

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РЯЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Кирсанова Ирина Владимировна

**Изучение особенностей цитокинового и свободнорадикального статуса и
возможностей его коррекции в экспериментальной модели ожога роговицы**

1.5.4. Биохимия

3.1.5. Офтальмология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, доцент

Щулькин Алексей Владимирович,

доктор медицинских наук, доцент

Колесников Александр Вячеславович

Рязань – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1. Биохимические свойства цитокинов и их роль в развитии офтальмологических патологий	15
1.1.1. Баланс цитокинов в роговице в норме.....	15
1.1.2. Биохимические и физиологические свойства провоспалительных и противовоспалительных цитокинов.....	18
1.1.3. Дисбаланс цитокинов в роговице при ее патологии	21
1.1.4. Дисбаланс цитокинов в роговице при термических и химических ожогах.....	24
1.1.5. Терапевтические подходы к коррекции дисбаланса цитокинов при термических и химических ожогах роговицы	28
1.2. Свободнорадикальные процессы в роговице, роль антиоксидантов в патогенезе и терапии ожогов роговицы.....	30
1.2.1. Свободнорадикальные процессы в роговице в норме и при ее патологии	30
1.2.2. Свободнорадикальные процессы в роговице при химических и термических ожогах.....	36
1.2.3. Эффективность применения антиоксидантов при терапии термических и химических ожогов роговицы	38
1.3. Возможность применения лактоферрина для коррекции биохимических и иммунологических нарушений при ожогах роговицы.....	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	48
2.1. Общая характеристика исследования	48
2.2. Экспериментальные модели	50
2.3. Методы исследования.....	51
2.4. Статистическая обработка результатов исследования.....	54
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	55

3.1. Разработка экспериментальной модели щелочного ожога роговицы	55
3.2. Разработка экспериментальной модели термического ожога роговицы	58
3.3. Особенности цитокинового и свободнорадикального статуса роговицы при ее щелочном ожоге	63
3.4. Особенности цитокинового и свободнорадикального статуса роговицы при ее термическом ожоге	67
3.5. Сравнение клинико-гистологических и биохимических изменений в роговице при щелочных и термических ожогах	70
3.6. Влияние лактоферрина на клиническую, гистологическую картину, цитокиновый и свободнорадикальный статус роговицы при ее щелочном ожоге	76
3.7. Влияние лактоферрина на клиническую, гистологическую картину, цитокиновый и свободнорадикальный статус роговицы при ее термическом ожоге	84
3.8. Сравнение влияния лактоферрина на клиническую, гистологическую картину, цитокиновый и свободнорадикальный статус роговицы при ее щелочном и термическом ожогах	93
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	100
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	109
ВЫВОДЫ	111
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	113
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	114
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	117

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Заболевания роговицы составляют не менее 1/4 всех глазных патологий [22]. Одним из наиболее тяжелых травматических повреждений органа зрения является ожог роговицы. Распространенность ожогов роговицы зависит от степени развития государства и производства, и составляет от 11,5 до 22,1% всех травм органа зрения [86,145]. Более 40% пострадавших от тяжелых ожогов становятся инвалидами 1–2 групп по зрению [20].

Несмотря на применение современных методов, результат лечения не всегда достигает поставленных целей, поэтому необходимо дальнейшее совершенствование терапевтических подходов [134]. Актуальным вопросом является разработка биохимических маркеров тяжести течения и изучение прогноза заболевания с целью раннего начала более агрессивного лечения, вплоть до применения хирургического подхода [144]. Для решения данных задач необходимо детальное изучение биохимических особенностей развития данной патологии.

В последнее время все большее внимание уделяется изучению цитокинового и свободнорадикального статуса роговицы, как одним из ключевых биохимических процессов, участвующих в патогенезе ее повреждений [119]. Показано, что от баланса провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, а также от выраженности окислительного стресса во многих случаях зависит исход заболевания [82]. Например, чрезмерное повышение провоспалительных цитокинов и активация свободнорадикальных процессов могут приводить к развитию перфорации роговицы, и наоборот, слабое повышение провоспалительных цитокинов и недостаточная продукция свободных радикалов вызывают хронизацию процесса и чрезмерное развитие соединительной ткани при инфекционных язвах роговицы [28,123,156]. Подобных критериев для асептических процессов (термических и химических повреждений)

на настоящий момент не разработано. Имеются лишь единичные сведения о биохимических изменениях при химических ожогах, а термические практически не изучены. Выявление данных особенностей позволит использовать их для прогнозирования течения патологий.

Доказательство важной роли баланса цитокинов и выраженности окислительного стресса в развитии термических и химических ожогов роговицы может послужить биохимическим обоснованием применения веществ, влияющих на данные процессы в качестве терапевтических агентов. С этих позиций особый интерес представляет лактоферрин (ЛФ), который кроме выраженного антибактериального действия проявляет и антиоксидантную активность [16], а также может оказывать влияние на баланс цитокинов [60,101,108,133,138].

Таким образом, изучение особенностей цитокинового и свободнорадикального статуса роговицы при ее термических и щелочных ожогах и оценка возможности их коррекции с помощью лактоферрина является актуальной проблемой биохимии и офтальмологии, решение которой позволит расширить представления о молекулярных механизмах данных патологий и разработать подходы их коррекции.

Степень разработанности темы

В многочисленных исследованиях была доказана важная роль продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов и окислительного стресса в патогенезе развития повреждений роговицы [72,114,150].

Накопление активных форм кислорода (АФК) и окислительный стресс играют важную роль в прогрессировании эндотелиальной дистрофии роговицы Фукса, кератоконуса, гранулярной дистрофии роговицы II типа (дистрофии Авеллино), поверхностной точечной кератопатии (кератопатии Тайджесона) и других патологий роговицы. Повреждение митохондриальной дезоксирибонуклеиновой кислоты (мДНК) и других макромолекул под действием АФК вызывает активацию p53-зависимого пути апоптоза клеток эндотелия

роговицы, что приводит к стромальному отеку и постепенной потере зрения при дистрофии Фукса [122]. Доказана роль окислительного стресса в патогенезе контузий глаза [136], повреждений, вызванных воздействием ультрафиолетового излучения, химических агентов, высоких температур и экстремально сухого воздуха, после проникающих ранениях глаза [93] и рефракционной хирургии [77]. Изучено содержание цитокинов при травмах глаза [9,13,25,91]. В единичных экспериментальных исследованиях было установлена активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [88,140,146], нитрозативного стресса [94] при щелочном ожоге роговицы. Ряд исследований доказали нарушение баланса некоторых цитокинов при щелочных ожогах роговицы [49,72,121,150].

При травме глаза идет активация провоспалительного потенциала через активный синтез интерлейкина-6 (IL-6), фактора некроза опухолей α (TNF- α) и интерлейкина-1 β (IL-1 β). Соответственно, препаратом выбора для коррекции данных нарушений могут быть лечебные моноклональные антитела, направленные на TNF- α или его рецептор. В модельном эксперименте травмы глаза на мышах использовали ребамипид как блокатор воспаления через подавление активности TNF- α [131]. В единичных исследованиях показана взаимосвязь между окислительным стрессом и продукцией ряда цитокинов при ожогах роговицы [69].

При термическом ожоге показана активация ПОЛ [53], однако баланс провоспалительных и противовоспалительных цитокинов не изучался.

На основании выявленной роли активации свободнорадикального окисления при развитии термического и химического ожогов были предприняты попытки применения антиоксидантов при терапии данных патологий [11,36,64,71,83,88,89,129,141,146,158]. Однако не все они оказались успешными [6,27,48].

Для коррекции воспалительных нарушений при ожогах роговицы чаще всего применяются глюкокортикоиды, которые наряду с противовоспалительным действием снижают резистентность к бактериальным инфекциям, что требует назначения антибактериальных препаратов [75].

Перспективным подходом для терапии данных патологий может явиться применение вещества, которое корректировало бы основные биохимические изменения, возникающие при термическом и химическом ожогах, а также профилактировало бы развитие инфекционных осложнений. С этих позиций выгодно отличается лактоферрин (ЛФ): сочетание антибактериальных [148] и антиоксидантных [99] свойств делает его перспективным препаратом для лечения ожогов глаз. Кроме того, ЛФ оказывает противовоспалительное действие путем угнетения синтеза конвертазы С3 системы комплемента [148].

Ранее на кафедре офтальмологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России было показано, что лактоферрин является эффективным средством для лечения гнойной язвы роговицы, которое снижало выраженность окислительного стресса, улучшало клиническое течение, снижало процент осложнений. Однако влияние на баланс цитокинов при данной патологии не оценивалось [16]. Логичным продолжением научных работ кафедры офтальмологии является оценка цитокинового и свободнорадикального статуса роговицы при щелочном и термическом ожогах и возможность коррекции данных нарушений с помощью лактоферрина.

Цель исследования

Изучить особенности цитокинового и свободнорадикального статуса роговицы и возможности его коррекции с помощью лактоферрина в экспериментальных моделях щелочного и термического ожогов.

Задачи исследования

1. Разработать экспериментальные модели щелочного и термического ожогов роговицы 3 степени.
2. Изучить особенности цитокинового и свободнорадикального статуса роговицы при ее щелочном ожоге.

3. Изучить особенности цитокинового и свободнорадикального статуса роговицы при ее термическом ожоге.

4. Сравнить цитокиновый и свободнорадикальный статус роговицы при ее щелочном и термическом ожогах.

5. Оценить влияние лактоферрина на клинико-гистологическую картину, цитокиновый и свободнорадикальный статус роговицы при ее щелочном ожоге.

6. Оценить влияние лактоферрина на клинико-гистологическую картину, цитокиновый и свободнорадикальный статус роговицы при ее термическом ожоге.

Научная новизна исследования

Разработана экспериментальная модель термических ожогов роговицы и модификация экспериментальной модели щелочных ожогов, соответствующие 3 степени ожогов по клинической офтальмологической классификации.

Установлено, что щелочной и термический ожоги роговицы сопровождаются развитием воспаления и окислительного стресса, однако, при щелочном ожоге окислительному повреждению подвержены в основном липиды и преобладают противовоспалительные цитокины, при термическом ожоге – окисляются преимущественно белки и преобладают провоспалительные цитокины.

Впервые доказано, что лактоферрин при местном применении при щелочном ожоге роговицы, ускоряет заживление дефекта, снижает выраженность окислительного стресса, влияет на баланс про- и противовоспалительных цитокинов.

Впервые установлено, что лактоферрин при местном применении при термическом ожоге роговицы, ускоряет заживление дефекта, снижает выраженность окислительного стресса, однако его применение приводит к чрезмерному разрастанию соединительной ткани за счет чрезмерного повышения уровня TGF-1 β .

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработан способ моделирования термического ожога роговицы (патент на изобретение № RU 2780945 С1, 04.10.2022), модификация способа моделирования щелочного ожога роговицы (рационализаторское предложение №1467 от 13.11.2024), которые позволяют воспроизводить патологию, соответствующую 3 степени ожогов по клинической офтальмологической классификации.

Установлены биохимические параметры, ассоциированные с течением щелочных и термических ожогов и их неблагоприятным прогнозом.

Обоснована актуальность использования антиоксидантных препаратов в лечении ожогов роговицы.

Изучено влияние раствора антиоксидантного препарата на основе лактоферрина на клинические, биохимические и морфологические параметры течения щелочных и термических ожогов роговицы в эксперименте.

Разработан способ лечения ожогов роговицы препаратом на основе лактоферрина человека, позволяющий ускорить процессы заживления и профилактировать развитие осложнений (патент на изобретение № RU 2766298 С2, 14.03.2022).

Методология и методы исследования

Работа выполнена *in vivo* с использованием кроликов-самцов породы «Советская Шиншилла». Воспроизведены щелочные и термические ожоги роговицы 3 степени. Для лечения ожогов, в конъюнктивальную полость закапывали раствор лактоферрина в концентрации 2,5 мг/мл по одной капле 3 раза в день. Контрольная группа получала закапывания физиологического раствора 3 раза в день.

Для контроля развития патологического состояния применялись стандартные офтальмологические методы: боковое освещение, проходящий свет, биомикроскопия, в том числе с фоторегистрацией, прямая офтальмоскопия,

бинокулярная офтальмоскопия.

Цитокиновый статус роговицы оценивали по концентрации провоспалительных (TNF- α) и противовоспалительных (интерлейкины-8, 10 и TGF-1 β) цитокинов. Выраженность окислительного стресса определяли по уровню конечных продуктов перекисного окисления липидов, в кислой среде реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактивных продуктов), карбонильных производных белков, активности антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы. Дополнительно проводили гистологическое исследование роговицы после ее фиксации в формалине, заливки в парафин, приготовления срезов и окраски их гематоксилином и эозином.

Полученные результаты анализировались с помощью программы «Statsoft Statistica 13.0» (США, номер лицензии JPZ811I521319AR25ACD-W). Характер распределения количественных переменных оценивался с помощью критерия Шапиро-Уилка. Так как во всех случаях распределение данных было отличным от нормального, для оценки статистической значимости применялись непараметрические критерии – при сравнении более чем двух групп критерий Крускала-Уоллиса, в дальнейшем попарные сравнения выполнялись с помощью критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Для сравнения двух выборок применяли критерий Манна-Уитни. При вероятности ошибки первого рода (p)<0,05 различия между группами считались статистически значимыми.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработаны экспериментальные модели термического и щелочного ожогов роговицы, клинически и гистологически соответствующие 3 степени ожога роговицы у человека.

2. Установлено, что щелочной и термический ожоги роговицы сопровождаются повышением уровня провоспалительных (TNF- α) и противовоспалительных (IL-10, TGF-1 β) цитокинов, а также активацией свободнорадикальных процессов, накоплением продуктов перекисного окисления

липидов и карбонилированных белков, снижением активности антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы. При щелочном ожоге окислительному повреждению подвержены в основном липиды (повышение ТБК-реактивных продуктов) и преобладают противовоспалительные (IL-10 и TGF-1 β) цитокины, при термическом ожоге – окисляются преимущественно белки (повышение карбонильных производных белков) и преобладают провоспалительные цитокины (TNF- α).

3. Обоснован биохимически ориентированный подход и доказана клинически и гистологически высокая эффективность местного применения лактоферрина при щелочном и термическом ожогах роговицы, проявляющаяся ускорением заживления, профилактикой развития осложнений (перфораций роговицы), снижением выраженности окислительного стресса, изменением баланса провоспалительных-противовоспалительных цитокинов. Однако применение лактоферрина при термическом ожоге также приводит к более грубому помутнению роговицы, что связано с повышенным уровнем TGF-1 β .

Соответствие диссертации паспортам научных специальностей

Диссертационное исследование соответствует паспортам научных специальностей: 1.5.4. Биохимия (медицинские науки) (пункт 2. Биохимия белков. Протеомика. Белковая инженерия. Структурная биология, пункт 11. Биохимические/метаболические/энергетические процессы в тканях и органах организма в норме и при патологии. Функциональная и клиническая метаболомика в норме и при патологии; и 3.1.5. Офтальмология (медицинские науки) (пункт 1. Изучение патогенеза, разработка и экспериментальное моделирование глазной патологии; пункт 6. Разработка, экспериментальная и клиническая апробация новых лекарственных препаратов, методов и схем фармакотерапии, генной и клеточной терапии заболеваний глаза).

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов исследования базируется на изучении и глубоком анализе фактического материала и статистической обработке полученных результатов с использованием адекватных методик медицинской статистики. Полученные выводы и практические рекомендации основаны на результатах, полученных в ходе исследования. В процессе работы подвергнуто анализу достаточное количество отечественных и зарубежных источников литературы.

Внедрение результатов в практику

Результаты исследования внедрены в образовательный процесс кафедры биологической химии, кафедры глазных болезней, кафедры фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, в работу Междисциплинарного научно-образовательного лабораторного центра (МНОЛЦ) ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, в практику работы кабинета неотложной офтальмологической помощи и 2-ого офтальмологического отделения Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Областная клиническая больница имени Н.А. Семашко» (ГБУ РО «ОКБ им. Н.А. Семашко»).

Личный вклад автора

Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно: проанализированы современные литературные источники по исследуемой проблеме, при участии автора сформулирована тема исследования, определены его цели и задачи, разработаны материалы и методы.

Автором самостоятельно разработаны и воспроизведены модели щелочного и термического ожогов роговицы 3 степени, осуществлено лечение указанных

патологий, проведена фотофиксация результатов исследования, проведен сбор и подготовка материалов для биохимического, гистологического исследования, проведена математическая и статистическая обработка полученных данных, выполнен анализ результатов, сформулированы выводы, практические рекомендации, написан текст диссертации и печатных работ, оформлены иллюстрации.

Апробация работы

Основные положения диссертации представлены и обсуждены на V Всероссийской конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2019), XLII Международной научно-практической конференции «Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования» (2020), Биохимических научных чтениях памяти академика РАН Е.А. Строева (Рязань, 2022), Пироговском офтальмологическом форуме (2022), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Федоровские чтения» (2023), 2-й Всероссийской научной конференции молодых ученых «Достижения современной фармакологической науки» (2023), IX Всероссийской научной конференции с международным участием молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине, взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2023), Республиканской конференции с международным участием «Актуальные вопросы офтальмологии» (2023), XIX Международной (XXVIII Всероссийская) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (2024), LXXXVI Ежегодной итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины» (2025), межкафедральном совещании кафедр биологической химии, фармакологии, управления экономики фармации, глазных болезней, центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,

кафедры офтальмологии Академии постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России (Рязань, 25.06.2025).

Работа поддержана грантом «УМНИК» (2019), внутривузовским грантом ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (2019).

Публикации по теме диссертации

По результатам диссертационной работы опубликовано 10 научных трудов, из них 6 статей в изданиях Перечня ВАК при Минобрнауки России, из которых 3 – в изданиях, входящих в международную цитатно-аналитическую базу данных Scopus. Получено 2 патента РФ на изобретение.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа построена по классическому плану и включает в себя следующие разделы: введение, глава 1 – обзор литературы, глава 2 – материалы и методы исследования, глава 3 – результаты исследования, глава 4 – обсуждение полученных результатов, заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений, список литературы.

Диссертация изложена на 137 страницах печатного текста, иллюстрирована 9 рисунками и 16 таблицами. Список литературы представлен 168 источниками, включая 41 отечественной и 127 зарубежной литературы.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность доктору медицинских наук, профессору Черданцевой Т.М., Шеломенцеву В.В. за помощь в выполнении гистологических исследований; доктору медицинских наук, доценту Абаленихиной Ю.В. – за помощь в освоении методик выполнения биохимической части исследования.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Биохимические свойства цитокинов и их роль в развитии офтальмологических патологий

1.1.1. Баланс цитокинов в роговице в норме

Цитокины – это группа растворимых белков с низкой молекулярной массой ($\approx 6\text{--}70$ кДа) [96] – клеточных сигнальных молекул, которые играют важную роль в межклеточной коммуникации при иммунных реакциях и стимулируют перемещение клеток к очагам воспаления, инфекции и травмы [135].

На практике точное определение концентрации цитокинов является сложной задачей из-за их следовых количеств (в диапазоне пмоль/л) в организме, динамических процессов их секреции и коротких периодов полураспада [132]. Цитокины образуют сложные сети, служащие для модуляции иммунных процессов; разные цитокины могут иметь антагонистическое, аддитивное или синергетическое влияние на один и тот же биологический процесс.

Наиболее часто используемые методы количественного определения цитокинов – твердофазный иммуноферментный анализ и полимеразная цепная реакция [35].

Цитокины можно разделить на несколько категорий. На основе их клеточного источника, цитокины классифицируются как цитокины 1 типа – продуцируются CD4-лимфоцитами Т-хелперами типа 1 (Th1 клетки). К цитокинам 1 типа относятся интерлейкин-2 (IL-2), IL-12, интерферон гамма (IFN- γ) и фактор некроза опухолей β (TNF- β). Цитокины 2 типа продуцируются CD4+ Т-хелперами типа 2 (Th2-клетки). К ним относятся – IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и IL-13 [135].

IL-1 в глазу продуцируется клетками Лангерганса, макрофагами, клетками конъюнктивы, эпителия и стромы роговицы, В-лимфоцитами. Данный цитокин принимает участие в дифференциации лимфоцитов, хемоаттракции, дегрануляции базофилов, секреции провоспалительных цитокинов, простагландинов, коллагена,

фибронектина, росте адгезивности сосудистого эндотелия, обладает прокоагулянтной активностью. В водянистой влаге IL-1 α определяется в концентрации 0,5–5 пг/мл, IL-1 β 0,7–24 пг/мл [10, 33].

Провоспалительные цитокины семейства IL-1 секретируются в виде белков-предшественников и активируются ферментом каспазой-1 (IL1-конвертазой) или матриксными металлопротеиназами. IL-1 является медиатором острого и хронического воспаления и является одним из первых цитокинов, выделяющихся в ответ на повреждение или проникновение патогена [110].

IL-2 в глазу секретируется активированными Т-лимфоцитами и натуральными киллерами (NK-клетками). Данный цитокин отвечает за дифференциацию Т- и В-лимфоцитов, активацию моноцитов и макрофагов, секрецию провоспалительных цитокинов. Концентрация во влаге передней камеры составляет примерно 1,42–24 пг/мл [33].

IL-4 образуется базофилами, Th2-клетками. Он отвечает за пролиферацию и дифференцировку Т- и В-лимфоцитов, снижение секреции IL-1, TNF, IL-6; рост цитотоксической активности и миграцию макрофагов, стимуляцию секреции колониестимулирующих факторов. Его концентрация во влаге передней камеры составляет 1,85–10 пг/мл [33,35].

IL-6 секретируется базофилами, макрофагами, эпителием роговицы и конъюнктивы, стромой роговицы, сосудистым эндотелием, Th2-клетками. Данный цитокин регулирует уровень воспаления, кроветворения, секрецию плазматических клеток, ингибирует синтез IL-1 и TNF и детектируется в водянистой влаге в концентрациях 5,8–438 пг/мл [33].

IL-8 образуется в строме роговицы, в макрофагах, в эндотелии сосудов. Он выполняет следующие биологические роли: хемотаксис нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, стимуляция ангиогенеза. Его концентрация во внутриглазной жидкости составляет 4,94–64 пг/мл [32,33].

IL-10 выделяется эпителием конъюнктивы и роговицы, Th2-клетками, моноцитами, макрофагами. IL-10 приводит к снижению продукции провоспалительных цитокинов, секреции антагониста рецепторов IL-1, снижению

адгезивности лейкоцитов. В передней камере его концентрация составляет 0,7–7 пг/мл. IL-10 ингибирует продукцию макрофагами всех провоспалительных цитокинов, в том числе TNF- α , IL-1, IL-6, снижает экспрессию рецепторов TNF- α и других интерлейкинов на естественных киллерах. Усиление продукции IL-10 ведет к снижению противомикробной защиты и развитию септических осложнений [5,33].

TNF секретируется макрофагами, Т- и В-клетками, эндотелием роговицы и конъюнктивы, трабекулярной сетью, базофилами. Провоспалительная активность TNF, схожа с IL-1 и IL-6, а концентрация в передней камере находится на уровне 0,88–3,1 пг/мл [33].

TNF (TNF- α) относится к группе цитокинов, которые могут вызывать гибель клеток (апоптоз). TNF- α является наиболее известным представителем этого класса. TNF – это цитотоксин моноцитарного происхождения, который участвует в регрессии опухолей, септическом шоке и кахексии. Белок синтезируется в виде предшественника с необычно длинной и нетипичной сигнальной последовательностью, которая отсутствует в зрелом цитокине. Короткий гидрофобный участок аминокислот служит для закрепления процитокина в липидных бислоях [143]. Активная форма TNF образуется после расщепления пропептида-[149].

Трансформирующий фактор роста β (TGF- β) – полифункциональный цитокин, экспрессия которого связана с физиологическими процессами роста, дифференцировки, регенерации и стрессовой реакцией во многих типах клеток организма. TGF- β играет важную роль в регуляции работы иммунной системы. Через белок Foxp3 он влияет на регуляторные Т-клетки и Т-хелперы 17-го типа. TGF- β блокирует активацию лимфоцитов и макрофагов [37]. Пропептид, или latency associated peptide (LAP), связан со зрелой молекулой TGF-1 β нековалентными взаимодействиями. Благодаря этому зрелая молекула белка TGF-1 β является биологически неактивной и хранится в экстрацеллюлярном матриксе. Активация TGF-1 β происходит путем отщепления пропептида LAP. Одним из факторов активации являются активные формы кислорода [149].

TGF-1 β вырабатывается макрофагами, клетками цилиарного тела и трабекулярной сети. Он ингибирует воспаление, рост эндотелия, ангиогенез, пролиферацию клеток цилиарного тела, синтез внеклеточного матрикса, активацию фибробластов. В передней камере содержится остаточное количество TGF-1 β , а концентрация трансформирующего фактора роста 2 β (TGF-2 β) составляет примерно 39,9 – 1680 пг/мл [33].

Таким образом, в нормальных условиях в тканях глаза присутствует ряд про- и противовоспалительных цитокинов.

1.1.2. Биохимические и физиологические свойства провоспалительных и противовоспалительных цитокинов

В зависимости от биологической роли, цитокины могут также быть разделены на провоспалительные или противовоспалительные. Провоспалительные цитокины – IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α и интерфероны усиливают воспалительный процесс и стимулируют иммунокомпетентные клетки. Противовоспалительные цитокины, такие как IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13, антагонист рецептора IL-1 и TGF- β , подавляют воспаление и подавляют иммунные клетки [51].

Один и тот же цитокин может секретироваться разными клетками и обладать как провоспалительной, так и противовоспалительной активностью в зависимости от контекста, создавая множественные иммунные ответы, например, IL-6 [31]. Следовательно, динамичный и постоянно меняющийся баланс между про- и противовоспалительными цитокинами играет существенную роль в патологических процессах.

Воспалительная реакция контролируется преимущественно цитокинами, которые вызывают острую фазу ответа для защиты организма от травм и инфекций. Эта реакция начинается с высвобождения провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ и TNF- α .

Эти цитокины оказывают как местное действие, на окружающие ткани, так

и системное: они могут поступать в системный кровоток, вызывая иммунную активацию клеток и значительные изменения в физиологии хозяина, такие как лихорадка и реакция острой фазы [51].

Провоспалительные цитокины, высвобождаемые макрофагами, имеют решающее значение для защиты против инфекций [127]. Макрофаги являются первой линией защиты хозяина от бактериальной инфекции, играя важную роль в запуске адаптивных иммунных реакций. Они стимулируются бактериальными продуктами и высвобождают несколько провоспалительных цитокинов, включая IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IFN- α/γ и TNF- α . Далее эти цитокины непосредственно участвуют в развитии воспалительных процессов. IL-1 оказывает прямое цитостатическое и цитоцидное действие *in vitro*, IL-6 считается основным медиатором иммунной системы и воспалительных реакций, IL-12 повышает реактивность Т-клеток, интерферон (IFN) опосредует защиту хозяина от вирусной инфекции [111].

Важно учитывать, что чрезмерный провоспалительный ответ может привести к хроническому воспалению и нарушению путей, ответственных за биологический гомеостаз, усугубляя течение заболевания [117].

Противовоспалительные цитокины, такие как антагонист рецептора IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13 и TGF- β , представляют собой серию иммунорегуляторных молекул, которые ингибируют избыточный воспалительный ответ провоспалительных цитокинов [117]. Например, IL-10 является мощным противовоспалительным цитокином с иммунорегуляторными функциями, которые ингибируют выработку нескольких провоспалительных цитокинов [127].

Противовоспалительные цитокины могут быть использованы в качестве терапевтических агентов для лечения воспалительных заболеваний. Однако цитокиновая терапия также имеет ряд ограничений [135]. При патологических состояниях эти противовоспалительные медиаторы могут чрезмерно компенсировать и подавлять иммунный ответ, подвергая хозяина риску генерализации инфекции. Хотя исследования показывают, что эндогенный IL-10

оказывает защитное действие при тяжелом сепсисе за счет снижения продукции TNF, чрезмерное количество IL-10 приводит к выраженному снижению уровня TNF и может иметь негативные последствия из-за ухудшения антибактериальной активности, обеспечиваемой TNF [43].

Таким образом, дисбаланс между тканевым гомеостазом и воспалительными цитокинами, а также нерегулируемый уровень про- и противовоспалительных цитокинов может привести к значительным негативным воздействиям на здоровье [117].

Цитокины модулируют баланс между гуморальными и клеточными иммунными реакциями, а также регулируют созревание, рост и реактивность определенных клеточных популяций. Цитокины действуют на клетку через рецепторы. Некоторые цитокины усиливают или ингибируют действие других цитокинов сложными способами. Одни цитокины могут вызывать высвобождение других цитокинов [127].

При активации системы распознавания патогенов также запускается синтез интерферонов I типа.

Интерфероны представляют собой группу сигнальных белков, вырабатываемых и высвобождаемых клетками-хозяевами в ответ на присутствие патогенов, таких как вирусы, бактерии, паразиты или опухолевые клетки. Инфицированная вирусом клетка выделяет интерфероны, заставляя близлежащие клетки усиливать свою противовирусную защиту [2].

Таким образом, при развитии патологического процесса, нарушается баланс между провоспалительными и противовоспалительными цитокинами. Влияние на уровни цитокинов при различных патологических состояниях, может иметь положительный терапевтический эффект.

1.1.3. Дисбаланс цитокинов в роговице при ее патологии

В ряде исследований изучено содержание цитокинов при травмах глаза. Оценка показателей иммунологической реактивности при травме глаза различной этиологии позволяет обнаружить, как на системном, так и на локальном уровне, ее изменения. В частности, гиперпродукция провоспалительных цитокинов коррелирует с тяжестью течения посттравматического процесса. При этом выявляемая разнонаправленность характера изменений цитокинового профиля на локальном и системном уровнях свидетельствует о преобладании роли местного иммунитета над системным при повреждении иммунологически привелигированного глаза [13].

При травме глаза идет активация провоспалительного потенциала через активный синтез IL-6, TNF- α и IL-1 β . Соответственно, препаратом выбора могут быть лечебные моноклональные антитела, направленные на TNF- α или его рецептор. В модельном эксперименте травмы глаза на мышах [131] использовали ребамипид как блокатор воспаления через подавление активности TNF- α . Было показано, что у животных, получавших ребамипид, уровень TNF- α в конъюнктиве был значительно ниже, чем в контрольной группе мышей, получавших плацебо (фосфатный буфер). Уровни IL-1 β и IL-1 α во всех исследуемых жидкостях и тканях глаза были сопоставимы в опытной и контрольной группах животных. Рана у мышей, получавших ребамипид, заживала быстрее, чем в контрольной группе.

По данным исследования Т.В. Гавриловой и соавт. (2013) [9], на 1-3-и сутки после проникающего ранения глаза, повышается уровень С-реактивного белка, IL-1 β , лактоферрина в крови, а также провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-8 по сравнению с контролем. Повышение продукции С-реактивного белка авторы связывали с увеличением его синтеза в печени под действием провоспалительных цитокинов, в частности IL-1. Параллельное нарастание уровня IL-8, обладающего мощной хемоаттрактантной активностью по отношению прежде всего к нейтрофилам, и лактоферрина, участвующего в кислородонезависимой

микробицидности этих клеток, по мнению авторов, отражало активацию гранулоцитарных лейкоцитов при повреждении тканей и структур глаза [91].

IL-1 и IL-6 при травмах глаза способны влиять на экспрессию факторов роста, таких как эпителиальный фактор роста (EGF), фактор роста кератоцитов (KGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), трансформирующий фактор роста (TGF) и тромбоцитарный фактор роста (PDGF). Эти факторы роста и цитокины вместе регулируют процессы заживления, включая клеточный апоптоз, миграцию, пролиферацию и дифференцировку. Закрывание раны также включает активацию протеаз, изменения белков внеклеточного матрикса и находится под влиянием нервной регуляции [110].

Взаимодействие внеклеточного матрикса с эпителием регулируют фазы заживления роговицы. Белки фокального контакта активируются в присутствии фибронектина, а это говорит о том, что внеклеточный матрикс инициирует и облегчает миграцию эпителиальных клеток в процессе заживления ран [18].

Факторы роста продуцируются локально в тканях глаза и играют гомеостатическую роль в поддержании состояния глазной поверхности. Исследования лечебных свойств факторов роста продемонстрировали, что некоторые из них, например, EGF, способны стимулировать пролиферацию или миграцию эпителиальных клеток роговицы. К сожалению, ряд этих факторов роста также имеют другие ростоподобные эффекты, которые могут быть нежелательны для роговицы. Например, TGF- β 2 ускоряет закрытие раны, но обладает ангиогенными свойствами [68]. TGF- β 2 и другие факторы роста, чрезмерно стимулируют процесс заживления до точки, способствующей стромальному фиброзу. PDGF способствует клеточной миграции и пролиферации, но требует присутствия фибронектина [126].

З.Х. Дикинов и соавт. (2013) изучили частоту выявления и динамику концентрации TNF- α , IL-1 β и неоптерина в слезной жидкости 93 пациентов с острыми посттравматическими увеитами различной локализации. Средние уровни TNF- α и IL-1 β коррелировали с выраженностью увеита, но у многих больных концентрации этих цитокинов были ниже уровня детекции. Даже через 3 месяца

после травмы, на фоне проводимой традиционной терапии, уровни TNF- α и неоптерина достоверно превосходили референсные значения. В это время средняя концентрация IL-1 β была также вдвое выше показателей здоровых доноров, но вариативность этого показателя и у здоровых участников исследования, и у пациентов с проникающими ранениями глаза делала это отличие недостоверным. Более высокий процент определения неоптерина в слезной жидкости авторы связывали как с большей продолжительностью жизни данного цитокина, так и с более высокой инертностью его продукции иммунокомпетентными клеткам. Острофазные цитокины TNF и IL-1, обладая коротким периодом жизни, не всегда адекватно отражают тяжесть воспалительного процесса, и частота их выявления значительно снижается в период стихания воспалительного процесса [7].

При проникающем ранении роговицы степень выраженности инфекционно-воспалительных поражений оболочек и структур глаза отрицательно коррелировала с концентрациями TNF- α во влаге передней камеры глаза, С-реактивного белка и циркулирующих иммунных комплексов в периферической крови. То есть чем меньше были эти показатели, тем более экспрессированными были проявления инфекционно-воспалительного процесса в оболочках и структурах глаза. Можно говорить о том, что именно относительный дефицит TNF- α во влаге передней камеры как главной молекулы активации местного клеточного врожденного и адаптивного иммунитета и С-реактивного белка как ведущей молекулы системного гуморального врожденного иммунитета является основой для активации инфекционно-воспалительного процесса в структурах глаза [25].

Полученные результаты показывают, что формированию инфекционных осложнений при травме роговицы способствуют дефицит регуляторных межклеточных мессенджеров, в частности TNF- α в реакциях локального иммунитета, дефицит молекул врожденного гуморального иммунитета и иммунокомплексное аллергическое воспаление.

Чем больше структур и оболочек глаза вовлечено в травматический процесс, тем меньше концентрация во влаге передней камеры глаза таких

цитокинов, как IL-6, IL-1 β , INF- α .

Таким образом, травмы и воспалительные заболевания глаз, приводят к дисбалансу цитокинов.

1.1.4. Дисбаланс цитокинов в роговице при термических и химических ожогах

Ряд авторов определял концентрацию цитокинов при щелочных ожогах роговицы. К.Т. Керимов и соавт. отмечали повышение уровня IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-4 в слезной жидкости, причем продукция этих же цитокинов в сыворотке крови была снижена, что свидетельствовало о решающей роли местного иммунитета над системным при данном виде травмы [13].

Первые семь дней после химического повреждения в глазу развивается острый воспалительный процесс [145]. Выраженная воспалительная реакция способствует инфильтрации лейкоцитов и макрофагов и, следовательно, выделению ферментов, таких как коллагеназы, металлопротеиназы [75]. Химические агенты, вызывающие некроз клеток роговицы, могут способствовать экспрессии воспалительных цитокинов и хемокинов. Острая воспалительная реакция часто продолжается до стадии рубцевания, что приводит к формированию помутнений роговицы.

Пролонгированная воспалительная реакция занимает центральное место в патогенезе поражения роговицы за счет амплификации лейкоцитов [33].

АФК через инфламмасомный путь индуцируют продукцию TNF- α поврежденным эпителием роговицы [69]. TNF- α является одним из первых медиаторов, образующихся после окислительного стресса в месте химической травмы глаза.

Связывание полипептида TNF- α с его рецепторами индуцирует и стимулирует врожденные и адаптивные иммунные клетки. Металлопротеаза превращает TNF- α в активную форму [43]. TNF- α начинает привлечение

нейтрофилов и макрофагов M1 в роговицу, а также активирует клетки врожденного иммунитета с помощью NF-κB пути [121]. После этого иммунные клетки производят другие воспалительные цитокины, такие как IL-1, IL-6, IL-8 и IL-18, что приводит к изменению в белках матрикса и ферментах [96].

Более того, Т-лимфоциты в ответ на хемокины постепенно воздействуют на поврежденную роговицу и усугубляют каскад воспаления. Этот каскад продолжается в течение 3 дней, пока противовоспалительный путь не ослабит сигналы воспаления [54].

Активированный NF-κB способствует активации про-IL-1β на ранних стадиях щелочного ожога роговицы у мышей.

Воспалительный путь необходим для продукции IL-1β из про-IL-1β (17,5 кДа). При травме глаза в нейтрофилах активируется семейство NLR – пириновых доменов, содержащих 3 белка (NLRP3), посредством распознавания эндогенных молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждениями. Далее, каспаза-1 – NLRP3 начинает протеолитическое расщепление и высвобождает IL-1β [89].

После щелочного повреждения роговицы, IL-1β активно экспрессируется в роговице, а также повышается экспрессия NLRP3 и каспазы-1.

Уровень IL-1β в водянистой влаге был повышен у кроликов, подвергшихся воздействию сернистого иприта, в сравнении с контрольной группой. Кроме того, уровень IL-1α был повышен у 128 ветеранов, подвергшихся воздействию иприта, от легкой до тяжелой степени поражения глаза [49].

IL-8 поддерживает воспалительные процессы за счет хемотаксиса нейтрофилов, базофилов и Т-лимфоцитов. IL-8, который выделяется эпителиальными и стромальными клетками, вызывает миграцию нейтрофилов после щелочных ожогов роговицы [121].

В исследовании И.А. Базикова и соавт. (2017) было показано, что развитие ожоговой раны обуславливает повышение уровня провоспалительных цитокинов. В сравнении с интактными животными на 3 сутки, количество IL-1β было повышено на 27%, на 7 сутки – на 62%, на 14 сутки – на 120%, на 21 сутки – на 43% ($p < 0,05$). На 3 и 7 сутки уровень TNF-α выросал в целом в 2 раза в

сравнении с интактными животными. Через 2 недели уровень TNF- α повышался на 70%, на 21-е сутки – на 40%, на 28-е сутки – на 34% ($p < 0,05$). Содержание IL-8 увеличивалось на 19% на 3-и сутки, и на 33% на 7 сутки в сравнении с интактными кроликами ($p < 0,05$). Через 3 и 4 недели содержание IL-8 было выше, чем у интактных кроликов, что превышало аналогичный показатель животных на 37% и 30% соответственно ($p < 0,05$). Такой уровень цитокинов обуславливал персистирующее воспаление без лечения и препятствовал нормальному заживлению раны при инфицированном химическом ожоге. У лабораторных животных с инфицированным щелочным ожогом, которым наносили ниосомальный антимикробный гель с пептидами, течение раневого инфицированного процесса было более благоприятным, чем в группе контроля [26].

Исследование C.C. Sotozono et al. (1997), показало, что при щелочных ожогах роговицы повышалась экспрессия мРНК IL-1 β , IL-6, IL-10 и TNF- α . Количественный анализ показал, что IL-1 α и IL-6 были сильно индуцированы на ранних стадиях ожога щелочью, пик продукции IL-1 α (53,2 пг/роговица) и IL-6 (23,6 пг/роговица) приходился на 3-й и 7-й дни соответственно. Выработка IL-10 и TNF- α не была значительно повышена в течение 42-дневного периода после ожога. Иммуногистохимические анализы показали, что как IL-1 α , так и IL-6 в основном были локализованы в регенерирующих эпителиальных базальных клетках. Авторы пришли к выводу, что уровни IL-1 α и IL-6 в роговице резко повышаются в регенерированном эпителии на ранних стадиях щелочного ожога и могут играть важную роль в сопутствующем повреждении и восстановлении роговицы [72].

М. Yuan et al. (2022) изучали роль лимфоцитов Т-хелпер 17 (Th17) в воспалении после ожогов роговицы у крыс. Уровни IL-1 β , IL-6 и TNF- α были значительно повышены во время острой фазы. Экспрессия IL-17A постепенно повышалась, начиная с 7-го дня и оставалась на относительно высоком уровне. Двойные положительные клетки, экспрессирующие CD4 и IL-17A были обнаружены в передней камере с 7 по 28-й день [150].

S.Y. Oh et al. (2010) изучали роль фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (MIF) в процессе заживления ран после тяжелых химических ожогов поверхности глаза. В проведенном ими исследовании экспрессия мРНК MIF, TNF- α и IL-1 β была значительно повышена на поверхности глаза вплоть до 30-го дня после нанесения химического ожога. В слезной жидкости повышался только уровень TNF- α . Авторы пришли к выводу, что MIF играет решающую роль в заживлении ран на поверхности глаза после индукции химических ожогов [157].

В последние годы появились исследования, показывающие, что тяжелые щелочные ожоги роговицы сопряжены с гибелью ганглионарных клеток сетчатки. Механизм не был ясен, пока E.I. Paschalis et al. в 2017 г. в эксперименте не выяснили, что повреждение сетчатки не вызвано прямым воздействием щелочи, которая эффективно буферизуется передним отрезком глаза. Изменения pH, содержания кислорода и окислительно-восстановительных процессов при щелочных ожогах ограничены роговицей и передней камерой, где они вызывали глубокое воспаление увеальной области и высвобождение провоспалительных цитокинов. Последние быстро распространяются в задний сегмент, вызывая повреждение сетчатки. TNF- α был идентифицирован как ключевой провоспалительный медиатор гибели ганглионарных клеток сетчатки. Блокада либо моноклональными антителами, либо нокаутом гена рецептора фактора некроза опухоли уменьшала воспаление и потерю ганглионарных клеток сетчатки [114].

Их выводы были подтверждены последующим исследованием C.H. Dohlman et al. (2018), которые показали, что диффузии воспалительных цитокинов (TNF- α и др.) при щелочных ожогах роговицы, может серьезно повредить ганглионарные клетки сетчатки. Своевременное лечение анти-TNF- α оказывает выраженное нейропротекторное действие [66].

Данных о влиянии термических ожогов роговицы на баланс цитокинов в доступной литературе обнаружить не удалось.

Таким образом, воздействие химических веществ на роговицу, приводит к повышенной продукции цитокинов и нарушению их баланса между

провоспалительными и противовоспалительными.

1.1.5. Терапевтические подходы к коррекции дисбаланса цитокинов при термических и химических ожогах роговицы

К. Tajima et al. (2018) предлагали в качестве препарата выбора для лечения ожогов роговицы лечебные моноклональные антитела, направленные на TNF- α или его рецептор. В модельном эксперименте травмы глаза на мышах использовали ребамипид, как блокатор TNF- α . Было показано, что у животных, получавших ребамипид, уровень TNF- α в конъюнктиве был значительно ниже, чем в контрольной группе мышей, получавших плацебо (фосфатный буфер). Уровни IL-1 β и IL-1 α во всех исследуемых жидкостях и тканях глаза были сопоставимы в опытной и контрольной группах животных. Рана у мышей, получавших ребамипид, заживлялась быстрее, чем в контрольной группе [131].

С. Sotozono et al. (1997) исследовали влияние синтетического ингибитора матричной металлопротеиназы (SIMP) на экспрессию воспалительных цитокинов в обожженных щелочью роговицах мышей. Уровни IL-1 α и IL-6 в роговице были значительно повышены на ранних стадиях после ожога щелочью. Уровни IL-1 α , IL-1 β и IL-6 были значительно ниже в группе, получавшей SIMP, чем в группе, получавшей носитель, через 7 дней после ожога. Однако уровни этих цитокинов были сходными в группах SIMP и не-SIMP на 4-й и 14-й дни. Уровни TNF- α не различались между обеими группами во всех сроках наблюдения после травмы [72].

Л.В. Ганковская и соавт. (1999) применяли комплекс цитокинов с IL-1, IL-6, TNF- α и TGF- α при ожогах глаз. Активность комплекса способствовала рассасыванию помутнений и пролиферации кератобластов при ожогах глаз [40].

J. He et al. (2023) на модели тяжелого щелочного ожога роговицы у крыс, показали способность биоактивного липидного медиатора Липоксина A4 (LXA4) уменьшать воспаление роговицы и неоваскуляризацию за счет ингибирования воспалительной инфильтрации лейкоцитов, снижения высвобождения цитокинов,

подавления ангиогенных факторов и стимулирования экспрессии генов репарации роговицы и поляризации макрофагов в крови. LXA4 снижает экспрессию генов и белков провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-6 и проангиогенных медиаторов матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9) и фактора роста эндотелия сосудов A (VEGFA) [109].

P. Dixon et al. (2018) тестировали возможность длительной доставки противовоспалительного, антифибротического препарата пирфенидона через контактные линзы, содержащие витамин E. Экспрессия генов воспалительного цитокина IL-1 β и профибротического фактора роста TGF- β 1 была значительно подавлена в роговицах, обработанных контактными линзами с пирфенидоном [70].

F. Cade et al. (2014) на экспериментальной модели щелочного ожога роговицы мыши, установили, что лечение анти-TNF- α -антителами (инфликсимаб, 6,25 мг/кг) уменьшает неоваскуляризацию роговицы и снижает поступление иммунных клеток в роговицу [47].

L. Chen et al. (2018) изучали влияние глазных капель с суспензией 0,05% такролимуса на экспрессию воспалительных цитокинов на модели щелочного ожога глаза крыс. Исследование проводилось на 84 крысах Wistar. Крысы были случайным образом разделены на три группы и получали либо физиологический раствор, либо 0,05% такролимус (0,5 мг/мл) четыре раза в день, либо субконъюнктивальную инъекцию анти-VEGF (0,5 мг/0,05 мл). На 3, 7, 14 и 28-й дни после травмы оценивали неоваскуляризацию роговицы, помутнение и дефекты эпителия, состояние воспаления и уровни провоспалительных и ангиогенных цитокинов. По сравнению с контролем, такролимус значительно снижал неоваскуляризацию роговицы на 7, 14 и 28-й дни после травмы, а анти-VEGF – на всех сроках наблюдения. Кроме того, такролимус ослабил воспалительную реакцию роговицы, а также значительно уменьшил помутнение роговицы и дефекты эпителия. Такролимус значительно снижал экспрессию IL-1 β , IL-6, моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1), макрофагального воспалительного белка-1 α (MIP)-1 α и TGF- β [153].

На модели щелочного ожога роговицы мышей было доказано, что блокирование NLRP3 оптимизирует восстановление прозрачности роговицы и снижает мРНК NLRP3, каспазы-1 и IL-1 β , а также сохраняет прозрачность роговицы [75].

IL-1 рассматривается как главный регулятор реакции роговицы на повреждение путем модулирования апоптоза кератоцитов, инфильтрации лейкоцитов и ангиогенеза [166]. Однако, как и в случае ряда других цитокинов, он может увеличивать риск васкуляризации раны и нейтрофильного повреждения тканей [77]. В лечении щелочного ожога роговицы у крыс, антагонист рецептора IL-1 купировал воспаление роговицы и улучшал прозрачность [110].

IL-6 способствует миграции клеток [90], однако, он не прошел клинических испытаний, по-видимому, из-за ожидаемых воспалительных нежелательных явлений.

Таким образом, в ряде работ изучены разные подходы влияния на эффекты цитокинов на течение щелочных ожогов роговицы, и в ряде из них были получены положительные результаты. Однако исследования данных процессов, в большинстве случаев, не вышли за рамки экспериментальных работ. Исследований по анализу цитокинового статуса при термическом ожоге роговице в доступной литературе обнаружить не удалось.

1.2. Свободнорадикальные процессы в роговице, роль антиоксидантов в патогенезе и терапии ожогов роговицы

1.2.1. Свободнорадикальные процессы в роговице в норме и при ее патологии

Роговица является важной частью оптической системы глаза: на нее приходится 80% преломляющей способности. Питание роговицы осуществляется из слезы, водянистой влаги и кровеносных сосудов краевой петливой сети. Роговица состоит из пяти слоев: эпителия, Боуменовой мембраны, стромы, Десцеметовой мембраны и эндотелия. Любое изменение в этих слоях приводит к

нарушению связи между ними и влияет на их функционирование [147]. Коллаген 1 типа является важным компонентом роговицы и составляет около 80% всех ее белков [81].

Роговица непрерывно подвергается воздействию кислорода, солнечного света, ультрафиолета, дыма и других токсичных загрязняющих воздух веществ, что приводит к образованию активных форм кислорода и развитию окислительного стресса в роговице [115]. Из-за постоянного повреждающего действия факторов внешней среды, роговица нуждается в надежной антиоксидантной защите [130]. Система антиоксидантной защиты любой клетки состоит из широкого спектра компонентов, включая как ферментативное, так и неферментативное звено. Неферментативные антиоксиданты представляют собой водорастворимые (например, аскорбиновая кислота и глутатион) или жирорастворимые (например, каротиноиды и витамины А и Е) молекулы, играющие важную роль не только в антиоксидантной защите, но и в поглощении ультрафиолетового излучения [67, 163].

Ферментативное звено включает первичную и вторичную линию защиты. Первичная ферментативная антиоксидантная линия защиты состоит из ферментов, которые действуют на начальные звенья цепи распространения окисления, предотвращая образование новых свободных радикалов путем удаления предшественников или ингибирования катализаторов данных процессов. Эти основные антиоксиданты включают такие ферменты, как супероксиддисмутаза (SOD), глутатионпероксидаза (GPX), каталаза (CAT) и пероксиредоксины (PRDXs). Для сравнения, вторичная ферментативная линия играет профилактическую и поддерживающую роль в антиоксидантной защите и может воздействовать на различные процессы, такие как дезактивация металлов, регенерация первичных антиоксидантов и поддержание восстановительной способности клеток. Она включает в себя метаболические ферменты, такие как транскетолаза (ТКТ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH); ферменты глутатион-окислительно-восстановительного цикла, такие как глутатионредуктаза (GSR) и

глутатионсинтетаза (GSS); селенопротеины и ферменты, связанные с тиоредоксином, такие как тиоредоксин и сульфиредоксин [62]. Как первичные, так и вторичные антиоксиданты являются важными составляющими глазной поверхности, хрусталика и сетчатки человеческого глаза.

SOD катализирует расщепление супероксидного аниона ($O_2^{\cdot-}$) до менее токсичного вещества пероксида водорода (H_2O_2) и является единственным ферментом, способным вступать в реакцию с $O_2^{\cdot-}$, и, таким образом, часто рассматривается как наиболее важный первичный антиоксидант системы антиоксидантной защиты роговицы [61]. В организме человека представлены три изоформы SOD, а именно супероксиддисмутаза 1 (SOD1), супероксиддисмутаза 2 (SOD2) и супероксиддисмутаза 3 (SOD3), которые различаются своим расположением (SOD1 находится в цитозоле, SOD2 – в митохондриях и SOD3 – во внеклеточном пространстве) и кофакторами (SOD1 и SOD3 используют Cu и Zn, в то время как SOD2 использует Mn) [163]. Изоформы SOD также обладают различной чувствительностью к ультрафиолетовому излучению и окислительному стрессу. Например, SOD1 легко подавляется воздействием ультрафиолета, в то время как SOD2 может быть индуцирована при окислительном стрессе, вызванном светом [155]. Из-за их различий некоторые авторы предполагают, что изоформы SOD выполняют различные функции в физиологии глаза. Эта гипотеза подтверждается тем фактом, что нокаутированные животные демонстрируют значительно отличающиеся фенотипы в зависимости от инактивированной изоформы [67]. Все три изоформы SOD присутствуют на поверхности глаза, причем SOD1 является наиболее часто встречающейся изоформой во всех тканях глаза, включая роговицу. В то время как SOD2 является второстепенной изоформой SOD в роговице человека, она в изобилии содержится в других тканях глаза млекопитающих и вызывает интерес из-за ее антиоксидантной функции в митохондриях и ее роли в предотвращении апоптоза, инициируемого повреждением митохондрий [155].

Поскольку H_2O_2 более стабилен, чем O_2 , он может диффундировать через гидрофобные мембраны и генерировать другие АФК, такие как $OH^{\cdot}$, вступая в

реакцию с ионами металлов. Следовательно, H_2O_2 представляет серьезную угрозу для функционирования клеток, и для его детоксикации задействованы многочисленные ферменты, такие как CAT, GPX и пероксиредоксин (PRDX) [85].

CAT – это гемосодержащий фермент, который катализирует расщепление H_2O_2 на O_2 и H_2O с использованием Mn в качестве кофактора. Он также защищает SOD от инактивации и может непосредственно участвовать в фильтрации ультрафиолетового излучения. CAT повсеместно экспрессируется в клетках млекопитающих, преимущественно в пероксисомах [67]. Однако, как в роговице, так и в склере CAT экспрессируется в низкой степени.

GPX катализирует ту же реакцию, что и CAT, восстанавливая H_2O_2 до H_2O , но используя восстановленный глутатион (GSH) в качестве донора электронов. Активность GPX зависит от регенерации GSH, которая осуществляется такими ферментами, как GSR и GSS, которые продуцируют GSH путем восстановления, окисленного глутатиона (дисульфид глутатиона, GSSG) или путем его синтеза *de novo*, соответственно [61,67]. У человека известно восемь изоформ GPX, и пять из них (глутатионпероксидаза-1 (GPX1), глутатионпероксидаза-2 (GPX2), глутатионпероксидаза-3 (GPX3), глутатионпероксидаза-4 (GPX4), глутатионпероксидаза-6 (GPX6)), требуют Se в качестве кофактора. Как и другие селенопротеины, семейство GPX следует иерархическому порядку поставок Se, наиболее предпочтительными изоформами являются GPX1 и GPX4 [59]. Шесть изоформ GPX экспрессируются на поверхности глаза, с преимущественным присутствием GPX1 и GPX4, в дополнение к GPX3 в склере. При сравнении экспрессии GPX и CAT в глазу показано, что GPX, а не CAT, может преимущественно осуществлять разложение H_2O_2 в роговице и склере. И наоборот, CAT может приобретать большее значение по сравнению с окислительно-восстановительной системой GSH, когда концентрация H_2O_2 увеличивается [139].

PRDX – это фермент, способный восстанавливать и детоксифицировать H_2O_2 с помощью своих окислительно-восстановительных структурных цистеинов без необходимости в специальных кофакторах [129]. У человека экспрессируются

шесть изоформ PRDX, а именно пероксиредоксин 1 (PRDX1) – пероксиредоксин 6 (PRDX6), и все они локализованы как в роговице, так и в склере. PRDX также могут обладать шапероноподобными и окислительно-восстановительными сигнальными свойствами, которые связывают их с процессами воспаления и старения [80].

Большая часть вторичных антиоксидантных ферментов роговицы относится к группе водорастворимых белков, ранее называемых кристаллинами, которые включают в себя очень разнообразные белки, такие как шапероны, метаболические ферменты и представители семейства белков теплового шока. Первоначально Й.Я. Берцелиус придумал это название в 1830 году для описания большого количества белков, присутствующих в хрусталике крупного рогатого скота [45]. Позже было обнаружено, что кристаллины также присутствуют в роговице и, в меньшем количестве, в некоторых тканях за пределами глаза [116]. В глазу их основная функция заключается в обеспечении хрусталику и роговице необходимой прозрачности и показателя преломления для адекватного проведения и преломления света. Интересно, что кристаллины в глазу также выполняют дополнительные функции, связанные с фильтрацией ультрафиолетового излучения, предотвращением денатурации белков и детоксикацией АФК [155]. Многофункциональность кристаллинов обусловлена феноменом, называемым “совместное использование генов”, который возникает, когда ген кодирует белок, который выполняет разные функции в зависимости от его концентрации и характера экспрессии [45]. Это открытие расширило знания о кристаллинах [162].

Одним из таких, так называемых ферментативных кристаллинов, является семейство альдегиддегидрогеназ (ALDH), которые регулируют метаболизм альдегидов и выполняют функцию кристаллинов.

В тканях глаза экспрессируются только изоформа альдегиддегидрогеназы 1A1 (ALDH1A1) и изоформа альдегиддегидрогеназы 3A1 (ALDH3A1) [76]. ALDH3A1, которая является ведущим антиоксидантным ферментом роговицы, составляет от 5 до 50% от общей водорастворимой белковой фракции эпителия

роговицы.

Суперсемейство ALDH катализирует никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН)-зависимое окисление широкого спектра эндогенных и экзогенных токсичных альдегидов и участвует в антиоксидантной защите, непосредственно поглощая АФК и косвенно продуцируя никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный (НАДФН₂). Хотя ALDH3A1 считается цитозольным белком, он также был обнаружен в клеточном ядре, что позволяет предположить, что он также может защищать дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) от окислительного повреждения [76]. В то время как ALDH3A1 экспрессируется почти исключительно в роговице и склере, ALDH1A1 присутствует во всех тканях глаза, за исключением сетчатки, и высоко экспрессируется в роговице, опережая другие распространенные ферменты, такие как SOD. Эти результаты подтверждают идею о том, что роговице требуется большее количество антиоксидантов, чем другим частям глаза, для поддержания своей функции фильтрации и защиты от ультрафиолетового излучения.

Ферменты транскетолаза (ТКТ) и GAPDH в большом количестве содержатся в роговице и также признаны кристаллинами. ТКТ является вторым по распространенности вторичным антиоксидантным ферментом сразу после ALDH3A1. ТКТ участвует в пентозофосфатном пути, а GAPDH – в гликолизе [161]. Пентозофосфатный путь и гликолиз являются тесно связанными процессами, которые генерируют рибозо-5-фосфат (необходимый строительный материал для синтеза РНК (рибонуклеиновой кислоты)) и аденозинтрифосфат, посредством окисления глюкозы, соответственно. Оба пути также генерируют НАДФН₂, который является основным восстановителем клетки, поэтому такие ферменты, как ТКТ и GAPDH, выполняют дополнительную антиоксидантную роль, стимулируя выработку НАДФН₂ [155].

Следует отметить, что в роговице значительную роль играют так же другие кристаллины, которые не являются ферментативными, например, шапероны, активность которых является фундаментальной для предотвращения агрегации белков и поддержания прозрачности роговицы [116]. В некоторых случаях

шапероны также предотвращают окислительный стресс, сохраняя структуру антиоксидантных ферментов, например, αВ-кристаллин уменьшает агрегацию мутантного SOD1 при семейном боковом амиотрофическом склерозе и обеспечивает его антиоксидантную активность [137].

Таким образом, в роговице имеется мощная антиоксидантная система, которая обеспечивает защиту роговицы и нижележащих тканей глаза от воздействия УФ-излучения и АФК.

1.2.2. Свободнорадикальные процессы в роговице при химических и термических ожогах

Окислительный стресс – это дисбаланс между продукцией свободных радикалов и антиоксидантной системой защиты, емкости которой не хватает для нейтрализации возросшего количества прооксидантов (АФК), что, в свою очередь, приводит к нарушению окислительно-восстановительного баланса, а также повреждению биомакромолекул, перекисному окислению липидов, окислительной модификации белков и окислительному повреждению ДНК [78].

Свободные радикалы, образующиеся в умеренных концентрациях во время клеточного дыхания, участвуют в важнейших сигнальных процессах и системе иммунной защиты, высвобождаясь фагоцитами для защиты от патогенов. Однако, когда активные формы не нейтрализуются антиоксидантами в достаточной степени, возникает окислительный стресс, приводящий к различным состояниям в клетке, таким как перекисное окисление липидов, окислительные повреждения ДНК и модификация белков [78].

За последние годы появилось большое количество исследований, показывающих важную роль окислительного стресса в патогенезе ожоговой болезни глаз.

Установлено, что сразу после воздействия щелочи на ткань роговицы усиливается образование активных форм кислорода [88]. В норме повышенная продукция АФК компенсируется активацией защитных антиоксидантных

ферментов, тогда как при ожогах данный баланс нарушается, что приводит к избытку свободных радикалов. В эпителии роговицы детектируются такие важные маркеры перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков, как малоновый диальдегид (МДА) и нитротирозин (NT), при этом, уровень антиоксидантного фермента альдегиддегидрогеназы снижается [146]. Так же после моделирования ожога, в роговице значительно уменьшается активность GPX – одного из основных антиоксидантных ферментов [140]. Аналогичные результаты были получены и в работе I.A. Salman et al. (2011): активность GPX снижается на 10 день после моделирования ожогов по сравнению с показателями интактных животных, что делает роговицу восприимчивой к повреждающему действию прооксидантов [140].

Антиоксидантная активность слезы – показатель выраженности окислительного стресса в переднем отрезке глаза – при ожогах роговицы на всех сроках наблюдения остается сниженной, а ее минимальные значения приходятся на 7–14 сутки – период максимальных клинических проявлений воспаления [88].

Было показано уменьшение активности другого антиоксидантного фермента – SOD при щелочном ожоге роговицы [89]. V. Chayakul et al. (1982) также показали, что активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы значительно снижается в эпителии и отсутствует в строме роговицы после щелочного ожога. Таким образом, расщепление глюкозы будет осуществляться по пути Эмбдена-Мейерхоффа, а не через пентозофосфатный путь, что приведет к уменьшению уровня НАДФН₂ и снижению емкости антиоксидантной системы защиты [65].

Работ по оценке состояния оксидантной-антиоксидантной систем роговицы при термических ожогах в доступной литературе обнаружено не было.

Таким образом, гиперпродукция свободных радикалов и развитие окислительного стресса играют важную роль в патогенезе развития химических ожогов роговицы. В то же время свободнорадикальный статус роговицы при термических ожогах, на данный момент, мало изучен и требует уточнения.

1.2.3. Эффективность применения антиоксидантов при терапии термических и химических ожогов роговицы

Учитывая важную роль окислительного стресса в патогенезе развития щелочных ожогов, в ряде исследований были предприняты попытки применения антиоксидантов – веществ, снижающих продукцию или инактивирующих свободные радикалы, в терапии.

S. Altan et al. (2017) оценивали эффективность применения известных антиоксидантных и противовоспалительных средств индометацина и диметилсульфоксида в терапии ожогов роговицы, вызванных 2% плавиковой кислотой. Исследование, выполненное на правых глазах 72 кроликов-самцов, показало, что диметилсульфоксид эффективно индуцировал реэпителизацию при легких ожогах глаз плавиковой кислотой, тогда как 0,1% индометацин как сам по себе, так и при совместном применении с диметилсульфоксидом, мало влиял на реэпителизацию и усугублял воспаление [48].

J.L. Alio et al. (1995) для местного лечения щелочных ожогов роговицы использовали 0,5% раствор диметилтиомочевина и 0,2% раствор SOD. Было показано, что диметилтиомочевина эффективна в подавлении воспаления роговицы, а SOD – в уменьшении количества язв на роговице [50].

В исследовании на 80 новозеландских кроликах-альбиносах была доказана противовоспалительная активность 0,5% раствора диметилтиомочевина и 1% индометацина в лечении щелочных ожогов роговицы [107].

M. Kubota et al. (2011) на модели щелочного ожога роговицы мышей, показали эффективность тридцатиминутного орошения поврежденной щелочью роговицы H_2 (водород)-обогащенным ирригационным раствором. Происходило значительное снижение уровня VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), MCP-1 и конечной площади неоваскуляризации роговицы. Авторы пришли к выводу, что окислительный стресс является пусковым механизмом развития неоваскуляризации роговицы при ожогах, а орошение H_2 -обогащенным ирригационным раствором может являться одним из перспективных методов

фармакотерапии [88]. Их выводы были подтверждены последующими исследованиями С. Sejka et al. (2015), которые использовали данный подход для лечения более тяжелых щелочных ожогов роговицы кроликов. В поврежденных щелочью роговицах, обработанных H_2 -обогащенным ирригационным раствором, экспрессия провоспалительных цитокинов, пероксинитрита (ONOO), определяемого по остаткам нитротирозина (NT), и малонового диальдегида (МДА) была очень низкой или отсутствовала по сравнению с поврежденной роговицей, обработанной физиологическим раствором с фосфатным буфером, где детектировались NT и МДА. H_2 -обогащенный ирригационный раствор благоприятно влиял на заживление роговицы после щелочного повреждения за счет подавления окислительного стресса. Вызванные щелочью повреждения роговицы заживали с восстановлением прозрачности без рубцов и неоваскуляризации [64].

Р. Zeng et al. (2015). изучили эффективность местной терапии щелочного ожога роговицы мышей фасудилом (ингибитор Rho-ассоциированной протеинкиназы и вазодилататор). Полученные авторами результаты свидетельствуют о том, что тестируемое вещество снижает продукцию АФК в эпителии и строме роговицы после щелочного ожога, уменьшает процентную долю области эпителиального дефекта роговицы по отношению ко всей роговице, увеличивает скорость эпителизации дефекта и снижает ее неоваскуляризацию [83].

Ј. Sejkova et al. (2013) продемонстрировали подавление окислительного повреждения в роговице кролика при моделировании щелочного ожога путем использования мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, растущих на каркасах нановолокон, перенесенных на поверхность роговицы. Данный способ лечения подавлял образование токсического пероксинитрита, понижал апоптотическую гибель клеток и уменьшал продукцию матриксной металлопротеиназы и провоспалительных цитокинов [146].

Регенерирующие агенты (RGTA) представляют собой биополимеры, сконструированные для замены гепарансульфатов, путем химического замещения

декстрана. RGTA усиливали реэпителизацию и улучшали прозрачность роговицы, сокращая продукцию H_2O_2 . Применение RGTA подавляло дисбаланс антиоксидант/прооксидант и ускоряло восстановление толщины роговицы. При лечении ожогов роговицы щелочью высокой концентрации, RGTA значительно снижали воспаление и неоваскуляризацию роговицы в сравнении с контролем [146].

W. Sekundo et al. (2002) на двадцати крысах Wistar, показали эффективность топического применения антиоксидантов аллопуринола (0,4% раствор) и ацетилцистеина (8% раствор), 1% раствора преднизолона ацетата в форме глазных капель в лечении щелочных ожогов роговицы [141].

Е.С. Kim et al. (2012) исследовали ранозаживляющий эффект глазных капель с ретинилпальмитатом на модели щелочного ожога роговицы крыс. Животные были разделены на 2 группы: первую группу лечили ретинилпальмитатом и левофлоксацином, а вторую – только антибактериальным препаратом. Заживление ран роговицы было лучше в группе витамина А, чем в контрольной группе [158].

J. Li et al. (2021) было обнаружено, что витамин С также способствует заживлению ран роговицы мышей после ожогов щелочью. Однако конкретный механизм и функциональные режимы до сих пор неясны. В группе животных, получавших лечение витамином С, дефекты эпителия, неоваскуляризация и помутнения роговицы были значительно меньше по сравнению с контрольной группой [129].

Еще один неферментативный антиоксидант, коэнзим Q, так же может оказывать положительный эффект на различные повреждения роговицы. R. Mencucci et al. (2014) оценили потенциальные защитные эффекты коэнзима Q10 на клетки роговицы человека после воздействия ультрафиолетового излучения и на модели заживления зон деэпителизации на глазах кроликов после удаления эпителия роговицы. В клетках роговицы человека, облученных ультрафиолетовым излучением, добавление коэнзима Q10 привело к увеличению выживаемости и митохондриальной функции, которую оценивали с помощью 3-

2,5-дифенил-тетразолия и высвобождения лактатдегидрогеназы. На модели удаления эпителия роговицы через 12 часов после операции у животных, получавших коэнзим Q10, показано уменьшение поврежденной области по отношению к контролю [71].

П.В. Макаров и соавт. (2005) при изучении эффективности перорального применения антиоксидантного препарата Иммуген (комплекс альфа-токоферола, убихинона, аспартата селена, метионина и соевых фосфолипидов) на модели тяжелого щелочного ожога роговицы кроликов, показали, что добавление данного препарата в корм кроликам оказывает значительное положительное влияние на параметры локальной антиоксидантной системы глаза и вызывает повышение активности SOD и CAT [11].

Таким образом, многие авторы отмечали положительный терапевтический эффект применения антиоксидантов для лечения ожогов глаз, однако, они до сих пор не нашли широкого практического применения в терапии данной патологии.

1.3. Возможность применения лактоферрина для коррекции биохимических и иммунологических нарушений при ожогах роговицы

Лактоферрин (ЛФ) – железосвязывающий гликопротеин, представитель семейства белков трансферринов. В его состав входит около семисот аминокислотных остатков. Одиночная полипептидная цепь собрана в два симметричных шаровидных N- и C-концевых полипептидных фрагмента, которые соединены α -спиралью. Каждый из этих фрагментов способен связывать по одному иону железа [159].

Впервые он был выделен из коровьего молока в 1939 году датским биохимиком С.П.Л. Сёренсеном. ЛФ естественным образом вырабатывается и секретируется эпителиальными клетками слизистой оболочки и нейтрофилами различных видов млекопитающих, включая человека. В частности, он содержится в таких жидкостях, как слюна, молоко, слеза и секретируется различными

органами, включая молочную железу, матку, почки и мозг [159]. Пьер Люсьен Массон и соавт. в 1966 году впервые обнаружили присутствие ЛФ в слезной жидкости [112].

ЛФ составляет 25% от общего количества белков слезы со средней концентрацией у здоровых людей около 1,42 мг/мл. Большая его часть секретируется основной слезной железой [44]. Сочетание антибактериальных и антиоксидантных свойств делает ЛФ перспективным препаратом для лечения системных заболеваний. В ряде исследований были доказаны его противовирусные и противовоспалительные свойства, а также способность ускорять заживление ран кожи. ЛФ обладает как бактериостатическими, так и бактерицидными свойствами, в связи с чем он является важным компонентом неспецифической системы защиты глаза человека [148]. Бактерицидное действие обусловлено способностью ЛФ непосредственно взаимодействовать с поверхностью бактериальной стенки, связываясь с анионным липидом А липополисахарида клеточной стенки. В результате такого взаимодействия повреждается бактериальная мембрана [95].

Кроме того, ЛФ изолирует ионы железа, необходимые для роста патогенных микроорганизмов, тем самым также уменьшая степень инфекционных осложнений. ЛФ может хелатировать два иона железа с высоким сродством при низких значениях pH, даже около 3, типичных для воспаленных или инфицированных участков [87].

В экспериментальных работах была доказана антибактериальная активность ЛФ в отношении таких бактерий, как *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus species*, *Staphylococcus species* и *Pseudomonas species* [95].

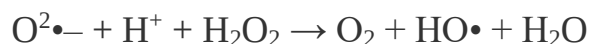
Имеются данные о том, что ЛФ контролирует чрезмерные воспалительные реакции путем снижения окислительного стресса на молекулярном уровне [102]. В химической реакции, приводящей к образованию АФК, участвуют ионы железа [106]. ЛФ считается белком-антиоксидантом благодаря своей способности связывать железо [57]. Следовательно, при таком связывании железа ЛФ

регулирует физиологический гомеостаз АФК и защищает клетки от окислительного повреждения [106]. Кроме этого, активируя экспрессию CAT, GPX и SOD, ЛФ также может снижать уровень АФК [79]. В нормальной ситуации эти три фермента работают вместе, чтобы инактивировать радикалы: SOD действует первым и превращает $O_2^{\cdot-}$ в перекись водорода. Позже CAT и GPX преобразуют H_2O_2 соответственно в H_2O и O_2 [99]. Ситуация меняется в присутствии избытка свободного иона железа (Fe^{3+}): в этом случае $O_2^{\cdot-}$ проходит неферментативную деградацию, состоящую из двух стадий. Вначале супероксидный радикал вступает в реакцию с ионом железа (Fe^{3+}), и в результате образуются два продукта: ион железа (Fe^{2+}) и молекулярный кислород: $Fe^{3+} + \bullet O_2^- \rightarrow Fe^{2+} + O_2$.

На этом этапе начинается вторая часть реакции с ионом железа (Fe^{2+}), который вступает в реакцию с пероксидом водорода, при этом образуются три продукта: ион железа (Fe^{3+}), спирт и гидроксильный радикал ($\bullet OH$). Эта вторая часть также известна как реакция Фентона: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \bullet OH$ [99].

Реакция Фентона является первым этапом – иницированием реакции Хабера – Вейса – процесса, в ходе которого из пероксида водорода (H_2O_2) и супероксида ($\bullet O_2^-$) генерируется гидроксил-радикал ($HO\bullet$).

После реакции Фентона происходит 2 стадия – размножение, так же протекающая посредством двух последовательных стадий:



Последняя стадия – завершение. Цепь обрывается, когда гидроксильный радикал поглощается ионом железа: $Fe^{2+} + HO\bullet + H^+ \rightarrow Fe^{3+} + H_2O$ [99].

Гидроксильные радикалы, образующиеся в результате реакции Фентона, могут быть опасны, поскольку они взаимодействуют с полиненасыщенными жирными кислотами, приводя к перекисному окислению липидов, которое вызывает образование новых радикалов, называемых гидроксиалкенами. Эти радикалы токсичны для клеток, поскольку они изменяют функцию важных биомолекул (таких как ДНК, белки и липиды) [99]. ЛФ вступает в действие на

первой стадии этого процесса: он связывает ион железа (Fe^{3+}), так что реакция даже не начинается. Таким образом, удастся избежать образования радикалов и повреждения биомолекул [99]. ЛФ действует также прямым образом, что не зависит от его способности связывать железо. ЛФ обладает способностью защищать ДНК *in vitro* путем удаления радикалов $\cdot\text{OH}$. Возможно, механизм этой защиты основан на специфической структуре молекул ЛФ, которая взаимодействует с олигонуклеотидами, и это приводит к защите ДНК от прямого окислительного повреждения [102].

Таким образом, ЛФ оказывает антиоксидантное действие за счет ингибирования реакции Фентона, связывая свободное железо, и активации экспрессии антиоксидантных ферментов CAT, GPX и SOD.

ЛФ является мощным активатором естественных клеток-киллеров, играющих важную роль в первичной защите от микробных и вирусных инфекций [120]. Было так же показано противовоспалительное действие ЛФ, реализующееся путем угнетения синтеза конвертазы C3 системы комплемента [148]. ЛФ обладает многими свойствами в модуляции врожденной и приобретенной иммунной системы. Он взаимодействует с иммунной системой несколькими способами. В частности, было продемонстрировано увеличение процента естественных клеток-киллеров и модуляция Т- и В-клеток и образования антител [52].

Исследования показывают, что ЛФ так же влияет на цитокиновую активность либо повышая уровень противовоспалительных цитокинов, таких как IL-4 и IL-10, либо модулируя провоспалительные, такие как TNF- α , IL-1, IL-6 и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор [42]. Повышение уровней IL-6 с последующим усилением клиренса бактерий было продемонстрировано D. Legrand et al. [100]. ЛФ может оказывать влияние на IL-6 и ускорять созревание Т-клеток и дифференцировку незрелых В-клеток [87]. ЛФ влияет на высвобождение хемокинов, таких как IL-8. Он влияет на рост, дифференцировку, активацию и функции иммунных клеток [108]. Более того, исследования продемонстрировали ускорение дифференцировки CD4⁺ Т-клеток под действием ЛФ. ЛФ играет различную роль в развитии заболеваний, влияя на

баланс цитокинов Th1/Th2 в зависимости от иммунного статуса хозяина [128]. Представленные данные свидетельствуют о том, что ЛФ может влиять на избыточную воспалительную реакцию.

ЛФ стимулирует пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови человека. Описана модуляция сигнальных путей, включая индукцию антигена CD4 и молекулы адгезии лимфоцитов-1. Сообщалось о повышенной экспрессии дзета-цепи в кластере дифференцировки 3 (CD3), приводящей к передаче сигнала активации в Т-клетках [55].

Человеческий пептид лактоферрин (продукт ферментативного гидролиза ЛФ), может активировать TLR-4, -5 и -7 сигнальные пути с усилением регуляции внутриклеточного NF-κB, приводящего к провоспалительному цитокиновому ответу на патогены [101].

В экспериментах на мышах, ЛФ снижал уровни TNF-α и экспрессию мРНК врожденных маркеров воспаления в кишечнике. Фактически, было продемонстрировано снижение уровня MCP-1, (MIP)-1α, IL-6, TNF-α и IFN-γ. Кроме того, важно подчеркнуть повышение уровня противовоспалительного IL-10 [133].

ЛФ предотвращает высвобождение провоспалительных цитокинов и активных форм кислорода, которые являются реакцией на повреждение тканей [60]. Иммунные клетки имеют на своей поверхности отрицательно заряженные группы, и эти группы взаимодействуют с ЛФ. В результате этого взаимодействия мы получаем физиологическую противовоспалительную реакцию, обусловленную активацией сигнальных путей [108]. Кроме того, ЛФ также может регулировать синтез цитокинов, модулируя экспрессию генов (т.е. блокируя NF-κB): в частности, ЛФ снижает уровни некоторых провоспалительных цитокинов, таких как IL-1α, TNF-α, IL-6 и IL-8, и он регулирует выработку противовоспалительного IL-10 [138]. Также продемонстрировано, что ЛФ может активировать моноциты и макрофаги другим способом: разрушая комплекс липополисахарида (LPS)-связывающий белок-эндотоксин, который активирует сигнальный путь TLR4. Чтобы разрушить комплекс, ЛФ нейтрализует свободные

LPS патогены [101].

С другой стороны, другие исследования показали, что ЛФ является стимулятором выработки супероксида, подвижности и высвобождения провоспалительных молекул, таких как оксид азота (NO), TNF- α и IL-8 [105].

Таким образом, ЛФ является мощным модулятором воспалительных реакций.

Описано применение ЛФ и в лечении заболеваний глазной поверхности, таких как синдром сухого глаза (ССГ), хронический мейбомит, герпетический кератит, эпидемический кератоконъюнктивит, язвы роговицы. Использование ЛФ при ССГ становится возможным благодаря его антиоксидантной активности [84]. В исследовании M. Dogru et al. (2007) у пациентов, страдавших ССГ, на фоне перорального приема ЛФ, улучшилась стабильность слезной пленки [103]. Сообщалось об эффективности перорального применения ЛФ у пациентов, страдавших ССГ после хирургического лечения катаракты [74]. Местное применение ЛФ приводило к восстановлению целостности эпителия роговицы на модели сухого глаза у кролика. Все вышеперечисленное делает возможным потенциальное использование глазных капель на основе ЛФ для лечения ССГ [104].

Также ЛФ обладает противовирусной активностью за счет связывания с компонентами вирусной поверхности и гепарансульфатными протеогликанами [159]. В отношении применения ЛФ в лечении вирусных инфекций глазной поверхности на сегодняшний день данных мало, но имеются отдельные публикации, посвященные использованию ЛФ в лечении герпетического кератита. Как *in vivo*, так и *ex vivo* была исследована антигерпетическая активность ЛФ. Связывание ЛФ с вирусными рецепторами на клетках-мишенях предотвращало прикрепление и проникновение вируса, а пероральное введение ЛФ увеличивало продукцию цитокинов и интерлейкинов, которые могут защищать организм от вируса простого герпеса [92].

Гнойная язва роговицы является одной из самых распространенных воспалительных патологий переднего отрезка глаза в России. Несмотря на

разнообразие методов лечения, осложнения встречаются в 2,5% – 37,9% [1]. Использование ЛФ в лечении гнойной язвы роговицы кроликов, вызванной *Staphylococcus aureus*, позволяло повысить эффективность лечения. ЛФ снижал выраженность окислительного стресса, усиливал антибактериальную активность противомикробных препаратов и ускорял эпителизацию роговицы. Авторы пришли к выводу, что сочетание антиоксидантного, бактериостатического, бактерицидного и ранозаживляющего эффектов ЛФ, обусловило ускорение регенерации эпителия и образование соединительной ткани, предотвращая развитие осложнений [16].

Было показано, что бычий ЛФ стимулирует заживление ран эпителия роговицы человека *in vitro* при концентрациях 2,5 и 5 мг/мл, и эта стимуляция опосредована активацией PDGF и IL-6 [56].

Таким образом, анализ отечественных и зарубежных источников литературы показал необходимость изучения биохимических изменений, происходящих в роговице при ее ожогах, актуальность поиска новых методов их лечения, и перспективность применения препаратов на основе ЛФ для терапии данной патологии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Общая характеристика исследования

Исследование проводилось на базе кафедры фармакологии и кафедры глазных болезней ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Протокол исследования рассмотрен и одобрен на заседании комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (выписка №17 от 07.11.2018, выписка №97 от 08.10.2024). Период исследования: 2018 – 2024 гг. Тип исследования – экспериментальное. В качестве тест-системы в работе использовали 186 кроликов-самцов, массой 3000-3500 г, в возрасте 9-12 месяцев. В это число входили животные, на глазах которых развивались перфорации роговицы, глаза с перфорациями не использовали для биохимической и гистологической части работы. Животные закупались в специализированном питомнике Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России и имели необходимые ветеринарные свидетельства. Кролики содержались в конвенциональном виварии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России в индивидуальных клетках.

Работу с животными проводили в соответствии с международными правилами (Директива 86/609/ЕЕС) и правилами надлежащей лабораторной практики (приказ МЗ РФ №199н от 01.04.16). Манипуляции на глазных яблоках проведены под топической анестезией 0,4% оксибупрокаина. Эвтаназия животных осуществлялась передозировкой золетила («Золетил 100», Virbac С.А., Франция) в дозе 30 мг/кг массы.

Исследование выполнялось в два этапа: первый этап – изучение особенностей цитокинового и свободнорадикального статуса роговицы, а также клинико-гистологической картины при щелочном ожоге и оценка возможности его коррекции; второй этап – изучение особенностей цитокинового и свободнорадикального статуса роговицы, а также клинико-гистологической картины при термическом ожоге и оценка возможности его коррекции.

Для изучения цитокинового и свободнорадикального статуса роговицы при щелочном ожоге и оценки возможности его коррекции животные были рандомизированы на две группы.

Первая группа – изучение особенностей цитокинового и свободнорадикального статуса роговицы при щелочном ожоге и оценка возможности его коррекции ЛФ.

Вторая группа – изучение особенностей клинической и гистологической картины роговицы при щелочном ожоге и при его лечении с помощью ЛФ.

Обе группы животных включали следующие серии:

Первая серия – интактные животные – без моделирования патологии и экспериментальных воздействий (n=6);

Вторая серия – контроль патологии – животные, у которых моделировали щелочной ожог роговицы и инстиллировали в конъюнктивальную полость физиологический раствор (n=42);

Третья серия – коррекция цитокиновых и свободнорадикальных нарушений с помощью ЛФ, представлена животными, у которых моделировали щелочной ожог роговицы и инстиллировали в конъюнктивальную полость раствор ЛФ в концентрации 2,5 мг/мл (n=42);

Животные выводились из эксперимента через 1, 3, 5, 7, 14, 21 и 28 сутки после моделирования ожога роговицы. На каждую временную точку приходилось по 3 кролика, то есть 6 глаз (n=6). Физиологический раствор и раствор ЛФ применялись 3 раза в день в виде инстилляций по 1 капле в каждый глаз каждый день.

Для оценки цитокинового и свободнорадикального статуса роговицы при термическом ожоге и возможностей его коррекции животные были рандомизированы на две группы.

Первая группа – изучение особенностей цитокинового и свободнорадикального статуса роговицы при термическом ожоге и оценка возможности его коррекции ЛФ.

Вторая группа – изучение особенностей клинической и гистологической

картины роговицы при термическом ожоге и при его лечении с помощью ЛФ.

Обе группы животных включали следующие серии:

Первая серия – интактные животные – без моделирования патологии и экспериментальных воздействий ($n=6$);

Вторая серия – контроль патологии – животные, у которых моделировали термический ожог роговицы и инстиллировали в конъюнктивальную полость физиологический раствор ($n=42$);

Третья серия – коррекция цитокиновых и свободнорадикальных нарушений с помощью ЛФ, представлена животными, у которых моделировали термический ожог роговицы и инстиллировали в конъюнктивальную полость раствор ЛФ в концентрации 2,5 мг/мл ($n=42$);

Животные выводились из эксперимента через 1, 3, 5, 7, 14, 21 и 28 сутки после моделирования ожога роговицы. На каждую временную точку приходилось по 3 кролика, то есть 6 глаз ($n=6$).

Физиологический раствор и раствор ЛФ применялись 3 раза в день в виде инстилляций по 1 капле в каждый глаз каждый день.

2.2. Экспериментальные модели

Экспериментальная модель щелочного ожога роговицы у кроликов воспроизводилась по методу J. Obenberger (1975) в модификации. В конъюнктивальную полость закапывали 0,4%-й раствор оксибупрокаина. Щелочной ожог вызывали аппликацией диска фильтровальной бумаги (в виде круга диаметром 6 мм), смоченного 5% раствором гидроксида натрия с экспозицией 20 секунд на роговицу (получено удостоверение на рационализаторское предложение №1467 от 13 ноября 2024). Непосредственно после воздействия всем кроликам проводили орошение роговицы и конъюнктивальной полости раствором натрия хлорида 0,9% комнатной температуры и инстилляцией 0,4% раствора оксибупрокаина.

Экспериментальная модель термического ожога роговицы у кроликов

воспроизводилась следующим методом. На электрическую плитку, нагретую до 200⁰С на протяжении 2 минут ставили цилиндр из нержавеющей стали, диаметром основания 6 мм, радиус кривизны основания цилиндра 9,0 мм. Контроль температуры цилиндра проводили пирометром. Перед термическим воздействием в конъюнктивальную полость закапывали 0,4%-й раствор оксибупрокаина. Основание цилиндра, разогретого до 200⁰С устанавливали на центральную область роговицы подопытных животных на 3 с. Непосредственно после термического воздействия всем кроликам проводили орошение роговицы и конъюнктивальной полости раствором натрия хлорида 0,9% комнатной температуры. После повторной инстилляции 0,4% раствора оксибупрокаина проводили скарификацию струпа роговицы в пределах обожжённой ткани. Все манипуляции проводились под визуальным контролем с использованием налобного бинокулярного офтальмоскопа Neitz IO-α (получен патент на изобретение № RU 2780945 C1, 04.10.2022).

2.3. Методы исследования

1. Биохимические методы. После эвтаназии животных, проводилась энуклеация глазных яблок. Роговицу высекали с участком склеры в 1 мм от лимба, проводили измерение массы роговицы, ее измельчение. Затем добавляли фосфатный буфер («ПанЭко», Россия) в пропорции 1:10 и гомогенизировали. Полученный гомогенат центрифугировался (3000 оборотов) в течение 10 мин. Надосадочную жидкость собирали и хранили при температуре -80⁰С до дальнейших исследований. Для определения свободнорадикального статуса исследуемых тканей оценивали концентрацию ТБК-реактивных продуктов, карбонильных производных белков, активность GPX, SOD.

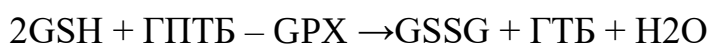
1) Концентрацию ТБК-реактивных продуктов определяли по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК, «Sigma-Aldrich», США). Принцип метода основан на способности некоторых конечных продуктов перекисного окисления

липидов в кислой среде реагировать с ТБК, с эквимольным образованием окрашенного комплекса, который имеет максимум поглощения при 532 нм. Принято считать, что этой реакцией определяется содержание малонового диальдегида, хотя, по данным ряда исследователей, с ТБК реагирует не только непосредственный предшественник МДА – эндопероксид, но и некоторые другие продукты ПОЛ. Во избежание разночтений, в дальнейшем мы будем говорить об определении количества ТБК-реактивных продуктов, так как данное допущение существенно сути полученных результатов не меняет [4].

2) Определение концентрации карбонильных производных белков в полученном гомогенате осуществляли с помощью коммерческого набора («Sigma-Aldrich», США). Метод основан на взаимодействии карбонильных производных белков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, которые регистрировали при длине волны 375 нм. Концентрацию карбонильных производных белков рассчитывали исходя из коэффициента экстинкции $\epsilon_{375} = 22 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [164]. Результаты выражали в нмоль/мг белка.

3) Активность супероксиддисмутазы оценивали по регистрации степени торможения реакции окисления кверцетина («Sigma-Aldrich», США), фиксируемой по изменению оптической плотности реакционной смеси при длине волны $\lambda=406 \text{ нм}$ [19].

4) Активность глутатионпероксидазы оценивали по скорости окисления НАДФН₂ («Sigma-Aldrich», США). Принцип метода: НАДФН₂ служит донором протонов для реакции ферментативного восстановления глутатиона («Sigma-Aldrich», США), который окисляется в реакции ферментативного восстановления гидроперекиси третбутила (гидроперекись третбутила (ГПТБ, «Sigma-Aldrich», США) – специфический субстрат для действия Se-зависимой GPX). Чем выше активность GPX, тем интенсивнее будет окисляться НАДФН₂, что приведет к снижению оптической плотности при 340 нм [21]. В модельной системе протекают следующие реакции:



$\text{GSSG} + \text{НАДФН} + \text{H}^+ - \text{глутатион-редуктаза} \rightarrow 2\text{GSH} + \text{НАДФ}^+$.

5) Определение концентрации IL-4, IL-10, TNF- α , TGF-1 β осуществляли иммуноферментным методом, с помощью коммерческих наборов «Cloud-Clone» (КНР).

6) Определение концентрации белка. Анализируемые показатели пересчитывались на количество белка в пробе, которое оценивалось методом Брэдфорда с помощью коммерческого набора («Thermo Fisher Scientific», США) [58]. Метод основан на связывании красителя Coomassie brilliant Blue G250 с остатками основных и ароматических аминокислот, с последующим развитием синей окраски. Количество белка оценивалось спектрофотометрическим методом по интенсивности окраски на микропланшетном анализаторе Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США) при длине волны 595 нм. Полученные результаты рассчитывали с помощью калибровочного графика (в качестве стандарта использовался бычий сывороточный альбумин, входящий в состав набора) и выражали в мг/мл белка.

2. Офтальмологические исследования. Для контроля развития патологического состояния применялись стандартные офтальмологические методы: боковое освещение, проходящий свет, биомикроскопия, в том числе с фоторегистрацией (фотощелевая лампа Inami CS40321 («INAMI & CO., LTD», Япония)), прямая офтальмоскопия (прямой офтальмоскоп Heine Beta-200 («HEINE Optotechnik», Германия)), бинокулярная офтальмоскопия (налобный бинокулярный офтальмоскоп Neitz IO- α («Neitz Instruments Co., Ltd.», Япония)).

3. Гистологическое исследование. Фиксация материала осуществлялась в 10% формалине HISTOSAFE (ООО «ЭргоПродакшн», Россия). После парафиновой проводки готовили срезы толщиной 5-6 мкм, проводили окрашивание гематоксилином и эозином. Морфометрию осуществляли с использованием светоптического микроскопа Leica DM 2000 («Leica Microsystems», Германия), при увеличении в 200 раз. Микропрепараты фотографировались с помощью цифровой камеры Nikon DS-1000 («Nikon Corporation», Япония). Ввод и анализ изображений осуществлялись с

использованием программы Photoshop CS2.

2.4. Статистическая обработка результатов исследования

Математический анализ данных и визуализация результатов исследования выполнялись с помощью программы Excel 2010 (Microsoft Corporation, США), статистический анализ – в программе Statistica 10.0 (Stat Soft Inc., США).

Характер распределения количественных переменных оценивался с помощью критерия Шапиро-Уилка. Так как во всех случаях распределение данных было отличным от нормального, результаты в таблицах представлены в медианы, нижнего и верхнего квартилей – Me [Q1 - Q3], где Me – медиана, Q1 – нижний (25%) квартиль, Q3 – верхний (75%) квартиль, а для оценки статистической значимости применялись непараметрические критерии – при сравнении более чем двух групп критерий Крускала-Уоллиса, в дальнейшем попарные сравнения выполнялись с помощью критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Для сравнения двух выборок применяли критерий Манна-Уитни.

При вероятности ошибки первого рода $p < 0,05$ различия между группами считались статистически значимыми.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Разработка экспериментальной модели щелочного ожога роговицы

Экспериментальная модель щелочного ожога роговицы воспроизводилась на кроликах породы «Советская Шиншилла» по методу J. Obenberger (1975) в собственной модификации [124].

В конъюнктивальную полость закапывали 0,4%-й раствор оксibuпрокаина. Щелочной ожог вызывали аппликацией диска фильтровальной бумаги (в виде круга диаметром 6 мм), смоченного 5% раствором гидроксида натрия с экспозицией 20 секунд на роговицу (получено удостоверение на рационализаторское предложение №1467 от 13 ноября 2024). Непосредственно после воздействия всем кроликам проводили орошение роговицы и конъюнктивальной полости раствором натрия хлорида 0,9% комнатной температуры и инстилляцией 0,4% раствора оксibuпрокаина.

От классического метода предложенный способ отличался диаметром диска фильтровальной бумаги, концентрацией щелочи и временем экспозиции, обеспечившие формирование более тяжелых в сравнении с классической методикой ожогов роговицы.

На первые сутки экспериментальной патологии отмечалась смешанная инъекция бульбарной конъюнктивы, которая сохранялась до 5–7 суток. С 2 по 7-е сутки отмечался отек роговицы вне зоны ожога. Полная эпителизация роговицы у животных наблюдалась с 8 по 15-е сутки, в среднем, на 9,5 [8-12] сутки (Рисунок 1). Перфорация развивалась на двух глазах на 13 и 16-е сутки. На 28-е сутки на всех глазах наблюдалось развитие грубых помутнений роговицы.

При гистологическом исследовании было обнаружено, что на первые сутки в центре роговицы передний эпителий отсутствовал, строма была представлена равномерно расположенными пучками коллагеновых волокон с щелевыми дефектами между ними. Кровеносные и лимфатические сосуды в строме отсутствовали, клетки также отсутствовали или были неразличимы. Участки

собственного вещества роговицы, расположенные проксимальнее места нанесения щелочного ожога, имели более эозинофильное окрашивание и плотное расположение волокон. Десцеметова мембрана не была изменена. Отмечались признаки некробиоза заднего эпителия (эндотелия) (Рисунок 2).



Рисунок 1 – Клиническая картина щелочного ожога роговицы (окраска флюоресцеином)

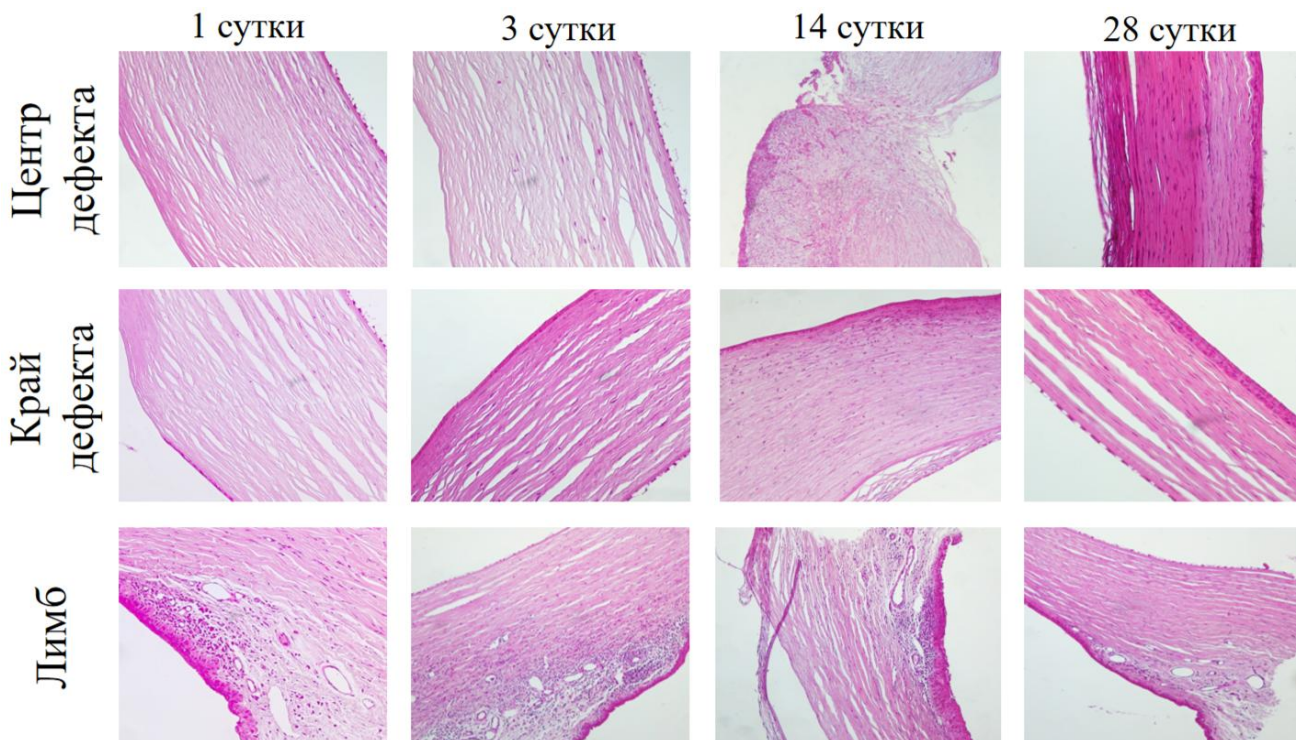


Рисунок 2 – Гистологическая картина роговицы при моделировании щелочного ожога (окраска гематоксилином и эозином, ув. 200 раз)

При рассмотрении края дефекта наблюдался однослойный эпителий с выраженной вакуолизацией и пикнотическими ядрами. По мере приближения к центру дефекта эпителий истончался и обрывался. Клетки стромы и сосуды не определялись. Десцеметова мембрана была не изменена. Отмечались признаки

некробиоза эндотелия. В зоне корнеосклерального лимба наблюдалась умеренная воспалительная инфильтрация в строме.

На 3-и сутки патологии в центре дефекта эпителий все еще отсутствовал. Строма была утолщена за счет умеренного отека, единичные округлые клетки наблюдались ближе к Десцеметовой мембране, которая не была изменена, на ней располагались эндотелиальные клетки в состоянии дистрофии и некроза. На краю дефекта отмечался эпителий с одним слоем уплощенных клеток без четкой границы между ними. Строма была отечна, содержала небольшое количество клеток с овальными ядрами. Коллагеновые волокна образовывали выраженный волнистый рисунок, местами были разволокнены. Десцеметова мембрана без изменений, на ней располагались эндотелиальные клетки в состоянии дистрофии и некроза. В корнеосклеральном лимбе отмечалась более выраженная относительно 1 суток диффузная полиморфно-клеточная воспалительная инфильтрация (Рисунок 2).

На 7-е сутки в центре дефекта роговицы отмечались выраженные деструктивные процессы. Эпителий не визуализировался. Строма была отечна, инфильтрирована полиморфно-ядерными лейкоцитами и макрофагами в большом количестве. Соединительнотканые волокна имели хаотичный ход, пучков не образовывали. Обнаруживалось большое количество полнокровных новообразованных сосудов. Десцеметова мембрана и эндотелий отсутствовали.

На краю дефекта эпителиальная пластинка была представлена двумя слоями клеток с элементами дистрофии. К базальному слою прилежал плотный слой коллагеновых волокон, инфильтрированный клетками воспалительного ряда. Собственное вещество роговицы было умеренно отечно. Десцеметова мембрана была без видимых изменений. Встречались участки с разрастанием плотной соединительной ткани над мембраной, покрытые плоским эпителием. В корнеосклеральном лимбе сохранялась умеренная воспалительная инфильтрация, представленная нейтрофильными лейкоцитами с примесью лимфоцитов (Рисунок 2).

При гистологическом исследовании на 28-е сутки было установлено, что в

центре дефекта на большом протяжении эпителий был представлен тремя слоями клеток: базальный слой состоял из кубических клеток с округлым ядром, поверхностные слои – из уплощенных клеток с вытянутым ядром. Строма представлена пучками коллагеновых волокон, плотно прилегающих друг к другу. Между пучками определялись клетки фибропластического ряда. Десцеметова мембрана была без видимых изменений, покрыта слоем плотной соединительной ткани и эндотелием. По краю дефекта гистологическая картина была схожа с гистологической картиной нормальной роговицы кролика. В корнеосклеральном лимбе сохранялась незначительная воспалительная инфильтрация (Рисунок 2).

Таким образом, развивающаяся клиническая и гистологическая картина при разработанной экспериментальной модели щелочного ожога роговицы соответствует типичной клинической картине щелочного ожога 3 степени у человека и может быть использована для дальнейших исследований.

3.2. Разработка экспериментальной модели термического ожога роговицы

Моделирование термического ожога роговицы осуществляли по оригинальной методике (патент на изобретение № RU 2780945 С1, 04.10.2022) следующим образом.

На электрическую плитку, нагретую до 200 °С на протяжении 2 минут ставили цилиндр из нержавеющей стали, диаметром основания 6 мм, радиус кривизны основания цилиндра 9,0 мм. Контроль температуры цилиндра проводили пирометром. Перед термическим воздействием в конъюнктивальную полость закапывали 0,4%-й раствор оксибупрокаина. Основание цилиндра, разогретого до 200°С, устанавливали на центральную область роговицы подопытных животных на 3 секунды. Непосредственно после термического воздействия всем кроликам проводили орошение роговицы и конъюнктивальной полости раствором натрия хлорида 0,9% комнатной температуры. После повторной инстилляции 0,4% раствора оксибупрокаина проводили скарификацию струпа роговицы в пределах обожжённой ткани.

С 1 по 5-е сутки после нанесения ожогов, в пределах обожженной ткани роговица становилась более отечной, место нанесения ожога тотально окрашивалось 1% раствором флюоресцеина (Рисунок 3).



Рисунок 3 – Клиническая картина термического ожога роговицы (окраска флюоресцеином)

Со 2 суток наблюдалась инфильтрация всей роговицы вокруг ожога, которая постепенно уменьшалась от периферии к центру. Прозрачность роговицы вне зоны ожога восстанавливалась с 3 по 7-е сутки. С 1 по 3-и сутки развивалась смешанная инъекция бульбарной конъюнктивы, сохранявшаяся до 7-10 суток (Рисунок 3).

Полная эпителизация дефекта в контрольной группе наблюдалась с 7 по 13-е сутки, в среднем – на 8,5 [8-11] день (Рисунок 3).

В ряде случаев, на 3 – 8-е сутки формировались участки изъязвления роговицы, завершавшиеся формированиями перфораций на 4 (1 глаз), 8 (3 глаза), 10 (1 глаз), 11 сутки (1 глаз) (Рисунок 5). Животные с перфорациями роговицы выводились из эксперимента и не использовались в дальнейшем исследовании (Рисунок 4).

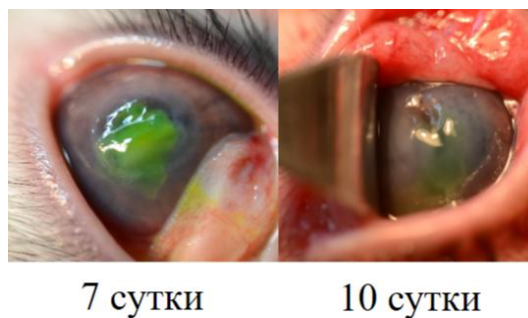


Рисунок 4– Формирование перфораций роговицы (окраска флюоресцеином)

В исходе (на 28-е сутки) на всех глазах на месте ожога роговицы, наблюдались грубые помутнения (Рисунок 3).

При гистологическом исследовании на первые сутки экспериментальной патологии в центре дефекта передний эпителий отсутствовал, строма была представлена равномерно расположенными коллагеновыми волокнами, погруженными во внеклеточный матрикс и образующими пучки. Кровеносные и лимфатические сосуды в строме отсутствовали, клетки отсутствовали или были неразличимы. Участки собственного вещества роговицы, расположенные проксимальнее к месту нанесения термического ожога, имели более эозинофильное окрашивание и плотное расположение волокон (что может говорить о коагуляции белка). Десцеметова мембрана была не изменена. Задний эпителий роговицы (эндотелий) отсутствовал (Рисунок 5).

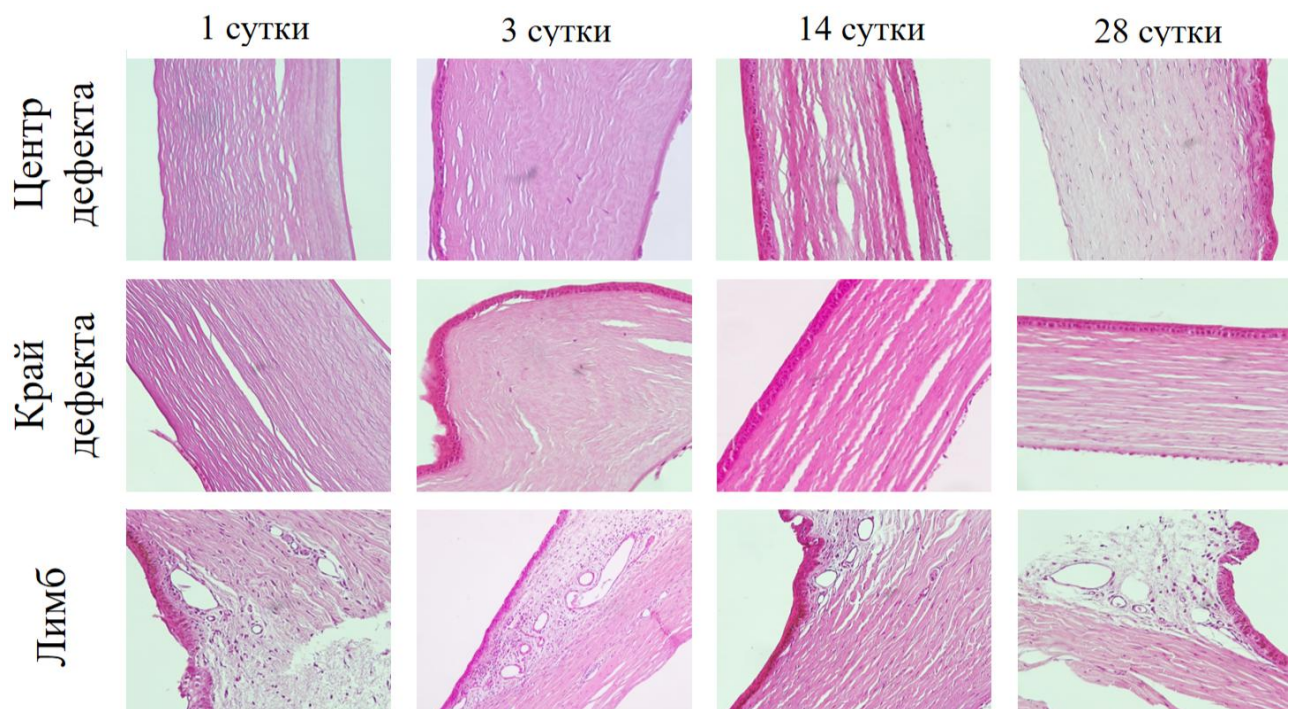


Рисунок 5 – Гистологическая картина роговицы при моделировании термического ожога (окраска гематоксилином и эозином, ув. 200 раз)

При рассмотрении края дефекта наблюдался однослойный эпителий с выраженной вакуолизацией и пикнотическими ядрами. По мере приближения к центру дефекта эпителий истончался и обрывался. Под эпителием наблюдались

менее выраженные участки с признаками коагуляции. Клетки стромы и сосуды не определялись. Десцеметова мембрана была не изменена. Эндотелий отсутствовал. В зоне корнеосклерального лимба ткани корнеосклерального перехода не отличались от интактных животных (Рисунок 5).

На 3-и сутки исследования в центре дефекта наблюдался одно- или двухслойный эпителий без четких границ между клетками со сморщенным ядром и эозинофильной зернистостью цитоплазмы. Местами отмечалась десквамация эпителия. Строма утолщена за счет умеренного отека, единичные округлые клетки наблюдались ближе к Десцеметовой мембране. Десцеметова мембрана без изменений, на ней располагались единичные эндотелиальные клетки (Рисунок 5).

На краю дефекта отмечался трехслойный эпителий с кубическим базальным, уплощенным промежуточным и плоским поверхностными слоями. По мере приближения к зоне нанесения термического ожога промежуточный и поверхностный слои теряли четкость границ между клетками. Клетки базального слоя уменьшались в размерах, местами напоззали друг на друга. Строма была отеена, содержала небольшое количество клеток с овальными ядрами. Коллагеновые волокна образовывали выраженный волнистый рисунок, местами были разволокнены. Десцеметова мембрана без изменений, на ней располагались единичные эндотелиальные клетки, тянущиеся со стороны неповрежденного участка роговицы. В области корнеосклерального лимба отмечалась более выраженная относительно 1 суток полиморфно-клеточная воспалительная инфильтрация преимущественно в субэпителиальной зоне (Рисунок 5).

На 5-е сутки в центре дефекта сохранялись клетки базального слоя с признаками баллонной дистрофии. Клетки поверхностных слоев некротизировались и десквамировались. Строма была отеена, бесклеточна. В зоне около Десцеметовой мембраны коллагеновые волокна были разволокнены и окрашивались менее интенсивно. Десцеметова мембрана была интактна, частично покрыта эндотелием ближе к краям описываемой зоны. В области края дефекта эпителий был двуслойный. В части клеток наблюдались признаки дистрофии и апоптоза. Строма роговицы была разволокнена и отеена преимущественно в

субэпителиальной зоне, содержала умеренное количество клеток с вытянутыми ядрами (кератоцитов) между пучками коллагеновых волокон. Десцеметова мембрана была интактна, эндотелий – в состоянии некробиоза (Рисунок 5). В области корнеосклерального лимба воспалительный инфильтрат был представлен лимфоцитами и нейтрофилами, сосредоточенными преимущественно вокруг сосудов (Рисунок 5).

На 7-е сутки в центре дефекта в эпителии отмечались деструктивные процессы. Происходила десквамация эпителия. Собственное вещество роговицы было отечно, в субэпителиальном слое разволокнено с участками деструкции. В строме отмечались явления воспалительной инфильтрации. Десцеметова мембрана интактна, эндотелий разрушен (Рисунок 5).

В области края дефекта эпителиальная пластинка была представлена двумя слоями клеток с элементами дистрофии. К базальному слою прилежал плотный слой коллагеновых волокон с большим количеством вытянутых клеток, напоминающих фиброциты. Собственное вещество роговицы умеренно отечно, представлено пучками коллагеновых волокон с щелевидными дефектами. Десцеметова мембрана интактна, полностью покрыта эндотелием (Рисунок 5).

В корнеосклеральном лимбе наблюдалась умеренная воспалительная инфильтрация, представленная нейтрофильными лейкоцитами с примесью лимфоцитов (Рисунок 5).

На 14-е сутки в центре роговицы эпителий был представлен 3–4 слоями эпителиоцитов: базальный слой состоял из цилиндрических клеток с округлым ядром и прозрачной цитоплазмой. Выше располагался переходный слой, включавший в себя 1–2 слоя уплощенных клеток. Наиболее поверхностно были расположены плоские клетки без четкой границы друг с другом и плоским вытянутым ядром. Строма была представлена толстыми пучками коллагеновых волокон, между которыми встречались единичные клетки с вытянутым ядром. Десцеметова мембрана была интактна, покрыта одним слоем эндотелиальных клеток на всем протяжении (Рисунок 5).

На краю дефекта эпителий был представлен 3–4 слоями эпителиоцитов:

цилиндрические клетки с округлым ядром базального слоя и расположенные на них в несколько слоев уплощенные клетки с вытянутым ядром. Строма была представлена толстыми пучками коллагеновых волокон, между которыми в умеренном количестве встречались клетки с вытянутым ядром. Десцеметова мембрана была интактна, покрыта эндотелием (Рисунок 5).

На 21-е и 28-е сутки в центре дефекта роговицы эпителий состоял из 3–4 слоев. Базальный слой состоял из кубических или прямоугольных клеток с округлым ядром, поверхностные слои – из уплощенных клеток с вытянутым ядром. В субэпителиальной зоне наблюдалось незначительное разрастание рыхлой соединительной ткани. Строма состояла из нежных коллагеновых волокон и незначительного количества клеток фибропластического ряда. В Десцеметовой мембране и эндотелии видимых изменений не отмечалось. В области края дефекта гистологическая картина была схожа с гистологической картиной нормальной роговицы кролика (Рисунок 5).

Таким образом, развивавшаяся клиническая и гистологическая картина при разработанной экспериментальной модели термического ожога роговицы соответствует типичной клинической картине термического ожога 3 степени у человека и может быть использована для дальнейших исследований.

3.3. Особенности цитокинового и свободнорадикального статуса роговицы при ее щелочном ожоге

На следующем этапе исследования были оценены особенности цитокинового и свободнорадикального статуса роговицы при ее щелочном ожоге.

Наблюдались следующие изменения концентрации цитокинов при щелочном ожоге роговицы. Уровень провоспалительного цитокина TNF- α достигал максимальных значений уже на первые сутки развития патологии и сохранялся повышенным к 28 суткам эксперимента. Содержание противовоспалительного цитокина IL-10 также увеличивалось с первого дня патологии, достигало пика на 3-и сутки, в 2 раза ($p < 0,05$) превышая значения

интактных животных, и оставался повышенным на 28 сутки. Уровень TGF-1 β также увеличивался при щелочном ожоге на протяжении всего эксперимента, максимально превышая значения интактных животных на 5 и 7-е сутки – на 76,08% ($p<0,05$) и 82,33% ($p<0,05$) (Таблица 1).

Концентрация противовоспалительного цитокина IL-4 повышалась только на 3 и 5-е сутки на 20,84% ($p<0,05$) и 19,31% ($p<0,05$), затем снижаясь на 7 и 14-е сутки на 12,22% ($p<0,05$) и 31,9% ($p<0,05$) по сравнению с показателями интактных животных (Таблица 1).

Моделирование щелочного ожога сопровождалось развитием окислительного стресса в роговице. Концентрация ТБК-реактивных продуктов повышалась с первых суток патологии, достигала максимума к 7 суткам, в 2,5 раза ($p<0,05$) превышая показатели интактных животных, а затем постепенно снижалась к 28 суткам, достоверно не отличаясь от значений интактных животных (Таблица 2).

Содержание карбонильных производных белков на 1 сутки было достоверно ($p<0,05$) ниже значений интактных животных на 17,72%, а затем достоверно ($p<0,05$) повышалось на 3, 5, 7 и 14-е сутки моделирования ожога, на 8,54%, 29,55%, 20,16%, и 28,58% ($p<0,05$) превосходя значения интактных животных, затем снова снижалось на 28-е сутки ниже значений интактных животных на 37,03% ($p<0,05$) соответственно (Таблица 2).

Отмечалось снижение активности антиоксидантных ферментов в роговице. Активность SOD уменьшалась с 3 по 28 сутки с минимальными значениями на 7 сутки – на 46,79% ($p<0,05$) ниже значений интактных животных, а активность GPX снижалась на 5, 7 и 14-е сутки на 25,46% ($p<0,05$), 25,21% ($p<0,05$) и 39,46% ($p<0,05$) по сравнению с интактными животными соответственно (Таблица 2).

Полученные результаты свидетельствуют о развитии воспаления и окислительного стресса при моделировании щелочного ожога роговицы.

Таблица 1 – Цитокиновый статус роговицы при щелочном ожоге (медиана, верхний и нижний квартили)

Изучаемый показатель	Интактные животные	Сутки эксперимента						
		1	3	5	7	14	21	28
TNF- α , пг/мг белка	120,19 [109,36– 123,73]	240,36 [235,24– 244,88]*	150,65 [148,02– 156,31]*	170,64 [169,23– 172,22]*	169,24 [162,85– 173,62]*	175,75 [173,62– 178,12]*	107,89 [100,26– 116,57]	219,62 [211,59– 233,08]*
IL-4, пг/мг белка	39,78 [36,65– 41,09]	39,72 [39,45– 40,28]	48,07 [47,33– 48,37]*	47,46 [46,94– 49,395]*	34,92 [34,69– 35,56]*	27,09 [26,65– 27,41]*	38,44 [38,24– 38,83]	38,6 [38,49– 39,05]
IL-10, пг/мг белка	6,21 [5,59– 6,3]	7,76 [7,27– 7,89] *	12,97 [12,29– 13,59]*	10,55 [9,89– 11,26] *	10,3 [10,13– 11,14]*	8,97 [8,63– 9,14]*	8,47 [7,92– 8,63]*	8,016 [7,32– 8,09]*
TGF-1 β , пг/мг белка	34,57 [34,21– 36,15]	51,16 [49,14– 51,835]*	54,41 [52,3– 55,04]*	60,87 [60,23– 61,26]*	63,03 [60,79– 65,21]*	45,53 [44,78– 46,91]*	43,77 [43,61– 46,12]*	46,12 [42,88– 47,98]*
Примечание – * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия с показателями интактных животных.								

Таблица 2 – Свободнорадикальный статус роговицы при ее щелочном ожоге (медиана, верхний и нижний квартили)

Изучаемый показатель	Интактные животные	Сутки эксперимента						
		1	3	5	7	14	21	28
ТБК-реактивные продукты, нмоль/мг белка	2,29 [2,18– 2,35]	3,08 [2,79– 3,39]*	5,495 [5,39– 5,92]*	5,695 [5,49– 5,91]*	5,79 [5,73– 6,00]*	5,695 [5,49– 5,91]*	3,64 [3,41– 4,46]*	2,47 [2,41– 2,485]
Карбонильные производные белков, нмоль/мг белка	3,16 [2,93– 3,2]	2,6 [2,54– 2,7]*	3,43 [3,39– 3,6]*	4,09 [4,21– 4,32]*	3,8 [3,66– 4,23]*	4,063 [3,92– 4,14]*	2,94 [2,92– 3,078]	1,99 [1,90– 2,03]*
SOD ЕА/мг белка	3,12 [3,07– 3,14]	2,97 [2,81– 3,05]	2,63 [2,54– 2,66]*	1,87 [1,82– 1,91]*	1,66 [1,58– 1,91]*	1,76 [1,7– 1,81]*	2,4 [2,34– 2,45]*	2,25 [2,22– 2,52]*
GPX нмоль НАДФН/ мин/мг белка	19,36 [17,88– 23,19]	19,56 [18,16– 21,48]	17,68 [16,07– 20,47]	14,43 [13,16– 15,24]*	14,48 [13,92– 15,13]*	11,72 [10,94– 14,39]*	17,96 [12,88– 21,47]	22,12 [21,41– 22,54]
Примечание – * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия с показателями интактных животных.								

3.4. Особенности цитокинового и свободнорадикального статуса роговицы при ее термическом ожоге

Моделирование термического ожога аналогичным образом сопровождалось изменениями баланса цитокинов и развитием окислительного стресса в роговице.

Уровень TNF- α увеличивался с первых суток, достигал максимального значения на 7-е сутки на 178,3% ($p<0,05$) превышая показатели интактных животных и сохранялся повышенным к 28 суткам эксперимента. Содержание IL-10 увеличивалось с первого дня патологии, достигало пика на 5 сутки, на 93,4%, достоверно ($p<0,05$) превышая значения интактных животных, и нормализовывалось к 28 суткам. Уровень TGF-1 β увеличивался на протяжении всего эксперимента, максимально превышая значения интактных животных на 5 сутки – на 77,8% ($p<0,05$). Уровень IL-4 повышался на 5 сутки на 22,9% ($p<0,05$) и на 7 сутки – на 12,0% ($p<0,05$) по сравнению с интактными животными, а в остальные сроки достоверно от них не отличался (Таблица 3).

Концентрация ТБК-реактивных продуктов повышалась с первых суток патологии, достигала максимума к 7 суткам, на 120,1% ($p<0,05$) превышая показатели интактных животных, затем постепенно снижалась к 28 суткам, не отличаясь от значений интактных животных. Содержание карбонильных производных белков также повышалось на 3, 5 и 28-е сутки патологии, на 70,9% ($p<0,05$), 47,2% ($p<0,05$) и 34,8% ($p<0,05$) превосходя значения интактных животных. Активность SOD была снижена на протяжении всего эксперимента, с минимальным значением на 7-е сутки – на 41,1% ($p<0,05$) ниже значений интактных животных, а активность GPX снижалась на 7, 14-е и 21-е сутки на 19,7% ($p<0,05$), 40,4% ($p<0,05$) и 15,8% ($p<0,05$) (Таблица 4).

Полученные результаты свидетельствуют о развитии воспаления и окислительного стресса при моделировании термического ожога роговицы, причем их максимальная выраженность совпадает со временем развития осложнений – перфораций роговицы.

Таблица 3 – Показатели цитокинового статуса при термическом ожоге роговицы (медиана, верхний и нижний квартили)

Изучаемый показатель	Интактные животные	Сутки эксперимента						
		1	3	5	7	14	21	28
TNF- α , пг/мг белка	120,19 [109,36– 123,73]	258,61 [246,01– 264,165]*	303,06 [298,84– 329,56]*	221,24 [211,57– 232,56]*	334,51 [330,36– 345,77]*	289,04 [282,215– 291,08]*	312,51 [302,59– 325,36]*	258,56 [251– 266,71]*
IL-4, пг/мг белка	39,78 [36,65– 41,09]	35,65 [34,4– 36,69]	40,12 [37,8– 41,11]	48,9 [48,4– 49,35] *	44,57 [43,53– 45,18] *	39,85 [37,64– 41,9]	39,14 [37,41– 42,29]	42,54 [40,32– 43,73]
IL-10, пг/мг белка	6,21 [5,59– 6,3]	9,15 [8,6– 9,45]*	11,02 [10,55– 11,23]*	12,01 [11,64– 13,4]*	9,12 [8,64– 9,75]*	8,99 [7,84– 9,37]*	8,34 [7,87– 8,68]*	8,15 [6,4– 9,75]
TGF-1 β , пг/мг белка	34,57 [34,21– 36,15]	47,19 [46,38– 49,21]*	53,64 [52,62– 54,97]*	61,47 [60,11– 62,88]*	47,8 [46,85– 48,57]*	45,13 [44,77– 46,26]*	43,45 [42,66– 46,11]*	42,5 [41,32– 44,85]*
Примечание – * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия с показателями интактных животных.								

Таблица 4 – Показатели окислительного стресса при термическом ожоге роговицы (медиана, верхний и нижний квартили)

Изучаемый показатель	Интактные животные	Сутки эксперимента						
		1	3	5	7	14	21	28
ТБК-реактивные продукты, нмоль/мг белка	2,29 [2,18– 2,35]	4,37 [3,53– 4,6]*	4,48 [4,22– 4,97]*	4,97 [3,94– 6,15]*	5,04 [4,64– 5,45]*	3,32 [3,21– 3,52]*	3,31 [3,11– 3,34]*	2,31 [2,15– 2,45]
Карбонильные производные белков, нмоль/мг белка	3,16 [2,93– 3,2]	2,78 [2,705– 2,99]	5,4 [5,31– 5,68]*	4,65 [4,503– 4,734]*	2,86 [2,81– 2,97]	3,1 [2,97– 3,23]	2,73 [2,41– 2,86]	4,26 [3,99– 4,39] *
SOD ЕА/мг белка	3,12 [3,07– 3,14]	2,84 [2,76– 2,91]*	2,5 [2,37– 2,54]*	2,05 [1,92– 2,3]*	1,83 [1,7– 1,92]*	2,08 [2,02– 2,2]*	2,26 [2,21– 2,27]*	2,81 [2,58– 2,83]*
GPX нмоль НАДФН/ мин/мг белка	19,36 [17,88– 23,19]	20,935 [20,21– 23,29]	19,72 [18,56– 21,13]	17,65 [16,7– 19,84]	15,55 [15,42– 16,23]*	11,53 [11,39– 11,785]*	16,30 [14,42– 17,33] *	19,11 [18,34– 20,51]
Примечание – * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия с показателями интактных животных.								

3.5. Сравнение клинико-гистологических и биохимических изменений в роговице при щелочных и термических ожогах

При сравнении клинической и гистологической картины роговицы при щелочных и термических ожогах, были обнаружены следующие особенности.

При щелочных ожогах перфорации роговицы встречались реже (2 случая) и в более поздний период (13 и 16 сутки), в то время, как при термических ожогах наблюдалось 6 случаев перфораций роговицы, развившиеся с 4 по 11 сутки (Таблица 5). Гистологическая картина была схожа в обеих группах.

Таблица 5 – Суммарная клиническая характеристика щелочного и термического ожога

Вид ожога	Смешанная инъекция бульбарной конъюнктивы	Отек роговицы вне зоны ожога	Полная эпителизация роговицы	Перфорации роговицы
Щелочной ожог	1-7 сутки	2-7 сутки	9,5 [8-12] сутки	N=2
Термический ожог	1-10 сутки	2-7 сутки	8,5 [8-11] сутки	N=6

При сравнении биохимических изменений в роговице при щелочных и термических ожогах, были получены следующие результаты.

В группе термического ожога уровень TNF- α был достоверно выше, чем в группе щелочного на 3, 5, 7, 14, 21 и 28 сутки на 101,17%, 29,65%, 97,65%, 64,46%, 189,66% и 17,73% ($p < 0,05$) соответственно. На 1 и 3 сутки эксперимента уровень IL-4 в группе щелочного ожога был достоверно выше (на 11,42% и на 19,82% ($p < 0,05$)), чем в группе термического ожога, на 7, 14, 28 сутки отмечалась обратная тенденция: уровень показателя в группе термического ожога был достоверно выше, чем в группе щелочного на 27,63%, 47,1%, 10,2% ($p < 0,05$)

соответственно. Уровень TGF-1 β на 7 сутки моделирования щелочного ожога превышал значения кроликов с термическим ожогом на 31,9% ($p<0,05$). Уровень IL-10 при термическом ожоге был достоверно ниже, чем при щелочном на 3 (на 15,0% ($p<0,05$)) и на 7 сутки (на 11,56% ($p<0,05$)) (Таблица 6).

Концентрация ТБК-реактивных продуктов в роговицах животных группы щелочного ожога была достоверно выше, чем в группе термического ожога на 3 (на 22,54% ($p<0,05$)), на 14 (на 71,39% ($p<0,05$)) и на 21 сутки (на 9,97% ($p<0,05$)). На 3, 5, 28 сутки патологии содержание карбонильных производных белков было статистически значимо выше при термическом ожоге (на 57,43%, 13,69% и на 114,07% соответственно ($p<0,05$)), а на 7 и 14 сутки в группе щелочного ожога данный показатель был достоверно выше, чем в группе термического ожога на 32,5% ($p<0,05$) и на 31,0 ($p<0,05$) соответственно.

Активность SOD у животных группы термического ожога статистически значимо превышала значения кроликов с щелочным ожогом на 14 сутки на 18,2% ($p<0,05$) и была достоверно ниже на 21 сутки на 5,83% ($p<0,05$). Активность GPX в группе термического ожога была достоверно ($p<0,05$) выше, чем в группе щелочного ожога на 5 (на 22,31%) и 7 сутки (на 7,39%). На 28 сутки активность GPX в группе термического ожога была достоверно ниже, чем в группе щелочного ожога на 13,61% ($p<0,05$) (Таблица 7).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при щелочном ожоге окислительному повреждению подвержены в основном липиды (повышение ТБК-реактивных продуктов) и преобладают противовоспалительные (IL-10 и TGF-1 β) цитокины, при термическом ожоге – окисляются преимущественно белки (повышение карбонильных производных белков) и преобладают провоспалительные цитокины (TNF- α).

Таблица 6 – Динамика показателей цитокинового статуса роговицы при щелочном и термическом ожоге (медиана, верхний и нижний квартили)

Показатель	Серия эксперимента	Сутки эксперимента						
		1	3	5	7	14	21	28
TNF- α , пг/мг белка	Щелочной ожог	240,36 [235,24– 244,88]	150,65 [148,02– 156,31]	170,64 [169,23– 172,22]	169,24 [162,85– 173,62]	175,75 [173,62– 178,12]	107,89 [100,26– 116,57]	219,62 [211,59– 233,075]
	Термический ожог	258,61 [246,01– 264,165]	303,06 [298,84– 329,56]#	221,24 [211,57– 232,56]#	334,51 [330,36– 345,77] #	289,04 [282,215– 291,08]#	312,51 [302,59– 325,36]#	258,56 [251– 266,71]#
IL-4, пг/мг белка	Щелочной ожог	39,72 [39,45– 40,28]	48,07 [47,33– 48,37]	47,46 [46,94– 49,395]	34,92 [34,69– 35,56]	27,09 [26,65– 27,41]	38,44 [38,24– 38,83]	38,6 [38,49– 39,05]
	Термический ожог	35,65 [34,4– 36,69]#	40,12 [37,8– 41,11]#	48,9 [48,4– 49,35]	44,57 [43,53– 45,18] #	39,85 [37,64– 41,9]#	39,14 [37,41– 42,29]	42,54 [40,32– 43,73] #
IL-10, пг/мг белка	Щелочной ожог	7,76 [7,27– 7,89]	12,97 [12,29– 13,59]	10,55 [9,89– 11,26]	10,3 [10,13– 11,14]	8,97 [8,63– 9,14]	8,47 [7,92– 8,63]	8,016 [7,32– 8,09]

Продолжение Таблицы 6

	Термический ожог	9,15 [8,6– 9,45]	11,02 [10,55– 11,23]#	12,01 [11,64– 13,4]	9,12 [8,64– 9,75]#	8,99 [7,84– 9,37]	8,34 [7,87– 8,68]	8,15 [6,4– 9,75]
TGF-1 β , пг/мг белка	Щелочной ожог	51,16 [49,14– 51,835]	54,41 [52,3– 55,04]	60,87 [60,23– 61,26]	63,03 [60,79– 65,21]	45,53 [44,78– 46,91]	43,77 [43,61– 46,12]	46,12 [42,88– 47,98]
	Термический ожог	47,19 [46,38– 49,21]	53,64 [52,62– 54,97]	61,47 [60,11– 62,88]	47,8 [46,85– 48,57]#	45,13 [44,77– 46,26]	43,45 [42,66– 46,11]	42,5 [41,32– 44,85]
Примечание – # – $p < 0,05$ статистически значимые различия между группами								

Таблица 7 – Динамика показателей свободнорадикального статуса роговицы при щелочном и термическом ожоге (медиана, верхний и нижний квартили)

Показатель	Серия эксперимента	Сутки эксперимента						
		1	3	5	7	14	21	28
ТБК-реактивные продукты, нмоль/мг белка	Щелочной ожог	3,08 [2,79– 3,39]	5,495 [5,39– 5,92]	5,695 [5,49– 5,91]	5,79 [5,73– 6,00]	5,695 [5,49– 5,91]	3,64 [3,41– 4,46]	2,47 [2,41– 2,485]
	Термический ожог	4,37 [3,53– 4,6]	4,48 [4,22– 4,97]#	4,97 [3,94– 6,15]	5,04 [4,64– 5,45]	3,32 [3,21– 3,52]#	3,31 [3,11– 3,34]#	2,31 [2,15– 2,45]
Карбонильные производные белков, нмоль/мг белка	Щелочной ожог	2,6 [2,54– 2,7]	3,43 [3,39– 3,6]	4,09 [4,21– 4,32]	3,8 [3,66– 4,23]	4,06 [3,92– 4,14]	2,94 [2,92– 3,08]	1,99 [1,90– 2,03]
	Термический ожог	2,78 [2,705– 2,987]	5,4 [5,31– 5,68]#	4,65 [4,503– 4,734]#	2,86 [2,81– 2,97]#	3,1 [2,97– 3,23]#	2,73 [2,41– 2,86]	4,26 [3,99– 4,39]#ë

Продолжение Таблицы 7

SOD ЕА/мг белка	Щелочной ожог	2,97 [2,81– 3,05]	2,63 [2,54– 2,66]	1,87 [1,82– 1,91]	1,66 [1,58– 1,91]	1,76 [1,7– 1,81]	2,4 [2,34– 2,45]	2,25 [2,22– 2,52]
	Термический ожог	2,84 [2,76– 2,91]	2,5 [2,37– 2,54]	2,05 [1,92– 2,3]	1,83 [1,7– 1,92]	2,08 [2,02– 2,2]#	2,26 [2,21– 2,27]#	2,81 [2,58– 2,83]
GPX нмоль НАДФН/ мин/мг белка	Щелочной ожог	19,56 [18,16– 21,48]	17,68 [16,07– 20,47]	14,43 [13,16– 15,24]	14,48 [13,92– 15,13]	11,72 [10,94– 14,39]	17,96 [12,88– 21,47]	22,12 [21,41– 22,54]
	Термический ожог	20,935 [20,21– 23,29]	19,72 [18,56– 21,13]	17,65 [16,7– 19,84]#	15,55 [15,42– 16,23]#	11,53 [11,39– 11,785]	16,30 [14,42– 17,33]	19,11 [18,34– 20,51]#
Примечание – # – $p < 0,05$ статистически значимые различия между группами								

3.6. Влияние лактоферрина на клиническую, гистологическую картину, цитокиновый и свободнорадикальный статус роговицы при ее щелочном ожоге

Применение раствора ЛФ в концентрации 2,5 мг/мл достоверно ($p < 0,05$) ускорило заживление дефекта роговицы кролика (восстановление нормального эпителия роговицы на фоне инстилляций ЛФ произошло к 7-му дню после нанесения дефекта), привело к более раннему стиханию смешанной инъекции бульбарной конъюнктивы и восстановлению прозрачности роговицы вне зоны ожога. При этом, ни у одного животного не было зафиксировано развития перфораций (Рисунок 6, Таблица 8).



Рисунок 6 – Клиническая картина щелочного ожога роговицы на фоне местного применения лактоферрина (окраска флюоресцеином)

Таблица 8 – Суммарная клиническая характеристика щелочного ожога при применении лактоферрина

Вид ожога	Смешанная инъекция бульбарной конъюнктивы	Отек роговицы вне зоны ожога	Полная эпителизация роговицы	Перфорации роговицы
Щелочной ожог	1-7 сутки	2-7 сутки	9,5 [8-12] сутки	N=2
Щелочной ожог + ЛФ	1-5 сутки	2-4 сутки	7 [6-7] сутки#	N=0
Примечание – # – $p < 0,05$ – статистически значимые различия между группами.				

Местное применение раствора лактоферрина привело к положительным

изменениям гистологической картины щелочного ожога роговицы.

До 7 суток гистологическая картина в экспериментальной группе значительно не отличалась от контрольной. На 7-е сутки в центре дефекта эпителий был очагово десквамирован. Пучки коллагеновых волокон плотно примыкали друг к другу, между ними находились полости. Десцеметова мембрана была интактна, покрыта эндотелием.

К 28 суткам эпителий состоял из 3–4 слоев. Базальный слой состоял из кубических или прямоугольных клеток с округлым ядром, поверхностные слои – из уплощенных клеток с вытянутым ядром. Строма состояла из нежных коллагеновых волокон и незначительного количества клеток фибропластического ряда. Десцеметова мембрана и эндотелий без видимых изменений. На краю дефекта и в зоне лимба гистологическая картина препаратов была схожа с гистологической картиной нормальной роговицы кролика (Рисунок 7).

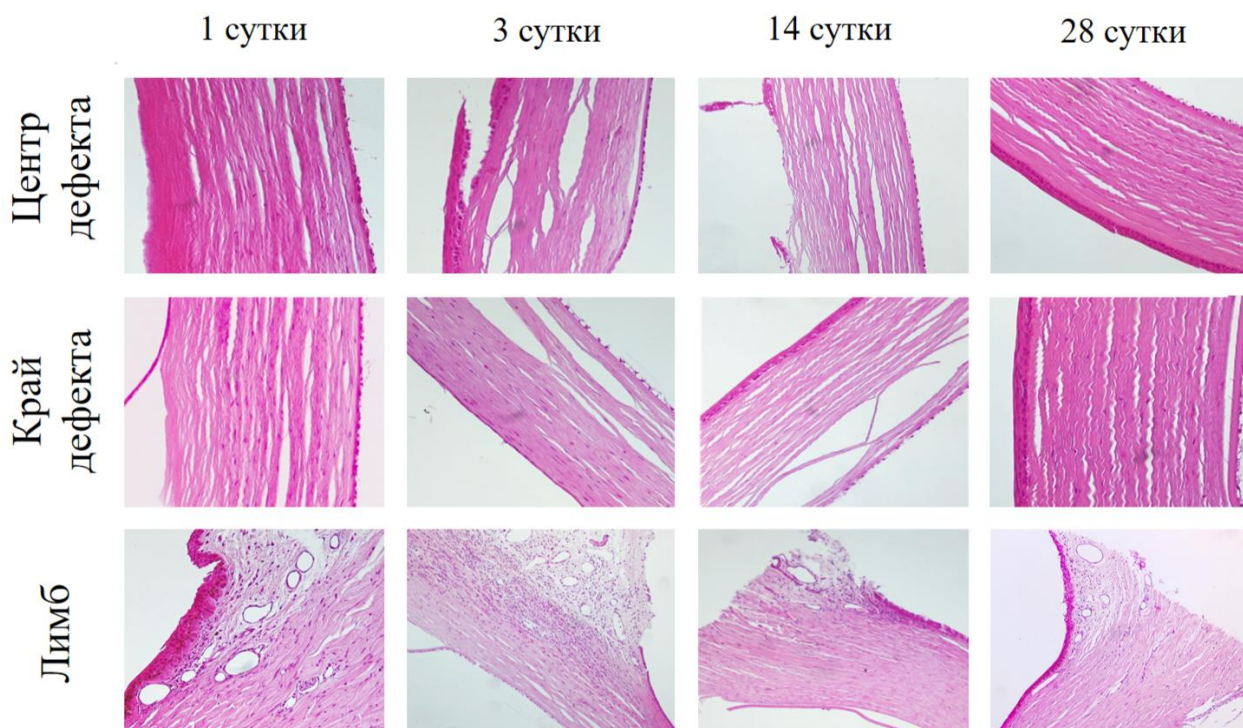


Рисунок 7 – Гистологическая картина роговицы при моделировании щелочного ожога на фоне местного применения раствора лактоферрина (окраска гематоксилином и эозином, ув. 200 раз)

При изучении влияния ЛФ на цитокиновый статус роговицы были получены следующие результаты.

Уровень TNF- α также достоверно ($p<0,05$) превышал показатели интактных животных на протяжении всего эксперимента достоверно на 149,66%, 81,25%, 50,22% 50,36%, 84,03%, 83,0%, 65,93% соответственно, более того на 1, 3, 14 и 21-е сутки даже достоверно ($p<0,05$) превышал показатели контрольных животных на 24,84%, 44,6%, 25,84%, 103,87% соответственно (Таблица 9).

Концентрация IL-10 на фоне применения ЛФ была выше значений интактных животных на всех сроках наблюдения с максимумом изменений на 5 сутки (в 2,6 раза выше, чем у интактных животных), а на 1, 5 и 14-е сутки – достоверно ($p<0,05$) превышала значения контрольных животных на 63,23%, 54,31% и 28,54% соответственно (Таблица 9).

Концентрация IL-4 на фоне применения ЛФ была достоверно ($p<0,05$) ниже значений интактных животных на 14–28-е сутки. При этом уровень IL-4 был достоверно ($p<0,05$) ниже значений контрольной группы на 3 (на 12,02%), 5 (на 13,38%), 21 (на 19,72%) и 28-е сутки (на 14,51%), но выше него – на 7-е сутки (на 8,1%) (Таблица 9).

Содержание TGF- 1β на фоне лечения ЛФ с 1 по 28-е сутки было достоверно выше показателей интактных животных с максимумом изменений на 7 сутки (в 1,98 раза, $p<0,05$). С 1 по 5 сутки концентрация данного фактора была ниже показателей контрольной группы на 16,6%, 29,79%, 27,53% ($p<0,05$)), а с 7 по 28-е сутки – выше их на 7,99%, 26,46%, 17,83%, 6,49% ($p<0,05$)) соответственно (Таблица 9).

ЛФ оказывал антиоксидантное действие, о чем свидетельствовало меньшее повышение уровня ТБК-реактивных продуктов и карбонильных производных белков, более быстрое восстановление активности SOD и GPX по сравнению с показателями контрольной группы.

Уровень ТБК-реактивных продуктов на 1 и 28 сутки достоверно не отличался от значений нормы (интактных животных). На 3, 5, 7, 14, 21 сутки, концентрация ТБК-реактивных продуктов достоверно ($p<0,05$) превышала показатели интактных животных на 51,09%, 97,82%, 112,66%, 66,38%. Данный показатель был достоверно ($p<0,05$) ниже значений контрольной группы

(физраствор) на 3, 5, 14 сутки – на 37,03%, 20,46%, 11,85% (Таблица 10).

Карбонильные производные белков на фоне терапии ЛФ с 1 по 5 сутки были достоверно ($p < 0,05$) выше на 80,06%, 59,81%, 28,48% соответственно, а с 7 по 21 сутки – достоверно ($p < 0,05$) ниже на 32,59%, 35,76%, 20,89% показателей интактных животных. При сравнении значений с показателями контрольной группы, были получены следующие результаты: на 1, 3 и 28 сутки концентрация карбонильных производных в группе ЛФ достоверно ($p < 0,05$) превосходила значения контрольной группы (на 118,85%, 47,23%, 46,73% соответственно), а на 7, 14 и 21 сутки – показатель в группе ЛФ был достоверно ($p < 0,05$) ниже значений в контрольной группе на 43,9%, 50,04%, 14,93% – соответственно (Таблица 10).

ЛФ также ускорял восстановление активности SOD – активность данного фермента достоверно ($p < 0,05$) снижалась только на 3, 5, 7 и 14-е сутки относительно значений интактных животных на 10,9%, 41,99%, 22,44%, 19,87% соответственно, а на 1, 21 и 28 сутки достоверно от значений нормы не отличалась. На 7, 14, 21 и 28-е сутки уровень активности SOD был достоверно выше показателей животных контрольной группы на 45,78%, 42,05%, 23,33% и 39,56% соответственно ($p < 0,05$). Кроме того, ЛФ повышал активность GPX, которая достоверно ($p < 0,05$) снижалась только на 7 и 14-е сутки на 21,76% и 15,56% соответственно относительно группы интактных животных, а на 21 сутки была достоверно ($p < 0,05$) выше показателя нормы на 17,1%. Активность GPX в группе ЛФ была достоверно ($p < 0,05$) выше значений контрольной группы на 1 и 5 сутки на 18,71% и 26,96% соответственно (Таблица 10).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ЛФ оказывает антиоксидантное действие, повышает уровень провоспалительного цитокина – TNF- α , однако разнонаправлено может влиять на содержание противовоспалительных цитокинов – повышает IL-10, снижает IL-4, как понижает, так и повышает TGF-1 β . В совокупности данные биохимические изменения приводят к ускорению заживления роговицы и профилактируют развитие осложнений в виде перфораций.

Таблица 9 – Влияние лактоферрина на концентрацию цитокинов в роговице при ее щелочном ожоге (медиана, верхний и нижний квартили)

Изучаемый показатель	Интактные животные	Сутки эксперимента							
		Группы эксперимента	1	3	5	7	14	21	28
TNF-α, пг/мг белка	120,19 [109,36–123,73]	Без лечения	240,36 [235,24–244,88]*	150,65 [148,02–156,31]*	170,64 [169,23–172,22]*	169,24 [162,85–173,62]*	175,75 [173,62–178,12]*	107,89 [100,26–116,57]	219,62 [211,59–233,08]*
		Лактоферрин 2,5 мг/мл	300,07 [297,26–303,54] *#	217,84 [213,72–225,47] *#	180,55 [176,38–186,56]*	180,72 [171,16–184,18] *	221,19 [210,35–229,52] *#	219,95 [208,93–234,47] *#	199,43 [190,16–213,73]*
IL -4, пг/мг белка	39,78 [36,65–41,09]	Без лечения	39,72 [39,45–40,28]	48,07 [47,33–48,37]*	47,46 [46,94–49,395]*	34,92 [34,69–35,56]*	27,09 [26,65–27,41]*	38,44 [38,24–38,83]	38,6 [38,49–39,05]
		Лактоферрин 2,5 мг/мл	38,61 [37,69–39,28]	42,29 [39,92–43,05] #	41,11 [38,44–42,46] #	37,75 [36,89–38,45]#	28,17 [27,59–28,9]*	30,86 [30,41–32,05] *#	33,0 [31,64–34,42]*#

Продолжение Таблицы 9

IL -10, пг/мг белка	6,21 [5,59– 6,3]	Без лечения	7,76 [7,27– 7,89] *	12,97 [12,29– 13,59]*	10,55 [9,89– 11,26] *	10,3 [10,13– 11,14]*	8,97 [8,63– 9,14]*	8,47 [7,92– 8,63]*	8,016 [7,32– 8,09]*
		Лактоферрин 2,5 мг/мл	12,65 [12,39– 12,71]* #	12,73 [11,93– 13,06]*	16,28 [15,98– 16,52]*#	10,83 [10,19– 11,21]*	11,53 [11,01– 11,84] *#	9,32 [9,26– 9,37]*	7,707 [7,43– 8,31]*
TGF-1β, пг/мг белка	34,57 [34,21– 36,15]	Без лечения	51,16 [49,14– 51,835]*	54,41 [52,3– 55,04]*	60,87 [60,23– 61,26]*	63,03 [60,79– 65,21]*	45,53 [44,78– 46,91]*	43,77 [43,61– 46,12]*	46,12 [42,88– 47,98]*
		Лактоферрин 2,5 мг/мл	42,67 [41,74– 43,43]*#	38,20 [36,17– 38,60]#	44,11 [42,94– 46,29]*#	68,5 [68,39– 68,78]*#	61,91 [61,36– 62,36]*#	53,27 [52,96– 53,56]*#	49,32 [48,96 – 50,5]*#
Примечание – * – p<0,05 – статистически значимые различия с показателями интактных животных; # – статистически значимые различия с показателями контроля.									

Таблица 10 – Влияние лактоферрина на выраженность окислительного стресса в роговице при ее щелочном ожоге (медиана, верхний и нижний квартили)

Изучаемый показатель	Интактные животные	Сутки эксперимента							
		Группы эксперимента	1	3	5	7	14	21	28
ТБК-реактивные продукты, нмоль/мг белка	2,29 [2,18–2,35]	Без лечения	3,08 [2,79–3,39]*	5,495 [5,39–5,92]*	5,695 [5,49–5,91]*	5,79 [5,73–6,00]*	5,695 [5,49–5,91]*	3,64 [3,41–4,46]*	2,47 [2,41–2,485]
		Лактоферрин 2,5 мг/мл	2,86 [2,31–3,01]	3,46 [3,04–3,87]*#	4,53 [4,37–4,6] *#	4,87 [4,54–5,09]*	5,02 [4,7–5,3] *#	3,81 [3,54–3,95]*	2,03 [1,81–2,23]
Карбонильные производные белков, нмоль/мг белка	3,16 [2,93–3,2]	Без лечения	2,6 [2,54–2,7]*	3,43 [3,39–3,6]*	4,0937 [4,21–4,32]*	3,797 [3,664–4,23]*	4,063 [3,919–4,143]*	2,939 [2,918–3,078]	1,99 [1,901–2,032]*
		Лактоферрин 2,5 мг/мл	5,69 [5,57–5,71] *#	5,05 [5,0–5,11] *#	4,06 [3,94–4,08] *	2,13 [2,08–2,35] *#	2,03 [2,0–2,13] *#	2,5 [2,4–2,63]*#	2,92 [2,76–2,98] #

8

Продолжение Таблицы 10

SOD ЕА/мг белка	3,12 [3,07– 3,14]	Без лечения	2,97 [2,81– 3,05]	2,63 [2,54– 2,66]*	1,87 [1,82– 1,91]*	1,66 [1,58– 1,91]*	1,76 [1,7– 1,81]*	2,4 [2,34– 2,45]*	2,25 [2,22– 2,52]*
		Лактоферрин 2,5 мг/мл	3,0 [2,92– 3,13]	2,78 [2,62– 2,99]*	1,81 [1,71– 1,99]*	2,42 [2,37– 2,51] *#	2,5 [2,37– 2,53] *#	2,96 [2,79– 3,12] #	3,14 [3,1– 3,16] #
GPX нмоль НАДФН/ мин/ мг белка	19,36 [17,88– 23,19]	Без лечения	19,56 [18,16– 21,48]	17,68 [16,07– 20,47]	14,43 [13,16– 15,24]*	14,48 [13,92– 15,13]*	11,72 [10,94– 14,39]*	17,96 [12,88– 21,47]	22,12 [21,41– 22,54]
		Лактоферрин 2,5 мг/мл	23,22 [23,07– 23,39] #	20,12 [19,75– 20,67]	18,32 [16,09– 19,47] #	15,15 [14,19– 17,21]*	16,33 [12,4– 17,76]*	22,67 [19,83– 23,89]*	21,17 [20,74– 22,41]
Примечание – * – p<0,05 – статистически значимые различия с показателями интактных животных; # – статистически значимые различия с показателями контроля.									

3.7. Влияние лактоферрина на клиническую, гистологическую картину, цитокиновый и свободнорадикальный статус роговицы при ее термическом ожоге

При оценке влияния ЛФ на клиническую и гистологическую картину роговицы при ее термическом ожоге были получены следующие результаты.

С 1 по 4-е сутки после нанесения ожогов роговицы, в пределах обожжённой ткани роговица становилась более отечной. Наблюдалась инфильтрация всей роговицы вокруг ожога, которая постепенно уменьшалась, прозрачность роговицы вне зоны ожога восстанавливалась со 2 по 4-е сутки. В течение первых суток развивалась смешанная инъекция бульбарной конъюнктивы, сохранявшаяся до 5–7 суток. Полная эпителизация дефекта на фоне экспериментальной терапии происходила достоверно ($p < 0,05$) раньше, чем в контрольной группе (с 6 по 8-е сутки). На 21-28 сутки формировались более интенсивные, чем в контрольной группе, помутнения роговицы. Перфораций не наблюдалось. (Рисунок 8).



Рисунок 8 – Клиническая картина термического ожога роговицы на фоне применения раствора лактоферрина

Таким образом, местное применение раствора ЛФ привело к более раннему стиханию смешанной инъекции бульбарной конъюнктивы, восстановлению прозрачности роговицы вне зоны ожога, восстановлению эпителия и профилактировало развитие перфораций роговицы, однако к концу регенерации наблюдалось формирование более грубых, относительно контрольной группы, помутнений роговицы. (Рисунок 8, Таблица 11).

С 1 по 3-е сутки гистологическая картина в группе ЛФ не отличалась от

роговицы животных, не получавших экспериментальной терапии (Рисунок 9).

Таблица 11 – Суммарная клиническая характеристика термического ожога при применении лактоферрина

Вид ожога	Смешанная инъекция бульбарной конъюнктивы	Отек роговицы вне зоны ожога	Полная эпителизация роговицы	Перфорации роговицы
Термический ожог	1-10 сутки	2-7 сутки	8,5 [8-11] сутки	N=6
Термический ожог + ЛФ	1-7 сутки	2-4 сутки	7 [6-7] # сутки	N=0
Примечание – # – $p < 0,05$ – статистически значимые различия между группами.				

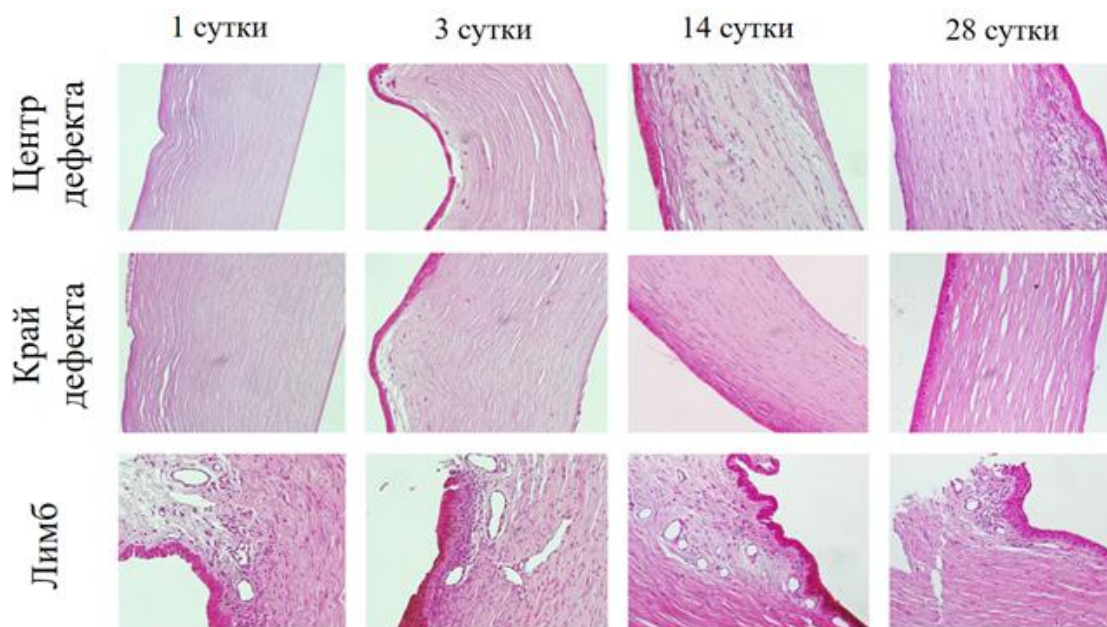


Рисунок 9 – Гистологическая картина роговицы при термическом ожоге на фоне применения раствора лактоферрина (окраска гематоксилином и эозином, ув. 200 раз)

На пятые сутки в группе с экспериментальным лечением в центре дефекта отмечалась отслойка разрушенного эпителия. В собственном веществе роговицы

выявлялся отек, набухание коллагеновых волокон, склеивание их между собой, формировались межфибриллярные полости, умеренное количество фибробластов. В обеих группах Десцеметова мембрана была интактна, частично покрыта эндотелием ближе к краям описываемой зоны (Рисунок 9).

К седьмым суткам наблюдался двухслойный эпителий без четких границ между клетками с вытянутыми ядрами. Пучки коллагеновых волокон плотно примыкали друг к другу, между ними находились полости преимущественно в центральной части собственного вещества роговицы. Наблюдалось большое количество клеток фибропластического ряда. Десцеметова мембрана была интактна, полностью покрыта эндотелием (Рисунок 9).

На 14-е сутки наблюдалась картина, схожая с нормальной гистологической картиной роговицы кролика. Эпителий был представлен 3-4 слоями эпителиоцитов: базальный слой состоял из цилиндрических клеток с округлым ядром и прозрачной цитоплазмой. Выше располагался переходный слой, включавший в себя 1–2 слоя уплощенных клеток. Наиболее поверхностно были расположены плоские клетки без четкой границы друг с другом и плоским вытянутым ядром. Сразу же под эпителием наблюдалось появление нежных тонких нитей соединительной ткани. В строме роговицы было обнаружено большое количество клеток фибропластического ряда, синтезировавших вокруг себя нежные коллагеновые волокна. В Десцеметовой мембране не отмечалось видимых изменений. Встречались участки разрастания плотной соединительной ткани над мембраной, покрытые плоским эпителием (Рисунок 9).

На 28-е сутки в центре дефекта сразу под эпителием отмечалось более выраженное относительно контрольной группы разрастание рыхлой соединительной ткани, напоминающей грануляционную. Клеточный состав собственного вещества был представлен клетками фибропластического ряда в большом количестве. Десцеметова мембрана без видимых изменений, покрыта слоем плотной соединительной ткани и эндотелием (Рисунок 9).

При изучении влияния ЛФ на цитокиновый статус роговицы были получены следующие результаты. Уровень TNF- α достоверно ($p < 0,05$) превышал

показатели интактных животных на всех сроках наблюдения на 112,61%, 137,57%, 145,97%, 124,7%, 127,41% и 107,01% соответственно, более того на 5 сутки даже превышал показатели животных контрольной группы (инстилляции физраствора) на 33,62% ($p < 0,05$) (Таблица 12).

Концентрация IL-4 на фоне местного применения ЛФ была достоверно ($p < 0,05$) выше на 1 (на 21,24%), на 5 (на 8,97%) и на 21 сутки (на 6,51%), а на 7 сутки – ниже значений интактных животных на 17,14%. Относительно группы контроля наблюдались следующие изменения: концентрация IL-4 была достоверно ($p < 0,05$) выше в группе ЛФ на 1 сутки на 35,29%, и ниже показателей контрольной группы на 5 (на 11,35%) и на 7 сутки (на 26,05%) (Таблица 12).

Концентрация IL-10 на фоне применения ЛФ на 1, 5 – 28 сутки была достоверно ($p < 0,05$) выше значений интактных животных на 18,2%, 50,56%, 29,15%, 57,65%, 76,17%, 112,56% соответственно. Относительно контрольной группы наблюдались следующие изменения: на 1, 3, 5 и 7 сутки уровень IL-10 на фоне терапии ЛФ был достоверно ($p < 0,05$) ниже значений контроля на 19,78%, 45,55%, 22,55%, 12,06% соответственно, а с 14 по 28-е сутки их превышал на 8,9%, 31,18% и 61,96% соответственно (Таблица 12).

Содержание TGF-1 β на фоне лечения ЛФ достоверно ($p < 0,05$) превышало как значения интактных животных (на 69,14%, 130,75%, 171,22%, 174,43%, 76,22%, 76,71% и 77,73% с 1 по 28-е сутки соответственно), так и показатели контроля (на 23,9%, 48,71%, 52,53%, 98,47%, 34,99%, 40,6%, 44,56% с 1 по 28-е сутки соответственно) на протяжении всего эксперимента (Таблица 12).

Применение ЛФ для коррекции свободнорадикальных нарушений приводило к следующим результатам. Несмотря на местное применение раствора ЛФ, концентрация ТБК-реактивных продуктов была достоверно ($p < 0,05$) повышена относительно интактных животных с 1 по 7 сутки на 61,14%, 67,69%, 75,55% и 43,23% соответственно. ЛФ оказывал антиоксидантное действие, о чем свидетельствует достоверное ($p < 0,05$) снижение уровня ТБК-реактивных продуктов по сравнению с показателями контроля на 7 (на 34,92%), на 14 (на 25,9%) и 21-е сутки (на 31,42%) (Таблица 13).

Концентрация карбонильных производных белков на фоне применения ЛФ превышало показатели интактных животных на 3 сутки патологии на 15,19% ($p < 0,05$) и на 5 сутки – на 36,08% ($p < 0,05$), а на 14, 21 и 28 сутки был достоверно ($p < 0,05$) их ниже на 21,2%, 17,41%, 36,08% ($p < 0,05$) соответственно. На 3 (на 32,59%), 14 (на 19,68%) и 28-е (на 52,58%) сутки эксперимента уровень карбонильных производных белков в роговице животных, получавших ЛФ был ниже значений контрольных (не леченных) животных, а на 7 сутки наблюдалось достоверное ($p < 0,05$) повышение их содержания на 25,52% (Таблица 13).

ЛФ также ускорял восстановление активности SOD – активность данного фермента достоверно ($p < 0,05$) снижалась только на 1 и 5 сутки относительно интактных животных на 8,33% и 33,33% соответственно, а далее достоверно от значений интактных животных не отличалась. На 28 сутки было зарегистрировано достоверное ($p < 0,05$) повышение уровня показателя на 11,03% относительно контроля (применения физраствора). ЛФ повышал активность GPX, которая достоверно ($p < 0,05$) превосходила значения контрольных животных на 14 (на 59,93%) и 21 сутки (на 42,58%) эксперимента и статистически значимо не отличалась от значений интактных животных на всех сроках наблюдения (Таблица 13).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ЛФ оказывал антиоксидантное действие при экспериментальном термическом ожоге роговицы, однако увеличивал уровень как про- так и противовоспалительных цитокинов в роговице. Произошедшие под воздействием лактоферрина биохимические изменения, приводили к более раннему восстановлению нормальной структуры роговицы (к 14 суткам) и менее выраженной воспалительной инфильтрации её ткани. Однако в то же время они вызывали активацию чрезмерного роста соединительной ткани, усиливавшегося к 28 суткам и клинически проявившегося формированием более грубых, чем в группе контроля, помутнений роговицы.

Таблица 12 – Показатели цитокинового статуса при термическом ожоге роговицы на фоне местного применения раствора лактоферрина (медиана, верхний и нижний квартили)

Изучаемый показатель	Интактные животные	Сутки эксперимента							
		Серии эксперимента	1	3	5	7	14	21	28
TNF- α , пг/мг белка	120,19 [109,36–123,73]	Без лечения	258,61 [246,01–264,165]*	303,06 [298,84–329,56]*	221,24 [211,57–232,56]*	334,51 [330,36–345,77]*	289,04 [282,215–291,08]*	312,51 [302,59–325,36]*	258,56 [251–266,71]*
		Лактоферрин 2,5 мг/мл	255,53 [238,38–258,67]*	285,53 [271,07–299,95]*	295,63 [287,45–310,57]*#	362,76 [345,93–368,91]*	273,32 [257,35–304,13]*	270,07 [255,75–282,03]*	248,81 [233,48–250,45]*
IL-4, пг/мг белка	39,78 [36,65–41,09]	Без лечения	35,65 [34,4–36,69]	40,12 [37,8–41,11]	48,9 [48,4–49,35] *	44,57 [43,53–45,18] *	39,85 [37,64–41,9]	39,14 [37,41–42,29]	42,54 [40,32–43,73]
		Лактоферрин 2,5 мг/мл	48,23 [47,93–50,81]*#	39,23 [38,52–40,89]	43,35 [42,76–44,25]*#	32,96 [31,29–34,23]*#	40,6 [39,11–41,15]	42,37 [42,14–42,98]*	41,87 [41,56–43,88]

Продолжение Таблицы 12

IL-10, пг/мг белка	6,21 [5,59– 6,3]	Без лечения	9,15 [8,6– 9,45]*	11,02 [10,55– 11,23]*	12,01 [11,64– 13,4]*	9,12 [8,64– 9,75]*	8,99 [7,84– 9,37]*	8,34 [7,87– 8,68]*	8,15 [6,4– 9,75]
		Лактоферрин 2,5 мг/мл	7,34 [7,19– 7,56]*#	6,0 [5,46– 6,38]#	9,35 [8,13– 10,39]*#	8,02 [7,83– 8,14] *#	9,79 [9,1– 10,3] *#	10,94 [8,61– 12,07]*#	13,2 [12,0– 13,46]*#
TGF-1β, пг/мг белка	34,57 [34,21– 36,15]	Без лечения	47,19 [46,38– 49,21]*	53,64 [52,62– 54,97]*	61,47 [60,11– 62,88]*	47,8 [46,85– 48,57]*	45,13 [44,77– 46,26]*	43,45 [42,66– 46,11]*	42,5 [41,32– 44,85]*
		Лактоферрин 2,5 мг/мл	58,47 [57,59– 59,83]*#	79,77 [79,21– 80,25]*#	93,76 [88,31– 99,03]*#	94,87 [89,40– 102,23]*#	60,92 [52,71– 63,65]*#	61,09 [53,61– 68,53]*#	61,44 [58,98– 63,64]*#
Примечание – * – p<0,05 – статистически значимые различия с показателями интактных животных; # – статистически значимые различия с показателями контроля.									

Таблица 13 – Показатели окислительного стресса при термическом ожоге роговицы на фоне местного применения раствора лактоферрина (медиана, верхний и нижний квартили)

Изучаемый показатель	Интактные животные	Сутки эксперимента							
		Серии эксперимента	1	3	5	7	14	21	28
ТБК-реактивные продукты, нмоль/мг белка	2,29 [2,18–2,35]	Без лечения	4,37 [3,53–4,6]*	4,48 [4,22–4,97]*	4,97 [3,94–6,15]*	5,04 [4,64–5,45]*	3,32 [3,21–3,52]*	3,31 [3,11–3,34]*	2,31 [2,15–2,45]
		Лактоферрин 2,5 мг/мл	3,69 [3,29–4,28]*	3,84 [3,26–4,2]*	4,02 [3,95–4,04]*	3,28 [3,05–3,62] *#	2,46 [2,43–2,49]#	2,27 [2,14–2,45]#	2,11 [2,08–2,16]
Карбонильные производные белков, нмоль/мг белка	3,16 [2,93–3,2]	Без лечения	2,78 [2,705–2,99]	5,4 [5,31–5,68]*	4,65 [4,503–4,734]*	2,86 [2,81–2,97]	3,1 [2,97–3,23]	2,73 [2,41–2,86]	4,26 [3,99–4,39] *
		Лактоферрин 2,5 мг/мл	2,68 [2,15–3,16]	3,64 [3,38–4] *#	4,3 [3,94–4,59] *	3,59 [3,06–3,73] #	2,49 [2,43–2,55]*#	2,61 [2,45–2,84] *	2,02 [1,95–2,14]*#

Продолжение Таблицы 13

SOD ЕА/мг белка	3,12 [3,07–3,14]	Без лечения	2,84 [2,76– 2,91]*	2,5 [2,37– 2,54]*	2,05 [1,92– 2,3]*	1,83 [1,7– 1,92]*	2,08 [2,02– 2,2]*	2,26 [2,21– 2,27]*	2,81 [2,58– 2,83]*
		Лактоферрин 2,5 мг/мл	2,86 [2,8– 2,9]*	1,94 [1,76– 2,83]	2,08 [1,98– 2,12]*	2,66 [2,56– 2,74]	2,77 [2,67– 2,83]	2,9 [2,77– 3,05]	3,12 [3,07– 3,13] #
GPX нмоль НАДФН/ мин/ мг белка	19,36 [17,88– 23,19]	Без лечения	20,935 [20,21– 23,29]	19,72 [18,56– 21,13]	17,65 [16,7– 19,84]	15,55 [15,42– 16,23]*	11,53 [11,39– 11,785]*	16,30 [14,42– 17,33] *	19,11 [18,34– 20,51]
		Лактоферрин 2,5 мг/мл	22,83 [22,36– 23,84]	22,01 [17,95– 23,85]	18,82 [16,34– 22,17]	17,32 [17,25– 17,41]	18,44 [17,2– 18,99]#	23,24 [21,92– 23,76]#	23,61 [21,19– 24,11]
Примечание – * – р<0,05 – статистически значимые различия с показателями интактных животных; # – статистически значимые различия с показателями контроля.									

3.8. Сравнение влияния лактоферрина на клиническую, гистологическую картину, цитокиновый и свободнорадикальный статус роговицы при ее щелочном и термическом ожогах

Местное применение раствора ЛФ при обоих видах ожога привело к более раннему стиханию смешанной инъекции бульбарной конъюнктивы, восстановлению прозрачности роговицы вне зоны ожога, восстановлению эпителия и профилактировало развитие перфораций роговицы (Таблица 14, Рисунки 6, 8).

Таблица 14 – Суммарная клиническая характеристика щелочного и термического ожога при применении лактоферрина

Вид ожога	Смешанная инъекция бульбарной конъюнктивы	Отек роговицы вне зоны ожога	Полная эпителизация роговицы	Перфорации роговицы
Щелочной ожог + ЛФ	1-5 сутки	2-4 сутки	7 [6-7]	N=0
Термический ожог + ЛФ	1-7 сутки	2-4 сутки	7 [6-7]	N=0

Изучение гистологической картины показало, что при щелочном ожоге ЛФ способствовал восстановлению нормального эпителия роговицы, на 28 сутки строма состояла из нежных коллагеновых волокон и незначительного количества клеток фибропластического ряда. Десцеметова мембрана и эндотелий – без видимых изменений. На краю дефекта и в зоне лимба гистологическая картина препаратов была схожа с гистологической картиной нормальной роговицы кролика (Рисунок 7).

При термическом ожоге местное применение раствора ЛФ так же привело к более раннему восстановлению эпителия роговицы, но, кроме того, способствовало появлению в строме умеренного количества фибробластов уже на

5 сутки наблюдения, количество которых нарастало к 28 суткам и в исходе в центре дефекта под эпителием отмечалось более выраженное относительно контрольной группы разрастание рыхлой соединительной ткани, напоминающей грануляционную. Десцеметова мембрана была также покрыта слоем плотной соединительной ткани (Рисунок 9).

Для изучения биохимических механизмов влияния лактоферрина на течение экспериментального щелочного и термического ожога было выполнено сравнение изучаемых показателей свободнорадикального и цитокинового статуса роговицы.

При изучении влияния лактоферрина на цитокиновый статус роговицы были получены следующие результаты.

На первые сутки уровень TNF- α в роговице в группе лечения лактоферрином термического ожога был достоверно ($p < 0,05$) ниже, чем в группе щелочного ожога на 14,84%, а с 3-их по 28 сутки уровень TNF- α в роговице в группе лечения лактоферрином термического ожога был выше, чем в группе щелочного ожога, максимальные различия – в 2 раза, наблюдались на 7-е сутки эксперимента (Таблица 15).

На 1, 14, 21 и 28 сутки концентрация IL-4 в роговице у животных с термическим ожогом достоверно ($p < 0,05$) превышала значения группы щелочного ожога на 24,9%, 44,1%, 37,3%, 26,9% соответственно. А на 7 сутки – была ниже значения группы щелочного ожога на 12,7% ($p < 0,05$) (Таблица 15).

Концентрация IL-10 в роговице при щелочном ожоге на 1, 3, 5 и 7 сутки достоверно превышала показатели кроликов с термическим ожогом, на 72,3%, 112,2%, 74,1% и 35,04% (для всех $p < 0,05$) соответственно, на 14 и 21 сутки достоверно между животными с разными экспериментальными моделями не различался, а на 28 сутки уровень IL-10 в роговице после термического ожога наоборот превышал показатели кроликов с щелочным ожогом на 71,43% ($p < 0,05$).

Уровень TGF- 1β на 1, 3, 5, 7, 28 сутки в группе термического ожога достоверно ($p < 0,05$) превышал значения группы щелочного ожога на 37,0%, 108,8%, 112,6%, 38,5%, 24,6% соответственно (Таблица 15).

При термических ожогах уровень ТБК-реактивных продуктов на 1 сутки было достоверно ($p < 0,05$) выше на 29,0%, чем в группе щелочных ожогов, а на 7, 14 и 21 сутки наоборот уровень ТБК-реактивных продуктов в роговице после щелочного ожога и лечения лактоферрином превышал показатели кроликов с термическим ожогом – на 48,5%, 104,1% и 67,8% ($p < 0,05$) (Таблица 16).

При щелочном ожоге и лечении лактоферрином уровень карбонильных производных белков превышал показатели пролеченных животных с термическим ожогом на 1 сутки на 112,3%, на 3 сутки на 38,7% и на 28 суток на 44,6% ($p < 0,05$), а на 7 и 14 сутки наоборот, в группе термического ожога превышал значения группы щелочного ожога на 68,5% и 22,7% ($p < 0,05$) (Таблица 16).

Активность SOD с 5 по 14 сутки была достоверно ($p < 0,05$) выше в группе термического ожога на 14,92%, 9,92% и 10,8% соответственно (Таблица 16).

Активность GPX в роговице кроликов на фоне лечения лактоферрином между животными с разными типами ожогов на фоне лечения не различалась (Таблица 16).

Таким образом, обращает на себя внимание существенное превышение уровней провоспалительного цитокина TNF- α и противовоспалительного цитокина TGF- 1β в роговице кроликов при лечении лактоферрином термического ожога лактоферрином по сравнению с данными показателями при лечении щелочного ожога. Данные биохимические изменения могут лежать в основе более выраженного развития соединительной ткани – образования помутнения роговицы при применении тестируемого вещества при термическом ожоге.

Таблица 15 – Сравнение влияния Лактоферрина на цитокиновый статус роговицы при щелочном и термическом ожоге (медиана, верхний и нижний квартили)

Изучаемый показатель	Сутки эксперимента							
	Серии эксперимента	1	3	5	7	14	21	28
TNF- α , пг/мг белка	Щелочной ожог	300,07 [297,26– 303,54]	217,84 [213,72– 225,47]	180,55 [176,38– 186,56]	180,72 [171,16– 184,18]	221,19 [210,35– 229,52]	219,95 [208,93– 234,47]	199,43 [190,16– 213,73]
	Термический ожог	255,53 [238,38– 258,67] #	285,53 [271,07– 299,95] #	295,63 [287,45– 310,57]#	362,76 [345,93– 368,91]#	273,32 [257,35– 304,13] #	270,07 [255,75– 282,03] #	248,81 [233,48– 250,45]#
IL-4, пг/мг белка	Щелочной ожог	38,61 [37,69– 39,28]	42,29 [39,92– 43,05]	41,11 [38,44– 42,46]*	37,75 [36,89– 38,45]	28,17 [27,59– 28,9]	30,86 [30,41– 32,05]	33,0 [31,64– 34,42]
	Термический ожог	48,23 [47,93– 50,81] #	39,23 [38,52– 40,89]	43,35 [42,76– 44,25]	32,96 [31,29– 34,23] #	40,60 [39,11– 41,15]#	42,37 [42,14– 42,98]#	41,87 [41,56– 43,88]#

Продолжение Таблицы 15

IL-10, пг/мг белка	Щелочной ожог	12,65 [12,39– 12,71]	12,73 [11,93– 13,06]	16,28 [15,98– 16,52]	10,83 [10,19– 11,21]	11,53 [11,01– 11,84]	9,32 [9,26– 9,37]	7,707 [7,43– 8,31]
	Термический ожог	7,34 [7,19– 7,56] #	6,00 [5,46– 6,38]#	9,35 [8,13– 10,39]#	8,02 [7,83– 8,14]#	9,79 [9,10– 10,30]	10,94 [8,61– 12,07]	13,20 [12,00– 13,46]#
TGF-1 β , пг/мг белка	Щелочной ожог	42,67 [41,74– 43,43]	38,20 [36,17– 38,60]	44,11 [42,94– 46,29]	68,5 [68,39– 68,78]	61,91 [61,36– 62,36]	53,27 [52,96– 53,56]	49,32 [48,96– 50,5]
	Термический ожог	58,47 [57,59– 59,83]#	79,77 [79,21– 80,25]#	93,76 [88,31– 99,03]#	94,87 [89,40– 102,23]#	60,92 [52,71– 63,65]	61,09 [53,61– 68,53]	61,44 [58,98– 63,64]#
Примечание – # – $p < 0,05$ – статистически значимые различия между группами.								

Таблица 16 – Сравнение влияния Лактоферрина на свободнорадикальный статус роговицы при щелочном и термическом ожоге (медиана, верхний и нижний квартили)

Изучаемый показатель	Сутки эксперимента							
	Серии эксперимента	1	3	5	7	14	21	28
ТБК-реактивные продукты, нмоль/мг белка	Щелочной ожог	2,86 [2,31–3,01]	3,46 [3,04–3,87]	4,53 [4,37–4,6]	4,87 [4,54–5,09]	5,02 [4,7–5,3]	3,81 [3,54–3,95]	2,03 [1,81–2,23]
	Термический ожог	3,69 [3,29–4,28]#	3,84 [3,26–4,2]	4,02 [3,95–4,04]	3,28 [3,05–3,62]#	2,46 [2,43–2,49]#	2,27 [2,14–2,45]#	2,11 [2,08–2,16]
Карбонильные производные белков, нмоль/мг белка	Щелочной ожог	5,69 [5,57–5,71]	5,05 [5,0–5,11]	4,06 [3,94–4,08]	2,13 [2,08–2,35]#	2,03 [2,0–2,13]#	2,5 [2,4–2,63]	2,92 [2,76–2,98]
	Термический ожог	2,68 [2,15–3,16]#	3,64 [3,38–4]#	4,3 [3,94–4,59]	3,59 [3,06–3,73]#	2,49 [2,43–2,55]#	2,61 [2,45–2,84]	2,02 [1,95–2,14]#

Продолжение Таблицы 16

SOD ЕА/мг белка	Щелочной ожог	3,0 [2,92– 3,13]	2,78 [2,62– 2,99]	1,81 [1,71– 1,99]	2,42 [2,37– 2,51]	2,5 [2,37– 2,53]	2,96 [2,79– 3,12]	3,14 [3,1– 3,16]
	Термический ожог	2,86 [2,8– 2,9]	1,94 [1,76– 2,83]	2,08 [1,98– 2,12] #	2,66 [2,56– 2,74] #	2,77 [2,67– 2,83] #	2,9 [2,77– 3,05]	3,12 [3,07– 3,13]
GPX нмоль НАДФН/ мин/ мг белка	Щелочной ожог	23,22 [23,07– 23,39]	20,12 [19,75– 20,67]	18,32 [16,09– 19,47]	15,15 [14,19– 17,21]	16,33 [12,4– 17,76]	22,67 [19,83– 23,89]	21,17 [20,74– 22,41]
	Термический ожог	22,83 [22,36– 23,84]	22,01 [17,95– 23,85]	18,82 [16,34– 22,17]	17,32 [17,25– 17,41]	18,44 [17,2– 18,99]	23,24 [21,92– 23,76]	23,61 [21,19– 24,11]
Примечание – # – $p < 0,05$ – статистически значимые различия между группами.								

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Более 2,2 миллиардов человек в мире страдают различными заболеваниями, приводящими к снижению зрительных функций [86, 145].

Среди всех травм органов зрения на долю ожогов глаз приходится от 7,7 до 18% [118]. В структуре ожогов роговицы преобладает химическое повреждение (84%), термический фактор встречается реже – в 16% случаев [152].

Наиболее тяжелыми и неблагоприятными в прогностическом плане, являются щелочные ожоги. Щелочь в глазу распадается на гидроксильный ион и катион. Гидроксильный ион омыляет жирные кислоты клеточных мембран, в то время как катион взаимодействует со стромальным коллагеном и гликозаминогликанами. Это взаимодействие способствует более глубокому проникновению щелочи в роговицу и через нее в более глубокие отделы глаза. Последующая гидратация гликозаминогликанов роговицы приводит к помутнению стромы. Щелочь вызывает деформацию и укорочение коллагеновых волокон, что приводит к изменению структуры трабекулярной сети, что может привести к повышению внутриглазного давления [64].

При термических ожогах повреждение тканей происходит высокотемпературным источником, при наличии у него тепловой энергии и контакта с поверхностью глаза. Под действием высокой температуры в роговице развивается коагуляционный некроз, который предотвращает более глубокое повреждение [8,53].

Для разработки новых методов лечения ожогов, необходимо детальное изучение биохимических процессов, лежащих в основе их патогенеза. Общим в патогенезе ожогов роговицы, вне зависимости от этиологии, является воспалительный процесс, сопровождающийся высвобождением протеолитических ферментов, и развитие окислительного стресса [17].

Поэтому в рамках настоящего исследования изучались особенности иммунологического и свободнорадикального статуса роговицы при ее термическом и щелочном ожогах и возможности их коррекции.

На первом этапе исследования разрабатывались адекватные экспериментальные модели.

Общепринятым считается воспроизведение щелочных ожогов роговицы по методу J. Obenberger. Методика формирования щелочного ожога в эксперименте заключается в следующем: щелочной ожог вызывают аппликацией диска фильтровальной бумаги (в виде круга диаметром 8 мм), смоченной 2,5% раствором гидроксида натрия, с экспозицией 5 секунд на роговицу под местной анестезией (0,4% оксибупрокаином) [14, 41, 124]. Некоторые авторы для изучения конкретных целей меняли локализацию повреждения (наносили ожоги паралимбально или в оптической зоне роговицы, с захватом конъюнктивы и без вовлечения конъюнктивы в ожоговый процесс), диаметр фильтровальной бумаги, концентрацию повреждающего агента или время экспозиции [24, 30]. Ряд исследователей использовали закапывание раствора щелочи в конъюнктивальную полость [15, 38].

В единичных исследованиях представлены способы моделирования кислотных ожогов роговицы 2% плавиковой кислотой [48], 3% уксусной кислотой [23]. Так же интерес представляет модель ожога роговицы 90% этанолом [3].

Известны разные способы моделирования термических ожогов роговицы. W.L. Seng et al. (1981) путем мгновенного прикосновения к центральной части роговицы наносил «легкий» ожог, а повторное воздействие термического фактора на то же место с усилением давления и продолжительностью 1 сек расценивал как «сильный ожог» [151]. K.R. Kenyon (1985) рекомендовал после термического ожога удалять неплотно прилегающий эпителий осторожно аппликатором с ватным наконечником [98]. M. Matsubara et al. (1991) считал более эффективным нанесение термического ожога в два этапа. Вначале зондом диаметром 4,5 мм, нагретым до температуры 130°C, путем прикосновения в течение 1 сек. Затем, удалив скальпелем ткань, прилипшую к зонду, повторно прикладывал зонд к роговице в том же месте, еще на 1 сек [113].

А.М. Кодунов (2022) экспериментально воспроизвел термический ожог роговицы в центральной зоне и серию повреждений лимбальной зоны с анализом

эффективности лечения. Ожог на центральную часть роговицы наносился с помощью специального приспособления – металлического цилиндра с плоским основанием диаметром 4 мм, соединенном с источником переменного тока, нагревающим цилиндр до температуры 210°C [3].

Другой подход в воспроизведении термического ожога глаза осуществлен в работе С.А. Мещеряковой и соавт. (2021). Травмирующий агент был представлен водой, нагретой до температуры 80–85°C. Воздействие на центральную зону роговицы происходило путем закапывания 30 капель в течение 20 секунд. Сложностью данного способа являлся контроль фиксированной площади повреждающего агента с глазом [23].

В настоящем исследовании в качестве тест-системы использовались кролики-самцы породы «Советская Шиншилла». Экспериментальная модель щелочного ожога роговицы воспроизводилась по методу J. Obenberger в собственной модификации [124]. Для этого выполнялась аппликация диска фильтровальной бумаги (в виде круга диаметром 6 мм), смоченного 5% раствором гидроксида натрия, на роговицу с экспозицией 20 секунд. От классического метода предложенный способ отличался диаметром диска фильтровальной бумаги, концентрацией щелочи и временем экспозиции, обеспечившие формирование более тяжелых в сравнении с классической методикой ожогов роговицы. При моделировании щелочного ожога по данному способу развивалась патология, соответствующая 3 степени тяжести щелочного ожога у человека.

Моделирование термического ожога роговицы осуществляли по оригинальной методике (патент на изобретение № RU 2780945 C1, 04.10.2022).

На электрическую плитку, нагретую до 200 °C на протяжении 2 минут ставили цилиндр из нержавеющей стали, диаметром основания 6 мм, радиус кривизны основания цилиндра 9,0 мм. Контроль температуры цилиндра проводили пирометром. Перед термическим воздействием в конъюнктивальную полость закапывали 0,4%-й раствор оксибупрокаина. Основание цилиндра, разогретого до 200°C, устанавливали на центральную область роговицы подопытных животных на 3 с. Непосредственно после термического воздействия

всем кроликам проводили орошение роговицы и конъюнктивальной полости раствором натрия хлорида 0,9% комнатной температуры. После повторной инстилляцией 0,4% раствора оксибупрокаина проводили скарификацию струпа роговицы в пределах обожжённой ткани. С помощью данного метода воспроизводилась патология, соответствующая 3 степени тяжести термического ожога у человека.

На следующем этапе исследования был оценен свободнорадикальный и цитокиновый статус роговицы при моделировании щелочного и термического ожогов.

В настоящем исследовании было показано, что развитие щелочного ожога роговицы сопровождается развитием выраженной воспалительной реакции, которая проявлялась повышением концентрации в ткани роговицы как провоспалительных TNF- α , так и противовоспалительных (IL-4, IL-10, TGF- β) цитокинов. Аналогичные результаты были получены и рядом других авторов [76, 168].

C. Sotozono et al. в 1997 году на самках мышей проанализировали изменение цитокинового статуса в обожженной щелочью роговице. Щелочной ожог воспроизводили нанесением 2 мл 0,5 н раствора NaOH на роговицу без последующего промывания глаз [72]. На 7-й день после ожога уровни продукции TNF- α примерно в 1,5 раза превышали нормальные уровни. В проведенном нами исследовании максимальный уровень TNF- α так же регистрировался на 7 сутки эксперимента. Среди десяти исследованных цитокинов, IL-1 α и IL-6 показали резко повышенный уровень в роговице на ранних стадиях ожога щелочью. Интересно, что регенерированный эпителий над роговицей, а не воспалительные клетки, были основными источниками этих двух цитокинов, которые могут играть важную роль в повреждении и заживлении роговицы после щелочных ожогов.

Полученные данные согласуются с результатами И.А. Базикова (2017), который также наблюдал повышение продукции TNF- α и IL-8 в течение 28 суток при развитии инфицированного щелочного ожога роговицы кролика [26].

TNF- α является одним из основных провоспалительных цитокинов, который с одной стороны участвует в развитии резистентности к инфекционным агентам, с другой стороны при гиперпродукции может вызывать развитие осложнений [168]. Показано, что активные формы кислорода через инфламмасомный путь индуцируют продукцию TNF- α поврежденным эпителием роговицы [76]. TNF- α является одним из первых медиаторов, образующихся после окислительного стресса в месте химической травмы глаза.

IL-10 – противовоспалительный цитокин, который приводит к снижению продукции провоспалительных цитокинов, в том числе и TNF- α [5], а усиление продукции IL-10 ведет к снижению противoinфекционной защиты и развитию септических осложнений [34].

TGF-1 β – полифункциональный цитокин, экспрессия которого связана с физиологическими процессами роста, дифференцировки, регенерации и стрессовой реакцией во многих типах клеток организма. TGF-1 β играет важную роль в регуляции работы иммунной системы. TGF-1 β блокирует активацию лимфоцитов и макрофагов [37].

Повышение уровня белков семейства TGF- β является одним из основных механизмов развития фиброза при многих заболеваниях [168].

В нашем исследовании также было показано, что при развитии щелочного ожога происходит активация свободнорадикального окисления и развитие окислительного стресса, о чем свидетельствовало повышение уровня ТБК-реактивных продуктов, карбонильных производных белков, снижение активности антиоксидантных ферментов SOD и GPX. Максимальные изменения отмечались на 5–7-е сутки патологии.

В норме повышенная продукция активных форм кислорода компенсируется активацией защитных антиоксидантных ферментов, тогда как при ожогах данный баланс нарушается, что приводит к избытку свободных радикалов. Так, установлено, что сразу после воздействия щелочи на ткань роговицы усиливается синтез активных форм кислорода [61, 154] и снижается экспрессия и активность антиоксидантных ферментов альдегиддегидрогеназы 3A1, SOD и GPX в эпителии

роговицы [26].

В нашем исследовании развитие термического ожога роговицы также сопровождалось активацией свободнорадикальных и воспалительных реакций – повышалась концентрация ТБК-реактивных продуктов, карбонильных производных белков, снижалась активность антиоксидантных ферментов SOD и GPX, увеличивалась продукция провоспалительного цитокина TNF- α и противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGF-1 β .

При сравнении биохимических изменений в роговице при развитии термического и щелочного ожогов было установлено, что при щелочном ожоге окислительному повреждению подвержены в основном липиды (повышение ТБК-реактивных продуктов) и преобладают противовоспалительные (IL-10 и TGF-1 β) цитокины, при термическом ожоге – окисляются преимущественно белки (повышение карбонильных производных белков) и преобладают провоспалительные цитокины (TNF- α).

Попытки коррекции окислительного стресса при ожогах предпринималось многими авторами [11,71,129,141,146,158]. В качестве терапевтических агентов для лечения ожогов роговицы успешно использовали индометацин и диметилсульфоксид [48], 0,5% раствор диметилтиомочевина и 0,2% раствор SOD [50], фасудил [83], аллопуринол, ацетилцистеин и преднизолона ацетат, ретинилпальмитат [158], витамин С [129], коэнзим Q [71].

Однако применение не всех препаратов с антиоксидантной активностью, оказывает одинаковый эффект на ожоги роговицы. Например, сравнение эффективности местного применения эмоксипина, мексидола и плацебо на репаративные и метаболические процессы в глазу кролика при ожоге роговицы третьей степени показало, что заживление дефекта роговицы было неодинаковым во всех трех группах. В течение первых двух недель площадь дефекта в группе, получавшей мексидол, была на 30% меньше, а у получавших эмоксипин – на 10–15% больше, чем в контроле. На 21-й день площадь дефектов в обеих опытных групп стала больше, чем в контроле, а к 28-м суткам не наблюдалось различий этого параметра ни в одной из трех групп. Антиоксидантная активность слезы в

отношении гидроксильного радикала в группах, получавших плацебо и эмоксипин, была снижена на всех сроках наблюдения, тогда как у кроликов, получавших мексидол, она ни разу не опускалась ниже уровня интактных животных [36]. Дальнейшее сравнение эффективности мексидола и эмоксипина при травмах глаза авторы проводили на моделях щелочной ишемии конъюнктивы и эрозии роговицы. Как и в предыдущем исследовании, эмоксипин, в отличие от мексидола, не повышал антиоксидантную активность слезы. Несмотря на это, оба препарата ускоряли заживление эпителиального дефекта роговицы. Эмоксипин – на стадии миграции эпителиоцитов в область дефекта, а мексидол – на стадии их пролиферации. Под действием обоих препаратов площадь ишемии конъюнктивы сокращалась быстрее, но мексидол был эффективнее [6].

В настоящем исследовании для коррекции свободнорадикальных и цитокиновых нарушений применялся лактоферрин. Было установлено, что применение ЛФ в концентрации 2,5 мг/мл в виде инстилляций по 1 капле 3 раза в день оказывает положительное действие при экспериментальном щелочном ожоге роговицы, ускоряя ее заживление и профилактируя развитие осложнений (перфораций). При этом лактоферрин оказывал антиоксидантное действие и влиял на баланс цитокинов: повышал уровень провоспалительного цитокина – TNF- α , однако разнонаправленно влиял на содержание противовоспалительных цитокинов – повышал IL-10, снижал IL-4, как понижал, так и повышал TGF-1 β .

Считается, что основное антиоксидантное действие ЛФ связано с его способностью связывать ионы железа и, таким образом, предотвращать развитие реакций Фентона и Хабера-Вейса [99].

Недавно, было показано, что ЛФ может также активировать экспрессию CAT, GPX и SOD [79].

В ряде исследований было показано, что ЛФ так же влияет на цитокиновую активность либо повышая уровень противовоспалительных цитокинов, таких как IL-4 и IL-10, либо модулируя провоспалительные, такие как TNF- α , IL-1, IL-6 и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор [42].

В ходе настоящего исследования было установлено, что ЛФ также оказывал

выраженное терапевтическое действие и при термическом ожоге, что проявлялось в ускорении заживления повреждения и профилактики развития осложнений – перфораций роговицы (в группе лечения не было зафиксировано развития ни одного случая перфораций).

При этом ЛФ проявлял выраженное антиоксидантное действие – снижал уровень ТБК-реактивных продуктов и карбонильных производных белков, повышал активность антиоксидантных ферментов – SOD и GPX. При изучении влияния лактоферрина на цитокиновый статус роговицы было показано, что тестируемое вещество повышало на ранних сроках уровень провоспалительного цитокина TNF- α , снижало содержание противовоспалительного цитокина IL-10, а на поздних сроках повышало концентрацию IL-10. Содержание TGF-1 β было повышено на протяжении всего эксперимента по сравнению с контролем.

Особенно стоит отметить, что в настоящем исследовании наряду с положительным действием ЛФ на течение термического ожога, к концу регенерации наблюдалось также более грубое, относительно контрольной группы и группы щелочного ожога помутнение роговицы.

При сравнении биохимических изменений в роговице при щелочном и термическом ожоге на фоне лечения лактоферрином было показано существенное превышение уровней провоспалительного цитокина TNF- α и противовоспалительного цитокина TGF-1 β в роговице кроликов при лечении лактоферрином термического ожога по сравнению с данными показателями при лечении щелочного ожога. Данные биохимические изменения могут лежать в основе более выраженного развития соединительной ткани-образования помутнения роговицы при применении тестируемого вещества при термическом ожоге.

Известно, что TGF-1 β и другие факторы роста, чрезмерно стимулируют процесс заживления, способствующий стромальному фиброзу [70]. Можно предположить, что для профилактики чрезмерного разрастания соединительной ткани можно ограничиться применением ЛФ в течение 14 суток, так как ЛФ ингибирует матриксные металлопротеазы-9 (ММР-9) и матриксные

металлопротеазы-2 (ММР-2) [56], которые необходимы для нормального протекания регенерации роговицы на поздних сроках. Еще в 1985 году Н.Б. Чесноковой и соавт. было показано, что при термическом ожоге роговицы резкая активация трипсиноподобных протеаз в ней, направленная на очищение ожоговой раны, происходит в период с 3 по 14-е сутки, после чего их активность снижается [8]. Далее начинается репарация, в которой участвуют ММР-9 и ММР-2. Ингибирующее действие ЛФ в этот период могло нарушить ее протекание и привести к формированию грубого рубца.

Аналогичные результаты были получены и при применении ЛФ при бактериальной язве роговицы – применение вещества в течение 28 суток приводило к усилению помутнения роговицы [16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе настоящего исследования на кроликах-самцах породы «Советская Шиншилла» были изучены особенности цитокинового и свободнорадикального статуса роговицы при экспериментальных щелочных и термических ожогах.

На первом этапе исследования были разработаны адекватные экспериментальные модели щелочного и термического (патент на изобретение № RU 2780945 C1, 04.10.2022; Удостоверение на рационализаторское предложение №1467 от 13 ноября 2024) ожогов, клиническая и гистологическая картина которых соответствует типичной клинической картине щелочного и термического ожогов 3 степени у человека.

Щелочной ожог вызывали аппликацией диска фильтровальной бумаги (в виде круга диаметром 6 мм), смоченного 5% раствором гидроксида натрия с экспозицией 20 секунд на роговицу.

Экспериментальная модель термического ожога воспроизводилась установкой на роговицу нагретого до 200⁰С цилиндра из нержавеющей стали, диаметром основания 6 мм на 3 с с последующей скарификацией струпа роговицы в пределах обожжённой ткани.

В ходе исследования было доказано, что развитие щелочного и термического ожогов роговицы сопровождается развитием окислительного стресса (повышением уровня ТБК-реактивных продуктов и карбонильных производных белков, снижением активности SOD и GPX), а также выраженной воспалительной реакции – повышением уровня TNF- α , IL-10, TGF-1 β .

При сравнении биохимических изменений в роговице при развитии термического и щелочного ожогов было установлено, что при щелочном ожоге окислительному повреждению подвержены в основном липиды (повышение ТБК-реактивных продуктов) и преобладают противовоспалительные (IL-10 и TGF-1 β) цитокины, при термическом ожоге – окисляются преимущественно белки (повышение карбонильных производных белков) и преобладают провоспалительные цитокины (TNF- α).

Применение раствора лактоферрина в концентрации 2,5 мг/мл в виде инстилляций по 1 капле три раза в день при щелочных ожогах роговицы оказывает выраженный терапевтический эффект, что проявляется ускорением заживления, профилактикой развития осложнений (перфораций роговицы), снижением выраженности окислительного стресса, изменением баланса провоспалительных-противовоспалительных цитокинов.

Местное применение лактоферрина по аналогичной схеме при термических ожогах роговицы наряду с выраженным терапевтическим эффектом, ускорением заживления, профилактикой развития осложнений (перфораций роговицы), снижением выраженности окислительного стресса, повышением концентраций TNF- α (на ранних сроках), IL-10 (на поздних сроках), TGF-1 β (на протяжении всего эксперимента), к концу регенерации усиливает помутнение роговицы.

При сравнении биохимических изменений в роговице при щелочном и термическом ожоге на фоне лечения лактоферрином было показано существенное превышение уровней провоспалительного цитокина TNF- α и противовоспалительного цитокина TGF-1 β в роговице кроликов при лечении термического ожога по сравнению с данными показателями при лечении щелочного ожога. Данные биохимические изменения могут лежать в основе более выраженного развития соединительной ткани – образования помутнения роговицы при применении тестируемого вещества при термическом ожоге.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны экспериментальные модели щелочного и термического ожогов роговицы, которые характеризуются клинической и гистологической картиной, соответствующей типичной клинической картине щелочного и термического ожогов у человека третьей степени.

2. Развитие щелочного ожога роговицы сопровождается развитием выраженной воспалительной реакцией – повышением уровня TNF- α , IL-10, TGF-1 β , а также окислительного стресса (повышением уровня ТБК-реактивных продуктов и карбонильных производных белков, снижением активности SOD и GPX).

3. Развитие термического ожога роговицы также сопровождается развитием воспалительной реакцией (повышением уровня TNF- α , IL-10, TGF-1 β) и окислительного стресса (повышением уровня ТБК-реактивных продуктов и карбонильных производных белков, снижением активности SOD и GPX).

4. При щелочном ожоге окислительному повреждению подвержены в основном липиды (повышение ТБК-реактивных продуктов) и преобладают противовоспалительные (IL-10 и TGF-1 β) цитокины, при термическом ожоге – окисляются преимущественно белки (повышение карбонильных производных белков) и преобладают провоспалительные цитокины (TNF- α).

5. Применение лактоферрина при щелочных ожогах роговицы оказывает выраженный терапевтический эффект, что проявляется ускорением заживления, профилактикой развития осложнений (перфораций роговицы), изменением баланса провоспалительных-противовоспалительных цитокинов и снижением выраженности окислительного стресса.

6. Местное применение лактоферрина при термических ожогах роговицы оказывает выраженный терапевтический эффект, что проявляется ускорением заживления, профилактикой развития осложнений (перфораций роговицы), повышением концентраций TNF- α (на ранних сроках), IL-10 (на поздних сроках), TGF-1 β (на протяжении всего эксперимента), снижением выраженности

окислительного стресса. При этом, к концу регенерации наблюдается более грубое, относительно контрольной группы, помутнение роговицы, что может быть связано с повышенным уровнем противовоспалительных цитокинов, особенно, TGF-1 β .

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанный способ моделирования ожогов третьей степени роговицы у кроликов, воспроизводящий типичную клиническую картину щелочного и термического ожогов у человека, рекомендуется использовать для дальнейших исследований, по оценке эффективности и безопасности способов лечения ожогов роговицы.

2. Местное применение лактоферрина при химических ожогах роговицы ускоряет ее заживление, профилактирует развитие осложнений (перфораций роговицы) и может использоваться для консервативного лечения химических ожогов роговицы после подтверждения полученных результатов в клинических исследованиях.

3. При термических ожогах роговицы третьей степени местное применение лактоферрина ускоряет процесс заживления, однако сопровождается более грубым помутнением роговицы, что требует оптимизации схемы его применения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АФК – активные формы кислорода
- ГБУ – Государственное бюджетное учреждение
- ГПТБ – гидроперекись трет-бутила
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЛФ – лактоферрин
- МДА – малоновыйдиальдегид
- мДНК – митохондриальная дезоксирибонуклеиновая кислота
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
- НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- НАДФН₂ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный
- ОКБ им. Н.А. Семашко – «Областная клиническая больница имени Н.А. Семашко»
- ПОЛ – перекисное окисление липидов
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- РО – Рязанская область
- ТБК – 2-тиобарбитуровая кислота
- ТБК – реактивные – конечные продукты перекисного окисления липидов, в кислой среде реагирующие с 2-тиобарбитуровой кислотой
- ALDH– альдегиддегидрогеназа
- ALDH1A1 – изоформаальдегиддегидрогеназы 1A1
- ALDH3A1 – изоформа альдегиддегидрогеназы 3A1
- α-SMA – альфа-актин гладких мышц
- CAT – каталаза
- CD4 – кластер дифференцировки лимфоцитов 4
- EGF – эпителиальный фактор роста
- GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
- GPX – глутатионпероксидаза
- GPX1, GPX2, GPX3, GPX4, GPX6 – изоформы глутатионпероксидазы

1,2,3,4 и 5 соответственно

GSH – восстановленный глутатион

GSR – глутатионредуктаза

GSS – глутатионсинтетаза

GSSG – дисульфид глутатиона

GT – глутатион-S-трансфераза

H₂ – водород

H₂O – вода

H₂O₂ – перекись водорода

HGF – фактор роста гепатоцитов

HDAC – гистондеацетилаза

HDAC1 – гистондеацетилаза 1

IL-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13,

IL-18 – интерлейкины 1, 1 α , 1 β , 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 18 соответственно

IFN-1 – Интерферон-1

IFN- α/γ – Интерферона α/γ

IFN- γ – Интерферон гамма

KGF – фактор роста кератоцитов

LAP – latency associated peptide

LXA4 – ЛипоксинA4

MCP-1 – моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1

MIF – фактор, ингибирующий миграцию макрофагов

MMP-2 – матриксная металлопротеиназа – 2

MMP-9 – матриксная металлопротеиназа – 9

NF- κ B, p53 – транскрипционные факторы

NK-клетки – натуральные киллеры

NLRP3 – NLR - пириновый домен, содержащий 3 белка

NO $\cdot$ – оксид азота

NT – нитротирозин

$\cdot$ OH – гидроксильный радикал

O₂ – кислород

O₂^{·-} – супероксидный анион-радикал

ONOO⁻ – пероксинитрит

PDGF – тромбоцитарный фактор роста

PRDXs – пероксиредоксины

PRDX – перидоксин

PRDX1 – перидоксин 1

PRDX6 – перидоксин 6

RCI001 – препарат, основным действующим веществом которого является 8-оксо-2'-деоксигуанозин

RGTA– Регенерирующие агенты

SIMP – ингибитор матриксной металлопротеиназы

SOD – супероксиддисмутаза

SOD1, SOD2, SOD3 – супероксиддисмутаза 1, 2 и 3 соответственно

SurR9-C84A - доминантный негативный мутант сурвивина

Th1, Th2, Th17 – Т-хелпер 1, 2, 17 соответственно

TGF-β – трансформирующий фактор роста-β

TGF-1β – трансформирующий фактор роста-1β

TGF-2β – трансформирующий фактор роста-2β

TGF-P – биологически неактивная молекула, состоящая из зрелой молекулы TGF-1β и или LAP

TKT – транскетолаза

TNF – фактор некроза опухолей

TNF-α – фактор некроза опухолей α

TNF-β – фактор некроза опухолей β

TSA – трихостатин-A

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

VEGFA – фактор роста эндотелия сосудов A

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бактериальные поражения роговицы: особенности клинического течения и исходы / Е.А. Дроздова, Н.М. Марачева, О.В. Пухова, Е.И. Тимошевская. – Текст : непосредственный // Медицинский вестник Башкортостана. – 2017. – Т. 12, № 2. – С. 29-32.
2. Валиев, Т.Т. Клиническое применение интерферонов: современный взгляд на вопросы эффективности и безопасности / Т. Т. Валиев. – Текст : непосредственный // Педиатрия. Consilium Medicum. – 2020. – №3. – С. 95-104.
3. Влияние раствора пептидов на процессы ангиогенеза роговицы крыс / А.М. Кодунов, А.В. Терещенко, И.Г. Трифаненкова [и др.]. – Текст : непосредственный // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2021. – Т. 17, № 2. – С. 314-318.
4. Гаврилова, В.Б. Анализ методов определения продуктов ПОЛ / В.Б. Гаврилова, А.Р. Гаврилова, Л.М. Мазул. – Текст : непосредственный // Вопросы медицинской химии. – 1987. – №1. – С. 118-120.
5. Гурина, О.П. Интерлейкин-10. Биологическая роль и клиническое значение / О.П. Гурина, О.Н. Варламова, Л.Ф. Мухитова. – Текст : непосредственный // University therapeutic journal. – 2020. – Т. 2, № 4. – С. 66-74.
6. Действие производных оксипиридинамексидола и эмоксипина на репаративные процессы в глазу кролика на моделях эпителиального дефекта роговицы и ишемии конъюнктивы / Н.Б. Чеснокова, О.В. Безнос, Т.А. Павленко [и др.]. – Текст : непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Т. 9, № 3. – С. 332-335.
7. Дикинов, З.Х. Поиск надежных и информативных молекулярных маркеров воспаления при посттравматическом увеите / З.Х. Дикинов, М.Т. Абидов. – Текст : непосредственный // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2013. – №4. – С. 58-61.
8. Динамика протеолитической и антипротеолитической активности при термическом ожоге роговицы / Н.Б. Чеснокова, Г.Г. Бордюгова, С. Багдаш, Н.Е.

Сосулина. – Текст : непосредственный // Офтальмологический журнал. – 1987. – Т. 4, № 1. – С. 52-55.

9. Изменение функций иммунной системы у пострадавших с проникающим ранением глаза в зависимости от срока травматического периода и терапии / Т.В. Гаврилова, В.В. Усова, Ю.И. Шилов [и др.] – Текст : непосредственный / VI Российский общенациональный офтальмологический форум: сборник научных трудов научно-практической конференции с международным участием. – Москва, 2013. – С. 479.

10. Иммуитет глазного яблока и конъюнктивальная микрофлора / Г.М. Чернакова, Е.А. Клещева, И.М. Шаповал [и др.]. – Текст : непосредственный // Инфекция и иммунитет. – 2012. – №3. – С. 635-644.

11. Исследование локальной антиоксидантной системы глаза при экспериментальном ожоговом повреждении роговицы и перспективы фармакологической коррекции ее параметров / П.В. Макаров, С.М. Титкова, М.В. Ануров [и др.]. – Текст : непосредственный // Вестник офтальмологии. – 2005. – Т. 121, № 6. – С. 40-43.

12. Кадышев, В.В. Применение стимуляторов регенерации роговицы при травматических повреждениях / В.В. Кадышев, Л.В. Кадышева. – Текст : непосредственный // Русский медицинский журнал. Клиническая офтальмология. – 2011. – Т. 12, № 4. – С.153-155.

13. Керимов, К.Т. Ожоги глаз: патогенез и лечение / К.Т. Керимов, А.И. Джафаров, Ф.С. Гахраманов. – Москва, 2005. – 464 с. – Текст : непосредственный.

14. Клеточный состав экспериментальной химической раны роговицы после воздействия пегилированными ферментами гиалуронидазы и субтилизина / В.Е. Забанова, К.И. Ершов, М.С. Селякова [и др.]. – Текст : непосредственный // Journal of Siberian Medical Sciences. – 2023. – Т. 7, № 1. – С. 89-109. doi: 10.31549/2542-1174-2023-7-1-89-109.

15. Козьмова, Т.С. Способ лечения ожогов глаз : авторское свидетельство SU 1827225 A1, МПК A61F 9/00(2006.01) : № 4823616 : заявлено 07.05.1990 : опубликовано 15.07.1993. – Бюл. №26. – 4 с. – Текст : непосредственный.

16. Влияние лактоферрина на течение экспериментальной гнойной язвы роговицы / А.В. Колесников, Е.Р. Немцова, М.М. Шишкин [и др.]. – Текст : непосредственный // Офтальмология. – 2023. – Т. 20, № 1. – С.128-135. doi: 10.18008/1816-5095-2023-1-128-135.

17. Коллагенолитическая и трипсиноподобная активности слёзной жидкости больных с ожоговой травмой глаза / О.С. Рыжакова, Т.А. Гуреева, А.Н. Агеев [и др.]. – Текст : непосредственный // Офтальмологические ведомости. – 2012. – Т. 5. – С. 75-84.

18. Компоненты внеклеточного матрикса в восстановлении поврежденных тканей: биохимические взаимодействия и протективный эффект / К.И. Мелконян, А.О. Бирюкова, Н.Н. Улитина [и др.]. – Текст : непосредственный // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2019. – Т. 4. – С. 55-62.

19. Костюк, В.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцитина / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.В. Ковалева. – Текст : непосредственный // Вопросы медицинской химии. – 1990. – Т.36, №2. – С. 88-91.

20. Куликов, А.Н. О новой классификации ожогов глаз / А.Н. Куликов, В.Ф. Черныш, С.В. Чурашов. – Текст : непосредственный // Вестник офтальмологии. – 2020. – № 2. – С. 134-142. doi: 10.17116/oftalma2020136021134.

21. Ланкин, В.З. Ингибирование перекисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментативными системами (супероксиддисмутаза, глутатион-пероксидаза, глутатион-редуктаза) при экспериментальном злокачественном росте / В.З. Ланкин, С.М. Гуревич. – Текст : непосредственный // Доклады Академии наук СССР. – 1976. – Т.226, №3. – С. 705 – 708.

22. Магеррамов, П.М. Региональные особенности распространенности заболеваний роговицы в республике Азербайджан / П.М. Магеррамов. – Текст : непосредственный // Социальные аспекты здоровья населения. – 2021. – № 6. – С. 23-26. doi: 10.21516/2072-0076-2021-14-2-23-26.

23. Новые лекарственные препараты для офтальмологии на основе 6-

метил-3-(тиетан-3-ил)урацила (экспериментальное исследование) / С.А. Мещерякова, А.Ф. Габдрахманова, Ф.Х. Кильдияров [и др.]. – Текст : непосредственный // Офтальмология. – 2021. – Т. 18, № 2. – С. 355-360. doi: 10.18008/1816-5095-2021-2-355-360.

24. Особенности заживления тяжелых щелочных ожогов только роговицы, только лимбальной зоны, а также их сочетания в эксперименте / С.В. Чурашов, В.Ф. Черныш, А.С. Рудько, И.А. Злобин. – Текст : непосредственный // Практическая медицина. – 2012. – Т. 2, № 4. – С. 214-217.

25. Особенности содержания клеточных мессенджеров воспаления при травмах глаза (обзор) / Е.А. Созуракова, Е.В. Громакина, О.А. Канаева [и др.]. – Текст : непосредственный // МиД. – 2022. – Т. 91, № 4. – С. 4-11.

26. Оценка эффективности применения офтальмологического ниосомального геля «Регенерин» в лечении химического ожога роговицы / И.А. Базиков, В.С. Боташева, Н.И. Калинкина [и др.]. – Текст : непосредственный // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2017. – Т. 13, № 2. – С. 216-220.

27. Патент №2134107 Российская Федерация, МПК 7 А61 К38/40, 35/20, А 61 Р 43/00. Препарат «гистохром» для лечения воспалительных заболеваний сетчатки и роговицы глаз : №98118370/14 : заявлено 1998.10.12 : опубликовано 10.08.1999 / А.А. Артюков, Л.И. Глебко, Г.Б Еляков [и др.]. – Текст : непосредственный.

28. Приходько, В.А. Возможности и перспективы антиоксидантной терапии в лечении заболеваний глаз / В.А. Приходько, С.В Оковитый. – Текст : непосредственный // Медицинский совет. – 2022. – Т.16, № 23. – С. 263–273. doi: 10.21518/2079-701X-2022-16-23-263-273.

29. Результаты использования «Хилопарин-комод» в поликлинической практике офтальмолога / А.Э. Бабушкин, Л.Х. Исангулова, Х.Г. Файзуллина [и др.]. – Текст : непосредственный // Точка зрения. Восток - Запад. – 2016. – № 4. – С.41-43.

30. Результаты раннего использования амниотической мембраны в экспериментальной модели химического ожога роговицы / Э.В. Бойко, Е.М. Трунин, В.В. Татаркин [и др.]. – Текст : непосредственный // Оперативная

хирургия и клиническая анатомия. – 2023. – Т. 7, № 4. – С. 15-24. doi: 10.17116/operhirurg2023704115.

31. Роль Интерлейкина-6 в механизмах развития шизофрении / Г.В. Рукавишников, Т.В. Жилыева, Е.Е. Дубинина, Г.Э. Мазо. – Текст : непосредственный // Нейрохимия. – 2023. – Т. 40, № 1. – С. 23-29. doi: 10.17116/oftalma2020136021134.

32. Роль интерлейкина-8 в непосредственной регуляции функциональной активности Т-лимфоцитов / М.Е. Меняйло, В.В. Малащенко, В.А. Шмаров [и др.]. – Текст : непосредственный // Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 5. – С. 529-536.

33. Роль цитокинов в патогенезе глазных болезней / В.П. Еричев, С.Ю. Петров, А.М. Суббот [и др.]. – Текст : непосредственный // Национальный журнал Глаукома. – 2017. – Т. 16, № 1. – С. 85-99.

34. Роль цитокинов в патогенезе осложнений при ожоговой болезни / И.Л. Иваненко, Г.П. Гладилин, В.В. Никитина С.И. Веретенников. – Текст : непосредственный // Фундаментальные исследования. – 2015. – Т. 1, № 4. – С. 752-754.

35. Симбирцев, А.С. Цитокины в лабораторной диагностике / А.С. Симбирцев, А.А. Тотолян. – Текст : непосредственный // Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. – 2015. – Т. 2, № 11. – Р. 82-98.

36. Сравнительное экспериментальное исследование влияния глазных капель на основе производных 3-оксипиридина (мексидола и эмоксипина) на локальные метаболические процессы и заживление ожоговой раны глаза кролика различной локализации. Сообщение 1. Рана центральной области роговицы / Н.Б. Чеснокова, О.В. Безнос, Т.А. Павленко [и др.]. – Текст : непосредственный // Российский офтальмологический журнал. – 2013. – Т. 6, № 3. – С. 81-85.

37. Трансформирующий фактор роста бета-1 (TGFB1) и развитие деформации позвоночника у детей с идиопатическим сколиозом / А.Н. Филиппова, С.В. Виссарионов, С.Е. Хальчицкий, М.В. Согоян. – Текст : непосредственный // Современные проблемы науки и образования – 2022. – Т. 6,

№ 1. – С. 111. doi: 10.17513/spno.32186.

38. Умарова, Л.Ф. Особенности щелочных ожогов глаз и результаты их лечения / Л.Ф. Умарова. – Текст : непосредственный // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2004. – № 5. – С. 163-165.

39. Шевлюк, Н.Н. Источники репаративного гистогенеза переднего эпителия роговицы / Н.Н. Шевлюк, А.А. Стадников А.В. Радченко. – Текст : непосредственный // Практическая медицина. – 2019. – Т. 17, № 1. – С. 120-122.

40. Экспериментальное исследование цитокиновой регуляции постожоговой регенерации роговицы / Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук, Т.В. Радыгина [и др.]. – Текст : непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1999. – Т. 127. – С. 283-285. <https://doi.org/10.1007/BF02433358>.

41. Экспериментальное моделирование травматических повреждений роговицы / В.Н. Канюков, А.А. Стадников, О.М. Трубина, О.М. Яхина. – Текст : непосредственный // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2014. – Т. 12. – С. 156-159.

42. Actor, J.K. Lactoferrin as a natural immune modulator/ J.K. Actor, S.A. Hwang, M.L. Kruzel. – Text : visual // Current pharmaceutical design. – 2009. – Vol. 15, №17. – P. 1956–1973. doi: 10.2174/138161209788453202.

43. ADAM17 Genetic Variants and the Response of TNF- α Inhibitor in Rheumatoid Arthritis Patients / H. Kim, N. Trinh, Y. Choi [et al.]. – Text : visual // Pharmacogenomics and Personalized Medicine. – 2020. – Vol. 13. – P. 81-88. doi: 10.2147/PGPM.S235035.

44. Age-Related Dry Eye Lactoferrin and Lactobionic Acid / D. Rusciano, S. Pezzino, M. Olivieri [et al.]. – Text : visual // Ophthalmic Research. – 2018. – Vol. 50. – P. 94–99.

45. ALDH3A1: A corneal crystallin with diverse functions / T. Estey, J. Piatigorsky, N. Lassen, V. Vasiliou. – Text : visual // Experimental Eye Research. – 2007. – Vol. 84. – P. 3–12. doi: 10.1016/j.exer.2006.04.010.

46. Alginate-Based Composites for Corneal Regeneration: The Optimization of

a Biomaterial to Overcome Its Limits / M. Tarsitano, M.C. Cristiano, M. Fresta [et al.]. – Text : visual // Gels. – 2022. – Vol. 8, №7. – P. 431. doi: 10.3390/gels8070431.

47. Alkali burn to the eye: protection using TNF- α inhibition / F. Cade, E.I. Paschalis, C.V. Regatieri [et al.]. – Text : visual // Cornea. – 2014. – Vol.4, № 4. – P. 382-389. doi: 10.1097/ICO.0000000000000071.

48. Altan, S. Dimethyl sulfoxide but not indomethacin is efficient for healing in hydrofluoric acid eye burns / S. Altan, Z. Oğurtan. – Text : visual // Burns. – 2017. – Vol. 43, №1. – P. 232-244. doi: 10.1016/j.burns.2016.09.026.

49. Alteration in inflammatory mediators in seriously eye-injured war veterans, long-term after sulfur mustard exposure / H. Ghasemi, M.A. Javadi, S.K. Ardestani [et al.]. – Text : visual // International Immunopharmacology. – 2019. – P. 105897. doi: 10.1016/j.intimp.2019.105897.

50. Antioxidant therapy in the treatment of experimental acute corneal inflammation / J.L. Alio, M.J. Ayala, M.E. Mulet [et al.]. – Text : visual // Ophthalmic Research. – 1995. – Vol. 27, №3. – P. 136–143.

51. Aptamers Against Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines: A Review / M. Boshtam, S. Asgary, Shirin Kouhpayeh [et al.]. – Text : visual // Inflammation. – 2017. – Vol. 40, № 13. – P. 340-349. doi: 10.1007/s10753-016-0477-1.

52. Artym, J. Enhanced clearance of Escherichia coli and Staphylococcus aureus in mice treated with cyclophosphamide and lactoferrin / J. Artym, M. Zimecki, M.L. Kruzel. – Text : visual // International Immunopharmacology. – 2004. – Vol. 4. – P. 1149–1157.

53. Babu, R.J. Oxidative stress in major thermal burns: Its implications and significance / R.J. Babu, M. J. Babu. – Text : visual // Indian Journal of Burns. – 2018. – Vol. 6. – P. 38-43. doi: 10.4103/ijb.ijb_37_17.

54. Bao, Y. Role of Chemokines and Inflammatory Cells in Respiratory Allergy / Y. Bao, X. Zhu. – Text : visual // Journal of Asthma and Allergy. – 2022. – Vol. 15. – P. 1805-1822. <https://doi.org/10.2147/JAA.S395490>.

55. Bovine lactoferrin enhances proliferation of human peripheral blood lymphocytes and induces cytokine production in whole blood cultures / E. Zaczyńska,

M. Kocięba, E. 'Sliwińska, M. Zimecki. – Text : visual // *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. – 2014. – Vol. 23. – P. 871–876.

56. Bovine lactoferrin stimulates human corneal epithelial alkali wound healing in vitro / U. Pattamatta, M. Willcox, F. Stapleton [et al.]. – Text : visual // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2009. – Vol. 50. – P. 1636–1643.

57. Bovine lactoferrin supplementation supports immune and antioxidant status in healthy human males / A.M. Mulder, P.A. Connellan, C.J. Oliver [et al.]. – Text : visual // *Nutrition Research*. – 2008. – Vol. 28, №9. – P. 583–589. doi: 10.1016/j.nutres.2008.05.007.

58. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford. – Text : visual // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.

59. Brigelius-Flohé, R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors / R. Brigelius-Flohé. – Text : visual // *Chem*. – 2006. – Vol. 387. – P. 1329–1335. doi: 10.1515/bc.2006.166.

60. Bukowska-Ośko, I. The immuno-logical role of the placenta in SARS-CoV-2 infection: viral transmission, immune regulation, and lactoferrin activity / I. Bukowska-Ośko, M. Popiel, P. Kowalczyk. – Text : visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, №20. – P. 5799.

61. Cabrera, M. P. Antioxidants and the integrity of ocular tissues / M. P. Cabrera, R. H. Chihuailaf. – Text : visual // *Veterinary medicine international*. – 2011. – P. 905153. doi: 10.4061/2011/905153.

62. Carocho, M. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives / M. Carocho, I.C. Ferreira. – Text : visual // *Food and Chemical Toxicology*. – 2013. – Vol. 51. – P. 15–25. doi: 10.1016/j.fct.2012.09.021.

63. Caspase 1-independent activation of interleukin-1beta in neutrophil-predominant inflammation / M. Guma, L. Ronacher, R. Liu-Bryan [et al.]. – Text : visual // *Arthritis & Rheumatology*. – 2009. – Vol. 60. – P.3642–3650.

64. Cejka, C. Oxidative Stress to the Cornea, Changes in Corneal Optical

Properties, and Advances in Treatment of Corneal Oxidative Injuries / C. Cejka, J. Cejkova. – Text : visual // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2015. – Vol. 10. – P. 591530. doi: 10.1155/2015/591530.

65. Chayakul, V. The enzymatic activities in the alkali-burnt rabbit cornea / V. Chayakul, M. Reim. – Text : visual // *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. – 1982. – Vol. 218, № 3. – P.145-153. doi: 10.1007/BF02215652.

66. Chemical Burns of the Eye: The Role of Retinal Injury and New Therapeutic Possibilities / C.H. Dohlman, F. Cade, C.V. Regatieri [et al.]. – Text : visual // *Cornea*. – 2018. – Vol. 37, № 12. – P. 248-251. doi: 10.1097/ICO.0000000000001438.

67. Chen, Y. Antioxidant defenses in the ocular surface / Y. Chen, G. Mehta, V. Vasiliou. – Text : visual // *SURFER Magazine: Surf News, Events, Photos, Culture, & More*. – 2009. – Vol. 7. – P. 176–185. doi: 10.1016/s1542- 0124(12)70185-4.

68. Chronic Wound Healing by Amniotic Membrane: TGF- β and EGF Signaling Modulation in Re-epithelialization / C. Ruiz-Cañada, Á. Bernabé-García, S. Liarte [et al.]. – Text : visual // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2021. – Vol. 9. – P. 689328. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.689328>.

69. Comparison of Corneal Epithelial Wound Healing between Topical RCI001, Solcoseryl, and Polydeoxyribonucleotide in the Murine Ocular Alkali Burn Model / M.S. Song, Y.A. Ku, S. Kim [et al.]. – Text : visual // *Korean Journal of Ophthalmology*. – 2023. – Vol. 37, №3. – P. 236-244. doi: 10.3341/kjo.2023.0019.

70. Controlled delivery of pirfenidone through vitamin E-loaded contact lens ameliorates corneal inflammation / P. Dixon, T. Ghosh, K. Mondal [et al.]. – Text : visual // *Drug Delivery and Translational Research*. – 2018. – Vol. 8, № 5. – P. 1114-1126. doi: 10.1007/s13346-018-0541-5.

71. CoQ10-containing eye drops prevent UVB-induced cornea cell damage and increase cornea wound healing by preserving mitochondrial function / R. Mencucci, E. Favuzza, C. Boccalini [et al.]. – Text : visual // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2014. – Vol. 55, № 11. – P. 7266-7271. doi: 10.1167/iovs.14-15306.

72. Cytokine expression in the alkali-burned cornea / C. Sotozono, J. He, Y.

Matsumoto [et al.]. – Text : visual // *Current Eye Research*. – 1997. – Vol. 16, №7. – P. 670-676. doi: 10.1076/ceyr.16.7.670.5057.

73. de Oliveira, R.C. Fibrocytes, wound healing and corneal fibrosis / R.C. de Oliveira, S.E. Wilson. – Text : visual // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2020. – Vol. 61. – P. 28–35.

74. Devendra, J. Effect of Oral Lactoferrin on Cataract Surgery Induced Dry Eye: A Randomised Controlled Trial / J. Devendra, S. Singh. – Text : visual // *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. – 2015. – Vol. 9. – P. 6–9.

75. Differential Effects of Dexamethasone and Doxycycline on Inflammation and MMP Production in Murine Alkali-Burned Corneas Associated with Dry Eye / F. Bian, F.S. Pelegrino, J.T. Henriksson [et al.]. – Text : visual // *Ocular Surface*. – 2016. – Vol. 14, №2. – P. 242-54. doi: 10.1016/j.jtos.2015.11.006.

76. Effect of Reactive Oxygen Species Generation in Rabbit Corneal Epithelial Cells on Inflammatory and Apoptotic Signaling Pathways in the Presence of High Osmotic Pressure / Y. Chen, M. Li, B. Li [et al.]. – Text : visual // *PLOS One*. – 2013. – Vol. 8, №8. – P. e72900. doi: 10.1371/journal.pone.0072900. 1371/journal.pone.0072900.

77. Effect of topical immunomodulatory interleukin 1 receptor antagonist therapy on corneal healing in New Zealand white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) after photorefractive keratectomy / B.W. Davies, V. Panday, M. Caldwell [et al.]. – Text : visual // *Archives of Ophthalmology*. – 2011. – Vol. 129, №7. – P. 909–913.

78. Evaluation of lipid oxidative stress status and inflammation in topic ocular surface disease / T.H. Wakamatsu, M. Dogru, I. Ayako [et al.]. – Text : visual // *Molecular Vision*. – 2010. – Vol. 19, № 16. – P. 2465–2475.

79. Evaluation of the Anti-Inflammatory and Anti-Oxidative Effects of Therapeutic Human Lactoferrin Fragments / Y. Pan, Z. Liu, Y. Wang [et al.]. – Text : visual // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. – 2021. – Vol. 9. – P. 779018. doi: 10.3389/fbioe.2021.779018.

80. Expression and prognostic value of PRDX family in colon adenocarcinoma by integrating comprehensive analysis and in vitro and in vivo validation / H. Zhou, L.

Lifa, J. Chen [et al.]. – Text : visual // *Frontiers in Oncology*. – 2023. – Vol. 13. – P.1136738. doi: 10.3389/fonc.2023.1136738.

81. Extracellular matrix components in retrocorneal fibrous membrane in comparison to corneal endothelium and Descemet's membrane / E.W. Leung, L. Rife, R.E. Smith, E.P. Kay. – Text : visual // *Molecular Vision*. – 2000. – Vol. 6. – P. 15–23.

82. Fagoonee, S. Innovative stem cell-based strategies for corneal wound healing: A step forward / S. Fagoonee, G. Saccu, B. Bussolati. – Text : visual // *Molecular Therapy*. – 2023. – Vol. 31, №8. – P. 2307-2308. doi: 10.1016/j.ymthe.2023.07.009.

83. Fasudil hydrochloride, a potent ROCK inhibitor, inhibits corneal neovascularization after alkali burns in mice / P. Zeng, R.-B. Pi, P. Li [et al.]. – Text : visual // *Molecular Vision*. – 2015. – Vol. 21. – P. 688–698.

84. Flanagan, J.L. Role of lactoferrin in the tear film / J.L. Flanagan, M.D. Willcox. – Text : visual // *Biochimie*. – 2009. – Vol. 91. – P. 35–43.

85. From imbalance to impairment: the central role of reactive oxygen species in oxidative stress-induced disorders and therapeutic exploration / S. Afzal, A. S. Abdul Manap, A. Attiq [et al.]. – Text : visual // *Frontiers in pharmacology*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1269581. doi: 10.3389/fphar.2023.1269581.

86. Graca, M. Chemical toxic exposures and chronic ocular pain / M. Graca, K. Sarantopoulos, D.B. Horn. – Text : visual // *Frontiers in Toxicology*. – 2023. – Vol. 10, №5. – P.1188152. doi: 10.3389/ftox.2023.1188152.

87. Gruden, Š, Diverse mechanisms of antimicro-bial activities of lactoferrins, lactoferricins, and other lactoferrin-derived peptides / Š. Gruden, N. Poklar-Ulrih. – Text : visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, №20. – P. 11264.

88. Hydrogen and N-acetyl-L-cysteine rescue oxidative stress-induced angiogenesis in a mouse corneal alkali-burn model / M. Kubota, S. Shimmura, S. Kubota [et al.]. – Text : visual // *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. – 2011. – Vol. 52, № 1. – P. 427–433. doi: 10.1167/iovis.10-6167.

89. Hydrogen promotes the activation of Cu, Zn superoxide dismutase in a rat

corneal alkali-burn model / T. Arima, T. Igarashi, M. Uchiyama [et al.]. – Text : visual // *International Journal of Ophthalmology*. – 2020. – Vol. 13, № 8. – P.1173-1179. doi: 10.18240/ijo.2020.08.01.

90. IL-6 as a corneal wound healing mediator in an in vitro scratch assay / I. Arranz-Valsero, L. Soriano-Romaní, L. García-Posadas [et al.]. – Text : visual // *Experimental Eye Research*. – 2014. – Vol. 125. – P. 183–192.

91. Increased aquaporin 1 and 5 membrane expression in the lens epithelium of cataract patients / O. Barandika, M. Ezquerro-Inchausti, A. Anasagasti [et al.]. – Text : visual // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. – 2015. – Vol. 1862, №10. – P. 2015-2021.

92. Involvement of bovine lactoferrin moieties in the inhibition of herpes simplex virus type 1 infection / L. Seganti, A.M. Di Biase, B. Rega [et al.]. – Text : visual // *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. – 2001. – Vol. 14. – P. 71-80.

93. Involvement of NADPH oxidases in alkali burn-induced corneal injury / X.J. Gu, X. Liu, Y.Y. Chen [et al.]. – Text : visual // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2016. – Vol. 38, №1 – P. 75–82. doi: 10.3892/ijmm.2016.2594.

94. Jensen, S.J.K. Oxidative stress and free radicals // S.J.K. Jensen. – Text : visual // *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. – 2003. – P. 387–392. doi: 10.1016/j.theochem.2003.08.037.

95. Jenssen, H. Antimicrobial properties of lactoferrin / H. Jenssen, R.E. Hancock. – Text : visual // *Biochimie*. – 2009. – Vol. 91, №1. – P. 19-29.

96. Kany, S. Cytokines inflammatory Disease / S. Kany, J.Vollrath, B. Relja. – Text : visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20. – P. 6008. 10.3390/ijms20236008.

97. Keen, J.N. Glutathione transferases catalysis of nucleophylic reactions of glutathione / J.N. Keen, W.B. Iakoby. – Text : visual // *Biological chemistry*. – 1978. – Vol.253, №16. – P. 5854 - 5858.

98. Kenyon, K.R. Inflammatory mechanisms in corneal ulceration / K.R. Kenyon. – Text : visual // *Transactions of the American Ophthalmological Society*. –

1985. – Vol. 83. – P. 610-663.

99. Kruzel, M.L. Lactoferrin in a context of inflammation-induced pathology / M.L. Kruzel, M. Zimecki, J.K. Actor. – Text : visual // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – Vol. 8. – P.1438.

100. Lactoferrin and host defence: An overview of its immuno-modulating and anti-inflammatory properties / D. Legrand, E. Ellass, A. Pierce, J. Mazurier. – Text : visual // *Biometals*. – 2004. – Vol. 17. – P. 225–229.

101. Lactoferrin and Peptide-derivatives: Antimicrobial Agents with Potential Use in Nonspecific Immunity Modulation / M.E. Drago-Serrano, R. Campos-Rodriguez, J.C. Carrero, M. de la Garza. – Text : visual // *Current Pharmaceutical Design*. – 2018. – Vol. 25. P. 1067–1078.

102. Lactoferrin directly scavenges hydroxyl radicals and undergoes oxidative self-degradation: a possible role in protection against oxidative DNA damage / Y. Ogasawara, M. Imase, H. Oda [et al.]. – Text : visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2014. – Vol. 15, №1. – P. 1003-1013. doi: 10.3390/ijms15011003.

103. Lactoferrin in Sjögren's syndrome / M. Dogru, Y. Matsumoto, Y. Yamamoto [et al.]. – Text : visual // *European Journal of Ophthalmology*. – 2007. – Vol. 114. – P. 2366–2367.

104. Lactoferrin suppresses loss of corneal epithelial integrity in a rabbit short-term dry eye model / T. Fujihara, T. Nagano, M. Nakamura, E. Shirasawa. –Text : visual // *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. – 1998. – Vol. 14. – P. 99–107.

105. Lactoferrin: Cytokine Modulation and Application in Clinical Practice / S. Presti, S. Manti, G. Parisi [et al.]. – Text : visual // *Journal of Clinical Medicine*. – 2021. – Vol. 10. – P. 5482. doi: 10.3390/jcm10235482.

106. Lactoferrin: Potential functions, pharmacological insights, and therapeutic promises / K. Ahmed, A.S.M. Saikat, A. Moni [et al.]. – Text : visual // *Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics*. – 2021. – Vol. 4. – P. 223-237. doi: 10.5455/jabet.2021.d123.

107. Laria, C. Combined non-steroidal therapy in experimental corneal injury / C. Laria, J.L. Alió, J.M. Ruiz-Moreno. – Text : visual // Journal of Ophthalmic Research and Ocular Care. – 1997. – Vol. 29, №3. – P. 145-153. doi: 10.1159/000268009.
108. Legrand, D. Overview of Lactoferrin as a Natural Immune Modulator/ D. Legrand. – Text : visual // The Journal of Pediatrics. – 2016. – Vol. 173. – P. 10–15.
109. Lipoxin A4 (LXA4) Reduces Alkali-Induced Corneal Inflammation and Neovascularization and Upregulates a Repair Transcriptome / J. He, T.L. Pham, A.H. Kakazu [et al.]. – Text : visual // Biomolecules. – 2023. – Vol. 13, № 13. – P. 831. doi: 10.3390/biom13050831.
110. Local suppression of IL-1 by receptor antagonist in the rat model of corneal alkali injury / J. Yamada, M.R. Dana, C. Sotozono, S. Kinoshita. – Text : visual // Experimental Eye Research. – 2003. – Vol. 76, №2. – P. 161–167. doi: 10.1016/S0014-4835(02)00293-2.
111. Macrophages in immunoregulation and therapeutics / S. Chen, A.F. Saeed, Q. Liu [et al.]. – Text : visual // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2023. – Vol. 8. – P. 207. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01452-1>.
112. Masson, P.L. An iron-binding protein common to many external secretions / P.L. Masson, J.P. Heremans, C. Dive. – Text : visual // Clinica Chimica Acta. – 1966. – Vol. 14. – P. 735-739.
113. Matsubara, M. Mechanism of basement membrane dissolution preceding corneal ulceration / M. Matsubara, J.D. Zieske, M.E. Fini. – Text : visual // Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 1991. – Vol. 32, №13. – P. 3221-3237.
114. Mechanisms of Retinal Damage after Ocular Alkali Burns / E.I. Paschalis, C. Zhou, F. Lei [et al.]. – Text : visual // American Journal of Pathology. – 2017. – Vol. 187, №6. – P. 1327-1342. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.02.005.
115. Melatonin protects against oxidative stress in granular corneal dystrophy type 2 corneal fibroblasts by mechanisms that involve membrane melatonin receptors / S.I. Choi, S. Dadakhujaev, J. Ryu [et al.]. – Text : visual // Journal of Pineal Research. –

2011. – Vol. 51. – P. 94–103.

116. Members of the ALDH gene family are lens and corneal crystallins / D.L. Cooper, N.R. Isola, K. Stevenson, E.W. Baptist. – Text : visual // *Experimental Biology and Medicine*. – 1993. – Vol. 328. – P. 169–179. doi:10.1007/978-1-4615-2904-0_19.

117. Mendes, V. Mechanisms by Which the Gut Microbiota Influences Cytokine Production and Modulates Host Inflammatory Responses / V. Mendes, I. Galvão, A. T. Vieira. – Text : visual // *Journal of Interferon & Cytokine Research*. – 2019. – Vol. 39. – P. 393–409.

118. Merle, H. Brûlures oculaires [Ocular burns] / H. Merle, M. Gérard, N. Schrage. – Text : visual // *Journal français d'ophtalmologie*. – 2008. – Vol. 31, № 7. – P. 723–34. doi: 10.1016/s0181-5512(08)74391-2.

119. Mesenchymal Stem Cell Exosomes as Immunomodulatory Therapy for Corneal Scarring / H.S. Ong, A.K. Riau, G.H. Yam [et al.]. – Text : visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, №8. – P. 7456. doi: 10.3390/ijms24087456.

120. Multiple enzymic activities of human milk lactoferrin / T.G. Kanyshkova, S.E. Babina, D.V. Semenov [et al.]. – Text : visual // *European Journal of Biochemistry*. – 2003. – Vol. 270. – P. 3353–3361.

121. NF- κ B feedback control of JNK1 activation modulates TRPV1- induced increases in IL-6 and IL-8 release by human corneal epithelial cells / Z. Wang, Y. Yang, H. Yang [et al.]. – Text : visual // *Molecular Vision*. – 2011. – Vol. 17. – P. 3137–3146.

122. Nita, M. The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults / M. Nita, A. Grzybowski. – Text : visual // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2016. – Vol. 12. – P. 1–23. doi: 10.1155/2016/3164734.

123. Nitric oxide attenuated transforming growth factor- β induced myofibroblast differentiation of human keratocytes / J.H. Park, M. Kim, B. Yim, C.Y. Park. – Text : visual // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11, №1. – P. 8183.

124. Obenberger, J. Paper strips and rings as simple tools for standartization of experimental eye injuries / J. Obenberger. – Text : visual // Archives of Ophthalmological Research. – 1975. – Vol. 7. – P. 363–366.

125. Ophthalmic Combination of SurR9-C84A and Trichostatin-A Targeting Molecular Pathogenesis of Alkali Burn / K. Roy, B. Sriramoju, R.K. Kanwar, J.R. Kanwar. – Text : visual // Frontiers in pharmacology. – 2017. – Vol. 21, №8.– P. 426.

126. PDGF-A interactions with fibronectin reveal a critical role for heparan sulfate in directed cell migration during *Xenopus* gastrulation / E.M. Smith, M. Mitsi, M.A. Nugent, K. Symes. – Text : visual // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2009. – Vol. 106, № 51. – P. 21683-21688. doi: 10.1073/pnas.0902510106.

127. Polyphenols from blueberries modulate inflammation cytokines in LPS-induced RAW264.7 macrophages / A. Cheng, H. Yan, C. Han [et al.]. – Text : visual // Molecular Vision. – 2014. – Vol. 69. – P. 382–387.

128. Porcine actoferrin administration enhances peripheral lymphocyte proliferation and assists infectious bursal disease vaccination in native chickens / C.-M. Hung, C.-C. Yeh, H.-L. Chen [et al.]. – Text : visual // Vaccine. – 2010. – Vol. 29. – P. 2895–2902.

129. PRDX2 Protects Against Atherosclerosis by Regulating the Phenotype and Function of the Vascular Smooth Muscle Cell / J. Li, C. Wang, W.Wang Wenjing [et al.]. – Text : visual // Frontiers in Cardiovascular. – 2021. – Vol. 8. – P. 624796. doi: 10.3389/fcvm.2021.624796.

130. Prevalence of dry eye among adult Chinese in the Beijing Eye Study / Y. Jie, L. Xu, Y.Y. Wu, J.B. Jonas. – Text : visual // Eye. – 2009. – Vol. 23. – P. 688–693.

131. Rebamipide suppresses TNF- α production and macrophage infiltration in the conjunctiva / K. Tajima, T. Hattori, H. Takahashi [et al.]. – Text : visual // Molecular Vision. – 2018. – Vol. 21, № 4. – P. 347-352. doi: 10.1111/vop.12510.

132. Recent advances in cytokine detection by immunosensing / G. Liu, M. Qi, M.R. Hutchinson [et al.]. – Text : visual // Biosensors and Bioelectronics. – 2016. – Vol. 79. – P. 810-821.

133. Recombinant expression of porcine lactoferrin peptide LF-6 with intein technology and its immunomodulatory function in ETEC K88-infected mice / Q. Jiang, H. Zhang, Y. Xie, Y. Wang. – Text : visual // *International Immunopharmacology*. – 2016. – Vol. 39. – P. 181–191.

134. Regenerative Approaches and Future Trends for the Treatment of Corneal Burn Injuries / G. Saccu, V. Menchise, C. Giordano [et al.]. – Text : visual // *Journal of Clinical Medicine*. – 2021. – Vol. 10, №2. – P. 317. doi: 10.3390/jcm10020317.

135. Rider, P. Biologics for Targeting Inflammatory Cytokines, Clinical Uses, and Limitations / P. Rider, Y. Carmi, I. Cohen. – Text : visual // *International Journal of Cell Biology*. – 2016. – Vol. 39. – P. 9259646. doi: 10.1155/2016/9259646.

136. Role of Oxidative Stress in Ocular Diseases Associated with Retinal Ganglion Cells Degeneration / E.Y. Kang, P.K. Liu, Y.T. Wen [et al.]. – Text : visual // *Antioxidants (Basel)*. – 2021. – Vol. 10, № 12. – P. 1948. <https://doi.org/10.3390/antiox10121948>.

137. Romi, F. Heat-shock proteins in clinical neurology / F. Romi, G. Helgeland, N.E. Gilhus. – Text : visual // *Neurological Research*. – 2011. – Vol. 66. – P. 65–69. doi: 10.1159/000329373.

138. Sabra, S. Lactoferrin, a unique molecule with diverse therapeutical and nanotechnological applications / S. Sabra, M.M. Agwa. – Text : visual // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – Vol. 164. – P. 1046–1060.

139. Saccà, S.C. Environmental light and endogenous antioxidants as the main determinants of non-cancer ocular diseases / S.C. Saccà, A.M. Roszkowska, A. Izzotti. – Text : visual // *RES (magazine)*. – 2013. – Vol. 752. – P.153–171. doi: 10.1016/j.mrrev.2013.01.001.

140. Salman I.A. The effect of alkali burn on corneal glutathione peroxidase activities in rabbits / I.A Salman, A. Kiziltunc, O. Baykal. – Text : visual // *Turkish journal of medical sciences*. – 2011. – Vol. 41, № 3. – P. 483-486. doi: 10.3906/sag-0910-376.

141. Sekundo W. Topical allopurinol or corticosteroids and acetylcysteine in the early treatment of experimental corneal alkali burns: a pilot study / W. Sekundo, A.J.

Augustin, I. Strempel. – Text : visual // *European Journal of Ophthalmology*. – 2002. – Vol. 12. – P. 366–372.

142. Siska, D.A. A successful amniotic membrane transplant for acute corneal thermal injury: a case report / D.A. Siska. – Text : visual // *Jurnal Oftalmologi*. – 2020. – Vol. 2, №2. – P. 28-32.

143. Skartsis, N. The dichotomous outcomes of TNF α signaling in CD4⁺ T cells / N. Skartsis, L.M.R. Ferreira, Q. Tang. – Text : visual // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 16, № 13. – P.1042622. doi: 10.3389/fimmu.2022.1042622.

144. Snowflake-inspired and blink-driven flexible piezoelectric contact lenses for effective corneal injury repair / G. Yao, X. Mo, S. Liu [et al.]. – Text : visual // *Nature Communications*. – 2023. – Vol. 14, №1. – P. 3604. doi: 10.1038/s41467-023-39315-6.

145. Soleimani, M. Management Strategies of Ocular Chemical Burns: Current Perspectives / M. Soleimani, M. Naderan. – Text : visual // *Clinical Ophthalmology*. – 2020. – Vol. 15, №14. – P. 2687-2699. doi: 10.2147/OPTH.S235873.

146. Suppression of alkali-induced oxidative injury in the cornea by mesenchymal stem cells growing on nanofiber scaffolds and transferred onto the damaged corneal surface / J. Cejkova, P. Trosan C. Cejka [et al.]. – Text : visual // *Experimental Eye Research*. – 2013. – Vol. 116, № 2. – P. 312–323. doi: 10.1016/j.exer.2013.10.02.

147. Tangvarasittichai, O. Oxidative Stress, Ocular Disease and Diabetes Retinopathy / O. Tangvarasittichai, S. Tangvarasittichai. – Text : visual // *Current Pharmaceutical Design*. – 2018. – Vol. 24. – P. 4726–4741.

148. Tear lactoferrin levels in patients with external inflammatory ocular disease / M. Ballow, P.C. Donshik, P. Rapacz, L. Samartino. – Text : visual // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 1987. – Vol. 28, №3. – P. 543-548.

149. TGF β 1 and TGF β 2 proteins in corneas with and without stromal fibrosis: delayed regeneration of apical epithelial growth factor barrier and the epithelial basement membrane in corneas with stromal fibrosis / R.C. de Oliveira, G. Tye, L.P. Sampaio [et al.]. – Text : visual // *Experimental Eye Research*. – 2021. – Vol. 202. – P.

108325.

150. Th17 Activation and Th17/Treg Imbalance in Prolonged Anterior Intraocular Inflammation after Ocular Alkali Burn / M. Yuan, X. Qian, Y. Huang [et al.]. – Text : visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23, №13. – P. 7075. doi: 10.3390/ijms23137075.

151. The effect of thermal burns on the release of collagenase from corneas of vitamin A--deficient and controls rats / W.L. Seng, J.A. Glogowski, G. Wolf [et al.]. – Text : visual // Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 1981. – Vol. 19, №12. – P. 1461-1470.

152. The epidemiology of chemical eye injuries / J. Blackburn, E.B. Levitan, P.A. MacLennan [et al.]. – Text : visual // Current Eye Research. – 2012. – Vol. 37, №9. – P. 787-93.

153. The long-term effect of tacrolimus on alkali burn-induced corneal neovascularization and inflammation surpasses that of anti-vascular endothelial growth factor / L. Chen, J. Zhong, S. Li [et al.]. – Text : visual // Drug Design, Development and Therapy. – 2018. – Vol. 12. – P. 2959-2969. doi: 10.2147/DDDT.S175297.

154. The Multifaceted Therapeutic Role of N-Acetylcysteine (NAC) in Disorders Characterized by Oxidative Stress / G. Raghu, M. Berk, P. A. Campochiaro [et al.]. – Text : visual // Current neuropharmacology. – 2021. – Vol. 19, №8. – P. 1202–1224. doi: 10.2174/1570159X19666201230144109.

155. The role of corneal crystallins in the cellular defense mechanisms against oxidative stress / N. Lassen, W.J. Black, T. Estey, V. Vasiliou. – Text : visual // Annual Review of Cell and Developmental Biology. – 2008. – Vol. 19. – P. 100–112. doi: 10.1016/j.semcdb.2007.10.004.

156. The Role of Inflammatory Cytokines in Neovascularization of Chemical Ocular Injury / A. Sabzevari, M. Jadidi, K. Yazdani [et al.]. – Text : visual // Ocular Immunology and Inflammation. – 2021. – Vol. 30. – P. 1149 - 1161.

157. The role of macrophage migration inhibitory factor in ocular surface disease pathogenesis after chemical burn in the murine eye / S.Y. Oh, J.S. Choi, E.J. Kim [et al.]. – Text : visual // Molecular Vision. – 2010. – Vol. 16. – P. 2402-2411.

158. The wound healing effects of vitamin A eye drops after a corneal alkali burn in rats / E.C. Kim, T.K. Kim, S.H. Park, M.S. Kim. – Text : visual // *Acta Ophthalmologica*. – 2012. – Vol. 90, № 7. – P. 540-546. doi: 10.1111/j.1755-3768.2012.02496.x.

159. Therapeutic Effects of Lactoferrin in Ocular Diseases: From Dry Eye Disease to Infections / A. Vagge, C. Senni, F. Bernabei [et al.]. – Text : visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21, №18. – P. 94–99.

160. Topical Vitamin C Promotes the Recovery of Corneal Alkali Burns in Mice / M. Li, Z. Chen, L. Liu [et al.]. – Text : visual // *Journal of Ophthalmology*. – 2021. – P.2406646. doi: 10.1155/2021/2406646.

161. Transketolase counteracts oxidative stress to drive cancer development / I.M. Xu, R.K. Lai, S.H. Lin [et al.]. – Text : visual // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2016. – Vol. 113. – P. 725-734. doi:10.1073/pnas.1508779113.

162. Transketolase gene expression in the cornea is influenced by environmental factors and developmentally controlled events / C.M. Sax, W.T. Kays, C. Salamon [et al.]. – Text : visual // *Cornea*. – 2000. – Vol. 19. – P. 833–841. doi:10.1097/00003226-200011000-00014.

163. Ultraviolet radiation: Cellular antioxidant response and the role of ocular aldehyde dehydrogenase enzymes / S.A. Marchitti, Y. Chen, D.C. Thompson [et al.]. – Text : visual // *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice*. – 2011. – Vol. 37. – P. 206–213. doi: 10.1097/ICL.0b013e3182212642.

164. Weber, D. Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions / D. Weber, M.J. Davies, T. Grune. – Text : visual // *Redox Biology*. – 2015. – Vol. 5. – P. 367-380.

165. Wilson, S.E. Corneal wound healing / S.E. Wilson. – Text : visual // *Experimental Eye Research*. – 2020. – Vol. 197. – P.108089.

166. Wilson, S.E. Focus on molecules: interleukin-1: a master regulator of the corneal response to injury / S.E. Wilson, A. Esposito. – Text : visual // *Experimental*

Eye Research. – 2003. – Vol. 89. – P. 124–125.

167. Wynn, T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis / T. A. Wynn. – Text : visual // The Journal of Pathology. – 2008. – Vol. 214, № 2. – P.199-210. doi: 10.1002/path.2277.

168. Zelová, H. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances / H. Zelová, J. Hošek. – Text : visual // Inflammation Research. – 2013. – Vol. 62, №7. – P. 641-651. doi: 10.1007/s00011-013-0633-0.