

## РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

DOI: 10.30906/0869-2092-2018-81-4-22-27

### ОСОБЕННОСТИ БИОДЕГРАДАЦИИ ИМПЛАНТАТА КОЛЛАГЕНА В ТКАНЯХ ГЛАЗА КРОЛИКА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ АНТИГЛАУКОМНОГО ХИРУРГИЧЕСКОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

В. Р. Мамиконян<sup>1</sup>, Н. В. Фисенко<sup>1</sup>, Т. А. Демура<sup>2</sup>,  
Е. А. Коган<sup>2</sup>, Э. Э. Казарян<sup>1</sup>

В экспериментах на кроликах изучен процесс репарации тканей после транслимбального микродренирования с использованием биорезорбируемого антиглаукомного дренажа (БРАД) и дренажа iGen. Имплантация исследуемых дренажей сопровождается активной локальной воспалительной реакцией на сроке 7 сут наблюдения и полным лизисом iGen к 30 дню и БРАД к 60 дню после операции. Активный ангиогенез на 60 – 90 сут после имплантации БРАД способствует медленному фиброзированию экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) конъюнктивы и склеры и обеспечивает сохранение выраженного оттока внутриглазной жидкости (ВГЖ). К 90 сут наблюдения после имплантации iGen отмечается уменьшение ангиогенеза, сопровождающееся грубым фиброзом ЭЦМ, приводящим к уменьшению просвета новообразованных сосудов и, следовательно, к снижению оттока ВГЖ.

**Ключевые слова:** коллаген; репарация тканей; ангиогенез; фиброз; отток внутриглазной жидкости; глаукома.

## ВВЕДЕНИЕ

Как известно, коллаген является биологическим материалом, используемым в качестве матрикса при тканевой инженерии, а также для формирования депо лекарственных препаратов различных групп. Термическая и химическая стабильность, отсутствие канцерогенных свойств, возможность полной резорбции в срок от нескольких недель до одного года позволяют широко применять коллаген в медицинской практике [2, 5, 8]. В офтальмологии коллагеновые матриксы используют в качестве роговичных покрытий с целью стимуляции репаративных процессов, при склероукрепляющих операциях, в хирургическом лечении глаукомы и т.д.

Принято считать, что глаукома — группа хронических заболеваний глаз различной этиологии, сопровождающихся периодическим или постоянным повышением внутриглазного давления (ВГД), выходящим за пределы толерантного, атрофией зрительного нерва, характерными изменениями поля зрения. Предложен показатель “целевого ВГД”, определяемый на основа-

нии стадии заболевания, начального уровня ВГД до проведения гипотензивной терапии, а также исходя из возраста пациента, скорости прогрессирования патологического процесса по данным морфофункциональных исследований и наличия других факторов риска [3]. В последние годы в ФГБНУ “НИИГБ” разработан и внедрен в практику метод определения индивидуальной нормы ВГД (ИНВГД), также обозначенной как толерантное ВГД [1]. Хирургическое лечение глаукомы направлено на снижение ВГД до толерантного уровня, при котором отсутствуют признаки прогрессирования оптической нейропатии.

В большинстве случаев уменьшение гипотензивного эффекта в отдаленные сроки после операции связано с избыточным рубцеванием сформированного пространства между конъюнктивой, теноновой капсулой, эписклерой и склерой. Перспективным направлением профилактики избыточного рубцевания является использование биорезорбируемых коллагеновых дренажей. Впервые применение коллагеновой губки в качестве дренажа при хирургическом лечении глаукомы описано в экспериментальной работе R. Mulberger и соавт. в 1962 г. [7]. В последующие годы были предложены различные модификации фистулизирующих и непроникающих антиглаукомных операций с применением коллагеновых дренажей. В 2009 г. FDA (США) был зарегистрирован биорезорбируемый дренаж iGen (Biomedical Inc. Taipei, Taiwan), представляющий со-

<sup>1</sup> ФГБНУ “НИИ глазных болезней”, Россия, 119021, Москва, ул. Россолимо, 11А, Б; e-mail: natfisenko@mail.ru, тел: 8-903-123-39-44.

<sup>2</sup> ФГОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский университет), Россия, 119991, Москва, Трубецкая ул., д. 8 стр. 2.

бой пористый матрикс, состоящий из коллагена и хондроитин-6-сульфата и предназначенный для имплантации в субконъюнктивальное пространство [9]. На основании результатов проведенных экспериментальных исследований было показано, что структура коллагенового матрикса обеспечивает направленный рост фибробластов и новообразованных сосудов через поры, а постепенная резорбция дренажа в сроки от 30 до 90 сут приводит к формированию порозного скелета соединительной ткани [4, 6]. Тканевая биоинженерия позволяет снизить риск склеро-конъюнктивального рубцевания и, таким образом, обеспечивает пролонгацию гипотензивного эффекта антиглаукомного вмешательства.

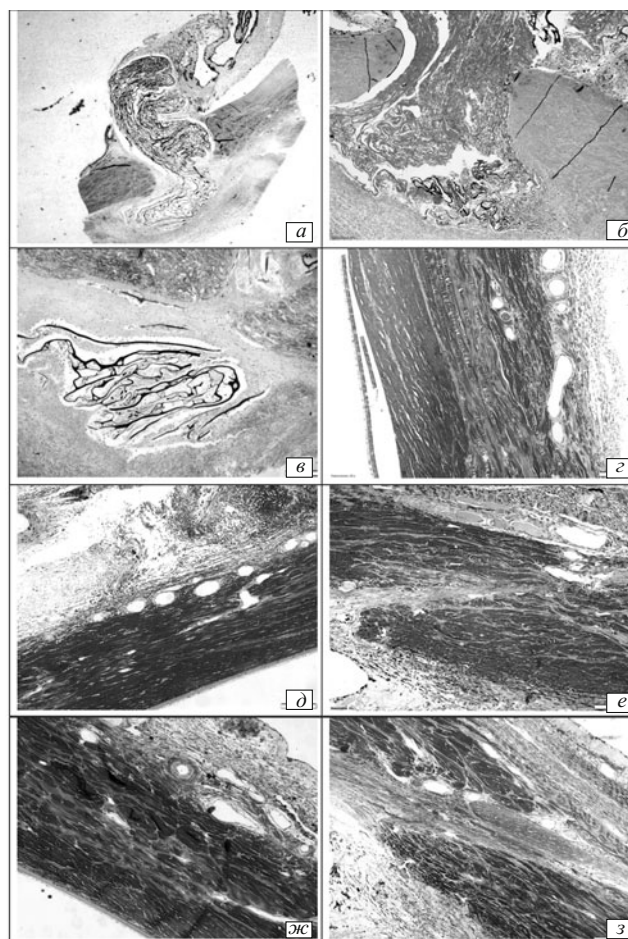
Нами был разработан биорезорбируемый антиглаукомный дренаж (БРАД) (заявка на получение патента № 2018104544 от 06.02.2018), выполненный из гемостатической губки, в состав которой входит коллаген (98 %), борная кислота (1,25 %), фурациллин (0,75 %) (Р N001656 от 08.08.2008 г.).

Цель работы — изучение процессов биодеградации имплантата коллагена и репарации тканей при транслимбальном микродренировании с использованием БРАД и дренажа iGen.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В пилотное проспективное сравнительное исследование были включены 16 половозрелых самцов кроликов породы шиншилла (32 глаза) массой 3,5 – 4 кг. Экспериментальные животные находились в стандартных условиях содержания в виварии Первого МГМУ им. И. М. Сеченова. Проведение исследования было разрешено локальным биомедицинским этическим комитетом ФГБНУ «НИИ глазных болезней». Содержание животных соответствовало правилам надлежащей лабораторной практики, утвержденной приказом № 199н от 01.04.2016 г. Минздрава РФ. При проведении экспериментов были приняты меры, исключающие излишние физические страдания или повреждения животных.

Всем животным было выполнено транслимбальное микродренирование с имплантацией дренажа. Основную группу составили 8 кроликов (16 глаз), которым был имплантирован БРАД (заявка на получение патента № 2018104544 от 06.02.2018 г.). Дренаж состоит из прямоугольной части для имплантации в интрасклеральный канал размером 3 × 2 мм и кольцевой части для субконъюнктивального введения с наружным диаметром 10 мм и внутренним диаметром 6 мм. Контрольная группа была представлена 8 кроликами (16 глаз), которым был имплантирован дренаж iGen (Biomedical Inc. Taipei, Taiwan) аналогичной конфигурации. Предоперационную подготовку животных для экспериментального исследования осуществляли внутримышечным введением раствора комбинированного препарата Золетил 100 (Virbac Sante Animale, Франция), содержащего в 5 мл 250 мг тилетамина гид-



**Рис. 1.** Морфологическая картина полутонких срезов удаленных образцов конъюнктивы и склеры, окраска метиленовым синим и фуксином:

*a* — основная группа, 7 сут; *б* — контрольная группа, 7 сут; *в* — основная группа, 30 сут; *г* — контрольная группа, 30 сут; *д* — основная группа, 60 сут; *е* — контрольная группа, 60 сут; *ж* — основная группа, 90 сут; *з* — контрольная группа, 90 сут.

рохлорида и 250 мг золазепам гидрохлорида в объеме 0,6 мл. Дополнительно проводилась инстилляционная анестезия раствором проксиметакаина 0,5 % (Алкаин, Alcon Бельгия). После формирования конъюнктивального лоскута круглым ножом выполнен интрасклеральный канал в переднюю камеру. БРАД (основная группа) или дренаж iGen (контрольная группа) имплантирован таким образом, что прямоугольная часть расположена в интрасклеральном канале, а кольцевая — под конъюнктивальным лоскутом. На конъюнктиву наложен непрерывный шов (пролен 8/0). В качестве антибактериального средства всем кроликам до операции, а также после операции в течение 7 сут инстиллировали раствор левомицитина 0,25 % 1 раз в сутки.

Животные были выведены из эксперимента на 7 – 30 – 60 – 90 сут (в каждый срок 2 кролика (4 глаза) из каждой группы). Гистологическое исследование биоптатов проводили методом полутонких срезов. Образцы ткани размерами 2 × 2 мм<sup>2</sup> фиксировали в хо-

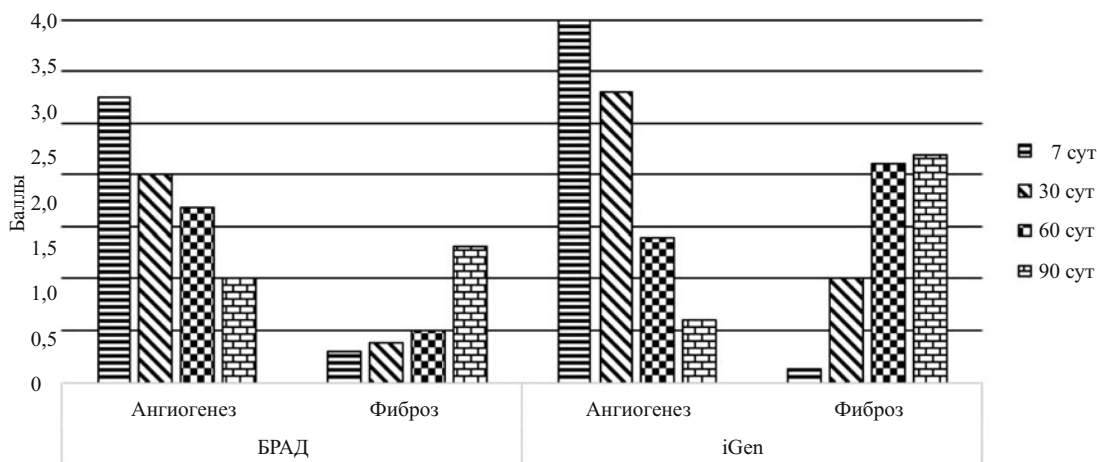


Рис. 2. Динамика ангиогенеза и фибрирования экстрацеллюлярного матрикса конъюнктивы после применения БРАД и дренажа iGen.

лодном 2,5 % растворе глутаральдегида в течение 2 – 8 ч. После промывания в фосфатном буфере образцы дофиксировали в 1 % растворе осмиевой кислоты в течение 1 ч, обезживали в спиртах восходящей концентрации, ацетоне и заливали в смесь эпоксидных смол эпон-аралдит. Поперечные полутонкие срезы толщиной 0,5 – 1,5 мкм готовили на “Ультратоме-IV” (ЛКВ, Швеция), окрашивали метиленовым синим и фуксином (полихромное окрашивание). Подготовку гистологических препаратов проводили в лаборатории фундаментальных исследований в офтальмологии ФГБНУ “НИИ глазных болезней”. Гистологические препараты исследовали на световом микроскопе Leica DM-2500. Фоторегистрацию осуществляли цифровой фотокамерой Leica DFC320. Морфометрический анализ конъюнктивы, склеры и зоны дренажа осуществлен при увеличении от 10 до 400 с помощью про-

граммного обеспечения ImageScope Color. Для оценки степени ангиогенеза, фиброза, склерального и субконъюнктивального оттока внутриглазной жидкости (ВГЖ) предложена балльная шкала (табл. 1).

Статистическая обработка материала проведена с использованием программы SPSS. Большинство данных в таблицах и графиках представлено в формате “среднее значение ± стандартное отклонение” ( $M \pm m$ ). Для оценки значимости различий между двумя независимыми выборками использован критерий Манна – Уитни. При корреляционном анализе применен коэффициент Пирсона.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что на 7 сут после транслимбального микродренирования в основной и контрольной груп-

Таблица 1. Оценка выраженности ангиогенеза, фиброза, субконъюнктивального и склерального оттока внутриглазной жидкости (ВГЖ) в баллах

Признак	Степень выраженности признака	Баллы
Ангиогенез	нет	0
	слабый	1
	умеренный	2
	выраженный	3
	диффузный	4
Фиброз	до 5 % в поле зрения соединительной ткани	1
	от 5 до 10 % в поле зрения соединительной ткани	2
	от 10 до 15 % в поле зрения соединительной ткани	3
Субконъюнктивальный отток ВГЖ	представлен выраженным субконъюнктивальным пространством	4
	представлен субконъюнктивальным пространством	3
	представлен суженным субконъюнктивальным пространством	2
	представлен расширенными новообразованными эписклеральными сосудами	1
	отсутствует	0
Склеральный отток ВГЖ	представлен широким интрасклеральным каналом	4
	представлен интрасклеральным каналом	3
	представлен суженным интрасклеральным каналом	2
	представлен расширенными новообразованными интрасклеральными сосудами	1
	отсутствует	0



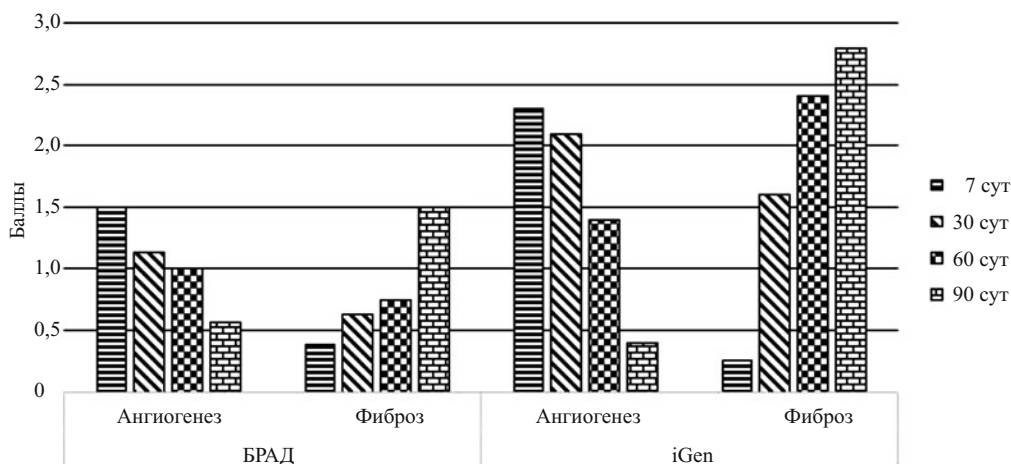


Рис. 3. Динамика ангиогенеза и фибрирования экстрацеллюлярного матрикса склеры после применения БРАД и дренажа iGen.

пах отмечается выраженная локальная воспалительная реакция в ответ на имплантацию дренажа. Эта реакция сопровождается макрофагальной, лимфоцитарной и лейкоцитарной инфильтрацией дренажа и прилежащих к нему склеры и конъюнктивы. В воспалительном инфильтрате преобладают лейкоциты, отмечена начальная пролиферация фибробластов во всех исследуемых зонах. Достоверных различий между количественными показателями клеток в обеих группах не выявлено (табл. 2). Воспаление сопровождается постепенной резорбцией волокон дренажа, более выраженной в контрольной группе. Отток ВГЖ в обеих группах осуществляется через склеральный канал и субконъюнктивальное пространство (рис. 1, а, б).

В основной группе на сроке 30 сут после хирургического вмешательства единичные коллагеновые волокна определяются в интрасклеральном канале, в субконъюнктивальном пространстве отмечается менее выраженный лизис дренажа. В контрольной группе к данному промежутку времени наступает полная резорбция волокон iGen. В основной группе воспали-

тельная клеточная реакция со стороны склеры и конъюнктивы уменьшается. Вместе с тем отмечаются активная пролиферация фибробластов, рост грануляционной ткани и сосудов, преимущественно в интрасклеральном канале. В контрольной группе интрасклеральный канал и частично субконъюнктивальное пространство заполнены грануляционной тканью, инфильтрированной макрофагами, лимфоцитами, большим количеством лейкоцитов и фибробластов (рис. 1, в, г). Выявлена статистически значимое различие в количестве клеток между группами (табл. 2). Выявленный ангиогенез отмечен в склере и в конъюнктиве глаз кроликов обеих групп. В контрольной группе отток ВГЖ в субконъюнктивальное пространство происходит преимущественно по новообразованным тонкостенным сосудам (рис.1, в, г).

На 60 сут после операции отмечен полный лизис дренажа у животных обеих групп. В зоне склерального канала и субконъюнктивальном пространстве как в основной, так и в контрольной группе выявлены остатки грануляционной ткани, представленной новооб-

Таблица 2. Морфометрическая оценка состояния конъюнктивы и склеры кроликов (n = 32) основной (БРАД) и контрольной (iGen) групп

Клетки	Срок наблюдения											
	7 сут			30 сут			60 сут			90 сут		
	БРАД	iGen	p	БРАД	iGen	p	БРАД	iGen	p	БРАД	iGen	p
<b>Конъюнктивa</b>												
Макрофаги	5,5 ± 0,6	5,75 ± 0,5	0,5	2,25 ± 0,5	5,75 ± 0,5	0,02	2,75 ± 0,5	1,75 ± 0,5	0,04	1,5 ± 1	4,5 ± 0,6	0,02
Лимфоциты	4,5 ± 0,6	5,25 ± 0,5	0,1	2,25 ± 0,5	5 ± 0,8	0,02	2,75 ± 0,5	1,75 ± 0,5	0,04	1,25 ± 0,5	4 ± 0,8	0,02
Лейкоциты	8,75 ± 2,2	8,25 ± 0,5	0,7	2,25 ± 0,5	8 ± 0,8	0,02	1,25 ± 0,5	2,5 ± 0,6	0,03	1,25 ± 0,5	4,5 ± 0,6	0,02
Фибробласты	7 ± 0,8	7,25 ± 0,5	0,6	9 ± 0,8	7,5 ± 1	0,04	4,75 ± 0,9	8 ± 0,8	0,02	4,5 ± 1	7 ± 0,8	0,03
<b>Склера</b>												
Макрофаги	2,75 ± 1,3	3,25 ± 0,5	0,6	1,5 ± 0,6	4 ± 0,8	0,02	1,25 ± 0,5	2,25 ± 0,5	0,04	0,75 ± 0,5	3 ± 0,8	0,02
Лимфоциты	3 ± 1,4	3,25 ± 0,5	0,9	1,5 ± 0,6	3,75 ± 0,5	0,02	1,5 ± 0,6	2,75 ± 0,5	0,03	1,25 ± 0,5	3 ± 0,8	0,03
Лейкоциты	9,5 ± 2,5	7,75 ± 0,9	0,2	1,5 ± 0,6	8,75 ± 0,5	0,02	0,5 ± 0,6	2 ± 0,8	0,04	0,25 ± 0,5	5,25 ± 0,5	0,02
Фибробласты	6,5 ± 1,3	6 ± 0,8	0,5	10,25 ± 0,5	8,25 ± 0,5	0,02	5 ± 0,8	6,75 ± 0,5	0,03	4,75 ± 0,5	7 ± 0,5	0,02

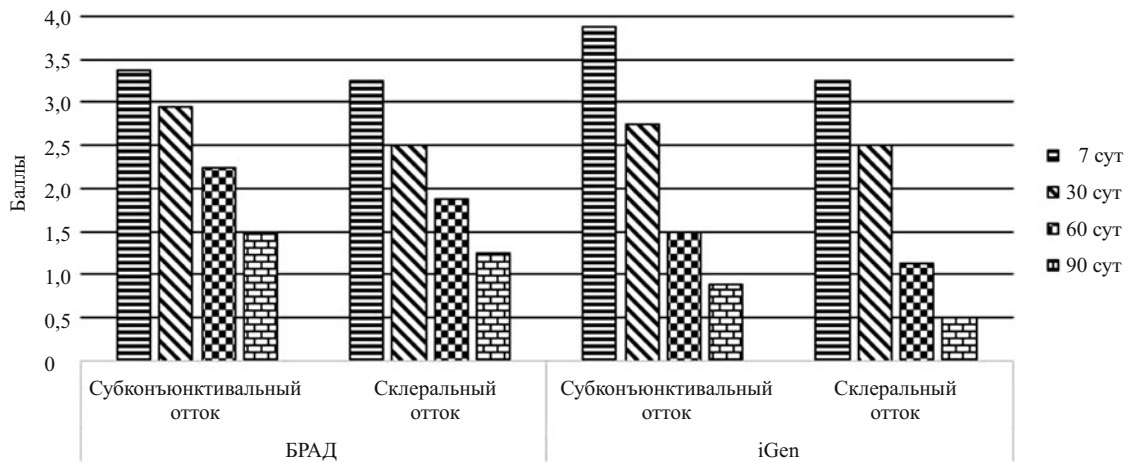


Рис. 4. Динамика субконъюнктивального и склерального оттока ВГЖ после применения БРАД и дренажа iGen.

разованными сосудами, макрофагами, лимфоцитами, лейкоцитами и фибробластами, а также волокнами соединительной ткани (рис. 1, *д, е*). Воспалительная реакция в зоне конъюнктивы и склеры у животных обеих групп уменьшается, оставаясь достоверно более выраженной в контрольной группе (табл. 2). Кроме того, только в контроле отмечается выраженная пролиферация фибробластов и образование более грубых волокон соединительной ткани в экстрацеллюлярном матриксе (ЭЦМ) как в склере, так и в конъюнктиве, что свидетельствует о ремоделировании ЭЦМ с развитием фиброза. Отток ВГЖ в обеих группах кроликов осуществляется диффузией через тонкостенные новообразованные интра- и эписклеральные сосуды (рис. 1, *д, е*).

Через 90 сут после транслимбального микродренирования в основной группе животных просвет склерального канала заполнен молодой соединительной тканью. Тонкостенные сосуды, пронизывающие склеру образуют пути оттока в субконъюнктивальное пространство. В контрольной группе кроликов сохраняется активная пролиферация фибробластов и ангиогенез, отмечается моноцитарная инфильтрация с примесью лейкоцитов в новообразованной соединительной ткани (рис. 1, *ж, з*). Выявлено статистически значимое различие в количестве клеток между группами (табл. 2). Отток ВГЖ обеспечивается диффузией через тонкостенные новообразованные интра- и эписклеральные сосуды (рис. 1, *ж, з*).

Таким образом, на всех сроках наблюдения в обеих группах экспериментальных животных отмечается положительная корреляционная связь между ангиогенезом в конъюнктиве и склере и формированием субконъюнктивального и склерального оттока ВГЖ.

При анализе процесса репарации склеры и конъюнктивы в зоне транслимбального микродренирования была произведена оценка динамики ангиогенеза и фиброза в основной и контрольной группах. На всех сроках наблюдения существует отрицательная корреляционная связь между ангиогенезом и выраженностью процесса фиброобразования ЭЦМ в конъюнктиве и

склере (рис. 2, 3). В основной группе обнаруживается активный рост новообразованных тонкостенных сосудов конъюнктивы и склеры на 7, 30 и 60 сут с постепенным его снижением к 90 сут. При этом к 90 дню наблюдения отмечается частичное фиброзирование ЭЦМ конъюнктивы и склеры (рис. 2, 3). В контрольной группе животных выявлено уменьшение периода активного ангиогенеза в конъюнктиве и склере до 30 сут. Резкое снижение образования тонкостенных сосудов на 60 сут сопровождается активным процессом фиброобразования ЭЦМ. Данная тенденция сохраняется к 90 сут наблюдения (рис. 2, 3). Отток внутриглазной жидкости на 60 – 90 сут в обеих группах осуществляется по тонкостенным склеральным, эписклеральным и субконъюнктивальным сосудам (рис. 4). Необходимо отметить, что при качественном сравнении просвет новообразованных сосудов в глазах животных основной группы оказывается более значительным, чем в контрольной группе.

## ВЫВОДЫ

1. Сравнительный морфометрический анализ состояния конъюнктивы и склеры в обеих группах животных свидетельствует о сходной острой воспалительной реакции на 7 сут после транслимбального микродренирования и достоверно менее выраженном клеточном ответе на сроках в 30, 60, 90 сут у кроликов основной группы (при имплантации биорезорбируемого антиглаукомного дренажа).

2. Слабая хроническая локальная воспалительная реакция тканей и активный ангиогенез способствуют медленному фиброзированию экстрацеллюлярного матрикса конъюнктивы и склеры в поздние сроки после имплантации биорезорбируемого антиглаукомного дренажа.

3. Отсутствие признаков выраженного фиброза конъюнктивы и склеры в зоне транслимбального микродренирования в глазах животных основной группы обеспечивает более выраженный отток внутриглазной

жидкости по новообразованным сосудам в субконъюнктивальное пространство.

## ЛИТЕРАТУРА

1. С. Э. Аветисов, В. Р. Мамиконян, Э. Э. Казарян и др., *Вестник офтальмол.*, **125**(5), 3 – 7 (2009).
2. Л. П. Истратов, Л. В. Истратова, И. А. Сыченников, *Фармация*, **5**, 76 – 79 (1984).
3. *Национальное руководство по глаукоме для практикующих врачей*, Е. А. Егоров, Ю. С. Астахов, В. П. Еричев (ред.), ГЭ-ОТАР-Медиа, Москва (2015).
4. Н. Chen, R. Ritch, T. Krupin, et al., *Vis Invest. Ophthalmol. Sci.*, **47**, 5310 – 5314 (2006); <https://doi.org/10.1167/iov.06-0378>.
5. K. Henriksen, M. Karsdal, Type I Collagen, in: *Biochemistry of collagens, laminins and elastin. Structure, function and biomarkers*, M. Karsdal (ed.) Elsevier Inc. (2016), pp. 1 – 11.
6. W. C. Hsu, R. Ritch, T. Krupin, et al., *Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **246**, 709 – 717 (2008); <https://doi.org/10.1007/s00417-007-0744-9>.
7. R. D. Mulberger, P. L. Carmichael, *Am. J. Ophthalmol.*, **54**(1), 19 – 20 (1962); [https://doi.org/10.1016/0002-9394\(62\)93990-9](https://doi.org/10.1016/0002-9394(62)93990-9).
8. R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin, F. Berthod, *Materials*, **3**(3), 1863 – 1887 (2010); <https://doi.org/10.3390/ma3031863>.
9. J. R. Zelefsky, W. C. Hsu, R. Ritch, *Expert Rev. Ophthalmol.*, **3**(6), 613 – 617 (2008) <https://doi.org/10.1586/17469899.3.6.613>.

Поступила 30.03.18

## SPECIFIC FEATURES OF COLLAGEN IMPLANT BIODEGRADATION AFTER GLAUCOMA SURGERY IN RABBIT EYE (EXPERIMENTAL STUDY)

V. R. Mamikonyan<sup>1</sup>, N. V. Fisenko<sup>1\*</sup>, T. A. Demura<sup>2</sup>, E. A. Kogan<sup>2</sup>, and E. E. Kazaryan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Eye Diseases, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Rossolimo 11A/B, Moscow, 119021 Russia

<sup>2</sup> I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, ul. Trubetskaya 8/2, Moscow, 119991 Russia

\* e-mail: natfisenko@mail.ru

The healing process in the adult rabbit conjunctiva and sclera tissues after translimbal microdrainage with the use of either biodegradable antiglaucomatous drainage (BDAD) or iGen was studied. Wound areas showed similar acute inflammatory response to the implantation of both matrixes on the 7th day. Complete lysis degradation of iGen and BDAD was observed on 30th day and 60th day, respectively. Within 60 – 90 days after BDAD implantation, the wound areas of conjunctiva and sclera showed intensive angiogenesis and poor extracellular matrix scarring. In contrast, on the 90th day after iGen implantation, a decrease in angiogenesis and intensive extracellular matrix scar formation were observed. As a result of scarring the thin-walled vessels were compressed, which led to the reduction of aqueous humor outflow.

**Keywords:** collagen; wound healing; angiogenesis; scarring; aqueous humor outflow; glaucoma.