

АГАММЕДОВ МУШВИГ БАЛАМИ ОГЛЫ

**СПОСОБ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-СТРОМАЛЬНЫХ
ДЕФЕКТОВ РОГОВИЦЫ ПРИ ПОМОЩИ БИОДЕГРАДИРУЕМОЙ
КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ ФИБРОИНА ШЕЛКА
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

3.3.3. Патологическая физиология

3.1.5. Офтальмология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор **Борзенко Сергей Анатольевич**
доктор медицинских наук, профессор **Гаврилова Наталья Александровна**

Официальные оппоненты:

Басок Юлия Борисовна – доктор биологических наук, заведующая отделом биомедицинских технологий и тканевой инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ченцова Екатерина Валериановна – доктор медицинских наук, профессор, начальник отдела Травматологии и реконструктивной хирургии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится 7 сентября 2023 года в 14 часов на заседании диссертационного совета 24.1.180.01 при ФГБНУ «НИИОПП» по адресу: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИОПП», а также на сайте <http://www.niiopp.ru/>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук



Панкова Наталия Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности

Во всем мире, по данным ВОЗ, насчитывается около 4,9 миллиона человек с двусторонней роговичной слепотой [Pascolini D. и соавт., 2012]. Для таких пациентов сквозная кератопластика (СКП), т.е. пересадка роговицы, является одним из основных методов лечения [Борзенко С.А., 1988 - 2021]. Однако во всем мире наблюдается значительный дефицит трупных донорских роговиц, что является качественным стимулом к поиску и разработке принципиально новых методов лечения роговичной слепоты [Griffith M. и соавт., 2009; Williams A.M. и соавт., 2018].

В связи с этим одним из наиболее перспективных направлений в создании эквивалента трупной донорской роговицы является разработка биоинженерных конструкций, обладающих подходящими оптическими и биомеханическими свойствами [Wu Z. и соавт., 2018].

В последние годы были предложены многие виды биоинженерных конструкций, базирующихся на основе различных веществ биологического и синтетического происхождения. Одним из наиболее перспективных и широко используемых природных материалов, который демонстрирует высокую способность к восстановлению дефектов роговицы, является фиброин шелка [Gil E.S. и соавт., 2010].

Фиброин шелка представляет собой биополимер природного происхождения, который выделяется из коконов тутового шелкопряда (лат. *Bombyx mori*) [Агапова О.И. и соавт., 2018]. Для культивирования эпителиальных клеток трупных донорских роговиц на данном материале используют 2D пленки, для культивирования эквивалентов стромального слоя – 3D условия [Yokoo S. и соавт., 2014]. Фиброин шелка является прозрачным биоматериалом, обладает высокой прочностью на разрыв, прост в обращении и обработке, не изменяется при стерилизации и не препятствует росту и культивированию клеток [Omenetto F.G. и соавт., 2010; Kundu S.C. и соавт., 2012].

Известно, что пленки из фиброина шелка поддерживают рост клеток переднего и заднего эпителия роговицы [Liu J. и соавт., 2012; Chirila T. и соавт., 2008; Bray L.J. и соавт., 2011]. Проведенные доклинические исследования на кроликах показали способность пленок из фиброина шелка выступать в качестве подходящего носителя эпителиальных клеток для регенерации дефектов роговицы [Higa K. и соавт., 2014].

При этом сообщается, что пролиферация эпителиальных клеток на пленках из фиброина шелка происходит медленнее, чем на амниотических мембранах, что может

быть связано с присутствием в амниотических мембранах факторов роста [Koizumi N.J. и соавт., 2000; Tseng S.C. и соавт., 2004]. Однако амниотические мембраны имеют известные недостатки: низкую механическую прочность и слабое светопропускание по сравнению с фиброином шелка, а также амниотические мембраны имеют потенциальную опасность передачи различных инфекций, поскольку являются донорской тканью [Tran S.H. и соавт., 2018].

В последние годы показана возможность фиброина шелка выступать в качестве субстрата для доставки в очаг поражения различных лекарственных препаратов, факторов роста и биоактивных молекул [Sivak W.N. и соавт., 2017; Wani S.U.D. и соавт., 2018; Farokhi M. и соавт., 2018; Tomeh M.A. и соавт., 2019].

Для восстановления эпителиально-стромальных дефектов роговицы необходимо использовать безопасный носитель клеточных популяций, такой как фиброин шелка в сочетании с глиальным нейротрофическим фактором (GDNF), который представляет безусловный интерес в регулировании регенерации роговицы за счет своих биологических эффектов.

В настоящее время в литературе не представлены и не разработаны способы эффективного восстановления эпителиально-стромальных дефектов роговицы при помощи биоинженерных конструкций на основе фиброина шелка в сочетании с глиальным нейротрофическим фактором, что явилось актуальной проблемой, определившей цель данного исследования.

Цель настоящего исследования

Разработать метод восстановления эпителиального и эпителиально-стромального повреждения роговицы путём доставки глиального нейротрофического фактора (GDNF).

Задачи исследования

1. Изучить влияние глиального нейротрофического фактора на процесс регенерации эпителиального и эпителиально-стромального повреждения роговицы в эксперименте на лабораторных животных.
2. Разработать биodeградируемую конструкцию из фиброина шелка для доставки глиального нейротрофического фактора (GDNF) в зону эпителиального и эпителиально-стромального повреждения роговицы.
3. В эксперименте *in vitro* на клеточной культуре кератоцитов оценить безопасность полученной биodeградируемой конструкции.

4. В эксперименте *in vitro* на клеточной культуре кератоцитов оценить эффективность полученной биodeградируемой конструкции.
5. В эксперименте на лабораторных животных доказать эффективность применения полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка для доставки глиального нейротрофического фактора (GDNF) в зону эпителиального и эпителиально-стромального повреждения роговицы.

Научная новизна

1. Впервые в эксперименте на животных показано, что глиальный нейротрофический фактор на различных сроках наблюдения оказывает эффективную стимуляцию эпителизации роговицы с эпителиальным и эпителиально-стромальным повреждением.
2. Впервые получена конструкция на основе биodeградируемого материала из фиброина шелка, содержащая в своем составе глиальный нейротрофический фактор для его доставки в зону дефекта роговицы.
3. Впервые проведена оценка жизнеспособности клеточных культур кератоцитов, выделенных из кадаверных глаз человека, в процессе культивирования совместно с каркасом на основе фиброина шелка, содержащих глиальный нейротрофический фактор.
4. Впервые проведена оценка эффективности полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка в процессе культивирования с клеточными культурами кератоцитов, выделенными из кадаверных роговиц человека.
5. Впервые с участием лабораторных животных проведена оценка эффективности полученных биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка в качестве материала для доставки глиального нейротрофического фактора в зону повреждения роговицы.

Практическая значимость

1. Разработанная в данном исследовании биodeградируемая конструкция на основе фиброина шелка, примененная в качестве материала для доставки глиального нейротрофического фактора, обеспечит эффективную эпителизацию поврежденных роговицы.
2. Разработанная биodeградируемая конструкция на основе фиброина шелка в сочетании с глиальным нейротрофическим фактором не оказывает влияния на жизнеспособность и является безопасной для клеточной популяции кератоцитов.
3. Систематизация абсолютных и относительных показаний к применению биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка в сочетании с глиальным

нейротрофическим фактором в дальнейшем позволит проводить эффективное восстановление ткани роговицы после эпителиальных и эпителиально-стромальных повреждений различной природы.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Полученная биodeградируемая конструкция на основе фиброина шелка, содержащая в своем составе глиальный нейротрофический фактор, способствует восстановлению роговичного эпителия после эпителиальных и эпителиально-стромальных повреждений роговицы на различных сроках наблюдения, а также не оказывает угнетающего воздействия на клеточные культуры кератоцитов, выделенные из кадаверных глаз человека, что подтверждалось данными, полученными в ходе иммуноцитохимического анализа данных клеточных культур.
2. Предложенный способ восстановления эпителиальных и эпителиально-стромальных повреждений роговицы при помощи биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка и содержащий в своем составе глиальный нейротрофический фактор в концентрации 250 нг/мл и 500 нг/мл в серии экспериментальных исследований на животных стимулировал восстановление роговичного эпителия, а также было показано, что местное применение изолированного глиального нейротрофического фактора также стимулирует реэпителизацию, однако с меньшей скоростью, чем при его применении с опорными конструкциями из фиброина шелка, что подтверждает возможность данных методик применяться в качестве перспективных способов восстановления поврежденной роговичной ткани.

Степень достоверности результатов и апробация работы

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом использованного в работе экспериментального материала, перечнем применённых методов исследования, соответствующих поставленным задачам, а также применением методов статистического анализа.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены в рамках следующих научных и научно-практических конференций: «IV Российского национального конгресса с международным участием «Трансплантация и донорство органов» 7 - 9 октября 2019 г. (Москва); СXXXIV Международной заочной научно-практической конференции «Инновационные подходы в современной науке» 30 января 2023 г. (Москва); LXVIII международной научно-практической конференции «Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования» 03 февраля 2023 г. (Москва).

Внедрение в практику

Результаты данного исследования внедрены в работу головной организации и филиалов ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Результаты данного диссертационного исследования применяются в лекционных курсах для клинических ординаторов и аспирантов на кафедре глазных болезней Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также используются в лекционных курсах для ординаторов, аспирантов и курсантов Института непрерывного профессионального образования ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Личный вклад автора в исследование

Автор принимал непосредственное участие в организации структуры, постановке цели и задач исследования, анализе отечественных и зарубежных источников литературы, осуществлял сбор материала для исследования, участвовал и самостоятельно проводил экспериментальные исследования. Автором самостоятельно проведена статистическая обработка, анализ и интерпретация данных, полученных в ходе экспериментальных исследований.

Публикации

По теме диссертационного исследования опубликовано 4 научные работы, из них 3 в центральных научных рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Российской Федерации и 1 в издании, включенном в базу данных Scopus.

Структура и объем диссертации

Текст диссертации представлен на 126 страницах, содержит 12 таблиц и 32 рисунка. Работа имеет классическую структуру и состоит из введения, 3 глав: обзора литературы, материалов и методов исследования и результатов проведенного исследования, а также из заключения, выводов, практических рекомендаций, списка используемых сокращений и терминов, списка литературы. Список литературы включает 144 источника, из которых 12 отечественных и 132 из иностранной литературы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Первый этап

Первый этап работы состоял в проведении эксперимента *in vivo* на лабораторных животных для первичной оценки влияния глиального нейротрофического фактора на процесс регенерации эпителиального и эпителиально-стромального повреждения роговицы. Для этого половозрелым самцам мышей формировали стандартную модель эпителиального и эпителиально-стромального дефекта роговицы, затем – проводили инстилляцию предварительно заготовленной среды, содержащей глиальный нейротрофический фактор. После чего контролировались изменения площади эпителиального и эпителиально-стромального повреждения для определения интенсивности регенеративного процесса. По окончании эксперимента проводился иммуногистохимический анализ (ИГХ) на специфические антитела, позволяющий провести детальную характеристику процесса регенерации.

В качестве опытной среды использовали кондиционированную среду, которую получали при культивировании клеток линии НЕК293 (Human Embryonic Kidney 293 cells), трансфицированных плазмидным вектором, содержащим ген GDNF без пре- и про-последовательностей под цитомегаловирусным промотором. Контролем служила среда DMEM. Моделирование дефекта роговицы выполняли при помощи трепана на самцах мышей линии C57BL/6 ($n = 20$), после чего проводили лечение указанными опытным и контрольным растворами. По окончании эксперимента проводилось ИГХ- исследование.

Использовались следующие антитела: к рецептору GDNF GFRa1, к анти-апоптозному фактору Bcl2 и его антагонисту Bax, к металлопротеиназе MMP9 и цитокератинам 5 и 18 типов (Abcam, Великобритания), к ERK1/2, JNK1/2, фосфо-ERK1/2 и фосфо-JNK1/2, к TGF- β , TIMP1 и c-Met (Santa Cruz, США), а также антитела к белковому маркеру пролиферации Ki67 (Novocastra, Великобритания).

Для оценки реиннервации срезы инкубировали с антителами к GAP43 (Acris Antibodies, Германия).

Различия в интенсивности иммуногистохимической окраски между роговицами контрольной и опытной группы оценивали по средним баллам оценки. Достоверность различий определяли с помощью одностороннего критерия ANOVA, применяя программу GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., США).

Второй этап

Данный этап работы заключался в получении и последующем изучении биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка как несущего матрикса для доставки глиального нейротрофического фактора в зону эпителиального и эпителиально-стромального повреждения роговицы. В связи с этим на данном этапе работы вначале была получена биodeградируемая конструкция на основе фиброина шелка. Затем в данном разделе работы проводилось исследование полученных биodeградируемых конструкций и аналогичных конструкций, содержащих различные концентрации GDNF.

Данный этап работы проводился на базе Лаборатории бионанотехнологий при ФГБУ "НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова" Минздрава России под руководством доктора биологических наук Антона Евгеньевича Ефимова.

Все виды биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка получали в виде пленок методом полива. Биodeградируемые конструкции получали из раствора, содержащего фиброин шелка, с общей концентрацией белка 20 мг/мл.

Для изготовления биodeградируемых конструкций (пленок), содержащих глиальный нейротрофический фактор, в раствор добавляли рекомбинантный глиальный нейротрофический фактор – GDNF (Cloud-Clone Corp., США) до требуемой концентрации. Использовали следующие концентрации глиального нейротрофического фактора: 50 нг/мл, 250 нг/мл, 500 нг/мл.

Полученные биodeградируемые конструкции исследовались в ходе сканирующей электронной микроскопии, сканирующей зондовой нанотомографии, оценки механических качеств, скорости биodeградации и интенсивности высвобождения глиального нейротрофического фактора.

Третий этап

Третий этап работы заключался в выделении клеточной культуры кератоцитов из трупных донорских роговиц Глазного тканевого банка и последующего клеточного культивирования кератоцитов роговицы человека с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка, содержащими глиальный нейротрофический фактор в концентрациях 50 нг/мл; 250 нг/мл; 500 нг/мл, а также без глиального нейротрофического фактора. Безопасность предлагаемых биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка, содержащих глиальный нейротрофический фактор, оценивалась в данном разделе исследования при помощи иммуноцитохимического анализа.

В работе использовали клетки, выделенные из стромальной части роговицы человека – кератоциты. Для получения первичной культуры кератоцитов использовались трупные роговицы, непригодные для СКП в клинике, полученные из Глазного банка ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургии глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. Экспериментальные исследования на тканях, выделенных из постмортальных человеческих глаз, проводились в соответствии с официально принятыми процедурами и специальным разрешением в рамках законодательства Российской Федерации. Лицензия позволяет использовать ткани, выделенные из трупных человеческих глаз для целей трансплантации и научных исследований.

Весь донорский материал, используемый в данном исследовании, проходил обязательную проверку на опасные инфекции. До экспериментальной части работы допускались роговицы от доноров, сыворотка крови которых не содержала ВИЧ 1 и 2 типов, гепатит В, гепатит С, а также сифилис.

Для культивирования выделенных из трупных донорских роговиц кератоцитов использовалась полная питательная среда следующего состава: DMEM/F12 (Sigma, США) с добавлением 5% - фетальной бычьей сыворотки (Thermo fisher scientific, США), 1% - раствора Glutamax (Thermo fisher scientific, США), 1% - раствора антибиотиков (Thermo fisher scientific, США).

Культивирование полученных в ходе исследования кератоцитов проводили при стандартных условиях: $t+37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 . Полную смену культуральной среды проводили каждые 3-ое суток, визуальный контроль роста клеток осуществляли, используя инвертированный световой фазово-контрастный микроскоп Olympus IX-81 (Olympus, Япония).

Полученные культуры кератоцитов были разделены на блоки: во 2, 3 и 4 блоках при культивировании кератоцитов использовали биodeградируемые конструкции на основе фиброина шелка, содержащие глиальный нейротрофический фактор в концентрациях 50 нг/мл, 250 нг/мл и 500 нг/мл соответственно; в 1 блоке культивирование кератоцитов проводилось без биodeградируемых конструкций и без глиального нейротрофического фактора (контроль); в 5 блоке – с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка, без содержания глиального нейротрофического фактора.

Для определения влияния полученных на предыдущих этапах работы биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка, содержащих глиальный нейротрофический фактор, и биodeградируемых конструкций без глиального нейротрофического фактора на культуру кератоцитов использовали Аннексин V и 7AAD (Abscam, Великобритания).

Четвертый этап

На данном этапе исследования для определения эффективности полученной биodeградируемой конструкции проводили оценку пролиферативной активности клеточных культур кератоцитов при их культивировании совместно с биodeградируемыми конструкциями. В качестве первого метода оценки использовался подсчет клеток с применением автоматизированной системы. Также на данном этапе работы проводилось иммуногистохимическое исследование для обнаружения в исследуемых образцах характерных маркеров пролиферации с использованием инвертированного лазерного сканирующего конфокального микроскопа и программного обеспечения.

Визуальный контроль роста кератоцитов осуществляли, используя инвертированный световой фазово-контрастный микроскоп Olympus IX-81 (Olympus Corporation, Япония).

Для оценки пролиферативной активности кератоцитов, клетки ферментативно снимали с 4-х лунок каждой группы на 3, 5 и 9 сутки, центрифугировали и проводили подсчет клеток в автоматическом счетчике клеток Luna II (Logos Biosystems, Республика Корея).

Затем на данном этапе работы проводилось иммуноцитохимическое исследование (ИЦХ) для оценки пролиферативной активности кератоцитов после культивирования совместно с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка, содержащими глиальный нейротрофический фактор и без глиального нейротрофического фактора. Оценивалась активация ядерного белка Ki-67 в клеточной культуре кератоцитов. Исследование производили на инвертированном лазерно-сканирующем конфокальном микроскопе FV10i (Olympus Corp., Япония), анализ снимков проводился при помощи программного обеспечения «CellProfiler».

Пятый этап

Заключительный этап исследования заключался в проведении эксперимента на лабораторных мышах. Вначале лабораторным животным формировали стандартизированную модель эпителиально-стромального повреждения роговицы. После формирования повреждения на роговицы животных накладывали полученные биodeградируемые конструкции на основе фиброина шелка, содержащие глиальный нейротрофический фактор. На момент окончания эксперимента проводили заключительную оценку состояния роговичной поверхности, после чего животных выводили из эксперимента для проведения иммуногистохимического исследования роговичной ткани.

Работу проводили на половозрелых самцах мышей линии C57BL/6J с экспериментальной моделью эпителиально-стромального повреждения роговицы. Все эксперименты на животных были одобрены Комитетом по этике ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России.

Для проведения экспериментального исследования были сформированы следующие группы лабораторных животных с моделями эпителиально-стромальных дефектов роговицы:

Группа №1 – модель повреждения роговицы + биodeградируемая конструкция с содержанием GDNF в концентрации 50 нг/мл.

Группа №2 – модель повреждения роговицы + биodeградируемая конструкция с содержанием GDNF в концентрации 250 нг/мл.

Группа №3 – модель повреждения роговицы + биodeградируемая конструкция с содержанием GDNF в концентрации 500 нг/мл.

Группа №4 – модель повреждения роговицы + биodeградируемая конструкция, не содержащая GDNF.

Группа №5 – модель повреждения роговицы + инстилляций водного раствора GDNF в концентрации 500 нг/мл (концентрацию 500 нг/мл глиального нейротрофического фактора выбрали как максимальную, используемую в биodeградируемых конструкциях, чтобы сравнить эффективность применения глиального нейротрофического фактора в виде инстилляций с применением биodeградируемых конструкций с глиальным нейротрофическим фактором в той же концентрации за то же количество дней наблюдения).

Группа №6 – контрольная группа с моделированным повреждением роговицы.

Все группы состояли из 7 животных и 7 глаз. Всем группам 3 раза в сутки проводили инстилляцию 1 капли 0,3% раствора офлоксацина.

В ходе эксперимента у животных на 1, 3 и 5 сутки после повреждения проводили анализ площади эпителиального дефекта роговицы для оценки регенерации эпителия. Для этого роговицу окрашивали флуоресцеином и фотографировали с помощью фотошелевой лампы VX 900, Haag-Streit IM (Швейцария). Область, окрашенную флуоресцеином, измеряли с использованием программного обеспечения ImageJ. Животных выводили из эксперимента на 5 сутки, после чего проводили иммуногистохимическое исследование роговичного материала. Применяли антитела к антиапоптозному фактору Bcl2 и его антагонисту Bax (Abscam, Великобритания), антитела к фосфо-ERK1/2 и фосфо-JNK1/2 (Thermo-Fisher Scientific, США), антитела к маркеру пролиферации Ki67 (Novocastra, Великобритания). Для оценки реиннервации срезы инкубировались с антителами к GAP43 (Acris Antibodies, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты первого этапа

В результате проведенной макроскопической оценки роговиц мышей опытной группы с эпителиальным дефектом диаметром 1,5 мм было установлено, что через 6, 12, 21 час его размер составлял, соответственно, 62 %, 30 % и 5 % от исходного, при этом в контрольной группе после формирования эпителиального дефекта 1,5 мм диаметром через 6, 12, 21 час его размер составил, соответственно, 70 %, 55 %, 25 % от исходного.

При макроскопической оценке эпителиального дефекта диаметром 2,5 мм было установлено, что размер дефекта в опытной группе спустя 6, 12, 21 час составил, соответственно, 81 %, 50 % и 18 % от исходного размера, при этом в контрольной группе через 6, 12, 21 час после формирования эпителиального дефекта диаметром 2,5 мм его размеры составляли, соответственно, 90%, 70 %, 42% от исходного диаметра.

В результате проведенного иммуногистохимического исследования роговиц после формирования эпителиально-стромального повреждения в базальном слое эпителия лимбальной зоны в опытной и контрольной группах была установлена положительная реакция с антителами к GFRA1, что подтвердило наличие GDNF-рецепторов в образцах обеих групп.

Установлено, что реакция с антителами к фосфо-ERK в опытной группе была более интенсивной в эпителии, а к фосфо-JNK в строме роговицы на 5 и 10 сут. после повреждения. Полученные результаты свидетельствуют о повышении пролиферативной активности эпителиоцитов и кератоцитов через MAP-киназный каскад сигнальных путей. Выраженная позитивная реакция на 5 и 10 сут. с антителами к C-met и Цитокератинам 5 и 18 в опытной группе являлась подтверждением пролиферативной активности и физиологического характера эпителизации.

Реакция с антителами к Bcl2 в эпителии роговицы в экспериментальной группе была более интенсивной, чем в контроле на 5 и 10-е сутки после повреждения. Напротив, реакция с антителами к Вах в эпителии роговицы была более выраженной в контрольной группе. Наличие высокого уровня антиапоптозных маркеров в опытной и проапоптозных – в контрольных группах может свидетельствовать об антиапоптотическом эффекте GDNF.

Реакция с антителами к матриксной MMP9 на 5 и 10 сут. протекала интенсивнее в эпителии контрольной группы. MMP9 способствует разрушению базальной мембраны и может приводить к нарушению процессов миграции эпителиальных клеток и их адгезии к базальной мембране.

Реакция с антителами к ингибитору металлопротеиназ TIMP-1 была более выраженной в эпителии, базальной мембране и прилежащих слоях стромы роговиц контрольной группы на 5 сут. и во всех слоях стромы на 10 сут. Избыток TIMP1 в контроле свидетельствует об аномальном накоплении матрикса (фиброзирование).

На 10-е сутки в опытной группе $6,5 \pm 2,1$ % клеток стромы и $2,2 \pm 0,3$ % клеток эпителия оставались Ki67-иммунопозитивными, в то время как в контрольной группе Ki67-иммунопозитивными были $1,6 \pm 0,4$ % клеток стромы, Ki67-иммунопозитивные клетки эпителия не определялись. Были обнаружены статистически значимые отличия между группами ($p < 0,05$).

Выявлена слабая реакция с антителами к TGF- β в роговицах опытной группы и более интенсивная – в контроле на 5 и 10 сут., что подтверждает более выраженный процесс фиброзирования в контрольной группе. На 10-е сутки в опытной группе, в отличие от контрольной группы, наблюдалась полная эпителизация.

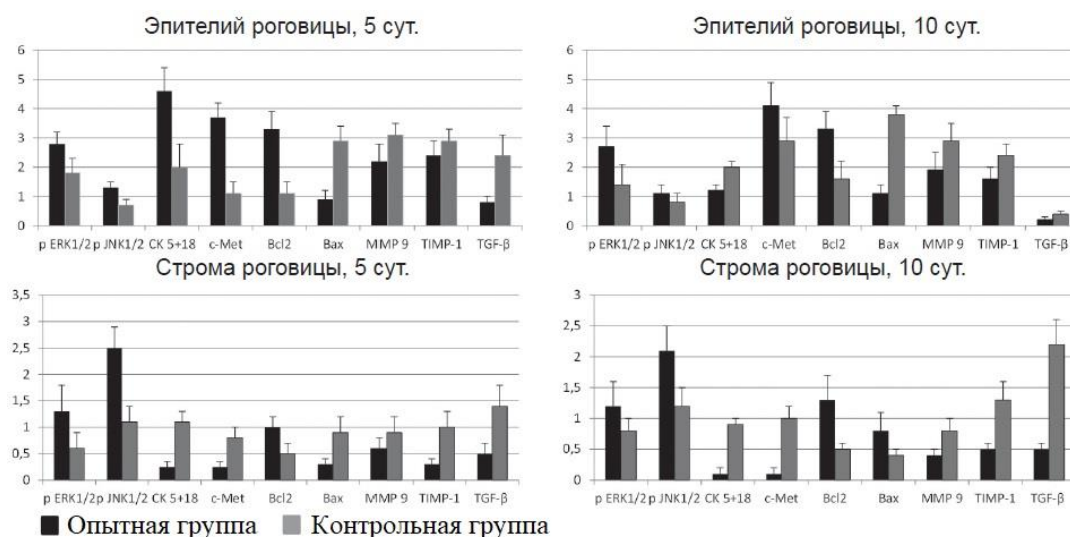


Рисунок 1 – Результаты бальной оценки интенсивности иммуногистохимической реакции эпителия и стромы роговицы опытной и контрольной групп на 5-е и 10-е сутки после повреждения с антителами к p-ERK1/2, p-JNK1/2, цитокератинам 5 и 18 типов, c-Met, Bcl2, Bax, MMP9, TIMP-1 и TGF- β

Количество GAP43-иммунопозитивных нервных волокон в строме на 10-е сутки с момента формирования дефекта было значительно больше в роговицах опытной группы, по сравнению с контрольной группой: 1150 ± 336 и 376 ± 156 волокон в 1 мм^2 среза, соответственно.

Результаты второго этапа

На данном этапе была получена и изучена конструкция на основе фиброина шелка, которую возможно использовать для доставки глиального нейротрофического фактора в зону эпителиального и эпителиально-стромального повреждения роговицы.

Были получены 4 вида матриксов – биodeградируемых конструкций в виде пленок. Все биodeградируемые конструкции были созданы на основе фиброина шелка: 3 вида полученных биodeградируемых конструкций содержали глиальный нейротрофический фактор (GDNF) в разных концентрациях – 50 нг/мл, 250 нг/мл и 500 нг/мл. Оставшийся вид – не содержал GDNF.

В результате проведенной сканирующей электронной микроскопии полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка была изучена её ультраструктура и рельеф поверхности. Толщина полученных конструкций была равномерной на всем протяжении оцениваемого участка и составила 45-50 мкм.

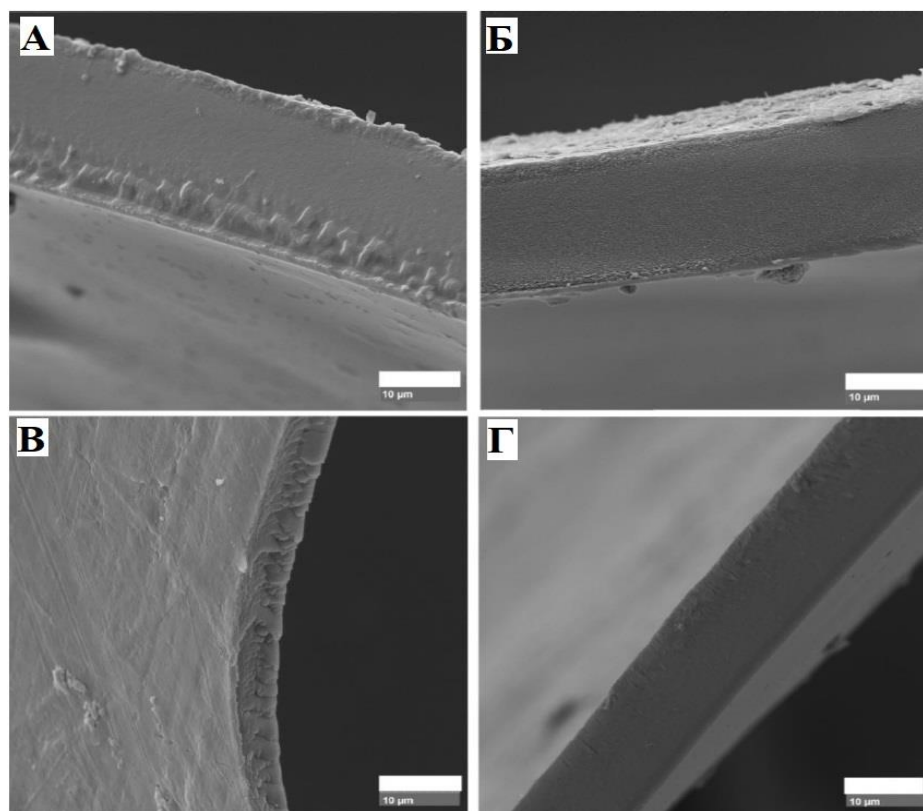


Рисунок 2 – Сканирующая электронная микроскопия.

Поперечные сечения полученных биodeградируемых конструкций с концентрациями GDNF:

А – 0 нг/мл; Б – 50 нг/мл; В – 250 нг/мл; Г – 500 нг/мл

В результате проведенного исследования внутренней структуры полученных биodeградируемых конструкций методом сканирующей зондовой нанотомографии с высоким разрешением было установлено, что все биodeградируемые конструкции имеют одинаковую структуру из плотно упакованных глобул фиброина с размерами в диапазоне от 15 до 30 нм.

В результате проведенных измерений механических свойств не было обнаружено статистически значимых отличий между биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка с концентрациями глиального нейротрофического фактора 0 нг/мл, 50 нг/мл, 250 нг/мл, 500 нг/мл. Было установлено, что средний предел прочности на растяжение у полученных биodeградируемых конструкций составляет 25-50 МПа, упругость – 3-8 %.

Таблица 1 – Количественные характеристики наноструктуры биodeградируемых конструкций, полученные в результате измерений поперечных сечений на сканирующем зондовом микроскопе

Исследуемые характеристики	Концентрация глиального нейротрофического фактора в биodeградируемой конструкции, нг/мл			
	0	50	250	500
Высота	43,19 ± 4,5	45,9 ± 4,5	64,7 ± 5,3	53,3 ± 5,1
Средняя шероховатость (R _a), нм	3,69 ± 0,14	3,72 ± 0,14	4,96 ± 0,26	4,76 ± 0,27
Среднеквадратичное значение высоты (RMS), нм	4,66 ± 0,12	4,63 ± 0,11	6,37 ± 0,37	5,98 ± 0,32
Средняя плотность глобул (1/мкм ²)	512,2 ± 22,8	524,4 ± 26,2	352,8 ± 21,4	408,2 ± 22,6
Средний диаметр глобулы, нм	19,3 ± 2,7	19,6 ± 2,5	26,4 ± 2,9	24,1 ± 2,8

В результате проведенного анализа процесса деградации конструкций в эксперименте *in vitro* было установлено, что биodeградируемые конструкции разлагаются в фосфатно-солевом буфере через 7 дней.

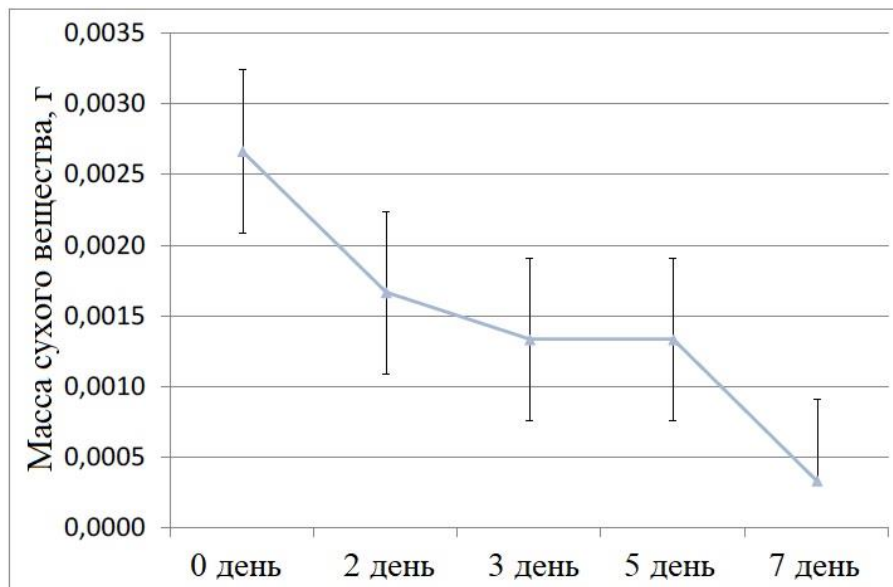


Рисунок 3 – Динамика изменения массы сухого вещества биodeградируемой конструкции, содержащей глиальный нейротрофический фактор в концентрации 250 нг/мл, в фосфатно-солевом буфере в течение 7 дней

Количество глиального нейротрофического фактора, высвобожденного из биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка, на 7-е сутки составило $90,4 \pm 4$ % в группе, содержащей 50 нг/мл GDNF, $92,92 \pm 6$ % в группе, содержащей 250 нг/мл GDNF и $92,75 \pm 6$ % в группе, содержащей 500 нг/мл GDNF.

Результаты третьего этапа

На данном этапе работы из трупных донорских роговиц были получены кератоциты, которые затем были культивированы и использовались на последующих этапах: полученные из трупных донорских роговиц кератоциты были культивированы совместно с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка.

Конъюгированный с флуоресцентным красителем аннексин V использовался в качестве маркера для обнаружения клеток на стадии апоптоза. Витальный краситель 7-амино-актиномицин (7-AAD) использовался для идентификации необратимо поврежденных клеток. Мембраны жизнеспособных и неповрежденных клеток не проницаемы для 7-AAD, тогда как мембраны мертвых и поврежденных клеток для 7-AAD проницаемы.

В результате оценки жизнеспособности кератоцитов на 3, 5 и 9 сутки при культивировании без биodeградируемых конструкций, с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка с глиальным нейротрофическим фактором в различных концентрациях и биodeградируемых конструкций без глиального

нейротрофического фактора достоверных различий выявлено не было, большинство клеток (90,38 - 97,89%) оставалось жизнеспособными.

Таблица 2 – Жизнеспособность клеток на 9 сутки

	9 сутки			
	AnV- 7AAD- Живые клетки	AnV+ 7AAD- Апоптоз	AnV+ 7AAD+ Мертвые клетки	AnV- 7AAD+ Некрот
Контроль	94% ± 2,4	4% ± 0,1	2% ± 0,1	0%
Пленка GDNF 50 нг/мл	96% ± 2,5	3% ± 0,3	1% ± 0,1	0%
Пленка GDNF 250 нг/мл	95% ± 2,7	4% ± 0,2	1% ± 0,1	0%
Пленка GDNF 500 нг/мл	92% ± 2,3	6% ± 0,7	2% ± 0,2	0%
Пленка без GDNF	95% ± 2,0	5% ± 0,3	0%	0%

Результаты четвертого этапа

В данном разделе исследования в эксперименте *in vitro* оценивалась эффективность биodeградируемых конструкций, содержащих глиальный нейротрофический фактор.

Для этого полученные клеточные культуры кератоцитов культивировались совместно с биodeградируемыми конструкциями, содержащими различные концентрации глиального нейротрофического фактора, после чего проводилась оценка пролиферативной активности при помощи автоматизированного счетчика клеток.

Для оценки пролиферативной активности кератоцитов в блоках 1-5 на 3, 7 и 9 сутки клеточного культивирования проводили подсчет клеток в автоматизированном счетчике клеток.

На 1 и 3 сутки культивирования кератоцитов без биodeградируемых конструкций, совместно с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина, содержащими глиальный нейротрофический фактор в различной концентрации и без него, их пролиферативная активность не отличалась ($p > 0,05$).

На 5 сутки пролиферативная активность кератоцитов при использовании биodeградируемых конструкций, содержащих глиальный нейротрофический фактор в концентрации 250 нг/мл и 500 нг/мл, была больше, чем при использовании биodeградируемых конструкций с глиальным нейротрофическим фактором в

концентрации 50 нг/мл в 1,5 и 1,6 раза, соответственно, и больше, чем при культивировании без биodeградируемых конструкций в 1,7 и 1,8 раза, соответственно; самая низкая пролиферативная активность кератоцитов наблюдалась при использовании биodeградируемых конструкций без глиального нейротрофического фактора.

На 9 сутки культивирования наиболее высокая пролиферативная активность клеточных культур кератоцитов также наблюдалась в присутствии биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка, содержащих глиальный нейротрофический фактор в концентрации 250 нг/мл и 500 нг/мл.

За время культивирования отмечалась постепенная биodeградация фиброиновых биodeградируемых конструкций, что способствовало миграции клеток внутрь биodeградируемой конструкции.

На 1 и 3 сутки активность белка Ki-67 в культуре кератоцитов была статистически не значима ($p > 0,05$).

На 5 сутки наибольшая активность белка Ki-67 в культуре кератоцитов была определена при использовании биodeградируемых конструкций, содержащих глиальный нейротрофический фактор в концентрации 250 нг/мл и 500 нг/мл; самая низкая активность белка Ki-67 в культуре кератоцитов наблюдалась при использовании биodeградируемых конструкций без глиального нейротрофического фактора.

На 9 сутки культивирования наиболее высокая активность белка Ki-67 в культуре кератоцитов также наблюдалась в присутствии биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка, содержащих глиальный нейротрофический фактор в концентрации 250 нг/мл и 500 нг/мл.

Таблица 3 – Количество кератоцитов при культивировании с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка, содержащими глиальный нейротрофический фактор в различных концентрациях

	1 сутки	3 сутки	5 сутки	9 сутки
Контроль	7500	14850±283,805	38610±519,262	177606±19943,91
50 нг/мл	7500	15720±284,086	45588±461,672	196030±21529,4
250 нг/мл	7500	19000±241,514	66500±548,821	285950±30551,02
500 нг/мл	7500	19600±260,064	71000±564,269	291100±32747,9
Контроль Пленки	7500	13200±272,213	29040±825,126	121960±6962,42

Результаты пятого этапа

Площадь эпителиального дефекта роговицы при биомикроскопическом исследовании на 3 и 5 сутки наблюдения во всех опытных группах животных была достоверно меньше, чем в контрольной группе.

На 3 сутки площадь эпителиального дефекта во 2 группе составляла 27%, в 3 и 5 группах – 29%, в 1 и 4 группах – 40% и 42%, соответственно. На 5 сутки площадь эпителиального дефекта во 2 группе составляла 3%, в 3 группе – 4%, в 5 группе – 10%, в 1 группе – 13%, в 4 группе – 18%. Также на 5 сутки наблюдалась полная биодеградация полученных конструкций на основе фиброина шелка.

К окончанию эксперимента (5 сутки) наиболее активное восстановление эпителиального слоя роговицы наблюдалось при использовании биодеградируемых конструкций, содержащих глиальный нейротрофический фактор в концентрации 250 нг/мл и 500 нг/мл: площадь эпителиального дефекта во 2 и 3 группах достоверно отличалась от контрольной группы ($p < 0,05$).

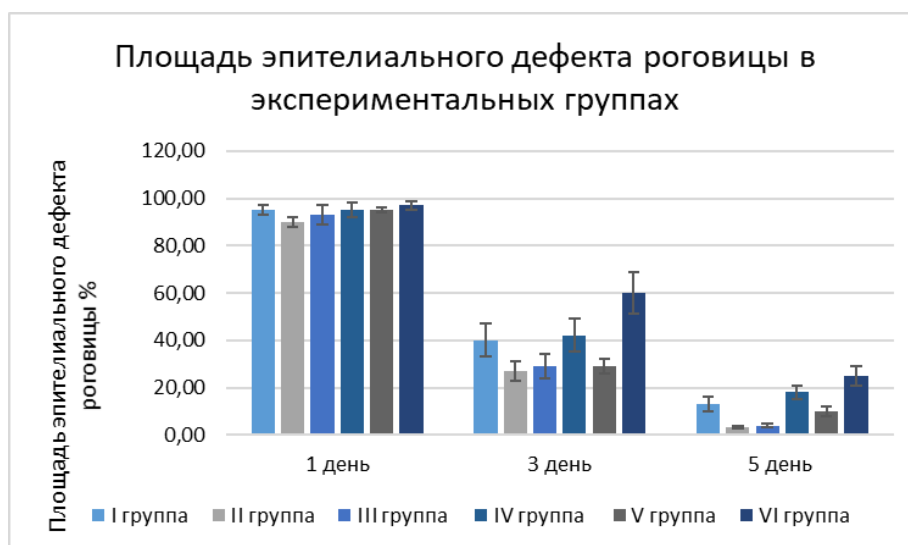


Рисунок 4 – Динамика изменения площади эпителиального дефекта роговицы в опытных и контрольной группах на 1, 3 и 5 день с момента формирования дефекта роговицы

При анализе результатов иммуногистохимического исследования установлено, что интенсивность реакции с антителами к фосфо-ERK1/2 и фосфо-JNK1/2 в эпителии и строме роговиц опытных групп животных 1, 2, 3, 5 была достоверно выше по сравнению с группой 4 и контрольной группой.

Наивысшая интенсивность реакции с антителами к фосфо-ERK1/2 и фосфо-JNK1/2 отмечена во 2 и 3 группах и была достоверно выше, чем в 4 группе и контроле. Реакция с антителами к Bcl2 протекала достоверно активнее в эпителии роговиц 1, 2, 3 и 5 групп по сравнению с 4 и контрольной группами. Установлено, что реакция с антителами к Вах протекала достоверно активнее в эпителиальном слое контрольной группы.

Полученные результаты свидетельствуют о повышении пролиферативной активности эпителиоцитов и кератоцитов опытных групп через MAP-киназный каскад сигнальных путей.

Наличие высокого уровня антиапоптозных маркеров в опытных группах и проапоптозных маркеров в контрольных группах может свидетельствовать об антиапоптотическом эффекте GDNF.

Установлено, что GDNF в составе биodeградируемых конструкций стимулировал образование нервных волокон, что приводило к восстановлению стромального нервного сплетения: выявлено достоверно большее количество GAP43-иммунопозитивных нервных волокон в строме роговиц опытных групп 1,2,3,5, по сравнению с группой № 4 и контрольной группой.



Рисунок 5 – Результаты оценки интенсивности иммуногистохимической реакции эпителия с антителами к pERK1/2, p JNK1/2, Bcl2 и Вах после эпителиально-стромального повреждения в опытных и контрольной группах (* p < 0,05)

В результате оценки количества GAP43-иммунопозитивных нервных волокон в ходе иммуногистохимического исследования было установлено, что GDNF в составе полученных биodeградируемых конструкций стимулировал образование нервных волокон, что приводило к восстановлению стромального нервного сплетения: выявлено достоверно большее количество GAP43-иммунопозитивных нервных волокон в строме роговиц опытных групп 1-3 и 5, чем в 4-й группе и в контроле. В 1-й группе количество GAP43-иммунопозитивных нервных волокон в строме роговиц составило 623 ± 65 волокон на 1 мм^2 среза, во 2-й группе – 1050 ± 121 волокон на 1 мм^2 среза, в 3-й группе – 975 ± 35 волокон на 1 мм^2 среза, в 4-й группе – 295 ± 47 волокон на 1 мм^2 среза, в 5-й группе – 895 ± 74 волокон на 1 мм^2 среза, в 6-й группе (контроль) – 276 ± 56 волокон на 1 мм^2 среза.

Таким образом, при статистическом анализе полученных данных о количестве GAP43-иммунопозитивных нервных волокон было установлено, что различия между опытными группами 1-3 и 5 с контролем были достоверно значимыми ($p < 0,05$), кроме группы 4. Данное наблюдение свидетельствует об увеличении интенсивности процесса формирования стромальных нервных сплетений под влиянием глиального нейротрофического фактора как при инстилляции данного фактора в виде раствора, так и в составе полученных биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка.

Основные положения диссертации опубликованы в рецензируемых научных изданиях, список публикаций указан на странице 22.

ВЫВОДЫ

1. На основании проведенного иммуногистохимического исследования в эксперименте показана способность глиального нейротрофического фактора стимулировать процессы клеточной пролиферации и регенерации в эпителиальных и эпителиально-стромальных дефектах роговицы диаметром 1,5 и 2,5 мм.
2. В эксперименте *in vitro* получены и проанализированы биodeградируемые конструкции на основе фиброина шелка, содержащие различные концентрации глиального нейротрофического фактора (50, 250, 500 нг/мл): высвобождение глиального нейротрофического фактора наблюдалось во всех опытных образцах и прекращалось по окончании процесса биodeградации (на 7-е сутки).
3. В эксперименте *in vitro* показана безопасность полученных биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка, содержащих глиальный нейротрофический фактор (50, 250, 500 нг/мл), для кератоцитов роговицы человека: большинство клеток (90,38 - 97,89 %) оставалось жизнеспособными к окончанию эксперимента (на 9-е сутки).

4. В эксперименте *in vitro* изучена эффективность полученных биodeградируемых конструкций: на 5 сутки пролиферативная активность кератоцитов при культивировании с биodeградируемыми конструкциями, содержащими глиальный нейротрофический фактор в концентрации 250 нг/мл и 500 нг/мл, была выше, чем при культивировании без биodeградируемых конструкций в 1,7 и 1,8 раза, соответственно.
5. В эксперименте *in vivo* на лабораторных животных показана эффективность применения биodeградируемых конструкций, содержащих глиальный нейротрофический фактор в концентрации 50, 250, 500 нг/мл: интенсивность регенерации эпителия роговицы на 3 и 5 сутки наблюдения во всех опытных группах была достоверно выше, чем в контрольной группе без глиального нейротрофического фактора.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные биodeградируемые конструкции на основе фиброина шелка, содержащие глиальный нейротрофический фактор в различных концентрациях (50, 250, 500 нг/мл) оказывают выраженное активирующее влияние на пролиферативные процессы и могут использоваться для стимулирования регенерации эпителиального и эпителиально-стромального повреждения роговицы.
2. Добавление глиального нейротрофического фактора в состав биodeградируемых конструкций не оказывает влияния на их физические характеристики при этом позволяет доставлять указанный фактор в очаг повреждения роговицы до момента окончания процесса биodeградации (на 7-е сутки от начала эксперимента).
3. Применение глиального нейротрофического фактора в виде инстилляций приводит к увеличению числа GAP-43-иммунопозитивных нервных волокон в строме роговицы, в результате чего в опытной группе наблюдаются процессы более активного формирования стромального нервного сплетения в поврежденной роговице по сравнению с контрольной группой, не получающей инстилляций глиального нейротрофического фактора.

Статьи в рецензируемых научных изданиях по специальностям 3.3.3.

Патологическая физиология, 3.1.5. Офтальмология и приравненные к ним публикации:

1. Гаврилова, Н.А. Влияние модифицированного глиального нейротрофического фактора (GDNF) на регенерацию эпителиального и эпителиально-стромального дефектов роговицы в эксперименте / Н.А. Гаврилова, А.В. Ревущин, С.А. Борзенков, М.Б. Агаммедов [и др.] // Гены и клетки. – 2016. – т. 11. – № 3. – С. 54-62.

2. Gavrilova, N.A. The effect of biodegradable silk fibroin-based scaffolds containing glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) on the corneal regeneration process / N.A. Gavrilova, S.A. Borzenok, A.V. Revishchin, **M.B. Agammedov** [et al] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – т. 185. – С. 264-276.
3. Агаммедов, М.Б. Патогенетические особенности восстановления повреждений роговицы при помощи биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка / **М.Б. Агаммедов**, Д.С. Островский, В.П. Соболев, М.Б. Агаммедов [и др.] // Патогенез. – 2022. – т. 20. – № 4. – С. 63-68.
4. Агаммедов, М.Б. Оценка пролиферативной активности кератоцитов после культивирования совместно с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка. / **М.Б. Агаммедов**, Д.С. Островский, М.Х. Хубецова [и др.] // Патогенез. – 2023. т. 21. – № 1. – С. 75-78.

Прочие публикации (тезисы):

1. Гаврилова, Н.А. Влияние биodeградируемых скаффолдов из фиброина шелка, содержащих глиальный нейротрофический фактор (GDNF), на процесс регенерации роговицы в эксперименте / Н.А. Гаврилова, С.А. Борзенок, И.И. Агапов, **М.Б. Агаммедов** [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов, Приложение. – 2019. – т.21. – № 5. – С.147-147.
2. Агаммедов, М.Б. Оценка биodeградируемых материалов в качестве систем доставки терапевтических препаратов для восстановления роговицы / **М.Б. Агаммедов** С.А. Борзенок // Инновационные подходы в современной науке: сб. ст. по материалам СХХХIV междунар. науч.-практ. конф. — № 2(134). — М., Изд. «Интернаука», 2023. – С. 17–22. <https://www.internauka.org/conf/inno/cxxxiv>
3. Агаммедов, М.Б. Оценка восстановления нервных волокон роговицы при помощи биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка / **М.Б. Агаммедов** С.А. Борзенок // Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования: сб. ст. по материалам LXVIII междунар. науч.-практ. конф. — № 1(62). — М., Изд. «Интернаука», 2023. – С. 15-18. <https://www.internauka.org/conf/med/lxviii>

Список сокращений

ВОЗ	Всемирная Организация Здравоохранения
ВИЧ	вирус иммунодефицита человека
СЭМ	сканирующая электронная микроскопия
СЗМ	сканирующая зондовая нанотомография
СКП	сквозная кератопластика
ИЦХ	иммуноцитохимическое исследование
ИГХ	иммуногистохимический анализ
GDNF	глиальный нейротрофический фактор
TGF-β	трансформирующий фактор роста-бета