

DOI: <https://doi.org/10.25276/2410-1257-2021-2-63-67>

Результаты экспериментального исследования гидрогелевого дренажа, содержащего ранибизумаб при антиглаукомных операциях

И.И. Хуснитдинов

ГБУ «Уфимский НИИ глазных болезней АН РБ», Уфа

РЕФЕРАТ

Цель. Экспериментальное обоснование эффективности биосовместимых биodeградируемых гидрогелей на основе гиалуроновой кислоты и сукцината хитозана в качестве носителя ранибизумаба при антиглаукомных операциях.

Материал и методы. Гидрогелевый дренаж (ГД) получали непосредственно перед операцией. Для этого раствор лекарственного препарата ранибизумаба (0,23 мл) смешивали с раствором диальдегида гиалуроновой кислоты (0,5 мл), затем добавляли раствор сукцината хитозана (0,5 мл). Экспериментальные исследования проведены на 12 (12 глаз) здоровых кроликах. Первую группу составили 6 глаз – 0,187 мл ранибизумаба на 1 мл геля. В контрольной группе интраоперационно применялся ГД без добавле-

ния ранибизумаба (6 глаз). Морфологические исследования проводили на 7, 21 и 42 сутки.

Результаты. При экспериментальных исследованиях в условиях *in vitro* и *in vivo* доказано, что ранибизумаб, введенный в составе 0,1 мл гидрогелевого дренажа в зону антиглаукомной операции, высвобождается в течение 3 недель и подавляет васкуляризацию, рубцевание операционной зоны, сохраняет интрасклеральную полость. Подобрана оптимальная концентрация ранибизумаба – 0,02 мл в 0,1 мл геля.

Заключение. Доказана безопасность и эффективность применения гидрогелевого дренажа с ранибизумабом на основе диальдегида гиалуроновой кислоты и сукцината хитозана при антиглаукомных операциях.

Ключевые слова: экспериментальное исследование, гидрогелевый дренаж, ранибизумаб, антиглаукомные операции. ■

Точка зрения. Восток – Запад. 2021;2:63–67.

ABSTRACT

Results of an experimental study of hydrogel drainage containing ranibizumab in antiglaucoma operations

I.I. Khusnitdinov

Ufa Eye Research Institute, Ufa

Purpose. Experimental substantiation of the effectiveness of biocompatible biodegradable hydrogels based on hyaluronic acid and chitosan succinate as a carrier of ranibizumab in antiglaucoma operations.

Material and methods. Hydrogel drainage (HD) was obtained immediately before surgery. A solution of ranibizumab (0.23 ml) was mixed with a solution of hyaluronic acid dialdehyde (0.5 ml), then a solution of chitosan succinate (0.5 ml) was added. Experimental studies were performed in 12 (12 eyes) healthy rabbits. The first group consisted of 6 eyes – 0.187 ml of ranibizumab per 1 ml of gel. In the control group, HD was used intraoperatively without the addition of ranibizumab (6 eyes). Morphological studies were performed on 7th, 21st, and 42nd days.

Results. In experimental studies *in vitro* and *in vivo*, it was proved that ranibizumab, administered as a part of 0.1 ml of hydrogel drainage in the antiglaucoma surgery area is released within 3 weeks and suppresses vascularization, scarring of the operating area, and preserves the intrascleral cavity. The optimal concentration of ranibizumab was selected-0.02 ml in 0.1 ml of gel.

Conclusion. The safety and effectiveness of the use of hydrogel drainage with ranibizumab based on hyaluronic acid dialdehyde and chitosan succinate in anti-glaucoma operations has been proven.

Key words: experimental research, hydrogel drainage, ranibizumab, glaucoma surgery. ■

Point of View. East – West. 2021;2:63–67.

Как известно, в ряде случаев (15-20%) при глаукоме медикаментозная терапия становится неэффективной и приходится прибегать к хирургическому лечению. Последнее актуально как для первичной, но особенно для рефрактерной глаукомы (РГ) при лечении которой помимо фистулизиру-

ющих операций, активно используются антиметаболиты и дренажная хирургия [1-5]. Эффективность классических фистулизирующих операций при РГ в отдаленные сроки невысока – 30-60% [6]. Известно, что вокруг имплантатов формируется соединительнотканная капсула, которая в свою очередь снижает гипо-

тензивный эффект антиглаукомной операции [7, 8].

В последние годы внимание исследователей привлекает VEGF (Vascular endothelial growth factor), который оказывает сосудистое и цитостатическое действие, избирательно влияя на эндотелиальные сосудистые клетки, миграцию макрофагов

и пролиферацию фибробластов [8]. При использовании в хирургии глаукомы он способствует формированию диффузной и менее васкулярной фильтрационной подушки [9, 10]. Гидрогели – одна из препаративных форм, обеспечивающая пролонгированное действие лекарственного препарата, в настоящее время широко используются в медицине [11].

ЦЕЛЬ

Экспериментальное обоснование эффективности биосовместимых биодеградируемых гидрогелей на основе гиалуроновой кислоты и сукцината хитозана в качестве носителя ранибизумаба при антиглаукомных операциях.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовались: гиалуроновая кислота (ММ=16x105), полученная с помощью *Streptococcus equi*, производства «Sigma Aldrich» (Германия), хитозан (ММ=1,5x105), полученный из краба дальневосточного, производства «Химмед» (Россия), марки «ч», «Луцентис» (ранибизумаб) производства «Novartis» (Швейцария), фосфатный буфер (рН=7,4). Гидрогелевый дренаж (ГД) получали непосредственно перед операцией. Для этого раствор лекарственного препарата ранибизумаба (0,23 мл) смешивали с раствором диальдегида гиалуроновой кислоты (0,5 мл), затем добавляли раствор сукцината хитозана (0,5 мл). Гидрогелевая лекарственная форма формировалась в течение минуты при комнатной температуре [5]. Содержание лекарственного препарата в гидрогеле составляло 0,187–0,200 мл на 1 мл геля (патент РФ на изобретение №2610368 от 26.10.15 г.).

При разработке лекарственной формы в виде гелей важным показателем является скорость выделения фармпрепарата из геля, что моделируется его диффузией в физиологический раствор. Кинетику высвобождения лекарственного препарата исследовали методом флуоресцентной спектроскопии на спектрофлуориметре «СМ-2203» с использованием кварцевой кюветы толщиной 5

мм при фотовозбуждении под углом 35°. Фотовозбуждение проводили при длине волны (λ_{ex}) 270 нм. Записывали спектры флуоресценции (ФЛ) в интервале длин волн эмиссии (λ_{em}) 300–500 нм. Спектры поглощения диальдегида гиалуроновой кислоты (ДГК) и ранибизумаба записывали с помощью «Shimadzu UV-3100».

Для определения степени диффузии лекарственного препарата из ГД в физиологический раствор во времени использовали модельный опыт, в котором ГД в диализном мешочке помещали в бюкс при температуре $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (310 К). Через определенные промежутки времени фиксировали кинетику изменения ФЛ ранибизумаба в физиологическом растворе. С помощью предварительно построенной калибровочной кривой находили количество лекарственного препарата, выделившегося к моменту времени t : $Q = Q_s / Q_0 \cdot 100\%$, где Q_0 и Q_s – количество ранибизумаба (мл), введенного в гель и выделившегося к моменту времени t .

Экспериментальные исследования проведены на 12 (12 глаз) здоровых кроликах породы «Шиншилла» примерно одного возраста и веса (2500–3000 г). Алгоритм эксперимента одобрен локальным этическим комитетом ГБУ «Уфимский НИИ глазных болезней». В эксперименте на модели непроникающей глубокой склерэктомии (НГСЭ) с микроперфорацией тестировался ГД с ранибизумабом. Животные были разделены на две опытные группы. Первую группу составили 6 глаз – 0,187 мл ранибизумаба на 1 мл геля. Разовая доза ГД составила 0,1 мл. В контрольной группе интраоперационно применялся ГД без добавления ранибизумаба (6 глаз). Для изучения динамики морфологических изменений, животных выводили из опыта на 7, 21 и 42 сутки после операции передозировкой кетамина и силасина. Гистологические препараты окрашивали гематоксилин-эозином.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При разработке лекарственной дренажной формы важным показателем является скорость высвобождения лекарственного препарата. Ниже на *рисунке 1* представлены результаты флуоресцентной спектроскопии гидрогелевого дренажа.

На *рис. 1А* (спектр 1) приведен спектр ФЛ гидрогеля, содержащего ранибизумаб, с перегибами в области 340 и 400 нм. По результатам покомпонентного разложения с помощью программы анализа нелинейных графиков Origin 8 спектра 1, данным перегибам соответствуют максимумы ФЛ (λ_{max}) при 336 нм и 398 нм (спектры 2, 3).

Для отнесения максимумов ФЛ к компонентам гидрогеля, содержащего ранибизумаб, были зарегистрированы их индивидуальные спектры люминесценции. На *рис. Б* приведены спектры ФЛ растворов ранибизумаба ($\lambda_{max}=336$ нм), ДГК ($\lambda_{max}=328$ нм, 438 нм), а также гидрогеля ($\lambda_{max}=396$ нм).

Ранибизумаб содержит в своем составе белки, и его спектр ФЛ (*рис. 1 Б*, спектр 1) с максимумом при 336 нм расположен в характерной области эмиссии триптофановой компоненты в составе белков [10, 11]. Флуоресценция сукцината хитозана (СХ) в водных растворах не наблюдается. В то же время в растворе ДГК, содержащей в своем составе карбонильные группы, регистрируется спектр ФЛ с максимумами при 328 нм и 438 нм (*рис. 1 Б*, спектр 2).

В гидрогеле в отсутствие ранибизумаба наблюдается ФЛ (*рис. 1Б*, спектр 3) с максимумом при 396 нм, которая может быть отнесена к излучению сополимера, формирующегося за счет поперечного сшивания макромолекул ДГК и сукцината хитозана. При сравнении спектров 2 и 3 на *рисунке 1 Б* также можно отметить отсутствие в гидрогеле максимума ФЛ при 438 нм, соответствующего излучению карбонильных групп в модифицированной гиалуроновой кислоте. На основании этого факта можно предположить, что карбонильные группы также участвуют в процессе формирования поперечных связей гидрогеля.

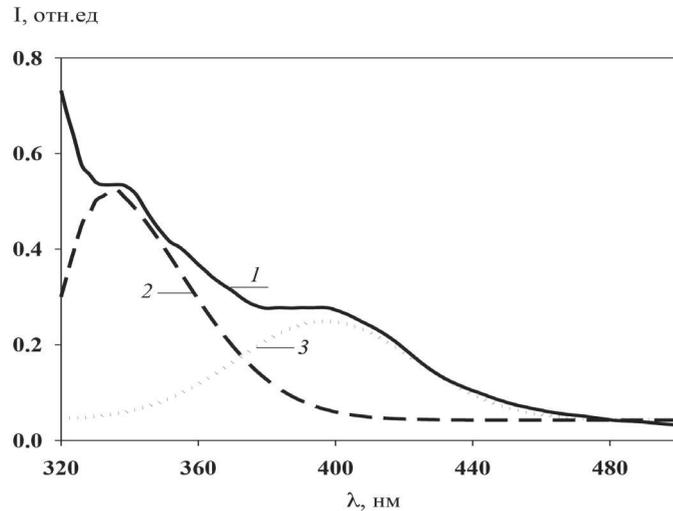
Таким образом, наличие ФЛ ранибизумаба позволяет исследовать спектрально-люминесцентным методом его диффузию из гидрогеля в физиологический раствор, моделирующую процессы, протекающие

щие в зоне антиглаукомной операции, что представляет практический интерес для клинической офтальмологии. Интенсивность ФЛ ($I_{\text{фл}}$) примесных белков в ДГК, в малых количествах, выделяющихся из гидрогеля, на порядки ниже $I_{\text{фл}}$ ранибизумаба и не влияет на точность данных кинетики диффузии лекарственно-го препарата в раствор.

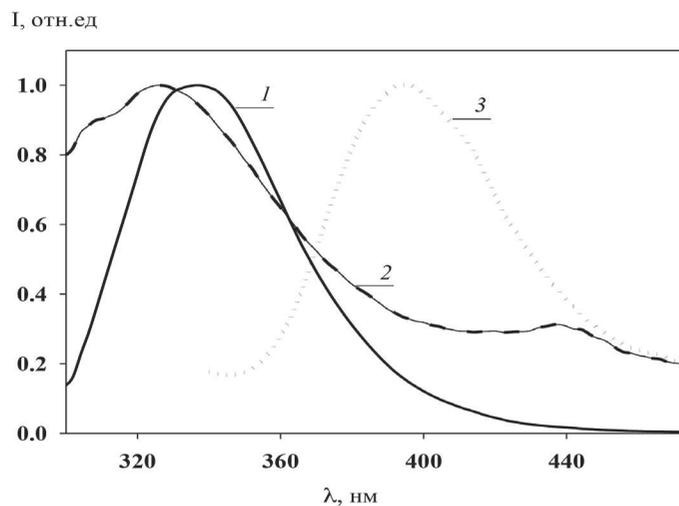
На рис. 1В представлена зависимость интенсивности ФЛ ранибизумаба ($\lambda_{\text{max}}=336$ нм) от времени при его диффузии из гидрогеля в физиологический раствор при 310 К. Из концентрационной зависимости интенсивности люминесценции ранибизумаба (рис. 1В, зависимость 2) можно определить его содержание в физиологическом растворе в момент времени t . Как следует из данных, представленных на рис. 1В, наиболее интенсивное высвобождение ранибизумаба из гидрогеля в физиологический раствор регистрируется в первые 1,5 часа. В дальнейшем при существенном снижении скорости диффузии мы наблюдали его выделение из гидрогеля в физиологический раствор в течение 25 ч., что демонстрирует высокое пролонгирующее действие биополимера. Через 25 ч. концентрация ранибизумаба в физиологическом растворе равна 0,11 мг/мл, что соответствует 30% его высвобождения из гидрогеля. Оставшееся количество ранибизумаба в дальнейшем выделяется постепенно по мере смещения равновесия в системе и тем самым пролонгирует его эффект.

Результаты офтальмологического исследования. На следующий день после операции во всех группах животных наблюдалась сходная клиническая картина. Биомикроскопия: глаз раздражен, швы на конъюнктиве чистые, края раны адаптированы, фильтрационная подушка выраженная, роговица прозрачная, передняя камера уменьшена, зрачок сужен, на свет реагирует. Рефлекс с глазного дна розовый. Внутриглазное давление пальпаторно – гипотония.

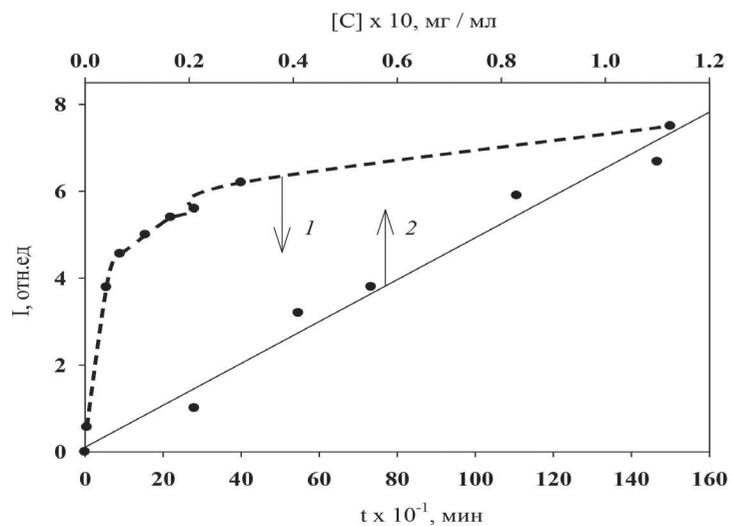
На 7 сутки. Биомикроскопия: края раны адаптированы, на швах конъюнктивы небольшое слизистое отделяемое, фильтрационная подушка разлитая, роговица прозрачная, передняя камера средней глубины. Зрачок сужен. Рефлекс с глазного



а



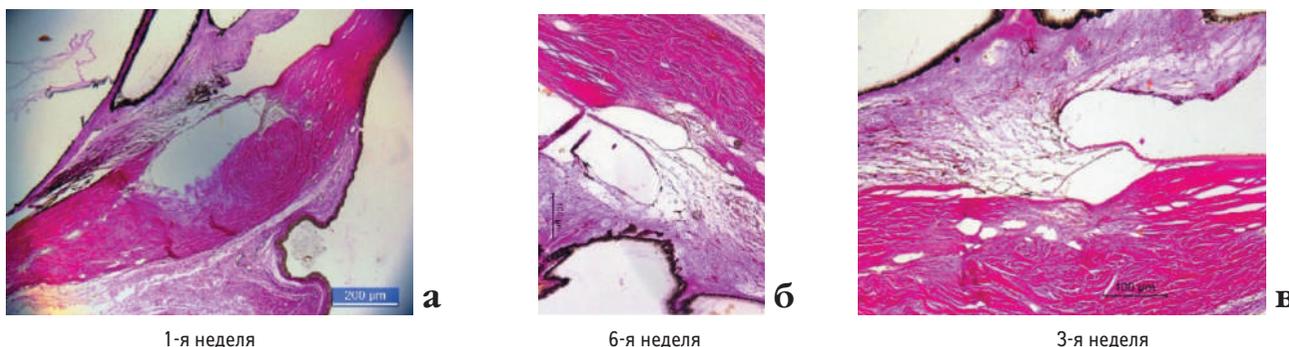
б



в

Рис. 1. Результаты флуоресцентной спектроскопии гидрогелевого дренажа на спектрофлуориметре «СМ-2203»: а) 1 – спектр ФЛ гидрогеля, содержащего ранибизумаб ($\lambda_{\text{ex}}=270$ нм, 0,9% NaCl, T=293 К). 2, 3 – результаты покомпонентного разложения спектра; б) нормированные спектры ФЛ: 1 – ранибизумаб, 2 – ДГК, 3 – гидрогель ($\lambda_{\text{ex}}=270$ нм, 0,9% NaCl, 293 К); в) 1 – зависимость интенсивности ФЛ ранибизумаба ($c=0,37$ мг/мл, $\lambda_{\text{max}}=336$ нм) от времени при его диффузии из гидрогеля в физиологический раствор; 2 – концентрационная зависимость интенсивности ФЛ ранибизумаба ($\lambda_{\text{ex}}=270$ нм, 0,9% NaCl, T=310 К)

Группа 1 (модель НГСЭ + гидрогелевый дренаж с ранибизумабом, разовая доза геля 0,1 мл содержит 0,02 мл препарата)

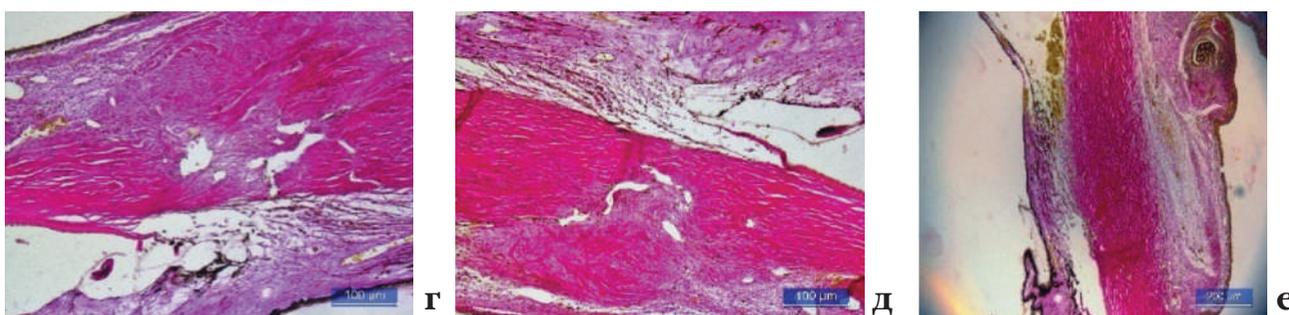


1-я неделя

3-я неделя

6-я неделя

Контрольная группа (модель НГСЭ + гидрогелевый дренаж без ранибизумаба)



1-я неделя

3-я неделя

6-я неделя

Рис. 2. Гистологические исследования зоны операции после моделирования НГСЭ в глазах кроликов. Окраска гематоксилин и эозин, ув. x100 и x200

го дна розовый. Внутриглазное давление – пальпаторно в норме. В 1-й группе фильтрационная подушка стала аваскулярной.

На 21-е и 42-е сутки после операции. Глаз спокоен, края раны адаптированы, фильтрационная подушка плоская, роговица прозрачная, передняя камера средней глубины. Радужка с четким рельефом. Зрачок сужен, рефлекс с глазного дна розовый. В группе 1-я зона антиглаукомной операции сохраняется аваскулярной.

Результаты гистологического исследования. Анализ гистологических исследований операционной зоны экспериментальных животных I группы спустя 7 суток после моделирования НГСЭ и имплантации ГД с ранибизумабом установил на срезах в толще склеры интрасклеральную полость (ИСП) с рыхлыми и неровными стенками. Вокруг – неравномерно расположенные коллагеновые волокна, межзоточный отек (рис. 2А).

Спустя 3 недели при морфологических исследованиях зоны операции ИСП сохраняется. В области ресничного тела интрасклерально визуализируются небольшие полости с тонкими стенками. Окружающая волокнистая ткань с признаками умеренного разрыхления, слабо выраженного коллагеногенеза. Окружающие ткани – без признаков токсического поражения (рис. 2Б).

Через 6 недель эксперимента в толще склеры определяются единичные полости, ограниченные волокнистой тканью. В окружающих области операции структурах выявляется умеренный отек с разволокнением коллагеновых структур. Однако просматривается ИСП, что свидетельствует о сохранности оттока ВГЖ (рис. 2В).

В результате гистологического исследования срезов операционной зоны контрольной группы на 7-е сутки после операции интрасклерально обнаружены полости с неровными стенками, ограничен-

ные плотной волокнистой тканью. В окружающей полости ткани склеры определяется выраженный коллагеногенез. Единичные сосуды с признаками кровенаполнения (рис. 2Г).

Через 3 недели в толще склеры определяются поля усиленного коллагеногенеза, единичные небольшие полости в области оперативного вмешательства. Объем полостей значительно уменьшился. По сравнению с 1-й группой исследования отмечается отсутствие сформированной ИСП, что свидетельствовало о ее рубцевании (рис. 2Д).

На 6-й неделе при исследовании среза склеры в области ресничного тела установлено очаговое утолщение за счет полей разрастания соединительной ткани и отложения коллагена. Сосуды эписклеры были спокойными, без признаков реактивных или застойных явлений. В конъюнктиве визуализируется шовный материал с признаками воспаления, что характерно для любой операционной раны (рис. 2Е).

При исследовании гистологических снимков глаз контрольной группы мы не обнаружили объективных признаков токсического влияния ГД на окружающие ткани, однако отмечается тенденция к усиленной пролиферации соединительной ткани в ответ на операционную травму.

Применение ГД с ранибизумабом (0,02 мл/мл) позволяет снизить офтальмотонус путем снижения пролиферации соединительной ткани в зоне операции благодаря пролонгированному высвобождению препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При экспериментальных исследованиях в условиях *in vitro* и *in vivo* доказано, что ранибизумаб, введенный в составе 0,1 мл гидрогелевого дренажа в зону антиглаукомной операции, высвобождается в течение 3 недель и подавляет васкуляризацию, рубцевание операционной зоны, со-

храняет интрасклеральную полость. Подобрана оптимальная концентрация ранибизумаба – 0,02 мл в 0,1 мл геля.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бикбов М.М., Хуснитдинов И.И. Анализ гипотензивного эффекта имплантации клапана Ahmed при рефрактерной глаукоме. Национальный журнал Глаукома. 2016; 3(15): 24-33.
2. Бикбов М.М., Хуснитдинов И.И. Послеоперационные осложнения имплантации клапана Ahmed. Клиническая офтальмология. 2016; 2: 103-107.
3. Бикбов М.М., Хуснитдинов И.И., Зайдуллин И.С., Вильданова Р.Р., Сигаева Н.Н. Доставка митомицина с и пролонгирование его действия при использовании новейших гидрогелей на основе гиалуроновой кислоты и сукцината хитозана в антиглаукомных операциях. Молекулярная медицина. 2017. Т. 15. № 1. С. 28-32.
4. Бикбов М.М., Хуснитдинов И.И. Отдаленные клинико-функциональные результаты хирургического лечения неоваскулярной глаукомы с применением дренажа «Глаутекс» и клапана Ahmed. Офтальмология. 2017. Т. 14. № 1. С. 47-52.
5. Глаукома. Национальное руководство. / Под ред. Е.А. Егорова. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013. 824 с.
6. Cheng A.C., Yuen K.S., Lai J.S. The Ahmed glaucoma valve in refractory glaucoma: experiences in Indian eyes. Eye. 2006; 7(20): 848-849.
7. Вильданова Р.Р., Сигаева Н.Н., Куковинец О.С., Володина В.П. и др. Модификация гиалуроновой кислоты и хитозана с целью создания гидрогелей для офтальмологии. Журнал прикладной химии. 2014; 10(87): 1500-1511.
8. Landers J. Avastin in glaucoma surgery. Clinical and Experimental Ophthalmol. 2012; 8(40): 769-770.
9. Chua B.E., Nguyen D.Q., Qin Q., Ruddle J.B. et al. Bleb vascularity following post-trabeculectomy subconjunctival bevacizumab: a pilot study. Clinical and Experimental Ophthalmol. 2012; 8(40): 773-779.
10. Kahook M.Y. Bleb morphology and vascularity after trabeculectomy with intravitreal ranibizumab: a pilot study. Am. J. Ophthalmol. 2010; 3(150): 399-403.
11. Хабаров В.Н. Гиалуроновая кислота: получение, свойства, применение в биологии и медицине. М., 2012. 224 с.
12. Демченко А.П. Люминесценция и динамика структуры белков. Киев, 1988. 280 с.
13. Пермяков Е.А. Метод собственной люминесценции белка. М.: Наука; 2003. 189 с.



УФИМСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЛАЗНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Приглашаем врачей-офтальмологов на обучение в аспирантуре по специальности 31.06.01 – Клиническая медицина



450008, г. Уфа, ул. Пушкина, 90 тел. +7 (347) 272-33-61 e-mail: obrotel@yandex.ru www.ufaeyeinstitute.ru