

Влияние иммобилизованных ферментов гиалуронидазы и субтилизина на ультраструктуру эпителиоцитов конъюнктивы человека

В.Е. Забанова¹, А.Ж. Фурсова^{1,2}, Н.А. Бондаренко³, Н.П. Бгатова³, А.В. Затеев^{1,3}, П.Г. Мадонов^{1,3}

¹ Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52

² ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10

³ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии –
филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН
630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Резюме

Применение ферментных препаратов является традиционным направлением в самых различных областях медицины. Использование иммобилизованной гиалуронидазы (ИГ) и субтилизина (ИС) представляется весьма перспективным для лечения повреждений глазной поверхности. Жидкие формы субтилизина и гиалуронидазы были предварительно иммобилизованы на полиэтиленоксиде импульсным линейным ускорителем ИЛУ-10. **Цель исследования** – установить характер изменений ультраструктурной организации эпителиоцитов конъюнктивы человека при воздействии ИГ и ИС *in vitro*. **Материал и методы.** В эксперименте культуру нормальных клеток конъюнктивы человека Changconjunctiva, клон 1–5 С-4, высевали в 96-луночные планшеты в количестве 2×10^4 клеток/лунку, через 24 ч среду удаляли, добавляли среду Игла MEM и с эмбриональной телячьей сывороткой и культивировали еще 48 ч. Сформировано пять экспериментальных групп: группа 1 – без добавления препаратов (кроме состава схемы инкубирования), группы 2 и 3 – с добавлением ИС в концентрации 37 и 150 Ед/мл соответственно, группы 4 и 5 – с добавлением ИГ в концентрации 37 и 150 Ед/мл соответственно. После приготовления препаратов клеток под электронным микроскопом JEM 1400 (Япония) изучены ультратонкие срезы 70–100 нм на увеличении $\times 1000$. **Результаты.** В статье приведены результаты электронной микроскопии культуры нормальных клеток конъюнктивы человека в 5 экспериментальных группах клеток с описанием изменений цитоархитектоники под воздействием ИГ и ИС. **Заключение.** Введение иммобилизованных ферментов в культуру клеток конъюнктивы человека в небольшой дозе (37 Ед/мл) оказывает влияние на организацию клеток без цитотоксического воздействия, в то время как повышение дозы прямо коррелирует с возникновением цитотоксического эффекта.

Ключевые слова: иммобилизованный субтилизин, иммобилизованная гиалуронидаза, цитоархитектоника.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Затеев А.В., e-mail: zateev1997@mail.ru

Для цитирования: Забанова В.Е., Фурсова А.Ж., Бондаренко Н.А., Бгатова Н.П., Затеев А.В., Мадонов П.Г. Влияние иммобилизованных ферментов гиалуронидазы и субтилизина на ультраструктуру эпителиоцитов конъюнктивы человека. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2023;43(1):59–70. doi: 10.18699/SSMJ20230106

Effect of immobilized hyaluronidase and subtilisin enzymes on the ultrastructure of human conjunctival epithelial cells

V.E. Zabanova¹, A.Zh. Fursova^{1,2}, N.A. Bondarenko³, N.P. Bgatova³, A.V. Zateev^{1,3}, P.G. Madonov^{1,3}

¹ Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia

630117, Novosibirsk, Krasny ave., 52

² Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS

630090, Novosibirsk, Akademika Lavrentyeva ave., 10

³ Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology –

Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS

630060, Novosibirsk, Timakova str., 2

Abstract

The use of enzyme preparations is a traditional trend in various fields of medicine. The usage of immobilized enzymes hyaluronidase (IG) and subtilisin (IS) seems to be very promising for the treatment of damage to the ocular surface. **The aim** of the study was to establish the nature of changes in the ultrastructural organization of human conjunctival epithelium under the influence of immobilized hyaluronidase and subtilisin *in vitro*. **Material and methods.** In the experiment, a culture of normal cells of the human conjunctiva Chanqconjunctiva, clone 1–5 C-4, was seeded in 96-well plates in the amount of 2×10^4 cells/well, after 24 h the medium was removed, Eagle's medium MEM and fetal calf serum were added and cells were cultured for another 48 h. 5 experimental groups were formed: group 1 – without drugs (except for the composition of the incubation scheme), groups 2 and 3 – with IS at a concentration of 37 and 150 U/ml, respectively, groups 4 and 5 – with IG at a concentration of 37 and 150 U/ml, respectively. After preparation of cell preparations under a JEM 1400 electron microscope (Japan), ultrathin sections of 70–100 nm were studied at $\times 1000$ magnification. **Results.** The article presents the results of electron microscopy of a culture of normal cells of the human conjunctiva in 5 experimental groups of cells with a description of changes in cytoarchitectonics under the influence of IG and IS. **Conclusions.** The introduction of immobilized enzymes into human conjunctival cell culture at a low dose (37 U/ml) affects the organization of cells without cytotoxic effects, while increasing the dose directly correlates with the occurrence of a cytotoxic effect.

Key words: immobilized subtilisin, immobilized hyaluronidase, cytoarchitectonics.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Correspondence author: Zateev A.V., e-mail: zateev1997@mail.ru

Citation: Zabanova V.E., Fursova A.Zh., Bondarenko N.A., Bgatova N.P., Zateev A.V., Madonov P.G. Effect of immobilized hyaluronidase and subtilisin enzymes on the ultrastructure of human conjunctival epithelial cells. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal* = *Siberian Scientific Medical Journal*. 2023;43(1):59–70. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20230106

Введение

В настоящее время применение ферментов считается перспективным направлением для лечения воспалительных и дегенеративных заболеваний в различных областях медицины. Лекарственные препараты на их основе способны преобразовывать широкий спектр молекул-мишеней для нормализации метаболизма и имеют ряд преимуществ по сравнению с установленными терапевтическими подходами благодаря их свойствам сродства и специфичности [1]. Фармакологические технологии с применением ферментов благодаря биоразнообразию последних обладают

широким спектром количества и терапевтической эффективности. Хотя ферменты – одни из первых биологических препаратов, используемых в клинической практике, скорость создания новых лекарств на их основе была сравнительно низкой [2]. Разработка безопасных и эффективных методов лечения человека с применением энзимов значительно активизировалась за последние десятилетия благодаря прогрессу в понимании молекулярных механизмов, ответственных за различные заболевания, а также детальному изучению каталитической активности соответствующих экзогенных ферментов. Несколько

биотерапевтических препаратов на их основе одобрены FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) и ЕМА (Европейское агентство по лекарственным средствам), многие проходят клинические испытания. Большинство терапевтических ферментов получают из микроорганизмов – наиболее удобного источника благодаря быстрому, простому и экономичному производству и последующей технологической обработке [1]. В настоящее время взят курс на фармакологическое совершенствование терапевтических ферментов. Они подразделяются на четыре основные группы: для заместительной терапии, для лечения рака, для фибринолиза и для регенеративной медицины. Также разрабатывается ферментная генная терапия [3].

Среди ферментных препаратов широко применяется гиалуронидаза, расщепляющая гиалуроновую кислоту и оказывающая множественное влияние на метаболизм гиалуроновой кислоты; она увеличивает проницаемость сосудов и временно разрушает внеклеточный матрикс, способствуя диффузии веществ через ткани. Наряду с применением в офтальмологии, акушерстве и гинекологии, скелетно-мышечной медицине, радиологии, а также при введении лекарств и жидкостей, гиалуронидаза используется в области пластической хирургии [4]. Показано, что гиалуронидаза способствует заживлению ран и оказывает дозозависимую индукцию синтеза гиалуроновой кислоты в структурных клетках кожи. Значительное усиление репарации наблюдалось даже при низкой концентрации фермента [5]. У человека идентифицировано шесть различных гиалуронидаз: HYAL-1–4, HYAL-P1 и PH-20. PH-20 проявляет наиболее выраженную биологическую активность, обнаруживается в высоких концентрациях в яйцах и может быть локализована на головке и акросоме сперматозоидов человека. Сегодня гиалуронидазы бычьего или овечьего яйца животного происхождения, а также синтетические гиалуронидазы применяются в клинической практике для повышения биодоступности лекарств, для терапии экстравазаций, для лечения осложнений в эстетической хирургии. Расширения области применения фермента в хирургии, эстетической медицине, иммунологии, онкологии и многих других сферах можно ожидать в ближайшие годы [6].

Субтилизины представляют собой микробные экзогенные ферменты, которые производит *Bacillus subtilis*. Их отличительной особенностью является выраженная протеолитическая активность

в отношении денатурированных или полимеризованных белков. На нативные гликозированные белки субтилизины оказывают минимальное гидролитическое действие. В настоящее время субтилизины используются преимущественно как антитромботические и вазопротекторные лекарственные средства [7–13]. В России зарегистрированы две формы лекарственного препарата «Тромбовазим®» (АО «СЦФБ») на основе субтилизинов: инъекционная (в качестве тромболитика для лечения острого инфаркта миокарда) и энтеральная (для лечения тяжелой венозной патологии, включая тромбозы).

Наряду с перспективами высокой клинической эффективности, применение ферментов сопряжено с некоторыми проблемами. Основные из них – это низкая биодоступность, короткий период полувыведения, потенциальный риск патологической реакции иммунной системы пациента на фермент [14]. Совершенствование энзимотерапии идет по пути поиска альтернативных источников ферментов с уменьшенными побочными эффектами и повышенной активностью, а также генетической модификации ферментов и новых систем доставки. Стратегии химической модификации, таргетная и/или опосредованная наночастицей доставка, направленная эволюция и сайт-специфический мутагенез, слитые белки, полученные с помощью генетических манипуляций, являются наиболее изученными инструментами для снижения токсичности и улучшения биодоступности и клеточного нацеливания. В этом отношении весьма успешная технология модификации ферментов – электронно-лучевое пегилирование, благодаря которому они утрачивают агрессивные свойства по отношению к организму человека и приобретают улучшенные фармакокинетические свойства [15].

Энзимотерапия при заболеваниях глаза описана в литературе, однако большого количества исследований и публикаций не наблюдается [16]. Применение иммобилизованных форм гиалуронидазы (ИГ) и субтилизина (ИС) для офтальмологической практики представляются весьма перспективными, поскольку их фармакологическое действие отслеживает многие патогенетические механизмы заболеваний глаза [17–20].

Нами проводятся исследования по изучению возможности применения данных ферментов для лечения повреждения глазной поверхности. Переднюю поверхность глаза составляют конъюнктив и роговица, а также слезная пленка. Конъюнктив – это слизистая оболочка, покрывающая переднюю поверхность глазного яблока

и заднюю поверхность век. Гистологически она включает в себя поверхностный и базальный эпителий, аденоидный и волокнистый слои [21]. Аденоидный и волокнистый слой представляют собой собственную субстанцию, которая отделена от базального эпителия базальной мембраной. Средняя толщина здорового бульбарного эпителия конъюнктивы имеет глубину $42,4 \pm 7,4$ мкм, средняя толщина собственного вещества составляет $197,7 \pm 32,5$ мкм [22]. В настоящей работе выполнено исследование влияния ИГ и ИС на состояние клеточного аппарата эпителия конъюнктивы для понимания их возможных повреждающих эффектов.

Цель исследования – установить характер изменений ультраструктурной организации эпителиоцитов конъюнктивы человека при воздействии ИГ и ИС *in vitro*.

Материал и методы

ИС и ИГ представляют собой лиофилизированные порошки светло-желтого и светло-серого цвета с ферментативной активностью 5400 и 2800 ЕД в грамме сухого вещества соответственно, легко растворяющиеся в кристаллоидных и коллоидных растворах (производитель АО «СЦФБ», г. Новосибирск). В экспериментах исследованы по две дозы жидких форм препарата с активностью фермента 37 и 150 ЕД/мл. Иммунизация ферментов проведена на полиэтилен-оксиде (Макрогол 1500) под пучком ускоренных электронов в дозе 1,5 МРад, создаваемым импульсным линейным ускорителем ИЛУ-10 (Институт ядерной физики имени Г.И. Будкера СО РАН, г. Новосибирск) на площадке ООО «СФМ-Фарм», г. Новосибирск.

В эксперименте использовали перевиваемую культуру нормальных клеток конъюнктивы человека Chanqconjunctiva, клон 1–5 C-4 из коллекции перевиваемых соматических клеток позвоночных (НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи). Клетки культивировали в питательной среде Игла MEM (ГНЦ ВБ «Вектор», Россия) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (HyClone, США), 40 мкг/мл гентамицина сульфата (Дальхимфарм, Россия) и 2 мМ L-глутамин (ICN, США) в CO₂-инкубаторе при 37 °C и 5 % CO₂ до образования confluentного монослоя. Клетки Chanqconjunctiva высевали в 96-луночные планшеты в количестве 2×10^4 клеток/луночку, через 24 ч среду удаляли, добавляли среду Игла MEM с 1 % ЭТС и исследуемое вещество, далее культивировали клетки в течение 48 ч. Было сформировано пять эксперимен-

тальных групп: контрольная, в которой к клеткам не добавляли препаратов, не входящих в состав технологической схемы инкубации, две группы – с добавлением ИС в дозе 37 и 150 ЕД/мл и две группы – с добавлением ИГ в дозе 37 и 150 ЕД/мл.

Для исследования в электронном микроскопе клетки фиксировали в 1%-м растворе OsO₄ на фосфатном буфере (pH 7,4), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон (Serva, Германия). Из полученных блоков готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм на ультратоме Leica UC7/FC7 (Германия/Швейцария), окрашивали толудиновым синим, изучали под световым микроскопом LEICA DME и выбирали клетки для исследования в электронном микроскопе. Из отобранного материала получали ультратонкие срезы толщиной 70–100 нм, контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1400 (Япония) Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. Увеличение $\times 1000$.

Результаты

Структура эпителиоцитов конъюнктивы в контрольной группе

Эпителиоциты конъюнктивы контрольной группы отличались наличием многочисленных микроворсинок и выростов клеточной мембраны (рис. 1, а, б). В цитоплазме клеток наблюдали скопления гликогена (рис. 1, в). В околоядерной зоне клеток отмечали лизосомы, аутолизосомы, редко встречались аутофагосомы (рис. 1, г, д). Митохондрии имели различную форму – округлую, извилистую, удлинённую, и содержались в большом количестве. Отмечали хорошо развитую сеть гранулярного эндоплазматического ретикулаума и большое количество полисомальных комплексов рибосом. В цитоплазме хорошо выявлялись мультивезикулярные тельца и везикулы (рис. 1, е). Эти морфологические признаки являются достаточно характерными для клеток эпителиальных барьеров.

Структура эпителиоцитов конъюнктивы после введения ИГ в дозе 37 ЕД/мл

При анализе структуры эпителиоцитов конъюнктивы после введения ИГ в дозе 37 ЕД/мл выявлено снижение содержания микроворсинок и наличие выростов цитоплазматической мембраны (рис. 2, а, б). Отмечали размытость кон-

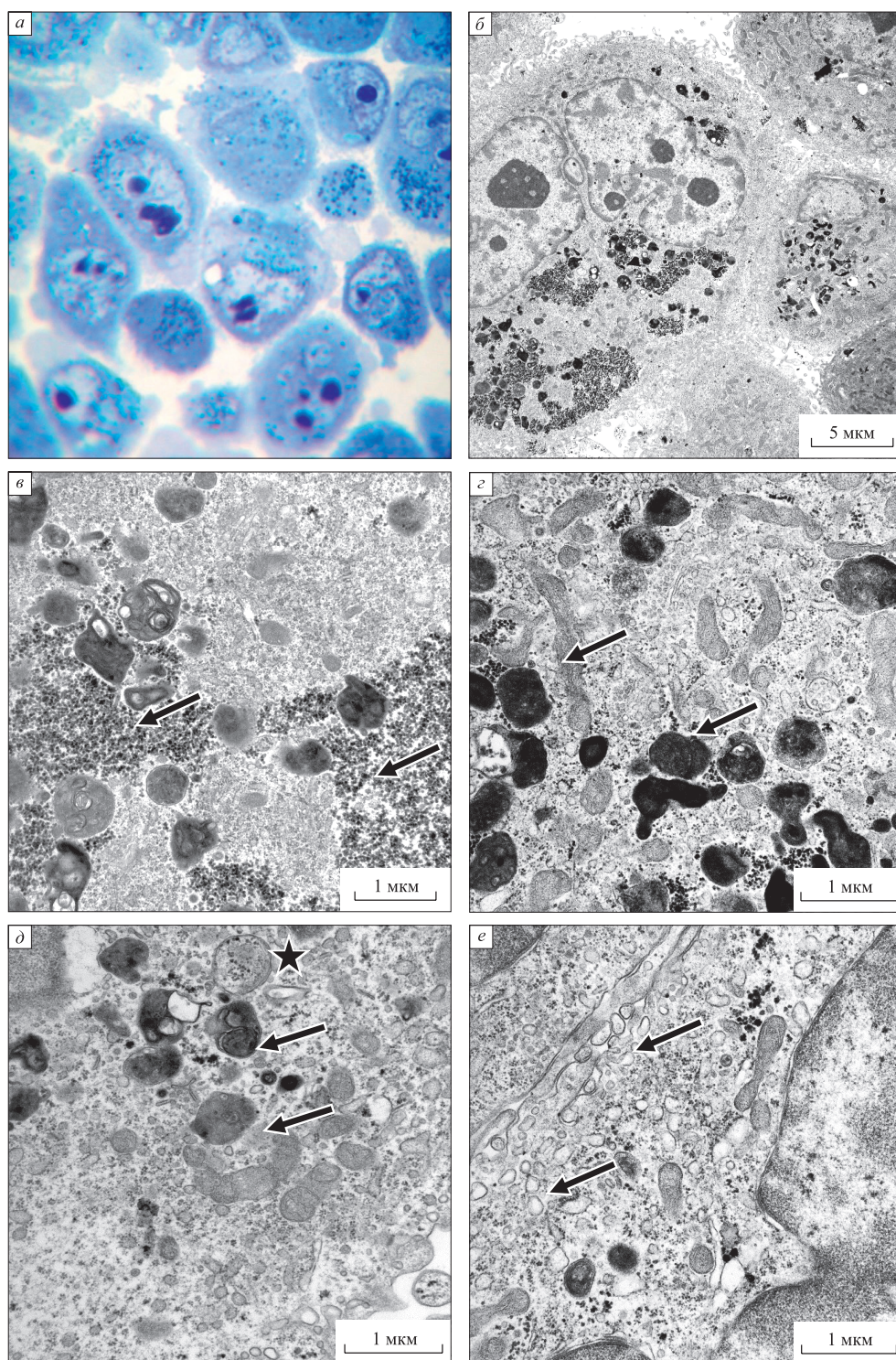


Рис. 1. Структура эпителиоцитов конъюнктивы в контроле: а – эпителиоциты конъюнктивы; б – ультра-структура эпителиоцитов конъюнктивы; в – скопления гликогена в цитоплазме эпителиоцитов конъюнктивы (стрелки); г – лизосомы в цитоплазме эпителиоцитов конъюнктивы (стрелки); д – аутофагосома (звездочка) и аутолизосомы (стрелки) в цитоплазме эпителиоцитов конъюнктивы; е – многочисленные везикулярные структуры в цитоплазме эпителиоцитов конъюнктивы (стрелки)

Fig. 1. The structure of conjunctival epithelial cells in the control: а – epithelial cells of the conjunctiva; б – ultrastructure of conjunctival epithelial cells; в – accumulations of glycogen in the cytoplasm of conjunctival epithelial cells (arrows); г – lysosomes in the cytoplasm of conjunctival epithelial cells (arrows); д – autophagosome (asterisk) and autolysosomes (arrows) in the cytoplasm of conjunctival epithelial cells; е – numerous vesicular structures in the cytoplasm of conjunctival epithelial cells (arrows)

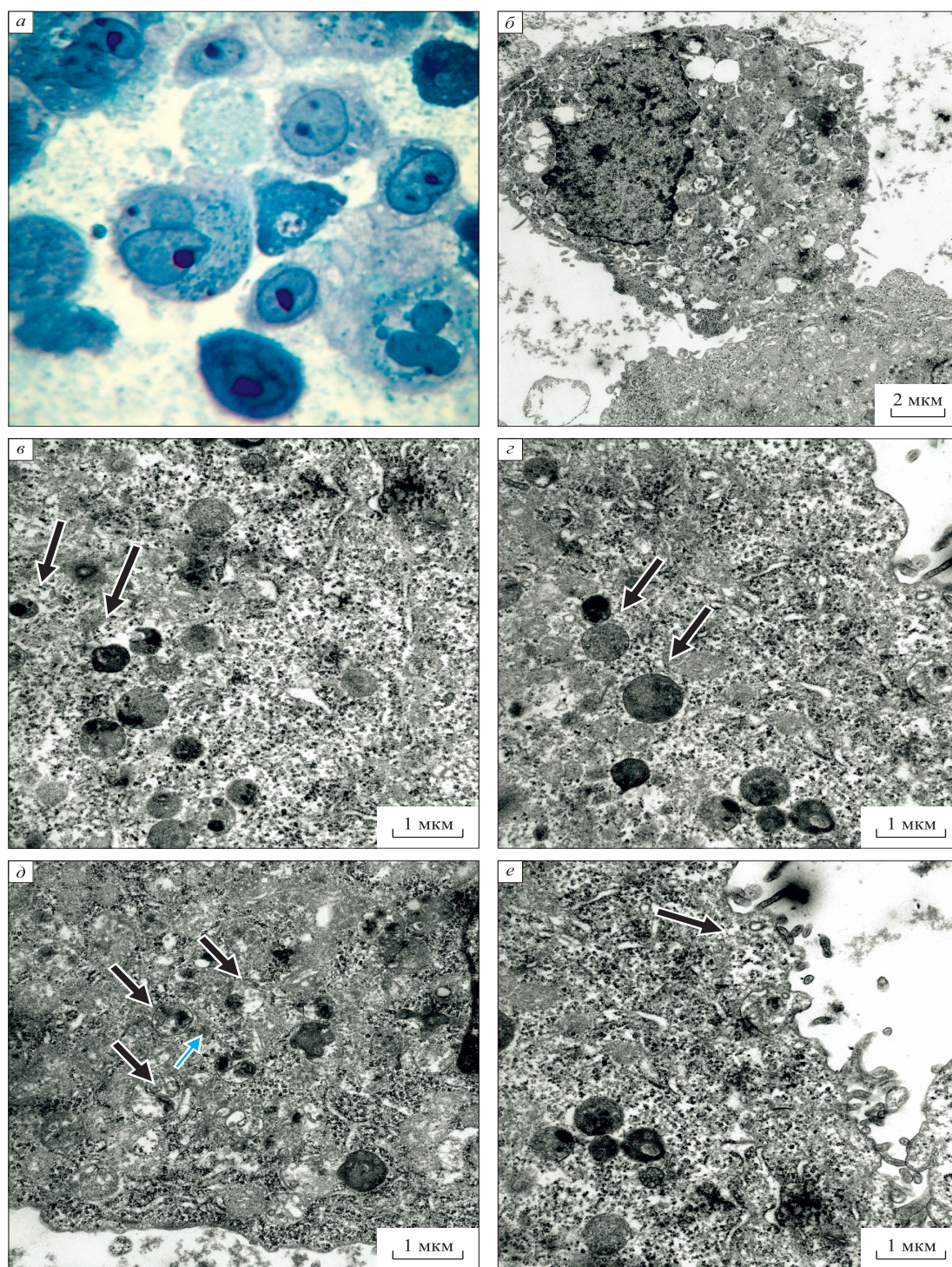


Рис. 2. Структура эпителиоцитов конъюнктивы после введения ИГ в дозе 37 ЕД/мл: а – эпителиоциты конъюнктивы; б – ультраструктура эпителиоцитов конъюнктивы; в – небольшое содержание вторичных лизосом (стрелки); г – первичные лизосомы в цитоплазме эпителиоцитов конъюнктивы (стрелки); д – аутолизосомы (стрелки) в цитоплазме эпителиоцитов конъюнктивы; е – небольшое содержание везикулярных структур в цитоплазме эпителиоцитов конъюнктивы (стрелки)

Fig. 2. The structure of conjunctival epithelial cells after the administration of IG at a dose of 37 U/ml: а – epithelial cells of the conjunctiva; б – ultrastructure of conjunctival epitheliocytes; в – a small amount of secondary lysosomes (arrows); г – primary lysosomes in the cytoplasm of conjunctival epithelial cells (arrows); д – autolysosomes (arrows) in the cytoplasm of conjunctival epithelial cells; е – a small amount of vesicular structures in the cytoplasm of conjunctival epithelial cells (arrows)

туров мембран цитоплазматических органелл, расширение цистерн гранулярного эндоплазматического ретикула, уменьшение содержания митохондрий и гликогена. Уменьшалось количество вторичных лизосом с электронно-плотным содержимым и возрастало число электронно-светлых первичных лизосом (рис. 2, в, з). Отмечали различные по размерам аутолизосомы (рис. 2, д). Практически не выявлялись везикулярные структуры около клеточной поверхности (рис. 2, е). Данные изменения можно трактовать как некоторое снижение биохимической активности, направленное, вероятнее всего, на ограничение энергетического бюджета клетки ввиду отсутствия провоспалительных стимулов.

Структура эпителиоцитов конъюнктивы после введения ИГ в дозе 150 ЕД/мл

При анализе структуры эпителиоцитов конъюнктивы после введения ИГ в дозе 150 ЕД/мл отмечали сглаживание клеточной поверхности, отсутствие микроворсинок и наличие отдельных выростов плазматической мембраны (рис. 3, а, б). В цитоплазме наблюдали уменьшение содержания гликогена и наличие зон деструкции в области локализации лизосом. Встречались крупные аутолизосомы с накоплением гликогена и более мелкие по размерам с неопределяемым содержимым (рис. 3, в, з). Имели место лизосомы с признаками повреждения (рис. 3, д). Отмечали возрастание электронной плотности участков, расположенных вдоль плазматической мембраны, и практически отсутствовали везикулярные структуры (рис. 3, е). ИГ в дозе 150 ЕД/мл не вызывает грубых нарушений citoархитектоники клеток эпителия конъюнктивы, но при этом очевидно, что с высокой долей вероятности ИГ проникает внутрь цитоплазмы.

Структура эпителиоцитов конъюнктивы после введения ИС в дозе 37 ЕД/мл

При анализе структуры эпителиоцитов конъюнктивы после введения ИС в дозе 37 ЕД/мл выявлено наличие микроворсинок и выростов клеточной поверхности и значительное накопление лизосомальных структур в цитоплазме клеток (рис. 4, а, б). Цистерны комплекса Гольджи были расширены (рис. 4, в). Среди лизосомальных структур преобладали аутолизосомы, размеры которых значительно различались, наблюдали мелкие, средние и крупные аутолизосомы (рис. 4, г, д). Имели место структурные признаки стресса эндоплазматического ретикула — цистерны гранулярного эндоплазматического ретикула

были значительно расширены и в их просветах определялся электронно-плотный материал (рис. 4, е). Принимая во внимание то обстоятельство, что субтилизины обладают не только протеолитическим, но и выраженным противовоспалительным действием, морфологические изменения эпителиоцитов конъюнктивы можно трактовать как увеличение метаболической активности для обеспечения антиинфламаторного потенциала клетки.

Структура эпителиоцитов конъюнктивы после введения ИС в дозе 150 ЕД/мл

При анализе эпителиоцитов конъюнктивы после введения ИС в дозе 150 ЕД/мл не было отмечено клеток с неповрежденной структурой (рис. 5, а, б). Ядро и органеллы в клетках не визуализировались. Цитоплазма была заполнена аутофагическими структурами (рис. 5, в, з). Отмеченные структурные изменения свидетельствуют о развитии аутофагической гибели эпителиоцитов конъюнктивы после воздействия большой дозы субтилизинов. Подобного рода изменения citoархитектоники, по нашему убеждению, следует расценивать как цитотоксическое действие, которое обусловлено накоплением высокоактивного протеолитического фермента в цитоплазме клеток. Цитоплазма была заполнена аутофагическими структурами, что является отражением аутофагической гибели клетки. По-видимому, ИС оказывал эффекты на уровне цитоплазмы клеток, вызывая стресс эндоплазматического ретикула, нарушение структуры органелл и активацию процессов аутофагии. Воздействие имело дозозависимый эффект и способствовало запуску процессов непрекращающегося аутофагического потока, приводящего клетки к аутофагической гибели. Данные изменения также можно расценивать, как подтверждение факта облегченного пиноцитоза иммобилизованного субтилизина внутрь клетки.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют, что введение ИГ в дозе 37 ЕД/мл в культуру клеток конъюнктивы оказывает влияние на ультраструктурную организацию клеток без цитотоксического воздействия. Увеличение концентрации ИГ увеличивает проницаемость клеточной мембраны, что способствует изменению структуры клеточной поверхности, и проницаемость мембран лизосом. При этом также имеет место отсутствие выраженных цитотоксических признаков. При введении ИС в дозе 37 ЕД/мл структура клеточной поверхности не изменялась, но при этом

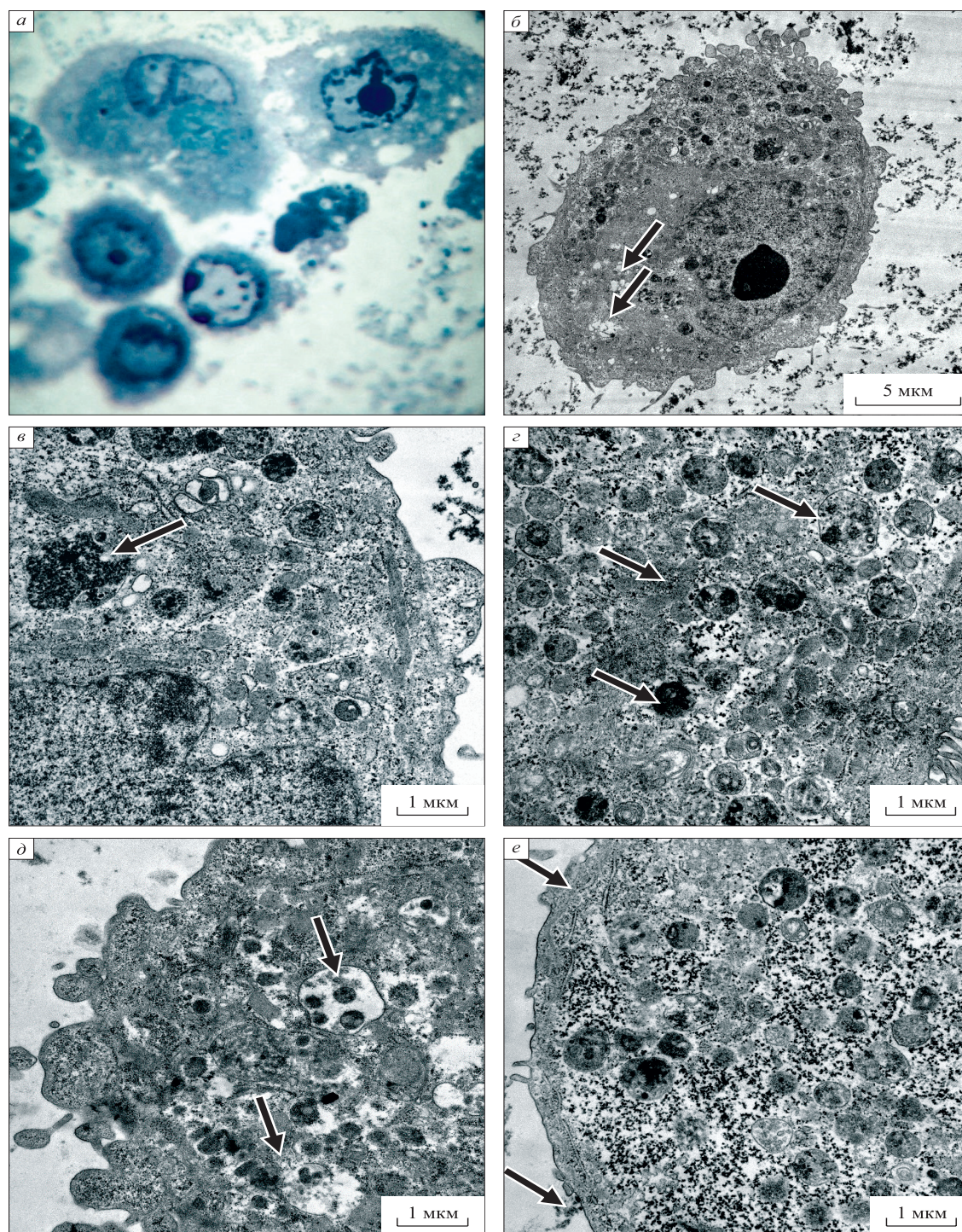


Рис. 3. Структура эпителиоцитов конъюнктивы после введения ИГ в дозе 150 ЕД/мл: а – эпителиоциты конъюнктивы; б – ультраструктура эпителиоцита конъюнктивы; увеличенные размеры цистерн комплекса Гольджи (стрелки); в – крупная аутолизосома в цитоплазме эпителиоцита (стрелка); г – аутолизосомы в цитоплазме эпителиоцитов конъюнктивы (стрелки); д – деструктивные лизосомы (стрелки) в цитоплазме эпителиоцитов конъюнктивы; е – сглаженная поверхность плазматической мембраны и отсутствие везикулярных структур в цитоплазме эпителиоцита конъюнктивы (стрелки)

Fig. 3. The structure of conjunctival epithelial cells after the administration of IG at a dose of 150 units/ml: а – epithelial cells of the conjunctiva; б – ultrastructure of the epitheliocyte of the conjunctiva, enlarged dimensions of the cisterns of the Golgi complex (arrows); в – large autolysosome in the cytoplasm of the epithelial cell (arrow); г – autolysosomes in the cytoplasm of conjunctival epithelial cells (arrows); д – destructive lysosomes (arrows) in the cytoplasm of conjunctival epithelial cells; е – smoothed surface of the plasma membrane and the absence of vesicular structures in the cytoplasm of the conjunctival epithelial cell (arrows)

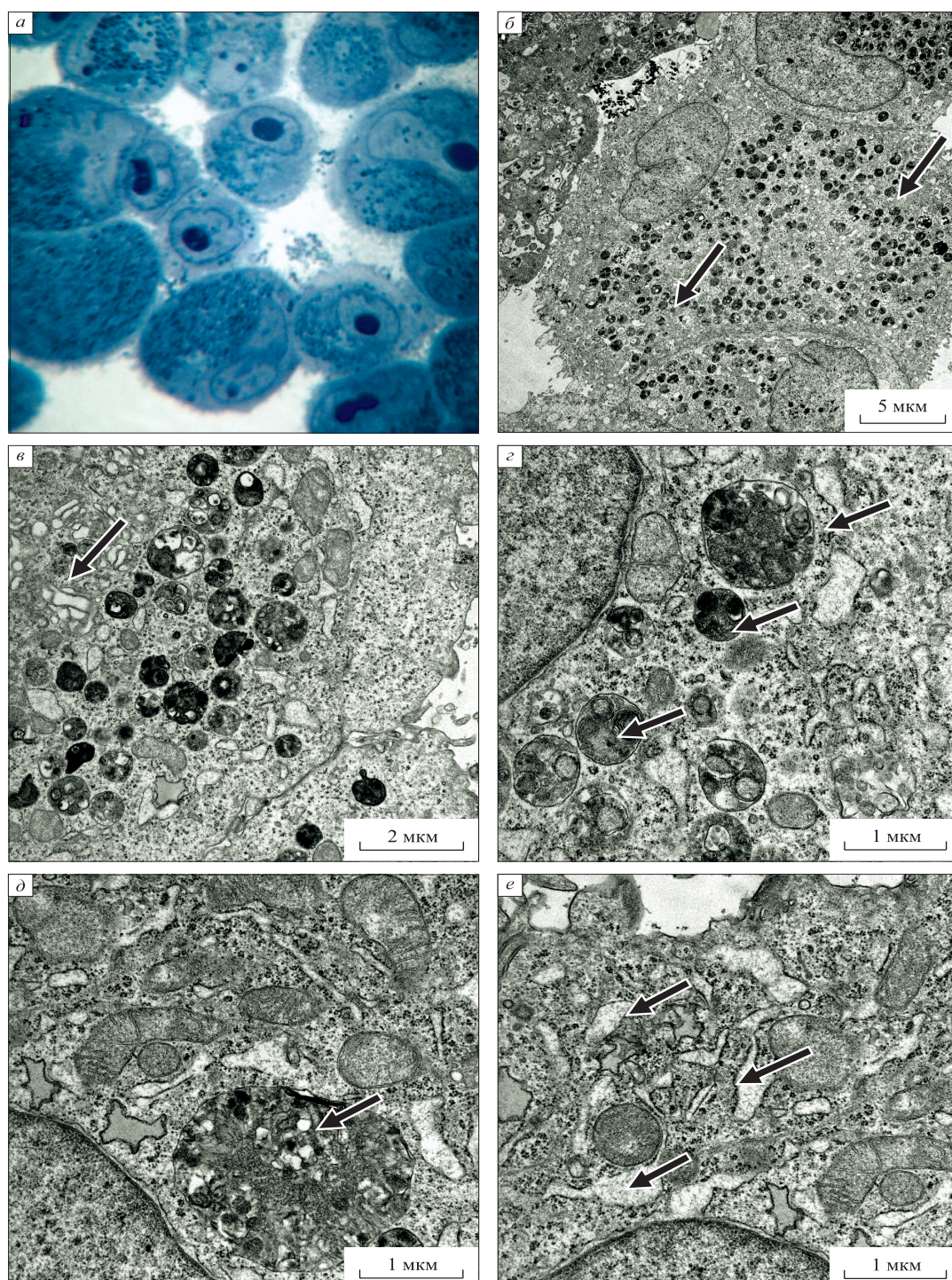


Рис. 4. Структура эпителиоцитов конъюнктивы после введения ИС в дозе 37 ЕД/мл: а – эпителиоциты конъюнктивы; б – ультраструктура эпителиоцитов конъюнктивы, большое содержание лизосомальных структур (стрелки); в – увеличенные размеры цистерн комплекса Гольджи (стрелки); г – аутолизосомы в цитоплазме эпителиоцитов конъюнктивы (стрелки); д – крупная аутолизосома в цитоплазме эпителиоцита (стрелка); е – расширенные цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума (стрелки) в цитоплазме эпителиоцитов конъюнктивы

Fig. 4. The structure of conjunctival epithelial cells after IS administration at a dose of 37 U/ml: a – epithelial cells of the conjunctiva; б – ultrastructure of conjunctival epithelial cells, high content of lysosomal structures (arrows); в – enlarged dimensions of the cisterns of the Golgi complex (arrows); г – autolysosomes in the cytoplasm of conjunctival epithelial cells (arrows); д – large autolysosome in the cytoplasm of the epithelial cell (arrow); е – expanded cisterns of the granular endoplasmic reticulum (arrows) in the cytoplasm of conjunctival epithelial cells

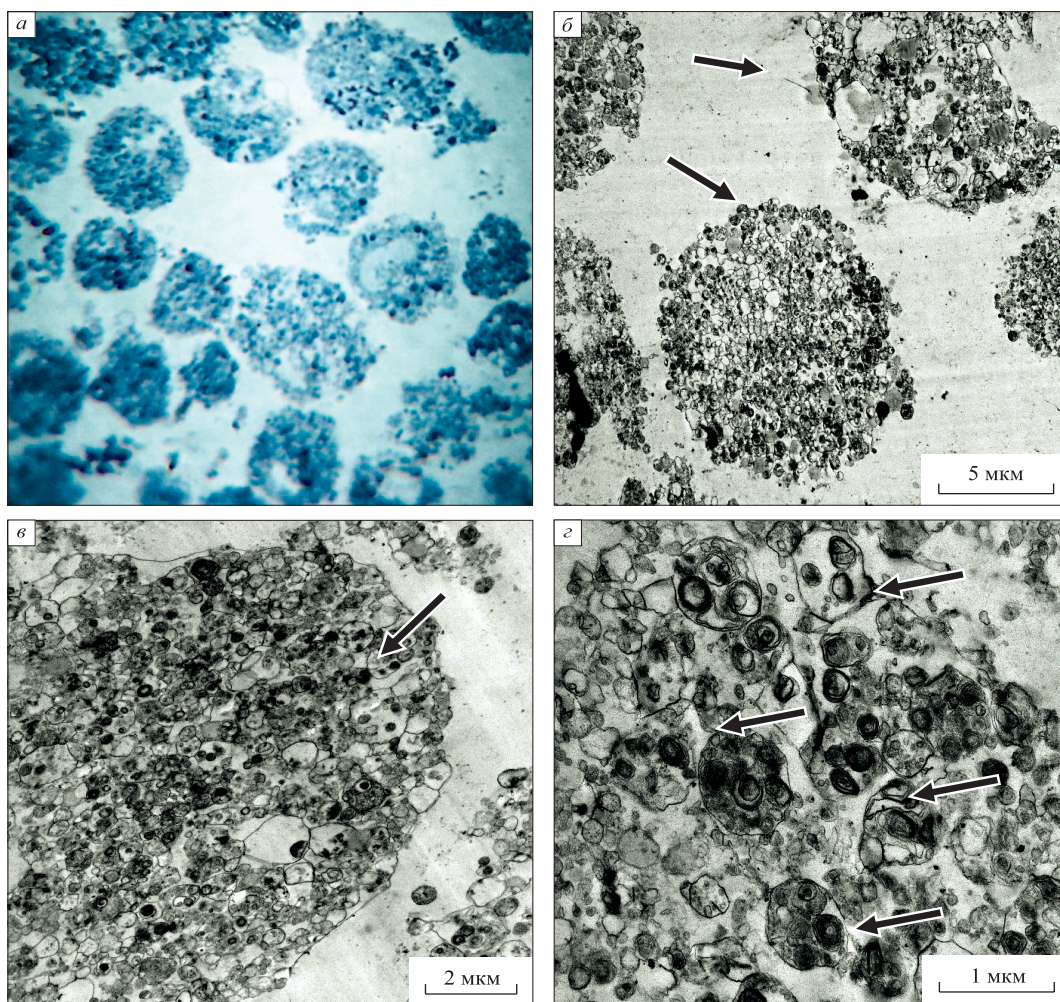


Рис. 5. Структура эпителиоцитов конъюнктивы после введения большой дозы субтилизинов: а – эпителиоциты конъюнктивы; б – ультраструктура эпителиоцитов конъюнктивы, деструктивные изменения клеток (стрелки); в – аутофагическая гибель эпителиоцита конъюнктивы (стрелка); г – аутолизосомы (стрелки) в цитоплазме эпителиоцита конъюнктивы

Fig. 5. The structure of conjunctival epithelial cells after a large dose of subtilisins: а – epithelial cells of the conjunctiva; б – ultrastructure of conjunctival epitheliocytes, destructive cell changes (arrows); в – autophagic death of conjunctival epithelial cells (arrow); г – autolysosomes (arrows) in the cytoplasm of the conjunctival epithelial cell

в цитоплазме отмечали структурные признаки стресса эндоплазматического ретикулума, что характеризует противовоспалительный потенциал эпителиальной клетки. Воздействие на эпителиоциты конъюнктивы ИС в дозе 150 ЕД/мл сопровождается выраженным цитотоксическим действием.

Список литературы / References

1. Cioni P., Gabellieri E., Campanini B., Bettati S., Raboni S. Use of exogenous enzymes in human therapy: approved drugs and potential applications. *Curr. Med. Chem.* 2022;29(3):411–452. doi: 10.2174/0929867328666210713094722

2. Hennigan J.N., Lynch M.D. The past, present, and future of enzyme-based therapies. *Drug Discov. Today.* 2022;27(1):117–133. doi: 10.1016/j.drudis.2021.09.004

3. Yari M., Ghoshoon M.B., Vakili B., Ghasemi Y. Therapeutic enzymes: applications and approaches to pharmacological improvement. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2017;18(7):531–540. doi: 10.2174/1389201018666170808150742

4. Sharma D.S.C., Lahiri M.A. Use of hyaluronidase in plastic surgery: A review. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 2021;74(7):1610–1614. doi: 10.1016/j.bjps.2021.03.125

5. Buhren B.A., Schrupf H., Gorges K., Reiners O., Bölke E., Fischer J.W., Homey B., Gerber P.A.

- Dose- and time-dependent effects of hyaluronidase on structural cells and the extracellular matrix of the skin. *Eur. J. Med. Res.* 2020;25(1):60. doi: 10.1186/s40001-020-00460-z
6. Weber G.C., Buhren B.A., Schrumpf H., Wohlrab J., Gerber P.A. Clinical applications of hyaluronidase. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019;1148:255–277. doi: 10.1007/978-981-13-7709-9_12
7. Мишенина С.В., Байкалов Г.И., Байкалова Н.Е., Макаров В.К., Мадонов П.Г. Обоснование применения иммобилизованных субтилизинов для таргетной терапии венозных тромбозов. *J. Sib. Med. Sci.* 2020;(1):76–88. doi: 10.31549/2542-1174-2020-1-76-88
- Mishenina S.V., Baikalov G.I., Baikalova N.E., Makarov V.K., Madonov P.G. A rationale for application of immobilized subtilisins for target therapy of venous thrombosis. *J. Sib. Med. Sci.* 2020;(1):76–88. [In Russian]. doi: 10.31549/2542-1174-2020-1-76-88
8. Мадонов П.Г., Момот А.П., Мамаев А.Н., Ройтман Е.В., Мишенина С.В. Неплазминовый фибринолиз субтилизинами. *Тромбоз, гемостаз и реол.* 2019;79(3): 24–31. doi: 10.25555/THR.2019.3.0886
- Madonov P.G., Momot A.P., Mamaev A.N., Roitman E.V., Mishenina S.V. Non-plasmin fibrinolysis with immobilized subtilisins. *Tromboz, gemostaz i reologiya = Thrombosis, Hemostasis and Rheology.* 2019;3(79):24–32. [In Russian]. doi.org/10.25555/THR.2019.3.0886
9. Эмедова Т.А., Макаров К.Ю., Мадонов П.Г., Соколова Т.М., Айдагулова С.В., Маринкин И.О. Позитивный эффект иммобилизованных субтилизинов при лечении хронической эстроген-индуцированной венозной недостаточности. *Сиб. науч. мед. ж.* 2017;37(4): 47–52.
- Emedova T.A., Makarov K.Yu., Madonov P.G., Sokolova T.M., Aidagulova S.V., Marinkin I.O. Positive effect of immobilized subtilisins at the treatment of estrogen-induced chronic venous insufficiency. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal.* 2017;37(4): 47–52. [In Russian].
10. Azrin N.A.M., Ali M.S.M., Rahman R.N.Z.R.A., Oslan S.N., Noor N.D.M. Versatility of subtilisin: A review on structure, characteristics, and applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2022. doi: 10.1002/bab.2309
11. Weng Y., Yao J., Sparks S., Wang K.Y. Nattokinase: an oral antithrombotic agent for the prevention of cardiovascular disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(3):523. doi: 10.3390/ijms18030523
12. Yuan L., Liangqi C., Xiyu T., Jinyao L. Biotechnology, bioengineering and applications of bacillus natto kinase. *Biomolecules.* 2022;12(7):980. doi: 10.3390/biom12070980
13. Hodis H.N., Mack W.J., Meiselman H.J., Kalra V., Liebman H., Hwang-Levine J., Dustin L., Kono N., Mert M., Wenby R.B., ... Whitfield L. Nattokinase atherothrombotic prevention study: A randomized controlled trial. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2021;78(4):339–353. doi: 10.3233/CH-211147
14. de la Fuente M., Lombardero L., Gómez-González A., Solari C., Angulo-Barturen I., Acera A., Vecino E., Astigarraga E., Barreda-Gómez G. Enzyme therapy: current challenges and future perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(17):9181. doi: 10.3390/ijms22179181
15. Мадонов П.Г., Ершов К.И., Дубровин А.В., Заполоцкий Е.Н., Мирошников П.Н., Шилова М.А., Киншт Д.Н. Электронно-лучевая модификация препаратов белковой природы для улучшения их фармакологических свойств. *Мед. и образ. в Сибири.* 2013;(4):40–52.
- Madonov P.G., Ershov K.I., Dubrov A.V., Zapolsky E.N., Miroshnikov P.N., Shilova M.A., Kinsht D.N. Electron-beam modification of preparations of the albuminous nature for improvement of their pharmacological properties. *Medsina i obrazovanie v Sibiri = Medicine and Education in Siberia.* 2013;(4):40–52. [In Russian].
16. Назаренко К.А., Хороших Ю.И., Запущаков И.В. Энзимотерапия в офтальмологии. *Вестн. офтальмол.* 2006;122(3):36–42.
- Nazarenko K.A., Khoroshikh Yu.I., Zapusakov I.V. Enzyme therapy in ophthalmology. *Vestnik oftal'mologii = The Russian Annals of Ophthalmology.* 2006;122(3):36–42. [In Russian].
17. Мадонов П.Г., Мишенина С.В., Киншт Д.Н., Кихтенко Н.В. Химические и фармакологические свойства субтилизинов. *Сиб. науч. мед. ж.* 2016;36(3):13–22.
- Madonov P.G., Mishenina S.V., Kinsht D.N., Kikhtenko N.V. Chemical and pharmacological properties of subtilisins. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal.* 2016;36(3):13–22. [In Russian].
18. Мадонов П.Г., Мишенина С.В., Киншт Д.Н., Кихтенко Н.В. Таргетная фармакодинамика субтилизинов. *Сиб. науч. мед. ж.* 2016;36(4):15–24.
- Madonov P.G., Mishenina S.V., Kinsht D.N., Kikhtenko N.V. Targeted pharmacodynamics of subtilisins. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal.* 2016;36(4):15–24. [In Russian].
19. Дыгай А.М., Першина О.В., Крупин В.А., Ермолаева Л.А., Ермакова Н.Н., Шилова М.А., Мадонов П.Г., Киншт Д.Н., Скурихин Е.Г. Изучение антифибротической активности модифицированной и нативной гиалуронидазы при пневмофиброзе. *Сиб. науч. мед. ж.* 2017;37(4):5–10.
- Dygai A.M., Pershina O.V., Krupin V.A., Ermolaeva L.A., Ermakova N.N., Shilova M.A., Madonov P.G., Kinsht D.N., Skurikhin E.G. Study of the antifibrotic activity of modified and native hyaluronidase at pulmonary fibrosis. *Sibirskij nauchnyj medicinskij*

zhurnal= *Siberian Scientific Medical Journal*. 2017;37(4):5–10. [In Russian].

20. Skurikhin E., Madonov P., Pershina O., Ermakova N., Pakhomova A., Widera D., Pan E., Zhukova M., Sandrikina L., Artamonov A., Dygai A. Micellar hyaluronidase and spiperone as a potential treatment for pulmonary fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22:5599. doi: 10.3390/ijms22115599

21. Șapte E., Costea C.F., Cărauleanu A., Dancă C., Dumitrescu G.F., Dimitriu G., Chihaiia M.A.,

Buzdugă C.M., Cucu A., Turliucet M.D. Histological, immunohistochemical and clinical considerations on amniotic membrane transplant for ocular surface reconstruction. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2017;58:363–369.

22. Dua H.S., Faraj L.A., Said D.G., Gray T., Lowe J. Human corneal anatomy redefined: A novel pre-Descemet's layer (Dua's Layer). *Ophthalmology*. 2013;120(9):1778–1785. doi: 10.1016/j.optha.2013.01.018

Сведения об авторах:

Виктория Евгеньевна Забанова, ORCID: 0000-0001-9879-8986, e-mail: vikazabanova@gmail.com,

Анжелла Жановна Фурсова, д.м.н., ORCID: 0000-0001-6311-5452, e-mail: anzhellafursova@yandex.ru

Наталья Анатольевна Бондаренко, к.б.н., e-mail: bond802888@yandex.ru

Наталья Петровна Бгатова, д.б.н., проф., ORCID: 0000-0002-4507-093X, e-mail: nataliya.bgatova@yandex.ru

Антон Владимирович Затеев, ORCID: 0000-0002-8863-2672, e-mail: zateev1997@mail.ru

Павел Геннадьевич Мадонов, д.м.н., ORCID: 0000-0002-1093-8938, e-mail: pmadonov@yandex.ru

Information about the authors:

Victoria E. Zabanova, ORCID: 0000-0001-9879-8986, e-mail: vikazabanova@gmail.com

Anzhella Z. Fursova, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0001-6311-5452, e-mail: anzhellafursova@yandex.ru

Natalya A. Bondarenko, candidate of biological sciences, e-mail: bond802888@yandex.ru

Nataliya P. Bgatova, doctor of biological sciences, professor, ORCID: 0000-0002-4507-093X, e-mail: nataliya.bgatova@yandex.ru

Anton V. Zateev, ORCID: 0000-0002-8863-2672, e-mail: zateev1997@mail.ru

Pavel G. Madonov, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-1093-8938, e-mail: pmadonov@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.10.2022

Принята к публикации 15.12.2022

Received 04.10.2022

Accepted 15.12.2022