

## **ГИСТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ РЕПАРАТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ГЕЛЯ ТЕРПЕНСУЛЬФИДА МЕНТАНОВОГО РЯДА НА РОГОВИЦУ ГЛАЗ КРОЛИКОВ**

Изучены гистологические препараты роговицы глаз кроликов под влиянием 2% и 3% геля 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтаната (терпенсульфида ментанового ряда). Обнаружено, что скорость репаративных процессов при применении 3% геля изучаемого терпенсульфида ментанового ряда, по сравнению с данными контрольной группы, была выше. Морфологическая картина роговицы глаз кроликов, получающих 3% гель 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтаната, идентична строению нормальной роговицы.

**Ключевые слова:** терпенсульфид ментанового ряда, плоскостная непроникающая рана, репаративная активность, кролики, роговица.

### **Актуальность**

Последние годы отмечены ростом количества глазной травмы и ее тяжести [2]. Причем на поражения роговицы и их последствия приходится более 30% от общего числа заболеваний глаз [4]. В большинстве этих случаев эффективным и радикальным методом лечения остается микрохирургия. Однако наряду с дальнейшим совершенствованием хирургических методов лечения актуальным направлением остается разработка и внедрение новых, эффективных лекарственных препаратов, направленных на стимуляцию регенераторных процессов роговицы глаза [5]. К таковым потенциальным препаратам можно отнести гель серосодержащего терпеноида ментанового ряда 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтанат в виде 2%, 3% концентраций для наружного применения, созданный на кафедре общей и органической химии Казанского государственного медицинского университета под руководством заведующей кафедрой профессора Л.Е. Никитиной [1, 7].

### **Цель работы**

Целью настоящего исследования явилось морфологическое изучение регенераторного действия 2%, 3% геля 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтаната на модели плоскостной непроникающей раны роговицы глаза у кролика.

### **Материалы и методы**

Экспериментальная работа выполнена на 50 глазах 25 кроликов породы Schinschilla массой 2,0-3,0 кг, у которых на двух глазах была выполнена несквозная плоскостная трепанационная рана роговицы диаметром 4 мм с захватом переднего эпителия, боуменовой мембраны и частично стромы роговицы [6]. При проведении всех экспериментальных исследований руководствовались требованиями «Международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985)», приказом Минздравсоцразвития России от 19.06.2003 №267 «Об утверждении правил лабораторной практики Российской Федерации».

Животные были распределены на 5 групп по 5 животных в каждой группе: 2 опытные и 3 группы контроля. Опытным животным, разделенным на две опытных группы в глаза инстиллировали соответственно 2% и 3% гель 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтаната 3 раза в день ежедневно в течение 3 недель после операции. Животные в первой группе контроля (интактная группа) гелей и мазей не получали. Кролики во второй группе контроля получали 1% тетрациклиновую глазную мазь 3 раза в день ежедневно в течение 3 недель, в третьей группе контроля получали «плацебо» (гель, не содержащий 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтанат.

Кроликов выводили из эксперимента под внутривенным наркозом этаминалом-натрия в дозе 50 мг/кг методом воздушной эмболии через ушную артерию. Материал для морфологического исследования забирался непосредственно после операции, а также 1, 3, 7, 14, 21 сутки после нанесения плоскостной непроникающей раны путем энуклеации глазных яблок по обычной методике. Глаза животных фиксировали в 10% нейтральном забуферном растворе формалина (рН 7,4) в течение 24 ч, обезживали в спиртах, заливали в парафин, с последующим формированием срезов толщиной 5-7 мкм. Выполнялось не менее 100 срезов с различных участков роговицы каждого глазного яблока. Полученные срезы окрашивали по стандартной методике гематоксилин-эозином, и пикрофуксином по методу Ван Гизона. Изучение микропрепаратов проводили на световом микроскопе фирмы Leica модели DM 4000 при увеличении x400 раз [3].

### Результаты и обсуждение

В ходе морфологического исследования микропрепаратов ран роговицы глаз кроликов всех групп в исходном состоянии констатировали наличие плоскостной непроникающей раневой поверхности роговицы. Поверхность раны роговой оболочки ровная, лишена эпителия, передняя пограничная (боуменовая) оболочка роговицы повреждена (рис. 1а, цветная вкладка). В строме роговицы наблюдаются признаки выраженной экссудативной реакции с разрыхлением волокон, в поверхностных слоях количество фибробластов уменьшено, наблюдается повреждение коллагеновых волокон (рис. 1б, цветная вкладка).

На 1-е сутки эксперимента в дне раны отмечаются зоны отека стромы, передняя пограничная оболочка повреждена, роговица в зоне трепанации деэпителизирована. Сходная гистоморфологическая картина наблюдается у животных, получающих 2% и 3% гель 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтаната, а также во всех группах контроля.

По данным гистологических исследований на 3-и сутки эксперимента на препаратах контрольной серии и в группе, получавшей «плацебо» (рис. 2а, цветная вкладка), отмечаются умеренно выраженные явления регенерации роговицы. Эпителиальные клетки наползают с периферии

роговой оболочки к центру. Наблюдается метахромазия коллагеновых волокон собственного вещества, выраженная лейкоцитарная инфильтрация с небольшим количеством эозинофильных лейкоцитов субэпителиальных отделов.

В опытных группах, получающих тиотерпеноид и препарат сравнения тетрациклин, явления регенерации на 3-и сутки более выражены по сравнению с контролем. На препаратах опытных серий роговица эпителизирована на 50% от площади раневой поверхности. Эпителий на поверхности роговицы в 1-2 ряда, недифференцированный. При изготовлении препарата эпителиальный слой легко отслаивается от боуменовой мембраны (рис. 2б, цветная вкладка). В поверхностных слоях стромы значительно уменьшено количество фибробластов. Строма отечная, по периферии отмечается миграция к центру полиморфно-ядерных лейкоцитов.

На микропрепаратах роговицы животных, изготовленных через 7 суток после начала эксперимента, в группе, получавшей 2%, 3% гель 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтаната и 1% тетрациклиновую мазь, отмечена полная эпителизация раневого дефекта. Растущий эпителий состоит из клеток удлинённой формы с вытянутыми ядрами по их длиннику, расположенными между собой практически параллельно и имеющие оксифильную цитоплазму. Эпителиоциты расположены в 2-3 слоя. Отмечается разрыхление и фрагментация волокон передней пограничной мембраны. Строма роговицы отечная, рыхлая, отмечается уменьшение миграции полиморфно-ядерных лейкоцитов в строму роговицы. В верхней трети стромы определяются единичные фибробласты. Отношение толщины рубца к толщине интактной роговицы составляет 20%. В структуре рубцовой ткани преобладает волокнистый компонент (рис. 3а, цветная вкладка).

На микропрепаратах контрольной группы животных, а также в группе животных, получавшей «плацебо» к данному сроку заканчивается эпителизация роговой оболочки. Встречаются мелкие очаги деэпителизированной роговицы. По периферии конъюнктивальный эпителий в виде вала врастает на поверхность роговой оболочки. Эпителий многослойный, ближе к центру эпителиальный слой становится более упорядоченным, клетки цилиндрические, ядра плоские. В участках вновь образованного эпителия

количество слоев на 2-3 слоя превышает толщину интактного эпителия. Строма роговицы отекая, рыхлая, инфильтрирована полиморфно-ядерными лейкоцитами, единичными макрофагами. Наблюдается выраженная пролиферация фибробластов, которые имеют разнонаправленный ход. Отношение толщины рубца к толщине интактной роговицы составляет 26%. В структуре рубцовой ткани преобладает клеточный компонент (рис. 3б, цветная вкладка).

На 14 сутки с начала эксперимента в опытной группе, получавшей 2% гель тиотерпеноида ментанового ряда, поверхность роговицы покрыта эпителием в 3-4 перекрывающих друг друга клеточных слоя, эпителий дифференцированный. Наблюдается разрыхление и некоторая фрагментация волокон передней переходной оболочки и коллагеновых волокон собственного вещества роговицы. Среди коллагеновых волокон отмечены единичные эозинофилы и плазматические клетки. Отношение толщины рубца к толщине интактной роговицы составляет 4,8%. В структуре рубцовой ткани преобладает волокнистый компонент, визуализируются единичные клеточные элементы.

Гистоморфологическая картина роговицы глаза кроликов, получающих 3% гель 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтаната, идентична строению нормальной роговицы. Поверхностный слой эпителия состоит из 4-5 слоев многослойного плоского неороговевающего эпителия, прилегающего к боуеновой оболочке. Собственное вещество роговой оболочки представлено параллельно расположенными коллагеновыми волокнами, верхние слои которых более компактно прилегают к боуеновой оболочке (рис. 4а, цветная вкладка).

На микропрепаратах передний эпителий роговицы кроликов, получавших 1% тетрациклиновую мазь, истончен, местами, до 1-2 слоев клеток, но в основном определяются три слоя клеток. Среди волокон передней пограничной мембраны определяется рассеянный лимфоцитарный инфилтрат, в основном, состоящий из зрелых плазматических клеток. Эпителий в зоне воспалительной инфильтрации истончен до одного – двух слоев клеток. Местами в цитоплазме эпителиальных клеток определяются зернистые оксифильные гранулы. Отношение толщины рубца к толщине интактной ро-

говицы составляет 6%. В структуре рубцовой ткани преобладает клеточный компонент.

Роговица животных группы контроля и группы «плацебо» на 14-е сутки после начала эксперимента имела схожее строение. Клетки переднего эпителия роговицы лежат в 4-5 слоев, эпителиальный пласт утолщен (в 1,5-2 раза толще, чем в норме), местами определяется неглубокое акантоцитическое погружение эпителия в переходную мембрану. Клетки базального слоя эпителия роговицы увеличены в размерах, с крупными ядрами не имеют базальной ориентировки. Отек и инфильтрация стромы значительно уменьшились, по сравнению с гистоморфологическими данными 7-х суток, встречаются единичные фибробласты. Отношение толщины рубца к толщине интактной роговицы составляет 11,7% (рис. 4б, цветная вкладка).

Цитоархитектоника эпителиального регенерата на 21-е сутки у всех групп животных, как опытных, так и контрольных, соответствовала картине опытов, проведенных на 14-е сутки. Так в опытной группе, получающей 2% гель 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтаната, отмечена полная эпителизация раневого дефекта, многослойность эпителиального пласта: поверхность роговицы покрыта эпителием в 4-5 перекрывающих друг друга клеточных слоев. Боуенова оболочка и собственное вещество роговицы структурированы. Гистоморфологическая картина роговицы глаза кроликов, получающих 3% гель 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтаната идентична строению нормальной роговицы.

У кроликов, получавших 1% тетрациклиновую мазь, поверхность роговицы покрыта 4-5 слоями плоскоклеточного неороговевающего эпителия, представленного бокаловидными клетками с характерным для клеток эпителия роговицы ядерно-цитоплазменным индексом. Среди волокон передней пограничной мембраны и стромы роговицы встречаются единичные плазматические клетки.

На микропрепаратах роговицы животных контрольной группы и группы, получавшей «плацебо» наряду с полной эпителизацией дефекта, на фоне многослойного эпителиального пласта, отмечается очаговый паракератоз собственного вещества в зоне альтерации, что свидетельствует о нарушении прозрачности роговицы глаза кроликов.

Результаты наблюдений за экспериментальными животными и морфологические исследования роговицы с поврежденным эпителием показали большую эффективность 3% геля 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтаната по сравнению с данными контрольной группы, а также с группой получающей 1% тетрациклиновую мазь, о чем свидетельствует раннее заполнение просвета раневого канала эпителиальной пробкой в первые 3 дня наблюдения на фоне применения изучаемого препарата. В группе, получающей гель 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтанатом, на 3 и 14 сутки после ранения отмечали менее выраженный отек стромы вокруг поражения, быструю регрессию эпителиальной пробки, раннюю миграцию фибробластов. К последнему сроку исследования в опытных группах отсутствовали явления отека роговицы, отношение толщины рубца к толщине роговицы кроликов интактной группы было в среднем в 1,5 раза ниже, чем этот же показатель в контрольной группе. Признаком благоприятного воздействия изучаемого серосодержащего терпеноида ментанового ряда на структуру рубца было преобладание волокнистого компонента

над клеточным пролифератом [8]. Сравнение результатов опытной группы, получающей изучаемый тиотерпеноид, с группой животных, получающих «плацебо», указывает на индифферентность состава геля в части влияния на регенераторную активность и доказывает, что репаративный эффект обусловлен действием 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтаната.

### Заключение

Таким образом, применение 3% геля 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтаната способствует более раннему наступлению репаративных процессов роговицы, позволяя добиться более прозрачного заживления роговицы и значительного сокращения сроков восстановительного лечения. Поэтому 3% гель 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтаната позволяет рассматривать его в качестве перспективного репаранта и рекомендовать его в качестве стимулятора репарации роговицы после травм и после оперативных вмешательств, а также для лечения пациентов с патологией глазной поверхности.

10.02.2013

### Список литературы:

1. Никитина Л.Е., Артемова Н.П., Старцева В.А., Сиразиева Е.В., Дорофеева Л.Ю., Глушко Н.И., Лисовская С.А., Гараев Р.С., Акулина И.В. 2-(1'-гидрокси-4'-изо-пренил-1'-метил-циклогексил-2'-тио) метилэтанат, обладающий фунгицидным и противовоспалительным действием: заявка на изобретение №2010130104 от 20.11.2010.
2. Гундорова Р.А., Нероев В.В., Кашников В.В. Травмы глаза. – 2009. – 560 с.
3. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники / Д.Э. Коржевский, А.В. Гиляров. – СПб: СпецЛит, 2010. – 95 с.
4. Кун Ф. Травматология глазного яблока / Ф. Кун; пер. с англ.; под ред. В.В. Волкова. – М.: Логосфера, 2011. – 576 с.
5. Сысуйев Б.Б., Смирнов А.В., Митрофанова И.Ю. Изучение морфологических особенностей процессов репарации кожных ран под влиянием глазных капель бишофита // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – №5. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.science-education.ru/99-4787>.
6. Сернов Л.Н., Гацура В.В. Элементы экспериментальной фармакологии / Л.Н. Сернов, В.В. Гацура. – М.: ВНИЦБАВ, 2000. – 135 с.
7. Akulina I.V., Nikitina L.E., Artemova N.P. et al. Estimation of influence of 2-(1-hydroxy-4-isopropenyl-1-methylcyclohexyl-2-thio)-methylethanoate on lipidperoxidation and antioxidant system of animals in chronic proliferative inflammation // International journal of applied and fundamental research. – 2011. – №10. – P. 5.
8. Qin Li, Ken Fukuda, Ying Lu, Yoshikuni Nakamura, Tai-ichiro Chikama, Naoki Kumagai, and Teruo Nishida. Enhancement by neutrophils of collagen degradation by corneal fibroblasts // Journal of Leukocyte Biology. – 2003. – Vol.74 [Электронный ресурс]. URL: <http://www.jleukbio.org/content/74/3/412.full.pdf>.

### Сведения об авторах:

**Акулина Ирина Владимировна**, кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии и биохимии Чувашского государственного университет им. И.Н. Ульянова, e-mail: [ir.ak-na@mail.ru](mailto:ir.ak-na@mail.ru)

**Москвичев Евгений Васильевич**, доцент кафедры нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией Чувашского государственного университет им. И.Н. Ульянова, кандидат медицинских наук, e-mail: [moskvichev@rambler.ru](mailto:moskvichev@rambler.ru)

428015, Чувашская Республика, г. Чебоксары, Московский пр-т, д. 15,

**Поздеева Надежда Александровна**, заместитель директора по научной работе Чебоксарского филиала «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н.Федорова» Минздрава России, доцент курса глазных болезней АУ Чувашии «Институт совершенствования врачей» Минздравсоцразвития Чувашии, кандидат медицинских наук

**Фролычев Иван Александрович**, младший научный сотрудник Чебоксарского филиала  
МНТК «Микрохирургия глаза», e-mail: ivan-f@yandex.ru  
428028 Чебоксары, пр. Тракторостроителей, 10. тел.: (8352)305081, e-mail: npozdeeva@mail.ru

**UDC 615.457.4+615.31: 611.018.74:611.841.2**

**Akulina I.V., Moskvichev E.V., Pozdeyeva N.A., Frolychev I.A.**

E-mail: ir.ak-na@mail.ru

**HISTOMORPHOLOGICAL MONITORING OF REPARATIVE ACTIVITY OF GEL 2-(1'-HYDROXY-4'-ISO-PROPENYL-1'-METHYLCYCLOGEXIL-2'-THIO)-METHYLETHANOAT ON THE CORNEA OF EYES OF RABBITS**

Histological preparations of corneas of rabbits under the influence of the 2% and 3% gel of 2-(1-hydroxy-4-isopropenyl-1-methylcyclohexyl-2-thio)-methylethanoate (sulphur containing terpenoid of mentan series) were studied. It is found that the rate of repair processes in the application of 3% gel of sulphur containing terpenoid of mentan series, compared to the data of the control group was higher. The morphological picture of the corneas of rabbits treated with 3% gel of 2-(1-hydroxy-4-isopropenyl-1-methylcyclohexyl-2-thio)-methylethanoate is identical to the structure of the normal cornea of rabbits.

Key words: terpenesulphide of terpane series, flat non-penetrating wound, reparative activity, rabbits, cornea.

**Bibliography:**

1. Nikitin L.E., Artemov N.P., Startseva V.A., Sirazieva E.V., Dorofeeva L.Y., Glushko N.I., Lisovskaya S.A., Garayev R.S., Akulina I.V. Metiletanoat having fungicidal and anti-inflammatory action: application for invention 2010130104: publ. 20.11.2010.
2. Gundorova P.A., Neroev V.V., Kashnikov V.V. Eye traumas. – M., 2009. – 560p.
3. Korzhevsky D.E., Gilarov A.B. Fundamentals of histological techniques / D.E. Korzhevsky, A.V. Gilyarov. – St. Petersburg: SpetsLit, 2010. – 95 p.
4. Kun F. Ocular Traumatology. – M.: Logosphaera, 2011. – 576 p.
5. Sysuyev B.B., Smirnov A.V., Mitrofanov I.Yu. Morphological features of the processes of repair of skin wounds under the influence of eye drops bischofite // Modern problems of science and education. – 2011. – №5. [Electronic resource]. URL: <http://www.science-education.ru/99-4787>.
6. Sernov L.N., Gatsura V.V. Elements of Experimental Pharmacology / L.N. Sernov, V.V. Gatsura. – Moscow: VNTSBAV, 2000. – 135 p.
7. Akulina I.V., Nikitina L.E., Artemova N.P. et al. Estimation of influence of 2-(1-hydroxy-4-isopropenyl-1-methylcyclohexyl-2-thio)-methylethanoate on lipidperoxidation and antioxidant system of animals in chronic proliferative inflammation / International journal of applied and fundamental research. – 2011. – №10. – P. 5.
8. Qin Li, Ken Fukuda, Ying Lu, Yoshikuni Nakamura, Tai-ichiro Chikama, Naoki Kumagai, and Teruo Nishida. Enhancement by neutrophils of collagen degradation by corneal fibroblasts // Journal of Leukocyte Biology. – 2003. – Vol.74 [Electronic resource]. URL: <http://www.jleukbio.org/content/74/3/412.full.pdf>.