

## РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-4-29-32

### ДЕЙСТВИЕ ОКСИЭТИЛАММОНИЯ МЕТИЛФЕНОКСИАЦЕТАТА НА РЕГЕНЕРАЦИЮ РОГОВИЦЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

К. А. Абзаева<sup>1</sup>, П. А. Стороженко<sup>2</sup>, И. В. Жигачёва<sup>3</sup>,  
В. М. Гукасов<sup>4,\*</sup>, Ю. Л. Рыбаков<sup>4</sup>

В экспериментах на кроликах показано, что 5 % водный раствор оксиэтиламмония метилфеноксиацетата в виде аппликаций на роговицу (2 раза в сутки) параллельно с субконъюнктивальными инъекциями (0,1 мл, 1 раз, через 15 – 20 мин после нарушения целостности роговицы, затем в это же время в тех же дозах ежедневно в течение 7 сут) оказывает стимулирующее действие на пролиферативно-репаративные процессы в роговице. Оксидэтиламмония метилфеноксиацетат сокращает срок заживления раны роговицы у кроликов на 21 % ( $p < 0,05$ ) и частоту образования катаракты в 6 раз ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (физиологический раствор).

**Ключевые слова:** роговица; механическая травма; оксидэтиламмоний метилфеноксиацетат; кролики.

#### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время продолжается поиск фармакологических веществ (ФВ), оказывающих ранозаживляющее действие [3]. Среди многих ФВ, обладающих подобным эффектом, вызывает интерес оксидэтиламмония метилфеноксиацетат, для которого характерна иммуномодулирующая и адаптогенная активность [2, 5]. В механизме его действия может иметь значение активация этим соединением триптофанил-тРНК-синтетазы (ТРСазы) [6], которая катализирует образование триптофанил-тРНК в реакции этерификации аминокислоты с молекулой тРНК. Этот фермент принимает участие в ангиогенезе, и его экспрессия увеличивается в присутствии цитокинов (например, гамма-интерферона) [7].

В связи с этим интересно было проверить способность оксидэтиламмония метилфеноксиацетата стимулировать репаративные процессы после травматических поражений роговицы, что и явилось причиной изучить в эксперименте действие этого ФВ на процессы регенерации роговицы после её механической травмы в эксперименте.

#### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали фармацевтическую субстанцию оксидэтиламмония метилфеноксиацетата производства АО “Усолье-Сибирский химфармзавод” (Россия). Химическая структура оксидэтиламмония метилфеноксиацетата (трис(2-гидроксиэтил)аммоний 2-метилфеноксиацетат) и его физико-химические свойства описаны ранее [2].

Концентрация раствора оксидэтиламмония метилфеноксиацетата соответствовала оптимальной концентрации его химического аналога — цинкатрана, стимулирующего заживление ожоговых ран кожи [5].

Эксперименты проведены на 32 (64 глаза) кроликах-самцах Шиншилла (г. Ангарск, питомник АГТУ) с массой тела 2,5 – 3 кг в соответствии с “Правилами лабораторной практики в Российской Федерации”, утвержденными приказом Минздрава России от 19.06.2003 г. № 267 (Правила лабораторной практики в Российской Федерации). Животных содержали в соответствии с правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей. По окончании эксперимента животных выводили из эксперимента цервикальной дислокацией 5 позвонка.

Всем животным наносили 5 % водный раствор оксидэтиламмония метилфеноксиацетата или раствора хлорида натрия в виде аппликаций пипеткой (2 – 3 капли) на роговицу (2 раза в сутки) параллельно с субконъюнктивальными инъекциями (0,1 мл, 1-й раз, через 15 – 20 мин после механической травмы роговицы, затем в это же время в тех же дозах ежедневно в течение 7 сут вводили изучаемые растворы, сразу после 3-кратного орошения роговицы 0,5 % раствором ди-

<sup>1</sup> ФГБНУ Иркутский институт химии имени А. Е. Фаворского СО РАН, Россия, 664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, д. 1.

<sup>2</sup> Государственный научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений, Россия, 105118, Москва, шоссе Энтузиастов, д. 38.

<sup>3</sup> ФГБНУ Институт биохимической физики имени Н. М. Эмануэля РАН, Россия, 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4.

<sup>4</sup> ФГБНУ Научно-исследовательский институт — Республиканский исследовательский научно-консультационный центр экспертизы, Россия, 123317, Москва, ул. Антонова-Овсеенко, д. 13, стр. 1.

\* e-mail: v\_m\_gukasov@mail.ru

каина (для обезболивания)). Использовали 2 пути введения для увеличения продолжительности действия этого ФВ. При нанесении на роговицу ФВ быстро распространяется по слизистой оболочке глаза, но столь же стремительно и вымывается благодаря функции слезной жидкости. Для увеличения продолжительности его действия применяли субконъюнктивальный метод введения ФВ.

Кролики были разделены на следующие группы:

1) контроль, 16 особей, которым вводили хлорид натрия 1 раз через 15 – 20 мин после механической травмы роговицы, затем в это же время в тех же дозах ежедневно в течение 7 сут вводили субконъюнктивально по 0,1 мл раствора натрия хлорида;

2) эксперимент, 16 особей, которым вводили раствор оксиэтиламмония метилфеноксиацетата 1 раз через 15 – 20 мин после механической травмы роговицы, затем в это же время в тех же дозах ежедневно в течение 7 сут вводили субконъюнктивально по 0,1 мл раствора оксиэтиламмония метилфеноксиацетата.

Материал для гистологического исследования брали после выведения животных из эксперимента, на 1, 7, 15 и 25 сут, по 4 животных (8 глаз) на каждый срок (через день после нанесения механической травмы роговицы), и обрабатывали обычными гистологическими методами [1]. Окрашивали срезы гематоксилин-эозином.

На разных сроках заживления роговицы у кроликов, характеризующих разные стадии воспалительного процесса, проводили изучение морфологических параметров роговицы, характерных для данного срока репарации.

Статистическую обработку данных проводили методом Стьюдента. Данные представляли в виде средних и стандартных значений ошибки —  $M$  и  $m$ , соответственно. Достоверными считали различия при  $p \leq 0,05$  [4].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологическое изучение срезов показало, что у 100 % кроликов контрольной группы на следующий день после удаления половины толщины роговицы наблюдается развитие как некротических деструктивных, так и воспалительно-компенсаторных процессов. Дно раны было заполнено воспалительным белково-слизистым выпотом с примесью различных патогенных клеток, преимущественно сегментоядерных нейтрофилов, расположенных, в основном, на границе экссудата и дна раневой полости. Коллагеновые пучки стромы роговицы были отечны и гомогенизированы, между ними встречались единичные лейкоциты; 55 % кератоцитов дегенерировали (клетки с патологическими гранулами и включениями). Среди оставшихся 45 % неразрушенных кератоцитов были видны активные клетки с фигурами клубка профазы; таких активных клеток в поле зрения насчитывалось до 10, что составляло около 15 % от их общего количества. До

88 % клеток эндотелия с периферии к центру зоны травмы постепенно дегенерировали. Передний эпителий роговицы с приближением к краю раневого дефекта постепенно утончался, клетки его, уплощаясь, вытягивались, количество клеточных слоев эпителия все более уменьшалось, и в виде однослойного эпителиального язычка покрывали поверхность боковых стенок раневого дефекта под раневым сгруппом.

У кроликов экспериментальной группы на данный срок целостность эндотелия нигде, в том числе напротив раневого дефекта, не была нарушена. Щели между коллагеновыми пучками стромы собственной оболочки роговицы в зоне травмы, несмотря на наличие отека, были хорошо выражены. То есть, целостность заднего эпителия у этих животных составляла 100 %. Наблюдался интенсивный рост эпителиального регенерата переднего эпителия по краям боковых стенок раневого дефекта. Митозы (все фазы) среди кератоцитов как в области травмы, так и соседней зоны, встречались среди  $52,3 \pm 4,6$  клеток, т.е. в 6 раз чаще, чем в контроле ( $p < 0,05$ ), указывая на снижение риска помутнения роговицы.

На 7 сут наблюдений у контрольных кроликов эпителизация раны была, в основном, завершена. Поверхность эпителия в центральных участках травмы – волнисто-зазубренная с интенсивно ороговевшими клетками верхних слоев. Местами (до 16 % поверхности) дефект покрыт многослойным плоским эпителием с нарушением вертикальной анизоморфии. Все базальные эпителиоциты и клетки второго слоя эпителиального регенерата сильно вакуолизированы. Связь эпителия с подлежащей тканью была сильно разрыхлена. Вследствие отека волокон собственной оболочки соседней и периферической зон травмированной области межволоконистые щели были плохо выражены, коллагеновые пучки разволокнены, отмечалось множество фибробластов, встречались единичные гематогенные клетки (эритроциты, лейкоциты) и кровеносные сосуды. По сравнению с предыдущим сроком фибриллогенез усиливался, но волокна коллагена располагались хаотично.

У животных, получавших оксиэтиламмония метилфеноксиацетат, на 7 сут регенерации эпителий периферической зоны травмированного участка отличался от неповрежденных зон меньшей толщиной, а регенерировавшая подлежащая собственная оболочка (ткань передней пограничной мембраны — боуменова оболочка) состояла из сравнительно тонких, но упорядочено расположенных пучков. Межпучковая и внутрипучковая отечность была выражена слабо, но фибробласты и кератобласты обнаруживались в нескольких больших количествах, чем в интактных участках. Центральные зоны травмы также были покрыты многослойным плоским, ороговевающим эпителием. В этих участках фибриллогенез регенерирующей боуменовой оболочки протекал интенсивнее, а вновь образованные коллагеновые волокна и их пучки, по сравнению с

контролем, располагались более упорядочено. Поверхностные слои регенерирующей боуменовой оболочки, где протекает интенсивный фибриллогенез, были богаты фибробластами (до 57 % случаев) и кератоцитами (до 41 % случаев) и бедны гематогенными клетками (эритроциты, лейкоциты) и некротизированными структурами. В этих участках иногда (до 15 % случаев) обнаруживались кровеносные сосуды. Следовательно, по сравнению с показателями, установленными для кроликов контрольной группы, при стимуляции животных заметно более упорядоченное и достоверное отличие в формировании пролиферативно-репаративных процессов в роговице.

На 15 сут после нанесения травмы у кроликов контрольной группы эпителизация роговицы в основном была завершена. Однако толщина регенерировавшего эпителиального пласта неодинакова на всем протяжении зоны повреждения. Ближе к краю травмы эпителий, утолщаясь, образовывал погружной рост в мало дифференцированную подлежащую ткань боуменовой оболочки. Здесь митозы выявлялись чаще. Установлено, что к середине травмированного участка эпителиальный пласт утончается, а в центре травмы становится двуслойным. В этом участке поверхностные слои: передний многослойный плоский — неороговевающий эпителий, передняя пограничная мембрана (боуменова оболочка) были богаты элементами фибробластического и фагоцитарного ряда. Местами встречались остатки некротизированных структур, эпителий местами дегенерировал, слущивался. Митозы (все фазы) фибробластов встречались чаще. Поверхность всего эпителиального пласта была волнисто-зазубренная, а собственная оболочка была богата капиллярами.

У животных, получавших оксиэтиламмоний метилфеноксиацетат, на 15 сут после операции вся регенерирующая роговица перестраивалась и принимала структуру, мало отличающуюся от нормальной. Только в центральных участках собственной оболочки сохранялась некоторая отечность волокнистых структур. При сравнении картин заживления роговицы в исследованных группах кроликов видно достоверное ( $p < 0,05$ ) отличие скорости заживления раны роговицы (таблица). На 25 сут после операции у кроликов контрольной группы вся травмированная поверхность роговицы была полностью эпителизирована. Эпителиальный пласт был неравной толщины: истонченные участки чередовались с участками значительной толщины, с некоторым погружным ростом в мало дифференцированную регенерирующую собственную оболочку, в которой митозы фибробластов и фибриллогенез продолжались достаточно интенсивно. В этих участках молодые коллагеновые волокна и их пучки располагались хаотично. Местами связь эпителия с подлежащей соединительнотканной собственной (боуменовой) оболочкой была непрочной, и при приготвлении срезов последняя легко отслаивалась. Поверхность эпителиального регенерата зазубрена. К

этому сроку наблюдения восстановительные процессы и перестройка тканевых компонентов роговицы не завершены; при этом у 9 кроликов этой группы наблюдалось формирование помутнения роговицы.

У животных экспериментальной группы, получавших оксиэтиламмония метилфеноксиацетат, в отличие от контрольных, к 25 дню наблюдений основные процессы регенерации и перестройки регенерировавших структур, в основном, завершались. К этому сроку коллагеновые волокна и их пучки были достаточно упорядочены, а регенерировавший эпителиальный пласт был тонким, с гладкой поверхностью. Только у одного кролика продолжались процессы дифференцировки роговицы, что позволило обнаружить едва заметное помутнение в центральном участке роговицы.

Субконъюнктивальные инъекции с одновременной аппликацией раствора оксиэтиламмония метилфеноксиацетата после нанесения механической травмы на роговицу активируют процессы ранней элиминации некротических тканей на месте дефекта. Оксиэтиламмония метилфеноксиацетат ограничивает распространение патологического процесса, ускоряет эпителизацию раны, обеспечивая гистотипичность эпителиального пласта, приводит к упорядоченному расположе-

**Морфологические параметры роговицы кроликов при заживлении после экспериментальной травмы в динамике ( $M \pm m$ )**

Показатель (% от общего количества исследованных клеток в поле зрения)	Контроль (физиологический раствор)	Эксперимент (оксиэтиламмония метилфеноксиацетат)
1 сутки		
Кератоциты — дегенерация	100	55,1 ± 3,4*
Кератоциты в профазе	8,5 ± 1,1	52,3 ± 4,6*
Эндотелий — дегенерация	86,8 ± 6,5	0*
7 сутки		
Многослойный эпителий	13,9 ± 1,2	84,8 ± 4,4*
Вакуолизация эпителия	100	8,3 ± 1,1*
Митозы фибробластов	32,6 ± 3,3	51,4 ± 4,2*
Кератобласты	21,6 ± 2,15	38,8 ± 3,1*
Гематогенные клетки	1,6 ± 0,15	3,8 ± 1,1*
Кровеносные сосуды	1,2 ± 0,1	10,5 ± 1,2*
15 сутки		
Эпителизация роговицы	91,5 ± 4,9	100,0*
Отёчность волокнистых структур	22,4 ± 3,1	6,5 ± 1,2*
Митозы фибробластов	24,4 ± 2,3	39,9 ± 3,1*
Эпителий — дегенерация	15,5 ± 3,7	0*
25 сутки		
Эпителизация роговицы	100,0	100
Митозы фибробластов	16,6 ± 2,2	1,0 ± 0,5*
Хаотичность волокон	100,0	0*
Средний срок полного заживления раны (сут)	30,2 ± 2,4	23,7 ± 2,1*

\* —  $p < 0,05$  по отношению к контролю.

нию волокон стромы роговицы в области раневого дефекта. При этом последовательность протекания фаз воспаления при применении оксиэтиламмония метилфеноксиацетата не изменяется. Можно полагать, что в основе перечисленных эффектов оксиэтиламмония метилфеноксиацетата лежит его стимуляция активности белоксинтезирующего аппарата клетки и, соответственно, ускорению пролиферативно-репаративных процессов, определяющих заживление пораженной роговицы. В этом плане отметим, что ранее нами [6] установлено свойство оксиэтиламмония метилфеноксиацетата стимулировать экспрессию матричной РНК триптофанил-гРНК-синтетазы, которая принимает участие в ангиогенезе [7]. Можно предполагать, что именно феномен активации триптофаниловых синтетаз лежит в основе стимулирующего правильного заживления роговицы эффекта оксиэтиламмония метилфеноксиацетата.

Полученные результаты позволяют считать 5 % раствор оксиэтиламмония метилфеноксиацетата перспективным для применения в офтальмологической практике при травматических поражениях роговицы после проведения установленных требованиями Минздрава России необходимых исследований.

## ВЫВОДЫ

1. Оксиэтиламмония метилфеноксиацетат (5 % водный раствор, ежедневно по 0,1 мл субконъюнктивально + двукратные аппликации этого же раствора на роговицу ежедневно, курсом 7 дней) уменьшает в 6 раз

риск помутнения роговицы, после её механического повреждения в эксперименте на кроликах ( $p < 0,05$ ).

2. Оксиэтиламмония метилфеноксиацетат (5 % водный раствор, ежедневно по 0,1 мл субконъюнктивально + двукратные аппликации этого же раствора на роговицу ежедневно) курсом 7 дней начиная с 1-го дня после моделирования механической травмы роговицы ускоряет на 21 % срок полного заживления раны роговицы у кроликов ( $p < 0,05$ ).

Статья подготовлена в рамках Государственного задания № 26.13330.2019/13.1 Министерства образования и науки Российской Федерации.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. И. Афанасьев, Л. П. Бобова, В. Л. Горячкина и др., в кн.: *Лабораторные занятия по курсу гистологии, цитологии и эмбриологии*, Ю. И. Афанасьев, А. Н. Яцковский (ред.), Москва (1999), сс. 7 – 12.
2. М. Г. Воронков, М. М. Расулов, *Хим.-фарм. журн.*, **41**(1), 3 – 7 (2007); *Pharm. Chem. J.*, **41**(1), 1 – 6 (2007).
3. О. А. Высокова, А. В. Жданова, И. М. Петрова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **53**(7), 41 – 43 (2019); *Pharm. Chem. J.*, **53**(7), 642 – 645 (2019).
4. Г. Н. Зайцев, *Математический анализ биологических данных*, Наука, Москва (1991), с. 184.
5. Р. М. Расулов, *Вестн. Моск. гос. обл. ун-та. Сер.: Естественные науки*, № 4, 56 – 62 (2017).
6. М. М. Расулов, М. К. Нурбеков, С. Н. Бобкова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **45**(7), 3 – 6 (2011); *Pharm. Chem. J.*, **45**(7), 381 – 384 (2011).
7. S. G. Park, P. Schimmel, S. Kim, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**(32), 11043 – 11049 (2008); doi: 10.1073 / pnas.0802862105.

Поступила 14.06.19

## EFFECT OF OXYETHYLAMMONIUM METHYLPHENOXYACETATE ON REPARATIVE REGENERATION OF CORNEA IN EXPERIMENT

K. A. Abzaeva<sup>1</sup>, P. A. Storozhenko<sup>2</sup>, I. V. Zhigacheva<sup>3</sup>, V. M. Gukasov<sup>4,\*</sup>, and Yu. L. Rybakov<sup>4</sup>

<sup>1</sup> A. E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Favorskogo 1, Irkutsk, 664033 Russia

<sup>2</sup> State Research Institute of Chemistry and Technology of Organoelement Compounds, sh. Entuziastov 38, Moscow, 105118 Russia

<sup>3</sup> N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

<sup>4</sup> Scientific Research Institute – Federal Research Centre for Project Evaluation and Consulting Services, ul. Antonova-Ovseenko 13/1, Moscow, 123317 Russia

\* e-mail: v m gukasov@mail.ru

Experiments on rabbits showed that 5% aqueous solution of oxyethylammonium methylphenoxyacetate in the form of applications to cornea (2 times a day) in parallel with subconjunctival injections (0.1 mL, once within 15 – 20 min after cornea integrity disturbance, then daily at the same time in the same dose for 7 days) produces a stimulating effect on the proliferative – reparative processes in the cornea. Oxyethylammonium methylphenoxyacetate reduces the corneal wound healing time in rabbits by 21% ( $p < 0.05$ ) and decreases the incidence of cataract formation 6 times ( $p < 0.05$ ) compared to control (saline solution).

**Keywords:** cornea; mechanical trauma; oxyethylammonium methylphenoxyacetate; rabbits.