

Влияние низкомолекулярной гиалуроновой кислоты на процессы ремоделирования стромы роговицы

Семак Г. Р., Захарова В. А., Клецкий С. К., Летковская Т. А., Жерко И. Ю.

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. Клинически диагностируемые стромальные помутнения роговицы развиваются в результате прогрессирующего отека, дезорганизации коллагеновых волокон. В статье описаны результаты исследования влияния низкомолекулярной гиалуроновой кислоты на ремоделирование стромы роговицы с помощью иммуногистохимического анализа экспрессии MMP9 и TGFβ1 в материале эксплантов роговиц пациентов, перенесших сквозную кератопластику в связи с хроническими дистрофическими заболеваниями роговицы (ХДЗР).

Исследование выполнено на проспективном материале 49 пациентов с хроническими дистрофическими заболеваниями роговицы. С целью анализа характера экспрессии биомолекулярных маркеров выполнено ИГХ исследование с использованием первичных моноклональных антител к MMP9 и TGFβ1.

Низкомолекулярная гиалуроновая кислота, вводимая субконъюнктивально, способна модулировать экспрессию MMP9 и TGFβ1, а вместе с тем и процессы ремоделирования матрикса. В группе пациентов с ХДЗР в результате кератитов, со сформированными помутнениями стромы роговицы MMP9 в строме способна активировать фибробласты, потенцировать их подвижность без трансформации в контрактильный тип и увеличивать синтез физиологического для роговицы коллагена 1-го типа. В группе пациентов с эндотелиально-эпителиальной дистрофией (ЭЭД), напротив, экспрессия MMP9 и TGFβ1 снижается, предотвращая возникновение стромальных помутнений.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота, регенерация, дистрофия роговицы, иммуногистохимия, ремоделирование матрикса.

Введение. Роговица — передняя прозрачная часть фиброзной оболочки глазного яблока. Она защищает ядро глаза и является его главной линзой. Самый мощный слой роговицы — ее строма. В основном она состоит из внеклеточного матрикса с небольшим количеством фиброцитов и нервных волокон между пластами коллагеновых волокон, которые непрерывно тянутся от лимба до лимба. Среди прочего, прозрачность роговицы обусловлена расположением коллагеновых волокон в виде решетки. При этом обязательными условиями прозрачности стромы являются одинаковый диаметр коллагеновых фибрилл и их равноудаленное расположение. Ремоделирование стромы запускается при кератитах и дистрофических заболеваниях роговицы. При этом одновременно происходят процессы разрушения нормальной структуры коллагеновой решетки и заживления роговицы. Клинически диагностируемые стромальные помутнения развиваются в результате прогрессирующего отека, дезорганизации коллагеновых волокон, трансформации фибробластов в миофибробласты, синтеза ими нетипичных для рого-

вицы коллагена 2-го и 3-го типов [1]. MMP9 в строме способна активировать фибробласты, потенцировать их подвижность без трансформации в контрактильный тип и увеличивать синтез коллагена 1-го типа [2]. Другой цитокин TGFβ1 контролирует рост и дифференцировку клеток, индуцирует фиброз и образование рубцов (процесс заживления ран), вызывает подавление иммунного ответа, участвует в ангиогенезе. Гиперэкспрессия TGFβ1 сопровождается процессами фиброобразования.

Ранее нами было показано положительное влияние субконъюнктивального введения низкомолекулярного натрия гиалуроната на прозрачность роговицы [3, 4].

СМ — среднемoleкулярный гиалуронат 250–1000 kDa, и НМ-ГА низкомолекулярный гиалуронат (10–250 kDa). Фрагменты средней и низкой молекулярной массы часто выявляются в виде полидисперсной фракции молекул с перекрывающимися молекулярными массами. Эта средняя фракция накапливается в результате наличия в ЭЦМ разных концентраций гиалуронидаз, а также разной активности механизмов элиминации ГА. В эту фракцию также входят синтезируемые молекулы ГА, еще не достигшие высокой молекулярной массы. Не удивительно, что СМ- и НМ-ГА проявляют свойства как ВМ, так и Олиго-ГА. Сообщается, что СМ-ГА способен индуцировать дифференцировку мезенхимальных клеток (хондроцитов, кератиноцитов, фибробластов, включая индукцию экспрессии факторов роста; эндотелиоцитов), опосредуя нормальный ответ на повреждение [5]. НМ-ГА ускоряет заживление ран путем индукции экспрессии CD44, RHAMM и накопления коллагена третьего типа. Местное применение НМ-ГА также способствует удалению ксенобиотиков. НМ-ГА обладает также антиэластаной активностью. Взаимодействуя с TLR4, НМ-ГА индуцирует апоптоз нейтрофилов, лимитируя реакцию воспаления [6]. Эксперименты *in vitro* продемонстрировали, что экзогенная ГК может усиливать синтез хондроитин и кератан-сульфата, отвечающих за поддержание прозрачности роговицы [7]. В высоких концентрациях ВМ-ГА способен подавлять подвижность и пролиферацию лимфоцитов. ГК любой молекулярной массы способна подавлять миграцию полиморфноядерных лимфоцитов, а также генерацию ими свободных радикалов.

Цель работы — изучение влияния низкомолекулярной гиалуроновой кислоты на ремоделирование стромы роговицы путем иммуногистохимического анализа экспрессии MMP9 и TGFβ1 в материале эксплантов роговиц пациентов, перенесших сквозную кератопластику по поводу хронических дистрофических заболеваний роговицы (далее — ХДЗР).

Материалы и методы. Исследование выполнено на базе кафедр офтальмологии и патологической анатомии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет». Изучен проспективный материал эксплантов роговиц пациентов с кератопатией в исходе кератитов, эндотелиально-эпителиальной дистрофии (ЭЭД) и глаукомы, обратившихся в 2017–2019 гг. для обследования и последующего лечения в УЗ «3-я городская клиническая больница им. Е. В. Клумова» (таблицы 1, 2, 3).

Таблица 1 — Структура материала для анализа морфологических и ИГХ признаков дисков роговиц пациентов с ЭЭД

| Нозологическая форма | Число случаев | Число полей зрения (×40) |
|---|---------------|--------------------------|
| Группа контроля | 3 | 18 |
| Эндотелиально-эпителиальная дистрофия («+» гиалуронозная кислота) | 6 | 36 |
| Эндотелиально-эпителиальная дистрофия («→» гиалуронозная кислота) | 5 | 30 |
| Всего | 14 | 84 |

Таблица 2 — Структура материала для анализа морфологических и ИГХ признаков дисков роговиц пациентов с заболеваниями глазной поверхности на фоне глаукомы

| Нозологическая форма | Число случаев | Число полей зрения (×40) |
|--|---------------|--------------------------|
| Группа контроля | 3 | 18 |
| Кератопатия на фоне глаукомы («+» гиалуронозная кислота) | 6 | 36 |
| Кератопатия на фоне глаукомы («→» гиалуронозная кислота) | 6 | 36 |
| Всего | 15 | 90 |

Таблица 3 – Структура материала для анализа морфологических и ИГХ признаков дисков роговиц пациентов с кератопатиями в исходе кератитов

| Нозологическая форма | Число случаев | Число полей зрения (×40) |
|-------------------------------------|---------------|--------------------------|
| Группа контроля | 6 | 36 |
| Кератиты («+» гиалуроновая кислота) | 6 | 36 |
| Кератиты («-» гиалуроновая кислота) | 8 | 48 |
| Всего | 20 | 120 |

Исследуемые группы были сопоставимы по основным клинико-лабораторным и морфологическим показателям. Критериями включения в исследование явились: неэффективность инстилляционной терапии болезни сухого глаза (БСГ); критериями исключения: наличие острого воспалительного процесса переднего отрезка глазного яблока. Клинико-лабораторное обследование включало: визометрию, биомикроскопию, тонометрию, тест Ширмера I, LIPCOF-тест, определение времени разрыва слезной пленки, оптическую когерентную томографию переднего отрезка глазного яблока.

С целью анализа характера экспрессии биомолекулярных маркеров выполнено ИГХ-исследование с использованием первичных моноклональных антител к MMP9 и TGFβ1. В качестве визуализирующей системы использовали комплекс вторичных антител EnVision фирмы «ДАКО», в качестве хромогена — диаминобензидин (ДАБ). Позитивный контроль — ткани и органы, рекомендованные производителем, негативный — исключение первичного антитела.

Для морфометрического исследования микропрепараты фотографировали в 6 полях зрения (объектив 40) с разрешением 2048×1536 пикселей при помощи микроскопа Leicas цифровой камерой LevenhukC-Series.

Статистический анализ данных проводился с использованием программного обеспечения Statistica 10.0. Полученные результаты обработаны статистически с вычислением медианы (Me), межквартильного размаха (МКР — 25 и 75 % процентиля) и 95% доверительного интервалов (ДИ), максимального и минимального значения. Для оценки характера распределения полученных данных использовался критерий Шапиро — Уилка (W). Уровень статистической значимости устанавливался $p < 0,05$. Сравнение независимых выборок по количественным признакам проводилось с использованием дисперсионного анализа непараметрических данных ANOVA и определением критериев Краскела — Уоллиса (H -критерий) для 3-х и более выборок и Манна — Уитни (U -критерий) с целью парного сравнения выборок.

Результаты и их обсуждение. В исследованных случаях ХДЗР в исходе кератитов экспрессия MMP9 выявлялась в ткани роговицы в виде цитоплазматического, преимущественно перинуклеарного, окрашивания эпителия с преобладанием в базальных и парабазальных слоях и стромы в кератоцитах и лейкоцитах с выраженной экспрессией в очагах неангиогенеза. Экспланты роговиц в группе контроля характеризовались негативным окрашиванием к MMP9 (рисунок 1).

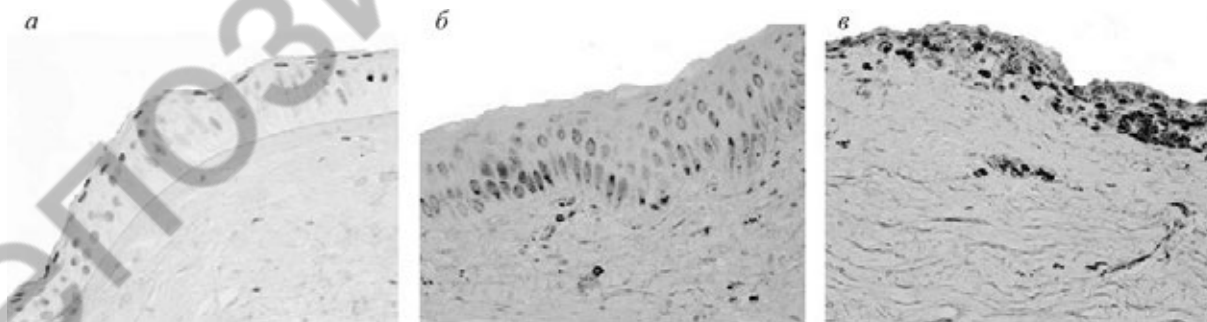


Рисунок 1 — Экспрессия MMP9 в ткани эксплантов роговиц в группе контроля (а) и в группах пациентов с ХДЗР в исходе кератитов (б–в).

ИГХМ. Хромоген — диаминобензидин.

(Контрокрасивание — гематоксилином Майера. Объектив 40)

В рамках анализа эффективности применения натрия гиалуроната в дополнение к стандартному протоколу лечения ХДЗР в исходе кератитов выявлены статистически значимо более высокие показатели экспрессии MMP9 в ткани эксплантов роговиц в группе с применением натрия гиалуроната (рисунок 2), что может свидетельствовать об активации процессов ремоделирования стромы поврежденной роговицы, что клинически проявлялось увеличением прозрачности роговицы.

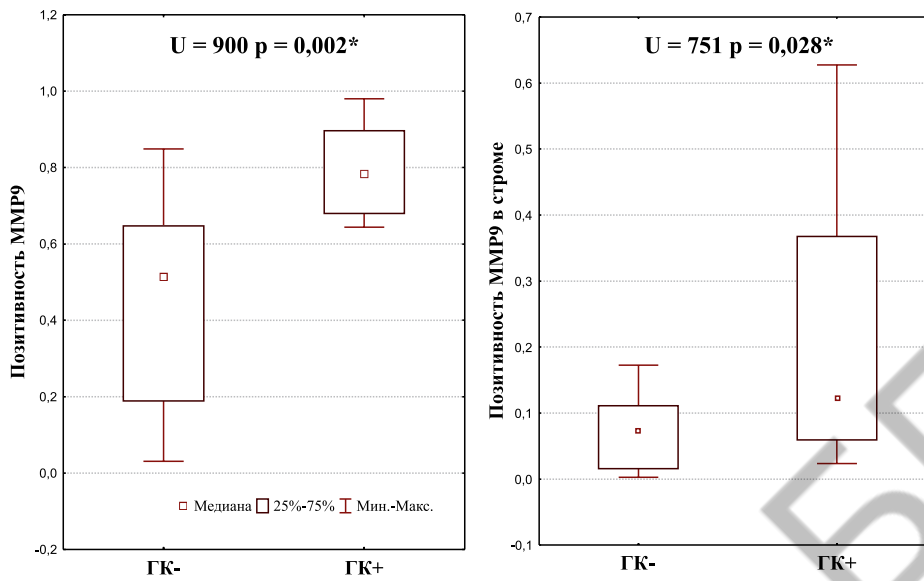


Рисунок 2 — Дисперсионный анализ экспрессии ММР9 в эпителии и строме экплантов роговиц пациентов с ХДЗР в исходе кератитов

В группах пациентов с различными нозологическими формами ЭЭД экспрессия ММР9 в эпителии соответствовала таковой или была менее выраженной, чем в группе контроля, одновременно стромальная экспрессия ММР9 была более выраженной в группах ЭЭД (рисунок 3).

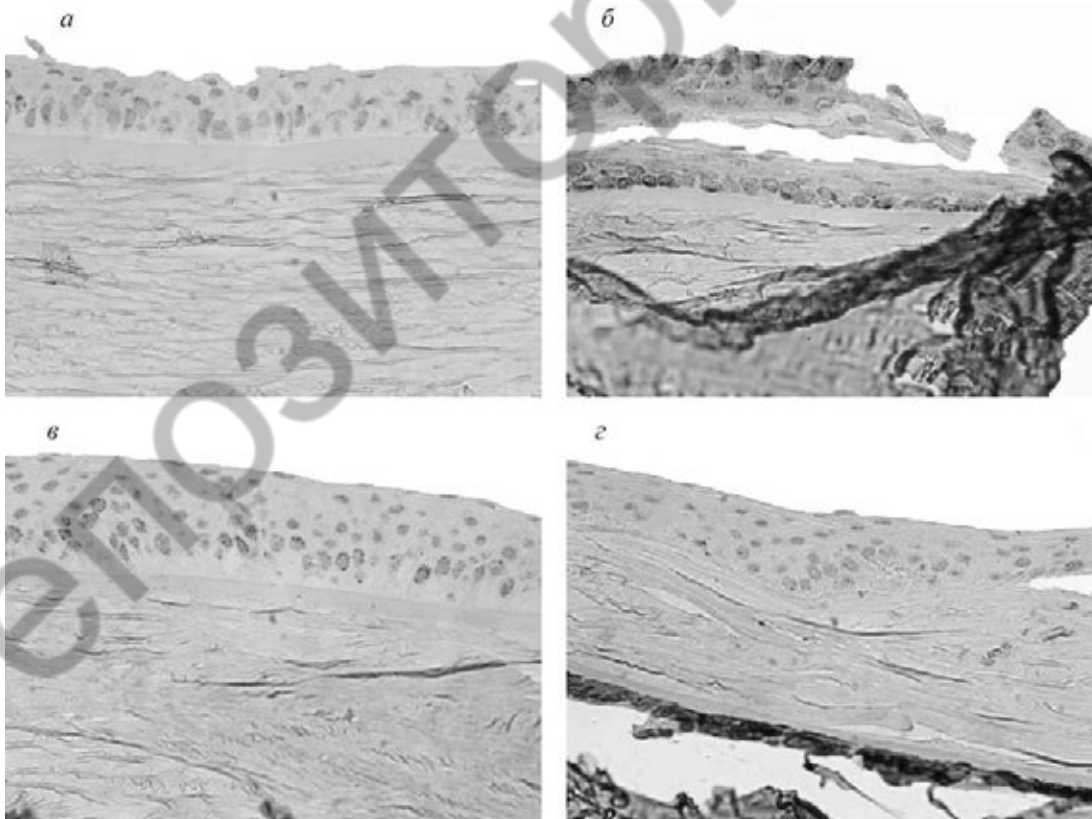


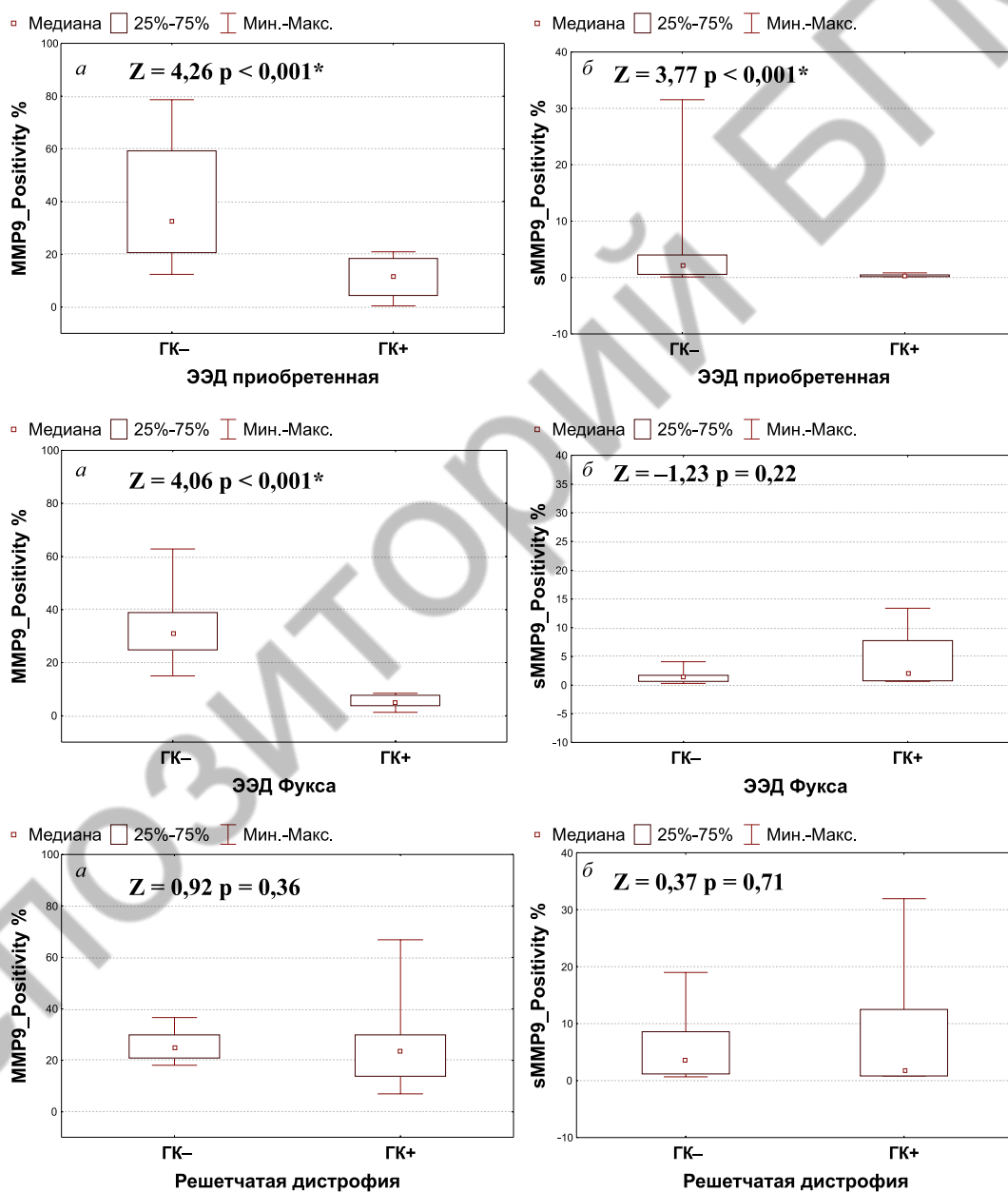
Рисунок 3 — Экспрессия ММР9 в ткани экплантов роговиц в группе контроля (а), приобретенных форм ЭЭД (б), дистрофии Фукса (в) и решетчатой дистрофии роговицы, тип I (г)

(ИГХМ. Хромоген — диаминобензидин.

Контрокрашивание — гематоксилином Майера. Объектив 40)

На фоне применения препаратов ГК анализ площади экспрессии MMP9 в ткани роговиц выявил значимое снижение показателя эпителиальной и стромальной позитивности в группе приобретенных форм ЭЭД, а также уменьшение позитивности эпителиальной экспрессии MMP9 в группе дистрофии Фукса. В то же время в группе решетчатой дистрофии роговицы (тип I) различия в эпителиальной и стромальной экспрессии MMP9 в зависимости от проводимой терапии отсутствовали (рисунок 4).

Интенсивность ИГХ реакции с моноклональными антителами к MMP9 в иммунопозитивных участках также уменьшалась на фоне применения инъекционных препаратов ГК: при приобретенных формах ЭЭД как в эпителиальном, так и стромальном компоненте роговиц, а при дистрофии Фукса — в эпителиальном компоненте. Одновременно, в группе решетчатой дистрофии, тип I, интенсивность экспрессии MMP9 на фоне ГК+ — терапии значимо увеличивалась как в эпителии, так и строме роговицы. При этом наиболее интенсивные отложения локализовались в зоне расположения амилоида.



* различия достоверны при $p < 0,05$

Рисунок 4 — Дисперсионный анализ позитивности экспрессии MMP9 в эпителии (a) и строме (b) экплантов роговиц при различных нозологических формах ЭЭД в зависимости от типа терапии

Таким образом, согласно результатам проведенного дисперсионного анализа на фоне терапии ЭЭД с применением инъекционной формы ГК имело место значимое уменьшение как площади, так и интенсивности экспрессии MMP9 в группах приобретенных форм ЭЭД и дистрофии Фукса. Это говорит об уменьшении интенсивности воспаления в эпителии роговицы. К тому же на фоне терапии уменьшается степень дезорганизации компонентов экстрацеллюлярного матрикса роговицы, что объясняет полученный клинический эффект.

В группах пациентов с различными нозологическими формами ЭЭД экспрессия TGFβ1 была более выраженной, чем в группе контроля.

Дисперсионный анализ экспрессии TGFβ1 в зависимости от нозологических форм ЭЭД выявил значимо большие показатели экспрессии TGFβ1 в строме по сравнению с группой контроля во всех исследуемых группах врожденных и приобретенных форм ЭЭД.

Анализ характера экспрессии TGFβ1 в ткани роговиц на фоне применения препаратов ГК выявил значимое снижение показателя позитивности стромальной экспрессии в группе приобретенных ЭЭД (рисунок 5).

Интенсивность ИГХ реакции с моноклональными антителами к TGFβ1 в иммунопозитивных участках также уменьшалась на фоне применения инъекционных препаратов ГК при приобретенных формах ЭЭД, а также в стромальном компоненте в группе решетчатой дистрофии. Одновременно в группе дистрофии Фукса интенсивность экспрессии TGFβ1 на фоне ГК+ — терапии значимо не изменялась.

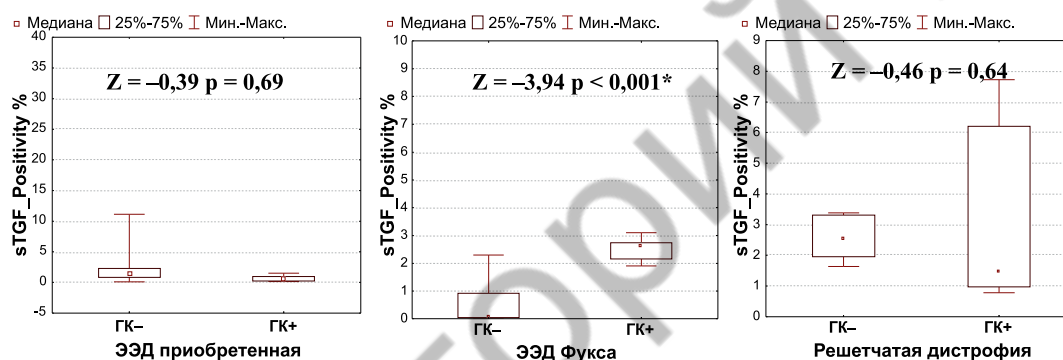


Рисунок 5 — Дисперсионный анализ позитивности экспрессии TGFβ1 в строме эксплантов роговиц при различных нозологических формах ЭЭД в зависимости от типа терапии

Согласно результатам проведенного анализа на фоне предлагаемого варианта терапии ЭЭД с применением инъекционной формы ГК снижается профибротическое действие TGFβ1 в группе приобретенных форм ЭЭД. В группах пациентов с глаукомой экспрессия MMP9 как в эпителии, так и строме роговицы значимо превышала таковую в группе контроля при стандартном протоколе терапии и снижалась с достижением сопоставимого с контролем уровня в группе пациентов с применением субконъюнктивального введения инъекционной формы гиалуроновой кислоты (таблица 4).

Таблица 4 — Дисперсионный анализ экспрессии MMP9 в ткани эксплантов роговиц у пациентов с глаукомой в зависимости от протокола терапии

| | ГК– | ГК+ | |
|---|---------------------|---------------------|--------------------------|
| Позитивность MMP9 в эпителии, % | | | |
| Me[МКР] | 46,63 [33,98;55,74] | 18,76[4,9;76,2] | <i>p</i> = 0,37 |
| Индекс интенсивности MMP9 в иммунопозитивных участках эпителия | | | |
| Me[МКР] | 163,8 [148,2;171] | 185 [163,5;200] | <i>p</i> = 0,05 |
| Общий индекс интенсивности MMP9 эпителия | | | |
| Me [МКР] | 169,5 [156,9;175,3] | 205,2 [173,4;208,1] | <i>p</i> = 0,028* |

*различия достоверны при *p* < 0,05.

Анализ характера экспрессии MMP9 в группах контроля и глаукомы в зависимости от характера проводимой терапии представлен на рисунке 6.

ММР9 является основным звеном патогенеза БСГ, инициируя и поддерживая воспаление [3]. Противовоспалительный эффект низкомолекулярного натрия гиалуроната у пациентов с ХДЗР на фоне глаукомы реализуется в подавлении экспрессии ММР9.

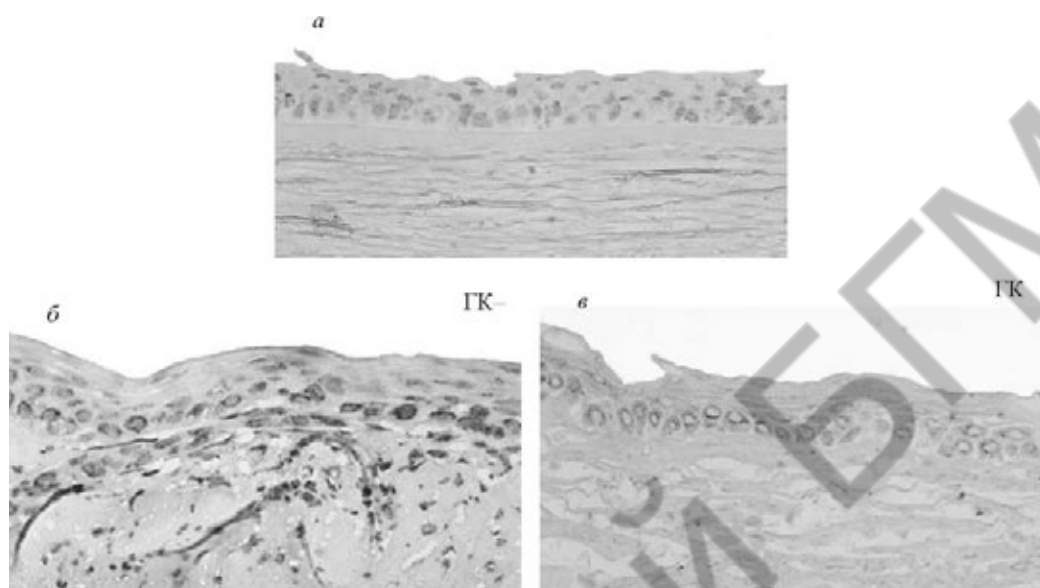


Рисунок 6 — Характер экспрессии ММР9 в ткани эксплантов в группах контроля (а) и глаукомы (б–в) в зависимости от протокола терапии (стандартный протокол — б, протокол с применением ГК — в). (ИГХМ. Хромоген — диаминобензидин. Контрокрасивание — гематоксилином Майера. Объектив 40)

В группе пациентов с глаукомой экспрессия TGFβ1 как в эпителии, так и в строме и эндотелии роговицы значительно превышала таковую в группе контроля при стандартном протоколе терапии и снижалась в группе пациентов с применением субконъюнктивального введения инъекционной формы гиалуроновой кислоты. Особенности экспрессии TGFβ1 в ткани роговиц при глаукоме в зависимости от характера проводимой терапии представлены в таблице 5.

Анализ характера экспрессии TGFβ1 в ткани роговиц на фоне применения препаратов ГК выявил некоторое снижение позитивности и значимое уменьшение интенсивности ($p = 0,002^*$) эпителиальной экспрессии и статистически значимое повышение стромальной экспрессии TGFβ1.

Таблица 5 — Дисперсионный анализ экспрессии TGFβ1 в ткани эксплантов роговиц у пациентов с глаукомой в зависимости от протокола терапии

| | ГК– | ГК+ | |
|--|---------------------|---------------------|-------------------------|
| Позитивность TGFβ1 в эпителии, % | | | |
| Me[МКР] | 11,4 [0,01;27,6] | 6,53 [4,8;7,6] | U = 30 p = 0,61 |
| Индекс интенсивности TGFβ1 в иммунопозитивных участках эпителия | | | |
| Me[МКР] | 174,9 [168,2;192,1] | 175,5 [154,8;185,5] | U = 24 p = 0,31 |
| Общий индекс интенсивности TGFβ1 в эпителии | | | |
| Me [МКР] | 174,3 [56,6;198] | 191,6 [166,1;208,4] | U = 4 p = 0,002* |
| Позитивность TGFβ1 в строме роговицы, % | | | |
| Me[МКР] | 0,12 [0,02;1,16] | 0,97 [0,73;1,32] | U = 14 p = 0,14 |
| Индекс интенсивности TGFβ1 в иммунопозитивных участках стромы | | | |
| Me[МКР] | 198,4 [192,9;200] | 169,8 [155,1;186,9] | U = 4 p = 0,011* |
| Общий индекс интенсивности TGFβ1 в строме роговицы | | | |
| Me[МКР] | 196,4 [17,1;200] | 167,2 [146,2;193,1] | U = 5 p = 0,015* |

*различия достоверны при $p < 0,05$.

Заключение. Низкомолекулярная гиалуроновая кислота, вводимая субконъюнктивально, способна модулировать экспрессию MMP9 и TGFβ1, а вместе с тем и процессы ремоделирования матрикса. В группе пациентов с ХДЗР в результате кератитов со сформированными помутнениями стромы роговицы MMP9 в строме способна активировать фибробласты, потенцировать их подвижность без трансформации в контрактильный тип и увеличивать синтез физиологического для роговицы коллагена 1-го типа. В группе пациентов с ЭЭД, напротив, экспрессия MMP9 и TGFβ1 снижается, предотвращая возникновение стромальных помутнений. Клинически это реализуется в более высоких показателях остроты зрения пациентов благодаря сохранению или повышению прозрачности роговицы.

Литература

1. Kaya, S., Schmidl, D., Schmetterer, L. (2015), Effect of hyaluronic acid on tear film thickness as assessed with ultra-high resolution optical coherence tomography. *Acta Ophthalmol*, 93: 439–443.
2. Franzmann, E. J, Schroeder, G. L, Goodwin, W. J. Expression of tumor markers hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) in head and neck tumors. *Int J Cancer* (2003), 106:438–45. — DOI:10.1002/ijc.11252.
3. Семак, Г. Р Клинические результаты комплексного лечения кератопатий в исходе воспалительных заболеваний переднего отрезка глазного яблока с использованием инъекционной формы гиалуроновой кислоты / Г. Р. Семак, И. Ю. Жерко // Научно-практический рецензируемый журнал «Медицинский журнал». — 2019. — № 1. — С. 97–100.
4. Семак, Г. Р. Иммуногистохимические доказательства эффективности гиалуроновой кислоты в лечении кератопатий / Г. Р. Семак, В. А. Захарова, С. К. Клецкий, Т. А. Летковская, И. Ю. Жерко // Доклады Национальной академии наук Беларуси. — № 3. — Минск, 2019.
5. Atmuri, V., Martin, D. C., Hemming, R. Hyaluronidase 3 (HYAL3) knockout mice do not display evidence of hyaluronan accumulation. *Matrix Biol* (2008), 27:653–60. — DOI:10.1016/j.matbio.2008.
6. Arnold, F., Jia, C., He, C., Cherry, G. W. Hyaluronan, heterogeneity, and healing: the effects of ultrapure hyaluronan of defined molecular size on the repair of full-thickness pig skin wounds. *Wound Repair Regen* (1995), 3:299–310. — DOI:10.1046/j.1524-475X.1995.30310.
7. Ibrahim, S., Ramamurthi, A. Hyaluronic acid cues for functional endothelialization of vascular constructs. *J Tissue Eng Regen Med* (2008), 2:22–32. — DOI:10.1002/term.61.

The effect of low molecular weight hyaluronan on the processes of corneal stroma remodeling

*Semak G. R., Zakhatava V. A., Kletsky S. K., Letkovskaya T. A., Zherka I. U.
Educational Establishment “The Belarusian State Medical University”,
Minsk, Republic of Belarus*

Clinically diagnosed corneal stromal clouding develops as a result of progressive edema, disorganization of collagen fibers. The article describes the results of low molecular weight hyaluronic acid effect on remodeling of corneal stroma investigation using immunohistochemical analysis of the expression of MMP9 and TGFβ1 in the material of corneal explants in patients who underwent through keratoplasty due to chronic dystrophic diseases of the cornea.

The study was performed on prospective material of 49 patients with chronic dystrophic diseases of the cornea. In order to analyze the nature of the expression of biomolecular markers, an IHC study was performed using primary monoclonal antibodies to MMP9 and TGFβ1. Low molecular weight hyaluronic acid, administered subconjunctively, is able to modulate the expression of MMP9 and TGFβ1, and at the same time, the processes of matrix remodeling. In the group of patients with dry eye disease due to keratitis, with clouding of the stroma of the cornea, MMP9 in the stroma is able to activate fibroblasts, potentiate their mobility without transformation into a contractile type and increase the synthesis of type 1 collagen physiological for the cornea. In the group of patients with endothelial-epithelial dystrophy (EED), in contrast, the expression of MMP9 and TGFβ1 was reduced, preventing the occurrence of stromal opacities.

Keywords: hyaluronic acid, dry eye disease, regeneration, corneal dystrophy, immunohistochemistry

Поступила 15.10.2019