

УДК 617.713–001.37–089.843: 611.013.83  
DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.2.46–49

## Влияние экстракта амниотической мембраны на эпителизацию и неоваскуляризацию в моделях повреждения роговицы

Д.С. Мальцев<sup>1</sup>, А.С. Рудько<sup>2</sup>, А.Н. Куликов<sup>1</sup>, В.Ф. Черныш<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова (194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6), <sup>2</sup> Филиал № 4 439 военного госпиталя (692350, Приморский край, с. Новосысоевка Яковлевского р-на, ул. Западная, 296)

Проведена оценка влияния экстракта амниотической мембраны на миграционную активность клеток роговичного эпителия человека в клеточной культуре, а также на процессы эпителизации роговицы и неоваскуляризации ее стро-  
мы в ходе ее заживления после тяжелых щелочных ожогов в эксперименте. Было установлено, что экстракт не вызы-  
вает увеличения риска перфорации роговицы в отдаленные сроки после ожога, несмотря на торможение миграции  
эпителиальных клеток *in vitro*, что также может быть обусловлено стимуляцией неоваскуляризации.

**Ключевые слова:** амнион, ожог роговицы, клеточная культура, сигнальные молекулы

Применение амниотической мембраны (АМ) в виде трансплантата, фиксируемого на глазной поверхности – хорошо известный подход к контролю эпителизации и неоваскуляризации при различных заболеваниях роговицы. АМ стимулирует восстановление целостности эпителия, ингибирует ангиогенез и обладает противовоспалительными свойствами, что позволяет применять ее в лечении повреждений или ожогов роговицы [2, 8, 14]. Преимуществом АМ человека можно назвать низкую иммуногенность, так как она не содержит молекул А, В и DR главного комплекса гистосовместимости, и поэтому реакции отторжения здесь наблюдаются крайне редко. Однако применение АМ связано с необходимостью хирургического вмешательства, потребностью в свежем или консервированном материале, что препятствует широкому применению данного метода.

Терапевтические свойства АМ объясняют как ее защитным действием, так и влиянием на стро-  
му и роговичный эпителий экспрессируемых амнионом нерастворимых и растворимых молекул, а также выполнением механических функций [5, 6, 8, 11, 13]. Основные биологические эффекты АМ опосредуются факторами роста и тканевыми ингибиторами протеиназ [13].

Экстракция сигнальных молекул из АМ предполагает возможность создания растворимой, обладающей лечебными свойствами амниона лекарственной формы, которую можно использовать в виде капель или инъекций. В связи с этим целью настоящего исследования была оценка влияния инстилляций жидкого экстракта амниотической мембраны (ЭАМ) на заживление раны монослоя эпителия роговицы, а также на процессы эпителизации и васкуляризации роговицы в модели тяжелого щелочного ожога.

### Материал и методы

**Получение ЭАМ.** Амнион получали через 4 часа после кесарева сечения, выделяя его из плодных оболочек в стерильных условиях и трижды отмывая раствором

Рудько Александр Сергеевич – канд. мед. наук, врач-офтальмолог филиала № 4 439 военного госпиталя; e-mail: sasha.vmeda@yandex.ru

Хэнкса. Амниотическую мембрану массой 5 г измельчали до фрагментов размером 2–3 мм. Измельченную массу смешивали с кварцевым песком (размер частиц 0,1 мм) и гомогенизировали ручным способом. Далее эмульсию АМ суспензировали в физрастворе (20 мл) и центрифугировали при 2000 об./мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость, не содержащую визуально различимых частиц, отделяли от осадка и фильтровали через бактериальный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Аликвоты отфильтрованного экстракта разливали в одноразовые флаконы-капельницы в стерильных условиях и хранили до использования при –20°C.

**Получение клеточной культуры.** Клеточная культура эпителия роговицы человека была получена из донорского материала через 36 часов после гибели донора и забора роговицы для кератопластики. После отделения внешних тканей глазное яблоко дезинфицировали раствором повидон-йода в течение 20 с и трижды отмывали в растворе Хэнкса. Корнеосклеральное кольцо формировали разрезом длиной 3 мм кзади от лимба. После отделения цилиарного тела его погружали в раствор Хэнкса и разделяли на фрагменты размером 3×4 мм. Полученные фрагменты переносили в чашки Петри диаметром 3,5 см со средой DMEM:F12 и 10% сывороткой крови крупного рогатого скота, укладывая внешней поверхностью на дно чашки. Фрагменты инкубировали 72 часа при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. После миграции эпителиальных клеток с эксплантов на дно чашек фрагменты корнеосклерального кольца удаляли, а клетки трипсинизировали для посева в культуральные флаконы 25 см<sup>2</sup>. Культуру выращивали до третьего пассажа, с последующим переносом в 48-луночные планшеты в условиях, описанных выше.

**Оценка токсичности** выполнялась в стандартном МТТ-тесте [4]. Для этого клеточная культура пересеивалась в 96-луночные планшеты в концентрации 104 клеток/луночка со средой DMEM:F12 и 10% сывороткой крови крупного рогатого скота. После формирования монослоя (24 часа инкубации) производили замену среды на DMEM:F12 с 1% сывороткой. После инкубации в течение 24 часов в лунки вносили 20% ЭАМ

до концентрации 6,3%, в контрольные лунки – 0,05% раствор хлоргексидина (положительный контроль) до концентрации 0,005% или стерильную среду (отрицательный контроль). После инкубации в течение 24 часов во все лунки добавляли аликвоты (20 мкл) раствора МТТ (1 мг/мл) и инкубировали четыре часа с периодическим микроскопическим контролем формирования кристаллов формазана. Через четыре часа среду удаляли и во все лунки вносили 100 мкл диметилсульфоксида (Биолот), в котором формазан хорошо растворим. После растворения кристаллов формазана планшеты сканировали, а интенсивность окрашивания раствора в лунках оценивали на полученном цифровом изображении с помощью программы Image J. Интенсивность окрашивания, выраженная в градациях серого (от 0 до 255 ед.), отражала жизнеспособность клеток в культуре.

*Тест заживления раны культурального монослоя* – стандарт для оценки миграционной способности клеток. После пересева культуры эпителия роговицы в планшеты и формирования монослоя культуральную среду заменяли на среду DMEM:F12 с 1% сывороткой. Через 24 часа инкубации в условиях пониженного содержания сыворотки в каждом образце культуры с помощью наконечника пипетки наносили рану монослоя. После этого среду удаляли, лунки промывали раствором Хэнкса и добавляли свежую среду DMEM:F12 с 1% сывороткой. После этого во все неконтрольные лунки вносили ЭАМ до концентраций 6,3, 0,63 и 0,063%, а в контрольные лунки – эквивалентный объем раствора Хэнкса. Интенсивность заживления раны оценивали по расстоянию между ее краями через 24 и 48 часов. Для этого из лунок удаляли культуральную среду, и материал фиксировали 70% этанолом 10 мин. После удаления фиксирующего агента лунки окрашивали генцианвиолетом в течение 5 мин и трижды споласкивали дистиллированной водой.

*Моделирование щелочного ожога.* Эту часть исследования выполнили на шести половозрелых кроликах (12 глаз) породы шиншилла весом 2,5–3 кг. Моделировались щелочные ожоги роговицы и лимба площадью 50% (сектор ожога 180°), которые наносили с помощью изготовленных из лабораторной фильтровальной бумаги аппликаторов, пропитанных 1,0N раствором NaOH. Время аппликации составляло 1 мин с последующим тщательным вымыванием остатков щелочи физраствором. После ожога проводились инстилляции 0,4% раствора гентамицина в оба глаза и ЭАМ в неконтрольный (левый) глаз 4 раза в сутки в течение 30 суток.

*Оценка эпителизации и неоваскуляризации роговицы в модели щелочного ожога.* В ходе наблюдения регулярно оценивали площадь эпителизации и неоваскуляризации роговицы. Результаты регистрировали на 1, 3, 7, 21 и 30-е сутки после ожога при окрашивании глазной поверхности 1% флюоресцеином натрия. Для количественной оценки площади ожога, хода эпителизации в процентах использовали стандартный пакет программы обработки цифровых изображений Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Inc., США) и проекционную сетку.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли путем вычисления средних арифмети-

ческих и их ошибок с оценкой достоверности разности по критерию Стьюдента.

---

#### Результаты исследования

---

*Оценка токсичности.* На основании МТТ-теста с колориметрией ЭАМ был признан нетоксичным. Показатель оптической плотности в образцах с концентрацией ЭАМ 6,3% составил  $154,2 \pm 11,3$  ЕД, а в положительных контрольных образцах с 0,005% хлоргексидином (в качестве агента, снижающего жизнеспособность всех видов клеток) –  $125,2 \pm 14,1$  ЕД. Показатель оптической плотности в отрицательных контрольных образцах равнялся  $165,0 \pm 10,0$  ЕД и не имел статистически значимых отличий при сравнении с образцами с ЭАМ.

*Тест заживления раны культурального монослоя.* Через 24 часа после нанесения раны в образцах культуры с ЭАМ в концентрациях 6,3, 0,63 и 0,063% и в контроле ширина раны монослоя составила, соответственно  $539,5 \pm 94,4$ ,  $474,0 \pm 77,2$ ,  $389,5 \pm 141,0$  и  $316,5 \pm 74,9$  мкм. Статистически значимые различия по сравнению с контролем были выявлены для образцов с содержанием 6,3 и 0,63% экстракта. Через 48 часов в образцах культуры с содержанием ЭАМ в концентрациях 6,3, 0,63 и 0,063% и в контроле ширина раны монослоя была  $433,0 \pm 130,3$ ,  $235,5 \pm 56,4$ ,  $159,5 \pm 100,0$  и  $132,5 \pm 53,2$  мкм, соответственно. Статистически значимые различия по сравнению с контролем определены для всех образцов (рис. 1).

*Эпителизация и неоваскуляризация роговицы в модели щелочного ожога.* Во всех группах сразу после ожога в секторе повреждения отмечали дезэпителизацию, равномерное глубокое помутнение стромы роговицы по типу «матового стекла» и ишемию прилежащей лимбальной зоны. Через 24 часа отмечали начало эпителизации обожженной стромы со стороны прилежащих интактных участков роговицы. К 3-м суткам зона эпителизации в опытной группе составила  $89,0 \pm 3,0\%$ , в контрольной группе –  $52,2 \pm 1,4\%$ . На 7-е сутки дезэпителизованный участок сохранялся в виде эрозии эпителия в центре. В пределах обожженной стромы вновь выросший эпителий имел признаки цитопатии в виде островкового прокрашивания флюоресцеином. В опытной и контрольной группе площадь эпителизованной зоны составила  $12,3 \pm 2,3$  и  $78,1 \pm 1,9\%$ . Возобновление эпителизации в опытной группе отмечали после 21-х суток, полную эпителизацию роговицы – на 30-е сутки с сохранением эпителиопатии (рис. 2). К 30-м суткам площадь эпителизации в контрольной и опытной группах составила  $21,2 \pm 10,2$  и  $99,5 \pm 0,45\%$ , соответственно.

В контрольной группе на 3-и сутки после ожога наблюдали активное врастание сосудов в строму роговицы со стороны неповрежденного лимба. Площадь неоваскуляризации в контрольной и опытной группах составила  $5,5 \pm 1,2$  и  $7,5 \pm 1,7\%$ , соответственно. Статистически значимое увеличение площади неоваскуляризации при применении ЭАМ по сравнению с контролем было зафиксировано на 7-е сутки  $28,5 \pm 12,7$  и  $12,1 \pm 3,2\%$ , соответственно, и сохранялось на протяжении всего периода наблюдения, составив к исходу 30-х суток

81,9±18,1 и 43,3±4,7%. Со стороны обожженного лимба сосуды начинали вращать в строму на 30-е сутки. Вращание сосудов сопровождалось постепенным помутнением стромы. Начиная с 30-х суток в 3 из 6 случаев в опытной группе и в 4 из 6 случаев в контроле наблюдали перфорации роговицы (рис. 3).

#### Обсуждение полученных данных

Результаты данного исследования демонстрируют дозозависимое торможение миграции клеток роговичного эпителия под действием ЭАМ *in vitro*, без цитотоксических эффектов высоких концентраций экстракта, а также стимуляцию неоваскуляризации роговицы в модели тяжелого химического ожога роговицы и лимба *in vivo*.

АМ применяется в офтальмологии для лечения широкого спектра заболеваний переднего сегмента глаза: недостаточности стволовых лимбальных клеток, рубцующемся пемфигоиде, буллезной кератопатии, персистирующих эпителиальных дефектах и перфорациях роговицы, при лечении последствий ожогов глазной поверхности и в хирургии глаукомы [2, 5, 7–9, 12, 14, 15]. Лечебный эффект АМ изучен не до конца, однако предполагается несколько механизмов:

- 1) АМ выполняет функцию биологического банджа, защищая регенерирующий эпителий от повреждения краями век [3] (вторично, это может снижать выработку эпителием провоспалительных сигнальных молекул и подавлять воспаление);
- 2) АМ выступает в роли базальной мембраны, облегчая адгезию и миграцию клеток эпителия, и ускоряя эпителизацию [9];
- 3) кубический эпителий, выстилающий амниотическую сторону АМ, и ее строма содержат ряд цитокинов и факторов роста, влияющих на эпителизацию роговицы. Среди сигнальных молекул АМ преобладают трансформирующий фактор роста-β, эпидермальный фактор роста и основной фактор роста фибробластов, стимулирующие клеточную миграцию и пролиферацию [1, 9, 13];
- 4) за счет гиалуроновой кислоты, в большом количестве содержащейся в строме и инактивирующей сигнальный каскад трансформирующего фактора роста-β, АМ подавляет фиброз;
- 5) АМ подавляет неоваскуляризацию за счет тромбоспондина-1 и тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ типов 1–4 [6].

В отличие от собственно АМ биологические эффекты ЭАМ обусловлены исключительно действием

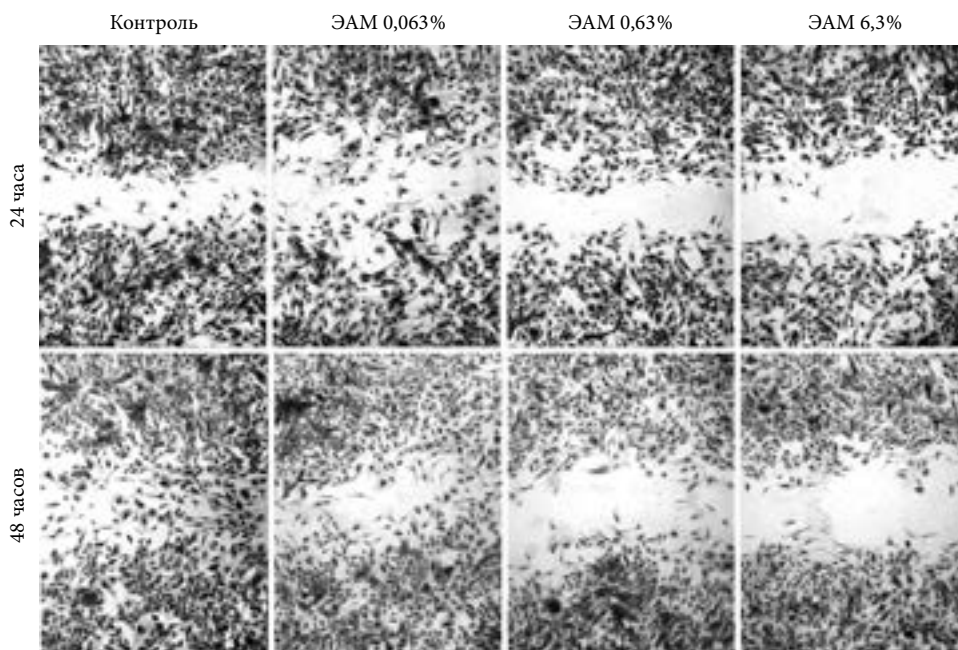


Рис. 1. Снижение миграционной активности клеток эпителия роговицы под действием ЭАМ в тесте заживления раны культурального монослоя. Окр. генцианвиолетом, ×200.

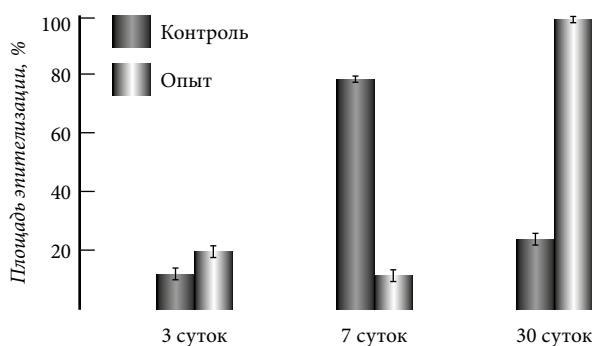


Рис. 2. Динамика эпителизации роговицы в модели тяжелого щелочного ожога роговицы и лимба.

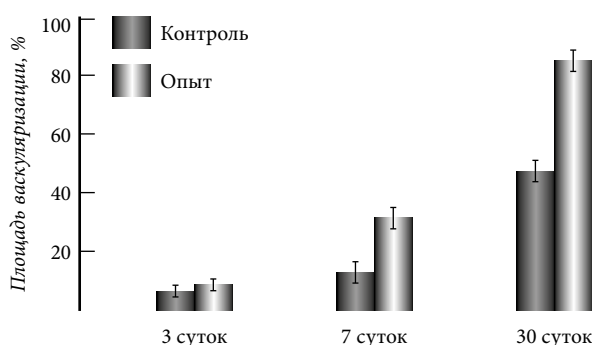


Рис. 3. Динамика неоваскуляризации роговицы в модели тяжелого щелочного ожога роговицы и лимба.

растворимых сигнальных молекул, входящих в АМ. Поскольку в ЭАМ, использованном в этом исследовании, потенциально входит большое число сигнальных молекул АМ, в том числе, с противоположными эффектами, его биологические эффекты в различных экспериментальных моделях могут иметь разнонаправленный характер. Это продемонстрировано в данном исследовании: ЭАМ тормозил клеточную миграцию *in vitro*, но не оказывал существенного влияния на эпителизацию *in vivo*, стимулируя неоваскуляризацию.

Торможение миграции клеток эпителия в культуре могло быть обусловлено блокированием активности матриксных металлопротеиназ (являющихся модуляторами клеточной миграции) их тканевыми ингибиторами, а ангиогенез – факторами роста эндотелия сосудов и фибробластов [10]. Поскольку концентрация фактора роста эндотелия сосудов в АМ существенно меньше концентрации фактора роста фибробластов [13], потенцирование ангиогенеза ЭАМ может быть в большей степени обусловлено именно последним.

Динамика эпителизации роговицы под действием ЭАМ в модели тяжелого химического ожога существенно отличалась от нормальной динамики эпителизации *in vivo*: 1) в ранние сроки наблюдалось ее замедление (что соответствовало торможению заживления раны культурального монослоя *in vitro*), 2) в поздние сроки отмечена более полная эпителизация по сравнению с контролем (что может быть объяснено более интенсивной неоваскуляризацией).

В ходе данного исследования было установлено, что ЭАМ не вызывает увеличения риска перфорации роговицы в отдаленные сроки после ожога, несмотря на торможение миграции эпителиальных клеток *in vitro*, что также может быть обусловлено стимулированием неоваскуляризации. Таким образом, в условиях неэкспериментального патологического процесса применение ЭАМ может продемонстрировать положительные эффекты в отношении предотвращения развития перфораций без токсического воздействия.

Ключевым отличием от результатов других исследований АМ и ее экстрактов в нашей работе стала демонстрация стимулирования неоваскуляризации, что можно объяснить преобладанием эффекта фактора роста фибробластов над эффектом тканевых ингибиторов матриксных протеиназ *in vivo*, возможно, из-за различий их экстрактивности в использованной методике. Полученные результаты указывают на перспективность дальнейшего изучения эффектов ЭАМ для лечения тяжелых ожогов или язв роговицы.

#### Литература / References

1. Ситник Г.В. Современные клеточные биотехнологии в офтальмологии. Амниотическая мембрана как субстрат для культивирования стволовых эпителиальных клеток // Белорус. мед. журн. 2006. Т. 4, № 4. С. 15–21.  
Sitnik G.V. Modern cellular biotechnology in ophthalmology. Amniotic membrane as a substrate for the cultivation of epithelial stem cells // Belarussian Med. J. 2006. Vol. 4, No. 4. P. 15–21.
2. Черныш В.Ф., Бойко Э.В. Ожоги глаз – состояние проблемы и новые подходы. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. 184 с.  
Chernysh V.F., Boyko E.V. Burns of the eye – status challenges and new approaches. Moscow: GEOTAR-Media, 2017. 184 p.
3. Baum J. Thygeson lecture. Amniotic membrane transplantation: Why is it effective? // Cornea. 2002. No. 21. P. 339–341.
4. Bernas T., Dobrucki J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes // Cytometry. Part A. 2002. Vol. 47, No. 4. P. 236–242.
5. Clare G.L., Suleman H., Bunce C. [et al.]. Amniotic membrane transplantation for acute ocular burns // Cochrane Database Syst. Rev. 2012. DOI: 10.1002/1465 1858.
6. Hao Y., Ma D.H., Hwang D.G. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane // Cornea. 2000. Vol. 19, No. 3. P. 348–352.
7. Kruse F.E. Diseases of the eye surface // Ophthalmol. 2003. Vol. 100, No. 11. P. 897–898.
8. Liu T. Amniotic membrane traps and induces apoptosis of inflammatory cells in ocular surface chemical burn // Mol. Vis. 2012. Vol. 18. P. 2137–2146.
9. Meller D., Pires R.T., Tseng S.C. Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane cultures // Br. J. Ophthalmol. 2002. Vol. 86, No. 4. P. 463–471.
10. Nabel E.G., Yang Z.Y., Plautz G. [et al.]. Recombinant fibroblast growth factor 1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo // Nature. 1993. Vol. 362, No. 6423. P. 844–846.
11. Ricciardelli G., Ceccuzzi R., Raneri M. [et al.]. Management of recurrent corneal ulcers: use of amniotic membrane // Eur. J. Ophthalmol. 2014. Vol. 24, No. 5. P. 793–796.
12. Slu G.D., Young A.L., Cheng L.L. Long-term symptomatic relief of bullous keratopathy with amniotic membrane transplant // Int. Ophthalmol. 2015. Vol. 35, No. 6. P. 777–783.
13. Thomas J.K., Lim J.J., Zabeck N., Masee M. Cytokines in single layer amnion allografts compared to multilayer amnion/chorion allografts for wound healing // J. Biomedical Mat. Res. Part B. 2014. Vol. 103, No. 5. P. 1133–1140.
14. Tseng S. Evolution of amniotic membrane transplantation // Clin. Experiment. Ophthalmol. 2007. Vol. 35, No. 2. P. 109–110.
15. Yang M.K., Kim M.K., Kim D.M. Amniotic membrane transplantation for repair of a large intraoperative conjunctival defect during trabeculectomy // Ophthalmol. 2015. Vol. 29, No. 1. P. 73–74.

Поступила в редакцию 14.10.2017.

#### THE EFFECT OF AMNIOTIC MEMBRANE EXTRACT ON EPITHELIALIZATION AND NEOVASCULARIZATION IN MODELS OF CORNEAL DAMAGE

D.S. Maltsev<sup>1</sup>, A.S. Rudko<sup>2</sup>, A.N. Kulikov<sup>1</sup>, V.F. Chernysh<sup>1</sup>

<sup>1</sup> S.M. Kirov Military Medical Academy (6 Akademika Lebedeva St., St. Petersburg 194044 Russian Federation), <sup>2</sup> Branch No. 4 of the Military Hospital 439 (29b Zapadnaya St. Novosysoevka, Yakavlevskiy district, Primorskiy territory 692350 Russian Federation)

**Objective.** The aim of the study was to evaluate the effect of the human amniotic membrane extract (AME) on wound healing of the corneal epithelium of the corneal epithelium, as well as on epithelialization and vascularization of the cornea in the model of severe alkaline burn.

**Methods.** The toxicity of AME (at a concentration of 6.3%) and its effect on the migration activity of corneal epithelial cells (at concentrations of 6.3, 0.63 and 0.063%) were examined on a cell culture obtained from a donor material in a standard MTT-test and a wound test culture monolayer, respectively.

The effect of AME (6.3%) on epithelialization and neovascularization of the cornea was studied in the experimental model of a corneal burn and a limb 50% in rabbits for 30 days.

**Results.** There were no statistically significant changes in the ability of the cell culture under the action of AME at a concentration of 6.3%. After 48 hours in culture samples with the content of AME at concentrations of 6.3, 0.63 and 0.063% and the control, the width of the monolayer wound was 433.0±130.3, 235.5±56.4, 159.5±100.0 and 132.5±53.2 μm. By the 30<sup>th</sup> day, the epithelialization area in control and treated with the use of AME animals was 21.2±10.2 and 99.5±0.4%, respectively. A statistically significant increase in the area of corneal neovascularization with the use of AME as compared with the control was observed at the 7<sup>th</sup> (28.5±12.7 and 12.1±3.2%) and 30<sup>th</sup> (81.9±18.1 and 43.3±4.7%, respectively) day.

**Conclusions.** The results of the study demonstrate the dose-dependent inhibition of the migration of corneal epithelium cells under the influence of AME *in vitro*, without the cytotoxic effects of high extract concentrations on the cell culture, and the stimulation of the neovascularization of the cornea in a severe chemical burn model *in vivo*.

**Keywords:** amnion, corneal burn, cell culture, signaling molecules

Pacific Medical Journal, 2017, No. 4, p. 46–49.