 1: n = 7, этап 2: n = 7 Left eye — instillation 0.9% NaCl; stage 1: n = 7, stage 2: n = 7	50,264 мм ²	~ 22,7 мм ² (min 21,03, max 24,04)
3	Правый глаз — инстилляцией ПЭГ-гиалуронидазы; этап 1: n = 7, этап 2: n = 7 Right Eye — PEG hyaluronidase instillation; stage 1: n = 7, stage 2: n = 7	50,264 мм ²	~ 13,65 мм ² (min 11,9, max 15,89)
4	Левый глаз — инстилляцией 0,9% NaCl; этап 1: n = 7, этап 2: n = 7 Left eye — 0.9% NaCl instillation; stage 1: n = 7, stage 2: n = 7	50,264 мм ²	~ 21,21 мм ² (min 18,76, max 24,04)
5	Правый глаз — субконъюнктивальное введение ПЭГ-субтилизина; этап 1: n = 7, этап 2: n = 7 Right eye — subconjunctival PEG-subtilisin injection; stage 1: n = 7, stage 2: n = 7	50,264 мм ²	~ 22,84 мм ² (min 19,46, max 25,6)
6	Левый глаз — субконъюнктивальное введение 0,9% NaCl; этап 1: n = 7, этап 2: n = 7 Left eye — 0.9% NaCl subconjunctival injection; stage 1: n = 7, stage 2: n = 7	50,264 мм ²	~ 22,38 мм ² (min 20,8, max 24,07)
7	Правый глаз — субконъюнктивальное введение ПЭГ-гиалуронидазы; этап 1: n = 7, этап 2: n = 7 Right eye — PEG-hyaluronidase subconjunctival injection; stage 1: n = 7, stage 2: n = 7	50,264 мм ²	~ 14,18 мм ² (min 12,72, max 14,93)
8	Левый глаз — субконъюнктивальное введение 0,9% NaCl; этап 1: n = 7, этап 2: n = 7 Left eye — 0.9% NaCl subconjunctival injection; stage 1: n = 7, stage 2: n = 7	50,264 мм ²	~ 22,85 мм ² (min 19,06, max 24,08)

Примечание. Здесь и в таблице 2: n — количество животных.

Note. Here and in the table 2: n — number of animals.

Таблица 2. Площадь зоны механического повреждения роговицы на этапах исследования
Table 2. Area of corneal mechanical injury zone at the stages of the study

Группа Group		Площадь раны роговицы, мм ² Corneal wound area, mm ²	
		этап 1 stage 1	этап 2 stage 2
1	Правый глаз — инстилляцией ПЭГ-субтилизина; этап 1: n = 7, этап 2: n = 6 Right eye — instillations of PEG-subtilisin; stage 1: n = 7, stage 2: n = 6	50,264 мм ²	~ 53,63 мм ² (min 52,42, max 55,03)
2	Левый глаз — инстилляцией 0,9% NaCl; этап 1: n = 7, этап 2: n = 7 Left eye — 0.9% NaCl instillation; stage 1: n = 7, stage 2: n = 7	50,264 мм ²	~ 23,02 мм ² (min 20,38, max 25,51)
3	Правый глаз — инстилляцией ПЭГ-гиалуронидазы; этап 1: n = 7, этап 2: n = 7 Right eye — PEG hyaluronidase instillation; stage 1: n = 7, stage 2: n = 7	50,264 мм ²	~ 14,23 мм ² (min 12,01, max 16,89)
4	Левый глаз — инстилляцией 0,9% NaCl; этап 1: n = 7, этап 2: n = 7 Left eye — 0.9% NaCl instillation; stage 1: n = 7, stage 2: n = 7	50,264 мм ²	~ 23,61 мм ² (min 20,38, max 25,52)
5	Правый глаз — субконъюнктивальное введение ПЭГ-субтилизина; этап 1: n = 7, этап 2: n = 7 Right eye — PEG-subtilisin subconjunctival injection; stage 1: n = 7, stage 2: n = 7	50,264 мм ²	~ 28,76 мм ² (min 24,12, max 31,93)
6	Левый глаз — субконъюнктивальное введение 0,9% NaCl; этап 1: n = 7, этап 2: n = 7 Left eye — 0.9% NaCl subconjunctival injection; stage 1: n = 7, stage 2: n = 7	50,264 мм ²	~ 21,22 мм ² (min 19,5, max 22,3)
7	Правый глаз — субконъюнктивальное введение ПЭГ-гиалуронидазы; этап 1: n = 7, этап 2: n = 7 Right eye — PEG-hyaluronidase subconjunctival injection; stage 1: n = 7, stage 2: n = 7	50,264 мм ²	~ 14,71 мм ² (min 13,67, max 16,63)
8	Левый глаз — субконъюнктивальное введение 0,9% NaCl; этап 1: n = 7, этап 2: n = 7 Left eye — 0.9% NaCl subconjunctival injection; stage 1: n = 7, stage 2: n = 7	50,264 мм ²	~ 21,33 мм ² (min 19,5, max 22,31)

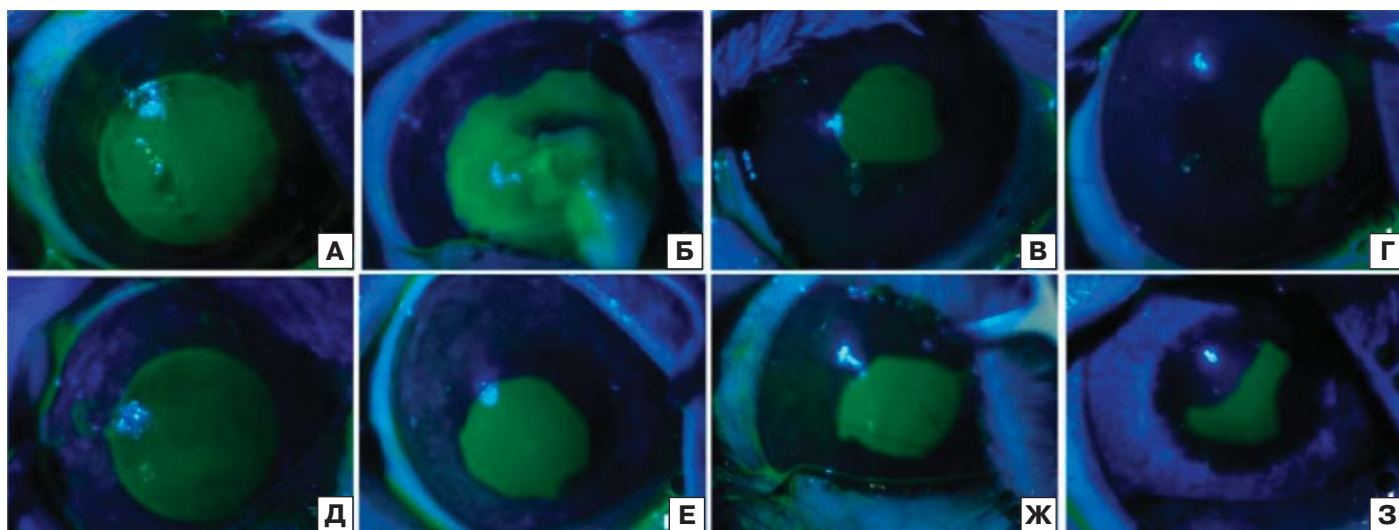


Рис. 3. А — окраска дефекта роговицы 1% раствором флюоресцеина сразу после нанесения механической травмы. Б — перфорация роговицы через сутки после травмы при инстилляцией ПЭ-субтилизина. В — дефект роговицы через сутки после травмы при инстилляцией ПЭГ-гиалуронидазы. Г — дефект роговицы через сутки после травмы при инстилляцией 0,9% раствора NaCl. Д — окраска дефекта роговицы 1% раствором флюоресцеина сразу после нанесения механической травмы. Е — дефект роговицы через сутки после травмы при субконъюнктивальной инъекции ПЭГ-субтилизина. Ж — дефект роговицы через сутки после травмы при субконъюнктивальной инъекции ПЭГ-гиалуронидазы. З — дефект роговицы через сутки после травмы при субконъюнктивальной инъекции 0,9% раствора NaCl

Fig. 3. А — staining of the corneal defect with a 1 % fluorescein solution immediately after mechanical trauma. Б — perforation of the cornea 1 day after injury in the case of instillation of PEG-subtilisin. В — corneal defect 1 day after injury in the case of instillation of PEG-hyaluronidase. Г — corneal defect 1 day after injury in the case of instillation of a 0.9 % NaCl solution. Д — staining of the corneal defect with a 1 % fluorescein solution immediately after mechanical trauma. Е — corneal defect 1 day post-injury in the case of subconjunctival injection of PEG-subtilisin. Ж — corneal defect 1 day post-injury in the case of subconjunctival injection of PEG-hyaluronidase. З — corneal defect 1 day post-injury in the case of subconjunctival injection of 0.9 % NaCl solution

различия в площади раны роговицы между группами исследования (BSE-G: $F = 126,04$, $p < 0,001$), внутри групп (WSE-F: $F = 3544,74$, $p < 0,001$), а также в зависимости от принадлежности к подгруппе (WSE-FG: $F = 148,84$, $p < 0,001$). На этапе анализа результатов экспериментального исследования выявлены различия в площади раны роговицы между подгруппами ($df = 7$, $N = 37,61$, $p < 0,0001$).

Динамика площади механической раны роговицы представлена в таблице 2. Результаты проведенного эксперимента подтвердили негативное влияние на регенераторный потенциал как инстилляций ПЭГ-субтилизина — площадь раны увеличилась и составила в среднем $53,63 \text{ мм}^2$ ($p = 0,014$), был зарегистрирован один случай перфорации роговицы, так и при субконъюнктивальном введении — несмотря на сокращение площади до $28,76 \text{ мм}^2$, ее значение статистически достоверно превышало значение контрольной группы $21,22 \text{ мм}^2$ ($p < 0,0001$). При аппликации ПЭГ-гиалуронидазы аналогично химической травме зарегистрировано достоверное уменьшение площади раны на 36 мм^2 (71,56%, 53,02% в контрольной группе), и в среднем она составила $14,23 \text{ мм}^2$ (в группе контроля — $23,61 \text{ мм}^2$), $p < 0,0001$). Субконъюнктивальное применение характеризовалось значимой положительной динамикой (уменьшением площади на 70,3% — до $14,71 \text{ мм}^2$ ($p < 0,0001$)). Динамика площади раны роговицы после химической травмы представлена на рисунке 3.

Изучение прозрачности роговицы показало сходную с химической травмой динамику: при использовании ПЭГ-субтилизина прозрачность соответствовала в 1-й и 3-й группах 5 баллам [4; 6], а при применении ПЭГ-гиалуронидазы во 2-й и 4-й группах — 4 баллам [3; 5].

При гистологическом исследовании роговицы как при инстилляцией ПЭГ-субтилизина, так и при его субконъюнктивальном введении обнаружена выраженная воспалитель-

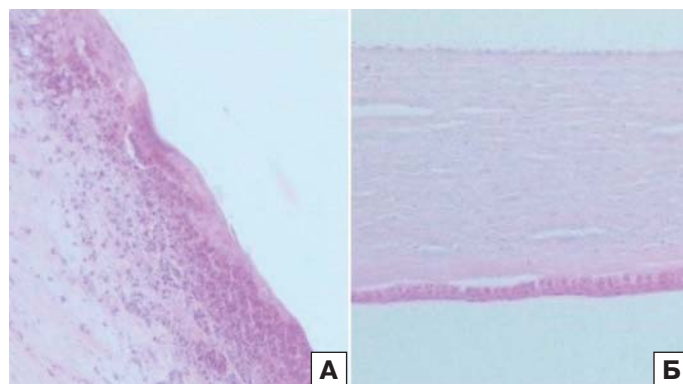


Рис. 4. А — препарат роговицы при аппликации ПЭГ-субтилизина (изъязвление эпителия, диффузная воспалительная инфильтрация). Б — препарат роговицы при аппликации ПЭГ-гиалуронидазы (отек и инфильтрация стромы роговицы)

Fig. 4. А — corneal preparation in the case of application of PEG-subtilisin (epithelial ulceration, diffuse inflammatory infiltration). Б — corneal preparation in the case of application of PEG-hyaluronidase (swelling and infiltration of the corneal stroma)

ная клеточная инфильтрация в поврежденной части роговицы. В области инфильтрата определялось значительное количество лимфоцитов, плазмочитов, небольшое количество эозинофилов и нейтрофилов (рис. 4, А). При применении ПЭГ-гиалуронидазы независимо от способа применения локальная воспалительная реакция была менее выражена, характеризовалась отеком и инфильтрацией стромы и эпителия, наличием единичных лимфоцитов, плазмочитов и эозинофилов, без изменения структуры коллагеновых волокон. Десцеметова мембрана и эндотелиальный слой

оставались интактными и прослеживались неизменными на всем протяжении роговицы (рис. 4, Б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальное изучение фармакологического воздействия ПЭГ-гиалуронидазы показало ее положительное влияние на активность регенеративных процессов в области раневого повреждения при химическом и механическом воздействии. Применение в виде инстилляций характеризовалось сходным с субконъюнктивальным введением положительным эффектом — уменьшением площади раневого дефекта и минимальной выраженностью воспалительной реакции, что может свидетельствовать о биодоступности данной формы препарата. Отсутствие положительного репаративного эффекта ПЭГ-субтилизины, зарегистрированное увеличение площади раневого повреждения, случаи перфорации из-за высокой фибринолитической активности, генерирующей избыточный гидролиз поврежденных белковых структур, являются противопоказаниями к его использованию. Анализ степени прозрачности роговицы также показал преимущество использования ПЭГ-гиалуронидазы. Необходимо проведение дальнейших исследований для изучения регенераторного потенциала препаратов иммобилизованных ферментов, учитывая их высокую противовоспалительную, иммуномодулирующую, регенеративную и антифибротическую активность, возможность воздействия на сложный патофизиологический каскад деструктивных процессов и минимизацию процесса рубцевания, которое ведет к необратимому снижению зрительных функций.

Литература/References

1. Всемирный доклад о проблемах зрения. Женева: Всемирная организация здравоохранения; 2020. Лицензия: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. [World Report on Vision Problems (World report on vision). Geneva: World Health Organization; 2020. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO (In Russ.)].
2. Рыбакова Е.Г., Егорова Г.Б., Калинин Н.И. Корнерегель — новый стимулятор репаративной регенерации. *РМЖ. Клиническая офтальмология*. 2001; 4: 162–4. [Rybakova E.G., Egorova G.B., Kalinich N.I. Korneregel — a new stimulator of reparative regeneration. *Clinical ophthalmology*. 2001; 4: 162–4 (In Russ.)].
3. Кадышев В.В., Кадышева Л.В. Применение стимуляторов регенерации роговицы при травматических повреждениях. *РМЖ. Клиническая офтальмология*. 2011. 4: 153–5. [Kadyshev V.V., Kadyшева L.V. The use of corneal regeneration stimulators in traumatic injuries. *Clinical ophthalmology*. 2011; 4: 153–5 (In Russ.)].

4. Castillo TN, Pouliot MA, Kim HJ, Dragoo JL. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. *Am J Sports Med*. 2011 Feb; 39 (2): 266–71. doi: 10.1177/0363546510387517
5. Walkden A. Amniotic membrane transplantation in ophthalmology: An updated perspective. *Clin Ophthalmol*. 2020 Jul 22; 14: 2057–72. doi: 10.2147/OPHTN.S208008
6. Ченцова Е.В., Боровкова Н.В., Макаров П.В. и др. Биологический эффект комбинации лизата тромбоцитов и амниотической мембраны в культуре букального эпителия. *Российский офтальмологический журнал*. 2022; 15 (4): 115–20. [Chentsova E.V., Borovkova N.V., Makarov P.V., et al. Biological effect of combination of platelet lysate and amniotic membrane in buccal epithelium culture. *Russian ophthalmological journal*. 2022; 15 (4): 115–20 (In Russ.)]. doi: 10.21516/2072-0076-2022-15-4-115-120
7. Duncan R, Spreafico F. Polymer conjugates. Pharmacokinetic considerations for design and development. *Clin Pharmacokinet*. 1994 Oct; 27 (4): 290–306. doi: 10.2165/00003088-199427040-00004
8. Khandare J, Minko T. Polymer-drug conjugates: Progress in polymeric prodrugs. *Progress in Polymer Science*. 2006; 31 (4), 359–97. doi:10.1016/j.prorgpolymsci.2005.09.004
9. Lv S-H, Rong S-F, Cai B-G, Guan S-M, Li Q-Q. Property and current clinical applications of mammal hyaluronidase. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015 Oct; 19 (20): 3968–76. PMID: 26531287.
10. Atkinson WS. Use of hyaluronidase with local anesthesia in ophthalmology; Preliminary report. *Arch Ophthalmol*. 1949 Nov; 42 (5): 628–33. doi: 10.1001/archophth.1949.00900050638012
11. Шмырева В.Ф., Иванова А.С., Федоров А.А., Петров С.Ю., Макарова А.С. Медико-биологическое исследование лонгидазы. Часть 1. *Глаукома*. 2011; 4: 5–10. [Shmyreva V.F., Ivanova A.S., Fedorov A.A., Petrov S. Yu., Makarova A.S. Medico-biological study of longidase. Part 1. *Glaucoma*. 2011; 4: 5–10 (In Russ.)].
12. Zhi-Liang W, Wo-Dong S, Min L, Xiao-Ping B, Jin J. Pharmacologic vitreolysis with plasmin and hyaluronidase in diabetic rats. *Retina*. 2009 Feb; 29 (2): 269–74. doi: 10.1097/IAE.0b013e3181923ff0
13. Гндоян И.А. Комбинированное лечение (лазерное и ферментативное) послеоперационного гемофтальма. *Вестник ВолГМУ*. 2012; 1 (41): 48–51. [Gndoyan I.A. Combined treatment (laser and enzymatic) of postoperative hemophthalmos. *Bulletin of VolGМУ*. 2012; 1 (41): 48–51 (In Russ.)].
14. Гндоян И.А. Применение фибринолитического препарата Тромбовазим в лечении фибриноидного синдрома после экстракции катаракты. *Вестник ВолГМУ*. 2012; 2 (42): 28–32. [Gndoyan I.A. The use of fibrinolytic drug Thrombovazim in the treatment of fibrinoid syndrome after cataract extraction. *Bulletin of VolgSMU*; 2012; 2 (42): 28–32 (In Russ.)].
15. Obenberger J. Paper strips and rings as simple tools for standardization of experimental eye injuries. *Ophthalmic Res*. 1975 May; 7 (5): 363–7. doi: 10.1159/000264772
16. Hanna C, Bicknell D.S., O'Brien J.E. Cell turnover in the adult human eye. *Arch Ophthalmol*. 1961 May; 65: 695–8. doi: 10.1001/archophth.1961.01840020697016
17. Войно-Ясенецкий В.В. Разрастание и изменчивость тканей глаза при его заболеваниях и травмах. Киев: Вища школа; 1979. [Voyno-Yasensky V.V. Proliferation and variability of eye tissues in its diseases and injuries. Kiev: Vishcha shkola; 1979 (In Russ.)].

Вклад авторов в работу: В.Е. Забанова — работа с экспериментальными животными, сбор, обработка данных, написание текста, редактирование; К.И. Ершов — работа с экспериментальными животными, анализ и статистическая обработка данных; Н.П. Леонов — анализ и статистическая обработка данных; А.Ж. Фурсова — концепция и дизайн исследования, научное редактирование, финальная подготовка статьи к публикации; П.Г. Мадонов — концепция и дизайн исследования, научное редактирование, анализ и статистическая обработка данных. **Authors' contribution:** V.E. Zabanova — work with experimental animals, data collection and processing, text writing, editing; K.I. Ershov — work with experimental animals, data analysis and statistical processing; N.P. Leonov — data analysis and statistical processing; A.Zh. Fursova — concept and design of the study, scientific editing, final preparation of the article for publication; P.G. Madonov — concept and design of the study, scientific editing, data analysis and statistical processing.

Поступила: 01.09.2023. Переработана: 23.09.2023. Принята к печати: 24.09.2023
Originally received: 01.09.2023. Final revision: 23.09.2023. Accepted: 24.09.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ/INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

¹ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Красный пр-т, д. 52, Новосибирск, 630091, Россия

² Институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал Института цитологии и генетики СО РАН, ул. Тимакова, д. 2, Новосибирск, 630117, Россия

³ ГБУЗ Новосибирской области «Государственная Новосибирская областная клиническая больница», ул. Немировича-Данченко, д. 130, Новосибирск, 630087, Россия

Виктория Евгеньевна Забанова — ассистент кафедры офтальмологии¹, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной и клинической фармакологии², врач-офтальмолог³, ORCID 0000-0001-9879-8986

Константин Игоревич Ершов — канд. биол. наук, доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины¹, научный сотрудник лаборатории фармацевтических технологий², ORCID 0000-0003-4139-036X

Николай Петрович Леонов — старший научный сотрудник лаборатории фармацевтической технологии², ORCID 0000-0002-4364-8937

Анжелла Жановна Фурсова — д-р мед. наук, доцент, заведующая кафедрой офтальмологии¹, заведующая офтальмологическим отделением³, ORCID 0000-0001-6311-5452

Павел Геннадьевич Мадонов — д-р мед. наук, доцент, заведующий кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины¹, руководитель отдела экспериментальной фармакологии², ORCID 0000-0002-1093-8938

Для контактов: Виктория Евгеньевна Забанова,
vikazabanova@gmail.com

¹ Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny Prospekt, Novosibirsk, 630091, Russia

² Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 2, Timakov St., Novosibirsk, 630117, Russia

³ Novosibirsk State Regional Clinical Hospital, 130, Nemirovich-Danchenko St., Novosibirsk, 630087, Russia

Victoriya E. Zabanova — assistant of chair of ophthalmology¹, junior researcher of the laboratory of experimental and clinical pharmacology², ophthalmologist³, ORCID 0000-0001-9879-8986

Konstantin I. Ershov — Cand. of Biol. Sci., associate professor of chair of pharmacology, clinical pharmacology and evidence-based medicine¹, researcher, laboratory of pharmaceutical technologies², ORCID 0000-0003-4139-036X

Nikolay P. Leonov — senior researcher at the laboratory of pharmaceutical technology², ORCID 0000-0002-4364-8937

Anzhella Zh. Fursova — Dr. of Med. Sci., associate professor, head of chair of ophthalmology¹, head of the ophthalmology department³, ORCID 0000-0001-6311-5452

Pavel G. Madonov — Dr. of Med. Sci., associate professor, head of chair of pharmacology, clinical pharmacology and evidence-based medicine¹, head of the department of experimental pharmacology², ORCID 0000-0002-1093-8938

For contacts: Zabanova Victoriya Evgenievna,
vikazabanova@gmail.com