



## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ CLINICAL TRIALS

Научная статья  
УДК 616-092.4:617.7  
DOI: <https://doi.org/10.25276/2410-1257-2022-3-29-32>

### Влияние интравитреального введения эпидермального фактора роста на морфофункциональное состояние глаза кролика

М.М. Бикбов, Т.А. Халимов

Уфимский НИИ глазных болезней, г. Уфа

#### РЕФЕРАТ

**Цель.** Изучить морфофункциональное состояние глаза кролика при интравитреальном введении эпидермального фактора роста. **Материал и методы.** В эксперименте на кроликах проведено интравитреальное курсовое введение препарата Эберпрот-П, содержащего рекомбинантный эпидермальный фактор роста (EGF), в дозе 100 нг. Через 7 и 30 дней после каждой инъекции проводили биомикроскопию и офтальмоскопию глаза, оптическую когерентную томографию (ОКТ) глазного дна *in vivo*. Морфологические исследования выполняли по общепринятой методике с окрашиванием гистопрепаратов гематоксилином и эозином. Производили оценку плотности клеток ганглиозного слоя, внутреннего и наружного ядерного слоев сетчатки. Для статистического анализа использовали программное обеспечение SPSS для Windows. **Результаты.** Биомикроскопические и офтальмоскопические исследования интраокулярных структур опытных глаз после интравитреальной инъекции не выявили признаков отека или внутриглазного воспаления, явлений токсического или раздражающего действия. Не было обнаружено патологических изменений в виде катаракты, феномена Тиндаля во влаге передней камеры, помутнений стекловидного тела, инфильтратов сетчатки. По данным ОКТ, толщина сетчатки осталась без изменений:  $158 \pm 5$  мкм против контроля  $158 \pm 3$  мкм ( $p = 1.0$ ), не обнаружено эффектов ретиального сморщивания. Морфологическая картина интраокулярных тканей глаза после интравитреальной инъекции характеризовалась отсутствием каких-либо патологических изменений в архитектонике слоев и клеточных структур сетчатой оболочки. Гистоморфометрический анализ продемонстрировал отсутствие разницы в плотности клеток ганглиозного слоя, внутреннего и наружного ядерных слоев сетчатки опытного и контрольного глаз животных. **Заключение.** Интравитреальное применение EGF у кроликов не вызывает внутриглазного специфического воспаления или каких-либо деструктивных эффектов в сетчатке, что указывает на потенциальную возможность его клинического применения для лечения дистрофических ретиальных заболеваний.

**Ключевые слова:** эпидермальный фактор роста, сетчатка глаза, интравитреальная инъекция, морфология, гистоморфометрия

**Для цитирования:** Бикбов М.М., Халимов А.Р. Влияние интравитреального введения эпидермального фактора роста на морфофункциональное состояние глаза кролика. Точка зрения. Восток – Запад. 2022;3:29–32. <https://doi.org/10.25276/2410-1257-2022-3-29-32>

**Автор, ответственный за переписку:** Халимов Тимур Азатович, [khalimoff.timur@yandex.ru](mailto:khalimoff.timur@yandex.ru)

Original article

### Effects of intravitreal administration of epidermal growth factor on the morphofunctional state of the rabbit eye

M.M. Bikbov, T.A. Khalimov

Ufa Eye Research Institute, Ufa

#### ABSTRACT

**Purpose.** To study the morphofunctional state of the rabbit eye after intravitreal injection of epidermal growth factor. **Material and methods.** In an experiment on rabbits, intravitreal course administration of Eberprot-P containing recombinant epidermal growth factor (EGF) at a dose of 100 ng was carried out. 7 and 30 days after each injection, biomicroscopy and ophthalmoscopy of the eye, optical coherence tomography (OCT) of the fundus *in vivo* were performed. Morphological studies were performed according to the generally accepted method with staining of histological preparations with hematoxylin and eosin. The cell density of the ganglionic layer, the inner and outer nuclear layers of the retina was assessed. SPSS software for Windows was used for statistical analysis. **Results.** Biomicroscopic and ophthalmoscopic studies of the intraocular structures of the experimental eyes did not reveal signs of edema or intraocular inflammation, toxic or irritant effects of intravitreal injection. There were no pathological changes in the form of cataracts, Tyndall's phenomenon in the anterior chamber moisture, vitreous opacities, retinal infiltrates. According to OCT data, the retinal thickness remained unchanged:  $158 \pm 5$   $\mu\text{m}$  versus the control  $158 \pm 3$   $\mu\text{m}$  ( $p = 1.0$ ), no retinal wrinkling effects were detected. The morphological picture

of the intraocular tissues of the eye after intravitreal injection was characterized by the absence of any pathological changes in the architectonics of the layers and cellular structures of the retina. Histomorphometric analysis showed no difference in the cell density of the ganglion layer, inner and outer nuclear layers of the retina of the experimental and control eyes of animals. **Conclusion.** Intravitreal application of EGF in rabbits does not cause intraocular specific inflammation or any destructive effects in the retina, which indicates the potential for its clinical use in the treatment of dystrophic retinal diseases.

**Keywords:** epidermal growth factor, retina, intravitreal injection, morphology, histomorphometry

**For quoting:** Bikbov M.M., Khalimov T.A. Effects of intravitreal administration of epidermal growth factor on the morphofunctional state of the rabbit eye. Point of view. East – West. 2022;3:29–32.

<https://doi.org/10.25276/2410-1257-2022-3-29-32>

**Corresponding author:** Khalimov Timur, khalimoff.timur@yandex.ru

## АКТУАЛЬНОСТЬ

Эпидермальный фактор роста (Epidermal Growth Factor, EGF) — стимулятор роста пролиферации и дифференцировки клеток, реализуемых за счет его связывания с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR). EGF представляет собой белок с молекулярной массой 6,4 кДа с 53 аминокислотными остатками, содержащими внутримолекулярные дисульфидные связи. Помимо самого эпидермального фактора роста, семейство EGF включает гепарин-связывающий EGF-подобный фактор роста (НВ-EGF), трансформирующий фактор роста  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), амфирегулин, эпирегулин, эпиген, бетацеллулин и нейррегулин-1, -2, -3 и -4 [1]. EGF выступает в роли сильного митогена различных типов клеток, стимулятора пролиферации эпителиоцитов и фибробластов. EGF является компонентом слезы человека [2], обнаружен в тканях глаза [3] и в ряде образцов стекловидного тела [4]. Установлено влияние EGF и членов его семейства как на экстраокулярные ткани и органы, так и на внутриглазные структуры и клетки, включая пигментный эпителий сетчатки (ПЭС) [5, 6].

На культурах клеток было показано влияние эпидермального фактора роста на пролиферацию и миграцию клеток ПЭС. Имеются сведения о том, что патологические процессы, происходящие в ретинальном пигментном эпителии, опосредуют развитие многочисленных заболеваний сетчатой оболочки глаза, таких как возрастная макулярная дегенерация (ВМД), дистрофии сетчатки, ретиниты и др. [7]. В связи с этим можно предположить, что внутриглазное присутствие терапевтической дозы EGF, основанное на его патогенетически ориентированном воздействии, может иметь положительное влияние на клиническое течение этих заболеваний сетчатки.

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить морфофункциональное состояние глаза кролика при интравитреальном введении эпидермального фактора роста.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на 4 кроликах породы Шиншилла массой 2,5 кг. В стекловидное тело правого

глаза (опыт) животных вводили препарат Эберпрот-П, содержащий рекомбинантный EGF, объемом 0,1 мл в дозе 100 нг. Левый глаз (контроль) оставался интактным. Животным опытной группы произвели три интравитреальные инъекции (ИВИ) EGF с интервалом 1 месяц. ИВИ выполняли в правый верхний квадрант глаза на расстоянии 3–4 мм от лимба под местной анестезией глазными каплями 0,4 % оксибупрокаина («Инокаин», Индия), общим внутримышечным наркозом препаратами Золетил («Valdepharm», Франция) 15 мг/кг и Ксила («Interchemie werken «De Adelaar B.V.», Нидерланды) 20 мг/кг с использованием операционного микроскопа Carl Zeiss (Германия).

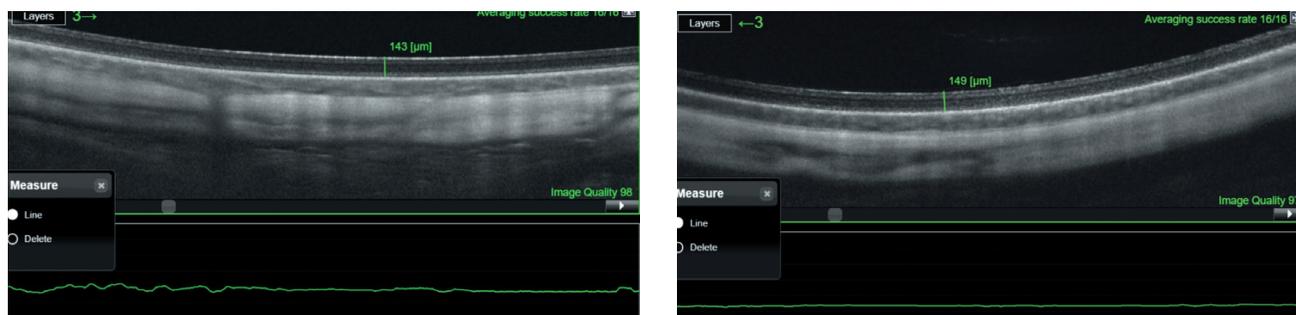
Через 7 и 30 дней после каждой инъекции проводили биомикроскопию и офтальмоскопию, оптическую когерентную томографию (ОКТ) заднего отрезка глаза (Nidek RS-3000 Advance, Япония) *in vivo*. Для морфологического исследования через 1 месяц после третьей ИВИ глаза энуклеировали и помещали в раствор 4 % формальдегида и 1 % глутарового альдегида. Перед заливкой в парафин производили обезвоживание глазных тканей в спирте. Гистологические срезы толщиной 4–6 мкм окрашивали гематоксилин-эозином. Проводили световую микроскопию гистопрепаратов и гистоморфометрический анализ (количество клеток на площадь поля зрения), включающий оценку плотности клеток ганглиозного слоя, внутреннего ядерного и наружного ядерного слоев сетчатки глаза экспериментальных животных.

Статистический анализ проведен с использованием программного обеспечения SPSS для Windows, версия 25.0, IBM-SPSS.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

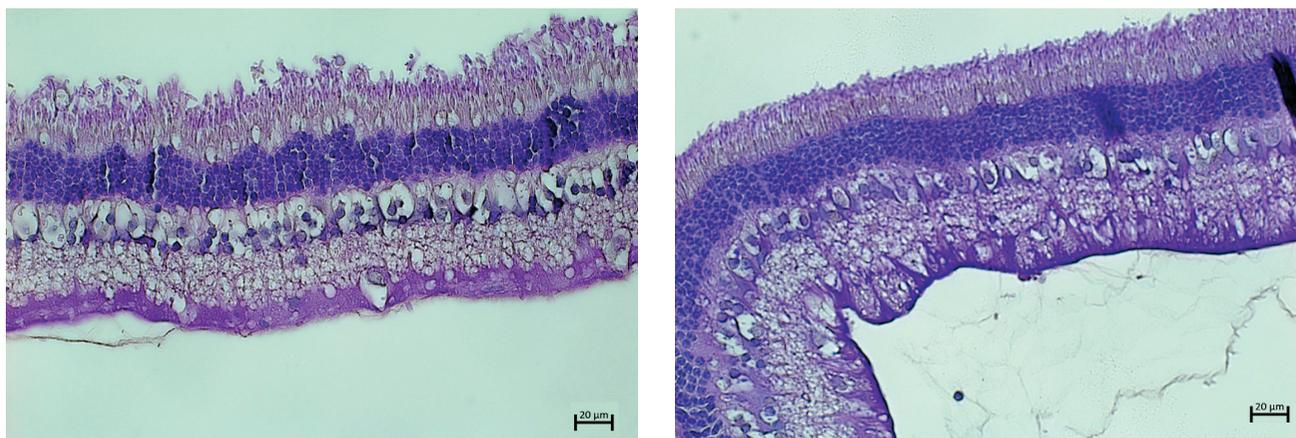
Прижизненные биомикроскопические и офтальмоскопические исследования интраокулярных структур глаза опытных кроликов не выявили признаков отека или внутриглазного воспаления, явлений токсического или раздражающего действия интравитреальной инъекции EGF. Не было обнаружено патологических изменений в виде катаракты, феномена Тиндаля в переднекамерной влаге, помутнений стекловидного тела в т.ч. в области сетчатки, ретинальных инфильтратов.

По данным ОКТ глаз кроликов *in vivo* не обнаружены эффекты «сморщивания» или «складчатости» сетчатки, связанные с ИВИ (рис. 1). При этом толщина сетчатки оставалась без изменений в течение всего срока наблю-



**Рис. 1.** Оптическая когерентная томография заднего отрезка глаза кролика: а — после интравитреального курсового введения 100 нг эпидермального фактора роста. Толщина сетчатки без изменений; б — intact eye

**Fig. 1.** Optical coherence tomography of the posterior segment of the rabbit eye: а — after intravitreal course of 100 ng of epidermal growth factor. Retinal thickness unchanged; б — intact eye



**Рис. 2.** Морфологическая картина сетчатки глаза кролика: а — после интравитреального курсового введения 100 нг эпидермального фактора роста. Архитектоника слоев и клеток сетчатки без изменений; б — intact eye. Микрофотография. Окраска гематоксилин-эозином

**Fig. 2.** Morphological picture of the retina of the rabbit eye: а — after intravitreal course of 100 ng of epidermal growth factor. The architectonics of the layers and cells of the retina is unchanged; б — intact eye. Micrograph. Hematoxylin-eosin staining

дения, что указывало на отсутствие ретинального отека: на 7-й день после ИВИ она составляла  $152 \pm 5$  мкм против контроля  $157 \pm 3$  мкм ( $p = 0,15$ ), на 30-й день —  $158 \pm 5$  мкм против контроля  $158 \pm 3$  мкм ( $p = 1,0$ ).

Морфологическая картина интраокулярных тканей глаза после интравитреальной инъекции EGF характеризовалась отсутствием каких-либо патологических изменений в архитектонике слоев и клеточных структур сетчатки (рис. 2). В гистопрепаратах опытной группы сохранялась последовательность слоев и клеток пигментного эпителия сетчатки, в которых определяются крупные клеточные ядра, что соответствовало результатам наблюдений в контроле. При этом четко визуализировались: ганглиозный слой клеток, внутренний ядерный слой сетчатки, включающий клетки Мюллера и наружный ядерный слой, образованный ядрами фоторецепторных клеток.

Гистоморфометрический анализ продемонстрировал отсутствие существенной разницы в плотности клеток ганглиозного слоя, внутреннего ядерного и наружного ядерного слоев сетчатки опытного и контрольного глаз кроликов (табл.).

Отсутствие каких-либо патологических изменений при интравитреальном введении EGF может быть связано с тем, что последний является естественным белком организма человека и животных, который присутствует и в глазных тканях. Так, EGF обнаружен в слезной жидкости, играет важную роль в восстановлении поврежденного эпителия роговицы [8]. Показано значимое снижение уровня эпидермального фактора роста в роговичном эпителии у пациентов с синдромом рецидивирующей эрозии роговицы [9]. В связи с этим EGF предложен в качестве средства для лечения стойких эпителиальных поражений роговой оболочки глаза.

Эпидермальный фактор роста признан одним из ключевых индукторов пролиферации клеток ПЭС [10]. Было установлено повышение продукции рецептора EGF в клетках Мюллера при повреждениях сетчатки [11]. Интравитреальное применение амфирегулина, являющегося лигандом рецептора EGF, у морских свинок подтвердило предположение специалистов о потенциальных возможностях его клинического использования при дистрофической ретинальной патологии [12].

Таблица

Плотность клеток в зоне экватора сетчатки глаза кроликов после интравитреального введения EGF в дозе 100 нг, (количество клеток на площадь поля зрения)

Table

Cell density in the equatorial zone of the retina of rabbits after intravitreal injection of EGF at a dose of 100 ng, (number of cells per field of view)

Слои сетчатки Retinal layers	Правый глаз (опыт) Right eye (after injection)	Левый глаз (контроль) Left eye (control)	P-значение p-value
Ганглиозный Ganglionic	1,8 ± 1,9	3,1 ± 2,3	0,40
Внутренний ядерный Internal nuclear	36,1 ± 10,8	28,8 ± 10,4	0,36
Наружный ядерный Outer nuclear	161 ± 53	168 ± 28	0,84

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интравитреальное применение эпидермального фактора роста в дозе 100 нг у кроликов не вызывает внутриглазного специфического воспаления или каких-либо деструктивных эффектов в сетчатке.

Положительные результаты проведенных экспериментальных исследований подтверждают представление о совместимости эпидермального фактора роста с интраокулярными тканями, что существенно повышает значимость применения этого многофункционального цитокина, как перспективного биологически активного соединения, нацеленного на патогенетически ориентированное лечение дистрофических заболеваний сетчатки.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp. Cell Res.* 2003;284(1):31–53. doi: 10.1016/s0014-4827(02)00098-8
- Van Setten GB, Schultz GS, Macauley S. Growth factors in human tear fluid and in lacrimal glands. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1994;350:315–319. doi: 10.1007/978-1-4615-2417-5\_53
- McAvoy JW, Chamberlain CG. Growth factors in the eye. *Prog. Growth Factor Res.* 1990;2(1):29–43. doi: 10.1016/0955-2235(90)90008-8
- Majima K. Presence of growth factor in human vitreous. *Ophthalmologica.* 1997;211(4):226–228. doi: 10.1159/000310795
- Hollborn M, Iandiev I, Seifert M, Schnurrbusch UE, Wolf S, Wiedemann P, Bringmann A, Kohlen L. Expression of HB-EGF by retinal pigment epithelial cells in vitreoretinal proliferative disease. *Curr. Eye Res.* 2006;31(10):863–874. doi: 10.1080/02713680600888807
- Yan F, Hui YN, Li YJ, Guo CM, Meng H. Epidermal growth factor receptor in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Ophthalmologica.* 2007;221(4):244–250. doi: 10.1159/000101926
- Dong L, Shi XH, Li YF, Jiang X, Wang YX, Li Y, Lan YJ, Wu HT, Gao F, Xu XL, Jonas JB, Wei WB. FASEB J. Blockade of epidermal growth factor and its receptor and axial elongation in experimental myopia. *2020;34(10):13654–13670.* doi: 10.1096/fj.202001095RR
- Huo Y, Chen W, Zheng X, Zhao J, Zhang Q, Hou Y, Cai Y, Lu X, Jin X. The protective effect of EGF-activated ROS in human corneal epithelial cells by inducing mitochondrial autophagy via activation TRPM2. *J. Cell Physiol.* 2020;10:7018–7029. doi: 10.1002/jcp.29597
- Candar T, Asena L, Alkayid H, Altınörs DD. Galectin-3, IL-1A, IL-6, and EGF levels in corneal epithelium of patients with recurrent corneal erosion syndrome. *Cornea.* 2020;39(11):1354–1358. doi: 10.1097/ICO.0000000000002422
- Steindl-Kuscher K, Boulton ME, Haas P, Dossenbach-Glaninger A, Feichtinger H, Binder S. Epidermal growth factor: the driving force in initiation of RPE cell proliferation. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2011;249(8):1195–2000. doi: 10.1007/s00417-011-1673-1
- Roque R, Caldwell R, Ali Behzadian M. Cultured Muller Cells Have High Levels of Epidermal Growth Factor Receptors. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1992;33(9):2587–2595.
- Bikbov MM, Khalimov TA, Cerrada-Gimenez M, Ragauskas S, Kalesnykas G, Jonas JB. Compatibility of intravitreally applied epidermal growth factor and amphiregulin. *Int. Ophthalmol.* 2021;41:2053–2063. <https://doi.org/10.1007/s10792-021-01761-w>

## Информация об авторах

**Бикбов Мухаррам Мухтарамович** — доктор медицинских наук, профессор, директор Уфимского НИИ глазных болезней, [eye@anrb.ru](mailto:eye@anrb.ru), <https://orcid.org/0000-0002-9476-8883>

**Халимов Тимур Азатович** — врач-офтальмолог IV микрохирургического отделения Уфимского НИИ глазных болезней, [khalimoff.timur@yandex.ru](mailto:khalimoff.timur@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0001-7141-3214>

About authors

**Bikbov Mukharram Mukhtaramovich** — PhD, Professor, Director of the Ufa Research Eye Institute, [eye@anrb.ru](mailto:eye@anrb.ru), <https://orcid.org/0000-0002-9476-8883>

**Khalimov Timur Azatovich** — ophthalmologist of the IV Microsurgical Department of the Ufa Research Eye Institute, [khalimoff.timur@yandex.ru](mailto:khalimoff.timur@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0001-7141-3214>

## Вклад авторов в работу:

**Бикбов М.М.:** концепция и дизайн исследования.

**Халимов Т.А.:** сбор и обработка материалов, сбор и обработка материалов, анализ полученных данных, диагностические исследования, написание текста.

## Contribution of the authors:

**Bikbov M.M.:** concept and design of the study.

**Khalimov T.A.:** collection and processing of materials, collection and processing materials, analysis of the obtained data, diagnostic studies, writing text.

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

**Конфликт интересов:** Отсутствует.

**Financial transparency:** Authors have no financial interest in the submitted materials or methods.

Conflict of interest: None.

Поступила: 19.06.2022

Переработана: 30.06.2022

Принята к печати: 31.08.2022

Originally received: 19.06.2022

Final revision: 30.06.2022

Accepted: 31.08.2022