

Научная статья

УДК 617.713

doi: 10.25276/0235-4160-2022-2-45-53

Анализ экспрессии люмикана, белка плотных контактов 1, фактора роста соединительной ткани, супероксиддисмутазы 1 в тканях роговиц при болезни трансплантата

Г.Р. Семак¹, Т.А. Летковская¹, В.А. Захарова², И.Ю. Жерко²

¹УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

²ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», Минск, Беларусь

РЕФЕРАТ

Цель. Установить характер экспрессии окклюдина, белка плотных контактов 1, фактора роста соединительной ткани, люмикана в эксплантах роговиц пациентов с болезнью роговичного трансплантата, а также проанализировать изменения экспрессии указанных белков на фоне применения 1% низкомолекулярного натрия гиалуроната. **Материал и методы.** В проспективное исследование были включены 11 пациентов с болезнью роговичного трансплантата после перенесенной сквозной кератопластики по поводу кератопатии в исходе воспалительных заболеваний роговицы и псевдофакричной буллезной кератопатии. Одна группа (6 пациентов) в предоперационном периоде проходила курс инъекций 1% низкомолекулярного натрия гиалуроната, а вторая (5 пациентов) не получала дополнительного лечения. Группу контроля составили экспланты 3 донорских здоровых роговиц нормального строения. Выполнено иммуногистохимическое исследование эксплантов с использованием первичных моно-

клональных антител к люмикану, фактору роста соединительной ткани, окклюдину, белку плотных контактов 1, супероксиддисмутазе 1. **Результаты.** После применения в предоперационном периоде 1% низкомолекулярного натрия гиалуроната коэффициенты экспрессии окклюдина и белка плотных контактов 1 повышались, приближаясь к нормальным значениям. На фоне лечения с применением инъекционной формы 1% низкомолекулярного натрия гиалуроната было выявлено увеличение коэффициента экспрессии и индекса интенсивности экспрессии люмикана, отмечалась нормализация коэффициента экспрессии люмикана и фактора роста соединительной ткани в строме роговицы. **Заключение.** Применение 1% низкомолекулярного натрия гиалуроната при болезни трансплантата активирует процессы регенерации в тканях роговицы, снижает активность фибрирования в строме и способствует восстановлению анатомической и функциональной целостности эпителия роговицы.

Ключевые слова: натрия гиалуронат, кератопластика, отторжение трансплантата, иммуногистохимия ■

Для цитирования: Семак Г.Р., Летковская Т.А., Захарова В.А., Жерко И.Ю. Анализ экспрессии люмикана, белка плотных контактов 1, фактора роста соединительной ткани, супероксиддисмутазы 1 в тканях роговиц при болезни трансплантата. Офтальмохирургия. 2022;2: 45–53. <https://doi.org/10.25276/0235-4160-2022-2-45-53>

Автор, ответственный за переписку: Галина Романовна Семак, semakgalina@mail.ru

ABSTRACT

Original article

The expression of lumican, tight junction protein 1, connective tissue growth factor, superoxide dismutase 1 in corneal tissues in graft disease

G.R. Semak¹, T.A. Letkovskaya¹, V.A. Zakharava², I.Yu. Zherko²

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

²Alexandrov National Cancer Centre of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Purpose. To determine the expression pattern of occludin, tight junction protein 1, connective tissue growth factor, lumican, in corneal explants of patients with corneal graft rejection, as well as analyze changes in the expression of these proteins after application of 1% low molecular weight sodium hyaluronate. **Material and methods.** The prospective

study included 11 patients with corneal graft rejection after penetrating keratoplasty for inflammatory diseases, endothelial-epithelial dystrophy, congenital corneal dystrophies. One group (6 patients) period underwent a course of injections of 1% low molecular weight sodium hyaluronate in the preoperative, and the second (5 patients) did not receive additional

treatment. The control group consisted of explants of 3 normal donor corneas. Immunohistochemical evaluation of explants was performed using primary monoclonal antibodies to lumican, connective tissue growth factor, occludin, tight junction protein 1, superoxide dismutase 1. **Results.** After preoperative use of 1% low molecular weight sodium hyaluronate, the expression coefficient of occludin and tight junction protein 1 increased, approaching normal values. An increase in the expression coefficient and the intensity index of lumican expression was revealed during therapy. During treatment with an injectable form of 1%

For quoting: Semak G.R., Letkovskaya T.A., Zakharava V.A., Zherko I.Yu. The expression of lumican, tight junction protein 1, connective tissue growth factor, superoxide dismutase 1 in corneal tissues in graft disease. *Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery.* 2022;2: 45-53. <https://doi.org/10.25276/0235-4160-2022-2-45-53>

Corresponding author: Galina R. Semak, semakgalina@mail.ru

low molecular weight sodium hyaluronate, normalization of the expression coefficient of lumican and connective tissue growth factor in the corneal stroma was noted. **Conclusion.** The use of 1% low molecular weight sodium hyaluronate in transplant rejection activates the regeneration processes in the corneal tissues, reduces the activity of fibrosis in the stroma and helps to restore the anatomical and functional integrity of the corneal epithelium.

Key words: sodium hyaluronate, keratoplasty, graft rejection, immunohistochemistry ■

ВВЕДЕНИЕ

Пересадка роговицы (кератопластика) характеризуется довольно высоким уровнем выживаемости трансплантата. Случаи реакции отторжения, по данным литературы, колеблются от 2,3 до 65% в зависимости от факторов риска, имеющих место у реципиента [1, 2]. Пациенты с хроническими дистрофическими заболеваниями роговицы в исходе воспалительного повреждения и после неоднократной кератопластики относятся к «группе высокого риска», вероятность неблагоприятного исхода аллотрансплантации может достигать 70% [3].

Реакция отторжения трансплантата (болезнь трансплантата) может протекать как в эпителии, так и в строме роговицы, обуславливаясь иммунологическими механизмами и характеризоваться помутнением, васкуляризацией или некрозом трансплантата [4, 5]. По степени выраженности процесса выделяют острую и хроническую реакции отторжения трансплантата [2]. Морфологически болезнь трансплантата характеризуется фиброзированием стромы, дезорганизацией эпителия, фокусами апоптоза, лимфоцитарной инфильтрацией, неоваскуляризацией [6].

Лечение болезни трансплантата обычно включает применение иммуносупрессоров, в том числе глюкокортикоидов (ГК). В то же время описана способность низкомолекулярного натрия гиалуроната активировать процессы регенерации, подавлять процессы воспаления и фиброобразования [7].

Ранее нами была охарактеризована экспрессия CD44, MMP9, TGF- β 1, окклюдина, белка плотных контактов 1, люмикана, фактора роста соединительной ткани в тканях (ФРСТ) роговицы в норме и изменение экспрессии маркеров при хронических дистрофических заболеваниях роговицы различной этиологии, доказана клиническая эффективность применения низкомолекулярного натрия гиалуроната при болезни трансплантата. Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование роговичных эксплантов показало, что патогенез хронического дис-

трофического поражения роговицы различной этиологии схож. Положительное влияние ГК на течение кератопатии любого генеза характеризуется увеличением прозрачности роговицы и уменьшением проявлений болезни «сухого глаза» [8]. На фоне комплексного лечения с включением субконъюнктивального введения 1% низкомолекулярного натрия гиалуроната мы отметили постепенное увеличение прозрачности роговицы (рис. 1), увеличение показателей пробы Ширмера и времени разрыва слезной пленки, снижение отечности трансплантата [8].

Для объяснения клинической эффективности и получения доказательств влияния 1% низкомолекулярного натрия гиалуроната на течение процесса при болезни роговичного трансплантата проведено ИГХ-исследование роговичных эксплантов после повторной кератопластики с определением экспрессии маркеров воспаления, фиброза и регенерации.

ЦЕЛЬ

Установление характера экспрессии окклюдина, белка плотных контактов, ФРСТ, люмикана, в эксплантах роговиц пациентов с болезнью роговичного трансплантата, а также анализ изменения экспрессии указанных белков на фоне применения 1% низкомолекулярного натрия гиалуроната.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на базе кафедр глазных болезней и патологической анатомии УО «Белорусский государственный медицинский университет».

В проспективное исследование были включены 11 пациентов с болезнью роговичного трансплантата, ранее перенесшие сквозную кератопластику по поводу кератопатии в исходе воспалительных заболеваний роговицы и псевдофакичной буллезной кератопатии. Все 11 пациентов с болезнью трансплантата были включены в иссле-



Рис. 1. Динамика изменения состояния переднего отрезка глазного яблока у пациента с роговичным трансплантатом: а) до лечения; б) после курса терапии с применением 1% низкомолекулярного натрия гиалуроната; в) через месяц после повторной сквозной кератопластики

Fig. 1. Dynamics of changes in the state of the anterior segment of the eyeball in a patient with a corneal transplant: а) before treatment; б) after a course of therapy with 1% low molecular weight sodium hyaluronate; в) a month after repeated penetrating keratoplasty

Таблица 1

Структура материала для анализа морфологических и ИГХ-признаков

Table 1

Structure of the material for the analysis of morphological and IHC features

Нозологическая форма Nosological form	Число случаев Number of cases	Число полей зрения (×40) Number of fields of view (×40)
Группа контроля Control group	3	18
Болезнь трансплантата (ГК+) Corneal graft rejection (HA+)	6	36
Болезнь трансплантата (ГК-) Corneal graft rejection (HA-)	5	30
Всего Total	14	84

дование в период от 3 до 5 лет после проведенной сквозной кератопластики в терминальной стадии формирования стромального фиброза и васкуляризации в двух и более квадрантах. Критерием включения в исследование являлась стойкая ремиссия воспалительного процесса в течение 3 лет до повторной кератопластики. Все пациенты проходили обследование и лечение в УЗ «3-я городская клиническая больница им. Е.В. Клумова» с 2017 по 2019 г.

Клинико-лабораторное обследование при включении в исследование включало: визометрию, биомикроскопию, тонометрию, тест Ширмера I, LIPCOF-тест, определение времени разрыва слезной пленки, оптическую когерентную томографию переднего отрезка глазного яблока. Все включенные пациенты были разделены на две группы: 1-я группа включала 6 глаз (6 пациентов) и в предоперационном периоде проходила курс лечения с проведением субконъюнктивальных инъекций 1% низкомолекулярного натрия гиалуроната (3 еженедельные инъекции) (ГК+); 2-я группа включала 5 глаз (5 пациен-

тов) и не получала дополнительного лечения с инъекциями натрия гиалуроната (ГК-). Контроль состояния глазной поверхности (биомикроскопия) осуществлялся перед каждой инъекцией. Исследуемые группы были сопоставимы по основным клинико-демографическим критериям.

Повторная сквозная кератопластика проводилась по стандартной методике [9]. Роговичные экспланты направлялись на гистологическое и иммуногистохимическое исследование. В качестве контроля использовались экспланты 3 здоровых донорских роговиц нормально строения (табл. 1).

Гистологическое исследование удаленных дисков роговицы проводилось после окрашивания срезов гематоксилином и эозином. С целью анализа характера экспрессии эпителиальных и стромальных маркеров выполнено ИГХ-исследование с использованием первичных моноклональных антител к люмикану, ФРСТ, окклюдину, белку плотных контактов 1, супероксиддисмутазе 1 (СОД-1). В качестве визуализирующей системы исполь-

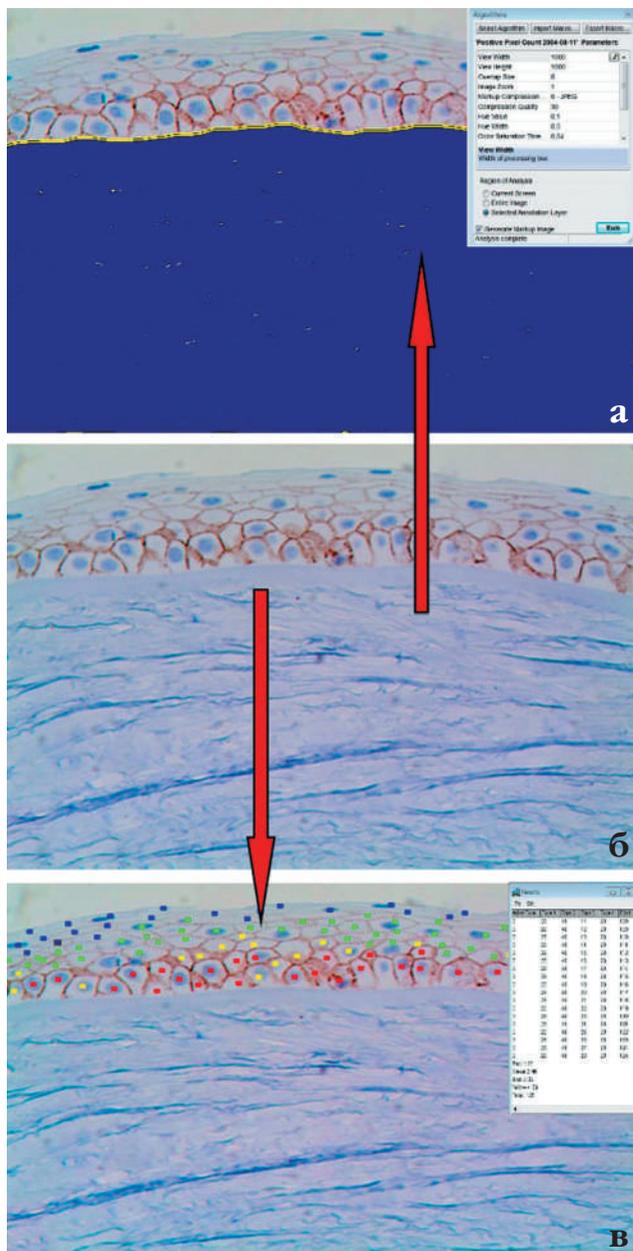


Рис. 2. Методика выявления и анализа экспрессии маркеров в материале роговицы, объектив 40: а) результат работы алгоритма «positive pixel count» программы Aperio Image Scope. Фокальная реакция в кератоцитах и эндотелии в очагах неоангиогенеза (оранжевые поля – умеренная экспрессия, желтые – слабая, синие – отсутствие экспрессии); б) мембранная экспрессия маркера в эпителии роговицы; в) результат работы алгоритма «Cell Counter» программы WCIF ImageJ. Преимущественно слабая реакция (красные точки – выраженная экспрессия, желтые – умеренная, зеленые – слабая, синие – отсутствие экспрессии)

Fig. 2. Method for detecting and analyzing the expression of markers in the material of the cornea, lens 40: a) the result of the positive pixel count algorithm of the Aperio Image Scope program. Focal reaction in keratocytes and endothelium in the foci of neoangiogenesis (red fields – pronounced expression, orange – moderate, yellow – weak, blue – no expression); б) membrane expression of the marker in the material of the cornea; в) the result of the Cell Counter algorithm of the WCIF ImageJ program. Predominantly weak reaction (red dots – pronounced expression, yellow – moderate, green – weak, blue – no expression)

зовали комплекс вторичных антител EnVision фирмы DAKO, в качестве хромогена – диаминобензидин. В качестве позитивного контроля были использованы ткани и органы, рекомендованные производителем, негативный контроль осуществлялся путем исключения первичного антитела.

Для морфометрического анализа выполняли сканирование препаратов с применением цифрового слайд-сканера MoticEasyScan с последующим программным анализом экспрессии маркера в материале ткани роговицы с использованием AperioImageScope v12.4.0.5043 (рис. 2).

Рассчитывали следующие параметры в 6 непересекающихся полях: позитивность экспрессии (коэффициент экспрессии – КЭ) (отношение числа позитивных пикселей к общему числу позитивных и негативных пикселей × 100%), индекс интенсивности экспрессии в иммунопозитивных участках (ИИ) (отношение суммы интенсивностей пикселей с высокой, средней, низкой интенсивностью к числу позитивных пикселей).

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 интервала (ДИ), максимального и минимального значений. Для оценки характера распределения полученных данных использовался критерий Шапиро–Уилка (W). Уровень статистической значимости – 0,05. Сравнение независимых выборок по количественным признакам проводилось с использованием дисперсионного анализа непараметрических данных ANOVA и определением критериев Манна–Уитни (U-критерий) с целью парного сравнения выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты анализа экспрессии маркеров в эпителии роговицы

В эксплантах роговиц с болезнью трансплантата было выявлено снижение КЭ как окклюдина, так и белка плотных контактов 1 с одновременным увеличением ИИ их экспрессии по сравнению с контрольными образцами. После применения в предоперационном периоде 1% низкомолекулярного натрия гиалуроната КЭ маркеров повышались, а ИИ снижались, приближаясь к нормальным значениям. Было выявлено некоторое снижение КЭ и ИИ СОД-1, а также увеличение КЭ и ИИ экспрессии люмикана на фоне терапии с применением ГК (табл. 2).

Результаты анализа экспрессии маркеров в строме роговицы

По сравнению с контрольными эксплантами в строме роговиц с болезнью трансплантата наблюдалось снижение КЭ люмикана, увеличение КЭ ФРСТ. На фоне лечения с применением инъекционной формы 1% низко-

Таблица 2

**Дисперсионный анализ КЭ и ИИ экспрессии молекулярных маркеров
в эпителии роговицы при болезни трансплантата**

Table 2

**Analysis of variance of CE and II expression of molecular markers
in the corneal epithelium in graft disease**

Параметр Parameter	Контроль Control	ГК- HA-	ГК+ HA+
Коэффициент экспрессии люмикана в эпителии,% Lumican expression coefficient in epithelium,%			
Me [МКР] Me [IQR]	97,0 [0,0; 100,0]	49,0 [0,0; 99,0]	97,5 [0,0; 99,0]
Контроль Control		p=0,42	p=0,91
		p=0,63	
Индекс интенсивности экспрессии люмикана в эпителии Lumican expression intensity index in epithelium			
Me [МКР] Me [IQR]	109,52 [83,52; 124,56]	124,66 [101,51; 168,08]	126,81 [101,86; 145,6]
Контроль Control		p=0,09	p=0,6
		p=0,37	
Коэффициент экспрессии окклюдина в эпителии,% Occludin expression coefficient in epithelium,%			
Me [МКР] Me [IQR]	100,0 [79,0; 100,0]	69,0 [48,0; 90,0]	89,5 [80,5; 100,0]
Контроль Control		p=0,12	p=0,37
		p=0,13	
Индекс интенсивности экспрессии окклюдина в эпителии Occludin expression intensity index in epithelium			
Me [МКР] Me [IQR]	137,65 [125,85; 150,96]	194,1 [174,42; 198,03]	163,69 [149,8; 177,27]
Контроль Control		p=0,02*	p=0,03*
		p=0,024*	
Коэффициент экспрессии TJP1 в эпителии,% TJP1 expression coefficient in epithelium,%			
Me [МКР] Me [IQR]	71,5 [69,0; 74,0]	53,0 [45,5; 86,0]	94,0 [80,0; 96,0]
Контроль Control		p=0,6	p=0,6
		p=0,09	
Индекс интенсивности экспрессии TJP1 в эпителии TJP1 expression intensity index in epithelium			
Me [МКР] Me [IQR]	136,6 [133,9; 139,3]	193,01 [145,09; 196,11]	126,98 [118,14; 138,61]
Контроль Control		p=0,67	p=0,067
		p=0,005*	

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (end)

Параметр Parameter	Контроль Control	ГК- HA-	ГК+ HA+
Коэффициент экспрессии СОД-1 в эпителии,% SOD1 expression coefficient in epithelium,%			
Me [МКР] Me [IQR]	100,0 [100,0; 100,0]	100,0 [99,0; 100,0]	98,0 [97,0; 98,0]
Контроль Control		p=0,08	p=0,007*
		p=0,02*	
Индекс интенсивности экспрессии СОД-1 в эпителии SOD1 expression intensity index in epithelium			
Me [МКР] Me [IQR]	56,47 [53,37; 63,95]	119,21 [98,87; 142,51]	102,94 [81,24; 112,71]
Контроль Control		p=0,0034*	p=0,016*
		p=0,32	
Примечание: * – различия достоверны при p<0,05. Note: * – differences are significant at p<0.05.			

молекулярного натрия гиалуроната отмечалась нормализация указанных показателей. Кроме того, на фоне лечения снижались КЭ и ИИ СОД-1 (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного ИГХ-исследования было установлено, что нарушение целостности эпителия роговицы при болезни трансплантата происходит за счет снижения экспрессии белков плотных контактов, а дезорганизация стромы – за счет гиперэкспрессии ФРСТ. Подобное изменение экспрессии маркеров клинически проявляется снижением прозрачности роговицы и отечностью трансплантата. В доступной литературе данные о характере экспрессии биомолекулярных маркеров при болезни трансплантата и дистрофии роговицы нами не обнаружены.

Окклюдин и белок плотных контактов 1 – белки комплекса плотных контактов. При этом окклюдин относится к группе мембранных белков и регулирует межклеточный транспорт малых гидрофильных молекул и нейтрофилов, а белок плотных контактов 1 – к группе цитоплазматических белков, необходимых для соединения с цитоплазматическими актиновыми филаментами [10].

Плотные контакты служат не только регуляторами парациеллюлярной и мембранной проницаемости, но и являются важными сигнальными платформами. Они обеспечивают передачу внутрь клетки сигналов, регулирую-

ющих состояние цитоскелета, экспрессию генов пролиферации и дифференцировки. В частности, белок плотных контактов 1 участвует в процессах транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, клеточной пролиферации, реакции клетки на стресс, способствуя поддержанию целостности межклеточных взаимодействий. Окклюдин, в свою очередь, ингибирует RAF-опосредованную диссоциацию клеточных соединений, взаимодействует с белками, регулирующими сигнальный путь ERK, а также связан с TGF-β1 – опосредованной диссоциацией плотных межклеточных контактов [11]. Снижение экспрессии белков было отмечено при различной роговичной патологии, в частности, при аллергическом конъюнктивите [12] и кератитах бактериальной этиологии [13].

В нашем исследовании было также выявлено снижение экспрессии белков плотных контактов с нормализацией показателей на фоне применения натрия гиалуроната. Стоит отметить отсутствие статистической значимости, что может быть связано с малым объемом выборки.

Люмикан относится к малым протеогликанам с высоким содержанием лейцина, являющимся основными компонентами экстрацеллюлярного матрикса роговицы. Участвуя в организации коллагеновых фибрилл, они обеспечивают прозрачность роговой оболочки. Люмикан также является необходимым компонентом в процессах миграции эпителиальных клеток и регенерации тканей роговицы. В эксперименте на крысах было отме-

Таблица 3

Дисперсионный анализ КЭ и ИИ экспрессии молекулярных маркеров в строме роговицы при болезни трансплантата

Table 3

Analysis of variance of EC and II expression of molecular markers in the corneal stroma in graft disease

Параметр Parameter	Контроль Control	ГК- HA-	ГК+ HA+
Коэффициент экспрессии люмикана в строме,% Lumican expression coefficient in the stroma,%			
Me [МКР] Me [IQR]	95,0 [0,0; 96,0]	48,0 [14,0; 95,0]	91,0 [35,0; 97,0]
Контроль Control		p=0,21	p=0,46
		p=0,03*	
Индекс интенсивности экспрессии люмикана в строме Lumican expression intensity index in the stroma			
Me [МКР] Me [IQR]	110,86 [104,51; 117,74]	167,44 [133,13; 174,8]	147,07 [124,2; 176,48]
Контроль Control		p=0,000016*	p=0,000032*
		p=0,36	
Коэффициент экспрессии ФРСТ в строме,% CTGF expression coefficient in the stroma,%			
Me [МКР] Me [IQR]	17,0 [15,0; 19,0]	98,0 [98,0; 98,5]	28,0 [16,5; 36,0]
Контроль Control		p=0,73	p=0,46
		p=0,06	
Индекс интенсивности экспрессии ФРСТ в строме CTGF expression intensity index in the stroma			
Me [МКР] Me [IQR]	176,96 [163,37; 180,32]	139,64 [102,49; 151,23]	178,25 [167,95; 182,74]
Контроль Control		p=0,13	p=0,63
		p=0,13	
Коэффициент экспрессии СОД-1 в строме,% SOD1 expression coefficient in the stroma,%			
Me [МКР] Me [IQR]	100,0 [100,0; 100,0]	87,5 [56,0; 100,0]	57,0 [54,0; 64,0]
Контроль Control		p=0,099	p=0,005*
		p=0,14	
Индекс интенсивности экспрессии СОД-1 в строме SOD1 expression intensity index in the stroma			
Me [МКР] Me [IQR]	184,91 [182,69; 187,06]	199,58 [195,6; 203,13]	180,86 [173,56; 186,28]
Контроль Control		p=0,078*	p=1,0
		p=0,007*	

Примечание: * – различия достоверны при p<0,05.

Note: * – differences are significant at p<0.05.

чено повышение уровня экспрессии люмикана во время заживления повреждения роговицы [14], в частности, в поздней фазе регенерации (через 1 месяц после повреждения), что способствовало восстановлению прозрачности роговой оболочки в этот период. Примечательно, что экспрессия люмикана в процессе заживления увеличивается также в эпителии роговицы [15]. Исследователями было отмечено снижение экспрессии люмикана в строме роговицы с новообразованными патологическими сосудами [16]. Последние исследования показывают, что малые протеогликаны не только выполняют механическую функцию, но и взаимодействуют с множеством сигнальных путей и таким образом напрямую влияют на процессы регенерации.

Повышение экспрессии люмикана в процессе заживления способствует миграции и адгезии эпителиальных клеток, привлечению нейтрофилов и макрофагов, пролиферации и своевременному апоптозу стромальных кератоцитов. Люмикан, в частности, способен связываться с рецептором TGF- β , снижая его биодоступность, замедляя тем самым процессы фиброобразования [17].

Функции люмикана также могут быть опосредованы взаимодействием с Fas/FasL, TLR4. Биологическую активность проявляют и продукты расщепления люмикана матриксными металлопротеазами [18].

В нашем исследовании было выявлено увеличение коэффициента экспрессии люмикана как в строме, так и в эпителии эксплантов роговиц в случае предоперационного применения 1% низкомолекулярного натрия гиалуроната, что, вероятно, способствовало не только активации процессов регенерации, но и увеличению прозрачности роговицы, регистрировавшемуся клинически. Ранее клинически были доказаны улучшение состояния и глазной поверхности и восстановление прозрачности роговицы за счет активации ремоделирования стромы. Однако в данной группе повышение прозрачности роговицы после курса комплексного лечения с применением субконъюнктивальных инъекций низкомолекулярного 1% натрия гиалуроната было недостаточным для увеличения остроты зрения. Все пациенты имели глубокий стромальный тотальный фиброз трансплантата вследствие длительного воспалительного процесса, что и явилось показанием к повторной кератопластике

Увеличение прозрачности роговицы также могло быть результатом снижения экспрессии ФРСТ в строме роговицы на фоне терапии. ФРСТ играет роль в процессах клеточной адгезии, миграции, пролиферации, ангиогенеза, заживления, а также участвует в патогенезе заболеваний, ассоциированных с фиброзом, и ряда опухолей [19]. Считается, что ФРСТ может взаимодействовать с TGF- β , потенцируя процесс фиброобразования, усиливая продукцию внеклеточного матрикса [20].

Показано, что ФРСТ участвует в патогенезе заболеваний органа зрения за счет модуляции фиброза и неоваскуляризации через увеличение экспрессии матриксных металлопротеаз и фактора роста эндотелия сосудов

(VEGF). В частности, при пролиферативной диабетической ретинопатии повышение экспрессии ФРСТ в дисбалансе с VEGF вызывает переход от неоваскуляризации к фиброзированию [21].

СОД-1 – одна из трех супероксиддисмутаз, ответственных за обезвреживание кислородных радикалов в организме. СОД-1 при наличии кофакторов (меди и цинка) способна превращать супероксидные радикалы в молекулярный кислород и перекись водорода. СОД-1 способна также подавлять апоптоз [22]. Мутации в гене СОД-1 были обнаружены у ряда пациентов с кератоконусом [23].

На фоне терапии было выявлено незначительное уменьшение уровня экспрессии СОД-1, что, вероятно, может свидетельствовать о снижении активности окислительных процессов в тканях роговицы на фоне применения 1% низкомолекулярного натрия гиалуроната.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследование были включены пациенты с большим количеством факторов риска отторжения (повторная кератопластика, васкуляризация, наличие кератита различной этиологии в анамнезе, наличие псевдофакичной буллезной кератопатии на фоне длительной воспалительной реакции). И даже в этой сложной группе ИГХ-исследование демонстрирует эффективность низкомолекулярного натрия гиалуроната: снижение экспрессии маркеров воспаления и восстановление экспрессии маркеров фиброобразования до значений, близких к таковым в контрольной группе.

Полученные нами ИГХ-доказательства эффективности натрия гиалуроната у пациентов с болезнью трансплантата позволяют включать его в курс комплексного лечения как с целью улучшения состояния глазной поверхности и активации регенеративных процессов при подготовке к оперативному лечению, так и с целью улучшения результатов повторной кератопластики.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Труфанов С.В., Суббот А.М., Маложен С.А., Крахмалева Д.А., Саловарова Е.П. Реакция тканевой несовместимости после трансплантации роговицы. *Офтальмология*. 2017;14(3): 180–187. [Trufanov SV, Subbot AM, Malozhen SA, Krakhmaleva DA, Salovarova EP. Corneal graft rejection after keratoplasty. *Ophthalmology in Russia*. 2017;14(3): 180–187. (In Russ.)] doi: 10.18008/1816-5095-2017-3-180-187
2. Banerjee S, Dick AD. Recent developments in the pharmacological treatment and prevention of corneal graft rejection. *Expert Opin Investig Drugs*. 2003;12(1): 29–37. doi: 10.1517/13543784.12.1.29
3. Panda A, Vanathi M, Kumar A, Dash Y, Priya S. Corneal graft rejection. *Surv Ophthalmol*. 2007;52(4): 375–396. doi: 10.1016/j.survophthal.2007.04.008
4. Милудин Е.С., Золотарев А.В., Милудин А.Е. Возможности местной иммуносупрессии при повторной кератопластике. *Клиническая офтальмология*. 2014;15(3): 160–164. [Milyudin ES, Zolotarev AV, Milyudin AE. Possibilities of local immunosuppression in repeated keratoplasty. *Clinical ophthalmology*. 2014;15(3): 160–164. (In Russ.)]
5. Armitage WJ, Goodchild C, Griffin MD, Gunn DJ, Hjortdal J, Lohan P, Murphy CC, Pleyer U, Ritter T, Tole DM, Vabres B. High-risk corneal transplantation: recent developments and future possibilities. *Transplantation*. 2019;103(12): 2468–2478. doi: 10.1097/TP.0000000000002938
6. Birnbaum F, Mayweg S, Reis A, Böhringer D, Seitz B, Engelmann K, Messner EM, Reinhard T. Mycophenolate mofetil (MMF) following penetrating high-risk

keratoplasty: long-term results of a prospective, randomised, multicentre study. *Eye (Lond)*. 2009;23(11):2063–2070. doi: 10.1038/eye.2008.402

7. Nykopp TK, Rilla K, Tammi MI, Tammi RH, Sironen R, Hämäläinen K, et al. Hyaluronan synthases (HAS1-3) and hyaluronidases (HYAL1-2) in the accumulation of hyaluronan in endometrioid endometrial carcinoma. *BMC Cancer*. 2010;10: 512. doi: 10.1186/1471-2407-10-512

8. Семак Г.Р., Людчик А.В., Жерко И.Ю. Новый подход к лечению хронических дистрофических заболеваний роговицы. Доклады Академии наук. 2018;62(6). [Semak G, Ludchik A, Zherka I. New approach to chronic dystrophic corneal diseases treatment. *Doklady of the National Academy of sciences of Belarus*. 2018;62(6). doi: 10.29235/1561-8323-2018-62-6-719-724

9. Keane M, Coster D, Ziaei M, Williams K. Deep anterior lamellar keratoplasty versus penetrating keratoplasty for treating keratoconus. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;7: CD009700. doi: 10.1002/14651858.CD009700.pub2

10. Anderson JM, Van Itallie CM. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(2):a002584. doi: 10.1101/cshperspect.a002584

11. Zihni C, Mills C, Matter K, et al. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17: 564–580. doi: 10.1038/nrm.2016.80

12. Hu J, Gao N, Zhang Y, et al. IL-33/ST2/IL-9/IL-9R signaling disrupts ocular surface barrier in allergic inflammation. *Mucosal Immunol*. 2020;13(6): 919–930. doi:10.1038/s41385-020-0288-4

13. Yi X, Wang Y, Yu FS. Corneal epithelial tight junctions and their response to lipopolysaccharide challenge. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000 Dec;41(13):4093–4100.

14. Yamamoto T, Otake H, Hiramatsu N, Yamamoto N, Taga A, Nagai N. A proteomic approach for understanding the mechanisms of delayed corneal wound healing in diabetic keratopathy using diabetic model rat. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11): 3635. doi: 10.3390/ijms19113635

15. Lorenzo-Martín E, Gallego-Muñoz P, Mar S, Fernández I, Cidrad P, Martínez-García MC. Dynamic changes of the extracellular matrix during corneal wound healing. *Exp Eye Res*. 2019;186: 107704. doi: 10.1016/j.exer.2019.107704

16. Barbariga M, Vallone F, Mosca E, Bignami F, Magagnotti C, Fonteyne P, Chiappori F, Milanese L, Rama P, Andolfo A, Ferrari G. The role of extracellular matrix in mouse and human corneal neovascularization. *Sci Rep*. 2019;9(1): 14272. doi: 10.1038/s41598-019-50718-8

17. Frikeche J, Maiti G, Chakravarti S. Small leucine-rich repeat proteoglycans in corneal inflammation and wound healing. *Exp Eye Res*. 2016;151: 142–149. doi: 10.1016/j.exer.2016.08.015

18. Puri S, Coulson-Thomas YM, Gesteira TF, Coulson-Thomas VJ. Distribution and function of glycosaminoglycans and proteoglycans in the development, homeostasis and pathology of the ocular surface. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8: 731. doi: 10.3389/fcell.2020.00731

19. Jun JI, Lau LF. Taking aim at the extracellular matrix: CCN proteins as emerging therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(12):945–963. doi: 10.1038/nrd3599

20. Sonnylal S, Shi-Wen X, Leoni P, et al. Selective expression of connective tissue growth factor in fibroblasts in vivo promotes systemic tissue fibrosis. *Arthritis Rheum*. 2010;62(5): 1523–1532. doi: 10.1002/art.27382

21. Ramazani Y, Knops N, Elmonem MA, Nguyen TQ, Arcolino FO, van den Heuvel L, Levchenko E, Kuypers D, Goldschmeding R. Connective tissue growth factor (CTGF) from basics to clinics. *Matrix Biol*. 2018;68/69: 44–66. doi: 10.1016/j.matbio.2018.03.007

22. Milani P, Gagliardi S, Cova E, Cereda C. SOD1 Transcriptional and posttranscriptional regulation and its potential implications in ALS. *Neurol Res Int*. 2011;2011: 458427. doi: 10.1155/2011/458427

23. Loukovitis E, Kozeis N, Gatzoufas Z, et al. The Proteins of Keratoconus: a Literature Review Exploring Their Contribution to the Pathophysiology of the Disease. *Adv Ther*. 2019;36(9): 2205–2222. doi: 10.1007/s12325-019-01026-0

Информация об авторах

Галина Романовна Семак, доцент кафедры глазных болезней Белорусского государственного медицинского университета, semakgalina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8505-8273>

Татьяна Анатольевна Летковская, зав. кафедрой патологической анатомии Белорусского государственного медицинского университета, taletkovskaya@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9381-2985>

Виктория Алексеевна Захарова, врач-патологоанатом Республиканского научно-практического центра онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, zakharava.vikt@gmail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2050-9800>

Ирина Юрьевна Жерко, врач-офтальмолог Республиканского научно-практического центра онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, zherko.irina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5134-3666>

Information about the authors

Galina R. Semak, Associate Professor of the Department of Eye Diseases of the Belarusian State Medical University, semakgalina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8505-8273>

Tat'yana A. Letkovskaya, Head of the Department of Pathological Anatomy of the Belarusian State Medical University, taletkovskaya@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9381-2985>

Viktoriya A. Zakharava, pathologist of the Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology named after N.N. Alexandrov, zakharava.vikt@gmail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2050-9800>

Irina Yu. Zherko, ophthalmologist of the Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology named after N.N. Alexandrov, zherko.irina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5134-3666>

Вклад авторов в работу:

Г.Р. Семак: существенный вклад в концепцию и дизайн работы, сбор, анализ и обработка материала, написание текста, редактирование, окончательное утверждение версии, подлежащей публикации.

Т.А. Летковская: существенный вклад в концепцию и дизайн работы, сбор, анализ и обработка материала, редактирование, окончательное утверждение версии, подлежащей публикации.

В.А. Захарова: сбор, анализ и обработка материала, статистическая обработка данных, окончательное утверждение версии, подлежащей публикации.

И.Ю. Жерко: сбор, анализ и обработка материала, статистическая обработка данных, написание текста, окончательное утверждение версии, подлежащей публикации.

Authors' contribution:

G.R. Semak: significant contribution to the concept and design of the work, collection, analysis and processing of material, writing the text, editing, final approval of the version to be published.

T.A. Letkovskaya: significant contribution to the concept and design of the work, collection, analysis and processing of material, editing, final approval of the version to be published.

V.A. Zakharava: collection, analysis and processing of material, statistical data processing, final approval of the version to be published.

I.Yu. Zherko: collection, analysis and processing of material, statistical data processing, writing the text, final approval of the version to be published.

Финансирование: Авторы не получали конкретный грант на это исследование от какого-либо финансирующего агентства в государственном, коммерческом и некоммерческом секторах.

Согласие пациента на публикацию: Письменного согласия на публикацию этого материала получено не было. Он не содержит никакой личной идентифицирующей информации.

Конфликт интересов: Отсутствует.

Funding: The authors have not declared a specific grant for this research from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors.

Patient consent for publication: No written consent was obtained for the publication of this material. It does not contain any personally identifying information.

Conflict of interest: There is no conflict of interest.

Поступила: 09.02.2022

Переработана: 18.03.2022

Принята к печати: 25.04.2022

Originally received: 09.02.2022

Final revision: 18.03.2022

Accepted: 25.04.2022