

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«МЕЖОТРАСЛЕВОЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС
«МИКРОХИРУРГИЯ ГЛАЗА» ИМЕНИ АКАДЕМИКА С.Н.ФЕДОРОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

УСАНОВА ГАЛИНА ЮРЬЕВНА

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ
ТОКСИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ РОГОВИЦЫ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ
ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

3.1.5 – офтальмология (медицинские науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,

Трифаненкова Ирина Георгиевна

Научный консультант:

Доктор медицинский наук

Темнов Андрей Александрович

Калуга 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА I. Обзор литературы.....	12
1.1 Система глазной поверхности. Местное побочное действие офтальмологических препаратов на глазную поверхность.....	12
1.1.1 Повреждение глазной поверхности при местном использовании анестезирующих препаратов в офтальмологии	14
1.1.2 Повреждение глазной поверхности при местном использовании противовоспалительных препаратов в офтальмологии.....	15
1.1.3 Повреждение глазной поверхности при местном использовании антибактериальных препаратов в офтальмологии	17
1.1.4 Повреждение глазной поверхности при местном использовании гипотензивных препаратов в офтальмологии	18
1.2 Консерванты в офтальмологических препаратах	20
1.2.1 Влияние бензалкония хлорида на структуры глазной поверхности ..	20
1.2.2 Снижение побочных эффектов медикаментозной терапии. Новое поколение консервантов. Протекторная терапия сопровождения	28
1.3 Сульфатированные гликозаминогликаны	34
1.3.1 Применение сульфатированных гликозаминогликанов в офтальмологии	38
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	41
2.1 Структура эксперимента	41
2.2 Серия экспериментальных исследований <i>in vitro</i>	42
2.2.1 Идентификация эпителиальных клеток	43
2.2.2 Исследование пролиферативного и протекторного действия смеси сГАГ <i>in vitro</i>	44

2.3	Серия экспериментальных исследований на лабораторных животных <i>in vivo</i>	48
2.3.1	Изучение местной токсичности смеси сГАГ, влияние смеси сГАГ на ширину зрачка и уровень внутриглазного давления у кроликов	48
2.3.2	Изучение влияния смеси сульфатированных гликозаминогликанов на модели механической эрозии роговицы в эксперименте <i>in vivo</i>	50
2.3.3	Изучение влияния смеси сульфатированных гликозаминогликанов на экспериментальной модели токсической эрозии роговицы	51
2.3.3.1	Изучение влияния 0,1% раствора бензалкония хлорида на клинко-функциональное состояние роговицы у кролика (моделирование токсической эрозии)	51
2.3.3.2	Изучение регенераторных и протекторных свойств сульфатированных гликозаминогликанов на экспериментальной модели токсической эрозии роговицы	52
2.4	Статистические методы исследования	54

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК *IN VITRO*

3.1	Результаты идентификации эпителиальных клеток	55
3.2	Исследование пролиферативного действия смеси сульфатированных гликозаминогликанов на культуру клеток эпителия роговицы человек в эксперименте <i>in vitro</i>	61
3.3	Изучение протекторного действия смеси сульфатированных гликозаминогликанов на культуру клеток эпителия роговицы в условиях токсического воздействия бензалкония хлорида в эксперименте <i>in vitro</i>	67

ГЛАВА IV. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ IN VIVO... 74

4.1	Результаты изучения местной токсичности смеси сульфатированных гликозаминогликанов и определение эффективности применения сульфатированных гликозаминогликанов на модели механической эрозии роговицы кролика	74
4.1.1	Результаты биомикроскопии переднего отрезка глаза	75
4.1.2	Влияние смеси сульфатированных гликозаминогликанов на ширину зрачка (пупиллометрия)	76
4.1.3	Влияние смеси сульфатированных гликозаминогликанов на уровень внутриглазного давления	77
4.1.4	Изучение влияния смеси сульфатированных гликозаминогликанов на модели механической эрозии роговицы в эксперименте in vivo	77
4.2	Результаты эксперимента по изучению функционального влияния смеси сульфатированных гликозаминогликанов на модели токсической эрозии роговицы	83
4.2.1	Результаты экспериментального исследования влияния 0,1% раствора бензалкония хлорида на состояние роговицы у кроликов (моделирование токсической эрозии роговицы)	84
4.2.2	Изучение влияния смеси сульфатированных гликозаминогликанов на экспериментальной модели токсической эрозии роговицы кролика в эксперименте in vivo	90
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	97
	ВЫВОДЫ	115
	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	117
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	118
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	120

ВВЕДЕНИЕ

Развитие современной офтальмологии и понимание патогенетических механизмов многих глазных заболеваний привели к стремительному прогрессу фармакологической индустрии в данном направлении. Несмотря на то, что это позволило сократить процент инвалидизации пациентов, снизить риск развития осложнений в послеоперационном периоде, а также улучшить эффективность проводимого лечения, частота встречаемости токсических реакций со стороны глазной поверхности значительно выросла и стала представлять актуальную проблему современной офтальмологии [70,115, 199,224].

Симптоматика токсического (или ятрогенного) повреждения глазной поверхности включает в себя неспецифические жалобы пациентов, наиболее часто представленные в виде красноты глаз, дискомфорта, жжения, ощущения сухости, чувства "инородного тела" [94,195]. Это может существенно снижать уровень комплаентности у пациентов, особенно вынужденных принимать терапию в течение длительного времени [34, 70, 142,143]. Развитие побочных реакций токсического характера может маскировать признаки основного заболевания, а также снижать клиничко-функциональные результаты лечения [1,2,147]. Помимо аллергических реакций, характер изменений глазной поверхности при объективном обследовании может варьировать от поверхностной эпителиопатии до значительных грубых изменений роговицы и конъюнктивы, вплоть до развития псевдопемфигоида, неоваскуляризации и перфорации роговицы, что во многом зависит от длительности и степени предшествующего воздействия [209,210, 123, 207]. Токсическое воздействие на структуры глазного яблока может оказывать активная субстанция лекарственных препаратов. Известны клинические случаи возникновения местных побочных реакций на фоне применения анестезирующих [69], противовирусных [58, 111], антибактериальных [66,67,79], противогрибковых

[137, 194], гипотензивных [55,71] и противовоспалительных препаратов [62,128,162, 62]. Имеются данные о тормозящем влиянии инстилляций дексаметазона [80], нестероидных противовоспалительных препаратов [63,117,162] и антибиотиков [198] на эпителизацию роговицы в эксперименте и в рамках клинических наблюдений. В литературе также представлены данные о токсическом влиянии противоаллергических [118,153] и местных анестетиков на эпителий роговицы при их длительном использовании [172,186].

Наибольший токсический эффект препаратов на структуры глазной поверхности связывают с влиянием консервантов, входящих в их состав [74,112,182]. В настоящее время самым распространенным консервантом является бензалкония хлорид. Многочисленные клинические и экспериментальные исследования подтверждают наличие токсического действия бензалкония хлорида на роговицу и другие структуры глазного яблока [91, 98, 201,219]. Отмена медикаментозного лечения или использование бесконсервантных аналогов не всегда представляется возможным, что определяет актуальность разработки новых подходов к лечению пациентов с сопутствующей патологией глазной поверхности или вынужденных использовать местные офтальмологические препараты в течение длительного периода времени [112].

Таким образом, поиск и создание новых изделий медицинского назначения, сочетающих в себе способность к стимуляции регенерации эпителия роговицы с протекторным действием на эпителий глазной поверхности в условиях токсического воздействия, является актуальной задачей современной офтальмологии.

Цель: разработать технологию профилактики и лечения токсического повреждения роговицы с использованием сульфатированных гликозаминогликанов и оценить её эффективность в эксперименте.

Задачи:

1. Изучить жизнеспособность культуры клеток эпителия роговицы человека, выделенных из кадаверных глаз и подтвердить эпителиальный фенотип клеток с использованием морфологического и иммуногистохимического анализа.
2. Исследовать пролиферативную активность клеток эпителия роговицы человека под влиянием различных концентраций сульфатированных гликозаминогликанов в эксперименте *in vitro*.
3. Определить наличие протекторного действия различных концентраций смеси сульфатированных гликозаминогликанов на культуру клеток эпителия роговицы человека в условиях токсического воздействия раствора бензалкония хлорида в эксперименте *in vitro*.
4. Оценить наличие местной токсичности смеси сульфатированных гликозаминогликанов и определить эффективность применения различных концентраций смеси сГАГ на репаративные процессы в роговице на модели механической эрозии в эксперименте *in vivo*, и определить наиболее эффективную концентрацию из диапазона исследуемых.
5. Разработать экспериментальную модель токсической эрозии роговицы кролика и изучить протекторное действие смеси сульфатированных гликозаминогликанов в условиях токсического воздействия бензалкония хлорида.

Научная новизна:

1. На основании изучения пролиферативной активности клеток эпителия роговицы человека при воздействии различных концентраций смеси сульфатированных гликозаминогликанов в эксперименте *in vitro* впервые доказано стимулирующее влияние смеси на процессы деления клеток в исследуемой культуре.

2. Впервые выявлено наличие протекторных свойств смеси сульфатированных гликозаминогликанов на культуру клеток эпителия роговицы человека в условиях токсического воздействия раствора бензалкония хлорида в эксперименте *in vitro*.

3. На основании изучения репаративной активности клеток эпителия роговицы кролика при воздействии различных концентраций смеси сГАГ на модели механической эрозии роговицы в эксперименте *in vivo*, определено стимулирующее влияние смеси на реэпителизацию эпителия роговицы.

4. Изучение функциональных свойств смеси сульфатированных гликозаминогликанов на клетки эпителия роговицы кролика в условиях токсического воздействия раствора бензалкония хлорида позволило обнаружить протекторное действие сульфатированных гликозаминогликанов в эксперименте *in vivo*.

Практическая значимость

В эксперименте обоснованы репаративные и протекторные свойства смеси сульфатированных гликозаминогликанов на культуре клеток в эксперименте *in vitro* и на различных экспериментальных моделях *in vivo*, что открывает перспективы для последующего внедрения в клиническую практику с целью профилактики и лечения сопутствующих заболеваний глазной поверхности у пациентов, находящихся на длительной медикаментозной терапии.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Разработанная технология профилактики и лечения токсического повреждения роговицы, заключающаяся в инстилляциях смеси сульфатированных гликозаминогликанов, позволяет ускорить репаративные процессы в роговице за счет наличия пролиферативной активности сульфатированных гликозаминогликанов на клетки эпителия роговицы.
2. Использование смеси сульфатированных гликозаминогликанов оказывает протекторное действие на клетки эпителия роговицы, что выражается в снижении клеточной гибели в культуре клеток при добавлении раствора бензалкония хлорида, а также замедлению клиничко-морфологических изменений роговицы кролика при инстилляциях раствора бензалкония хлорида.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены и обсуждены на X съезде Офтальмологов России (Москва 2015), на X Всероссийской научной конференции молодых ученых с участием иностранных специалистов "Актуальные проблемы офтальмологии" (Москва, 2015), научно-клинической конференции ФГАУ "МНТК "Микрохирургия глаза" им. акад. С.Н. Федорова (Москва 2016), 12th European Glaucoma Society Congress -2016 (Prague, Czech Republic), ESCRS 2016 Copenhagen Congress, XV Российском общенациональном офтальмологическом форуме (Москва 2022), 22-м Всероссийском научно-практическом конгрессе с международным участием «Современные технологии катарактальной, рефракционной и роговичной хирургии» (Москва 2022).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, из них 7 - в журналах, рецензируемых ВАК РФ.

Внедрение результатов работы:

Результаты проведенных исследований внедрены в практику исследовательских работ на экспериментальных животных в Чебоксарском филиале ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Федорова» Минздрава РФ и Калужском филиале ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Федорова» Минздрава РФ, в работе Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Минздрава РФ, изложены в докладах на научно-практических конференциях, публикациях, кандидатской диссертации.

Структура и объём работы

Текст диссертации изложен на 154 страницах, содержит 10 таблиц и иллюстрирована 15 рисунками. Работа состоит из введения и 4 глав, включающих обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты экспериментальных и морфологических исследований, содержит общее заключение и выводы. Список использованной литературы включает 228 источников, из них- 51 отечественных и 177 иностранных.

Экспериментальные образцы смеси сульфатированных гликозаминогликанов, состоящей из роговичных хондроитин-4,6-сульфатов и кератансульфата, разработаны в ООО "НЭП Микрохирургия глаза" при непосредственном участии зам. генерального директора по производству С.В. Новикова.

Этапы научно-исследовательской работы (анализ литературных источников, составление дизайна исследования, анализ проведенных экспериментальных исследований) выполнены при непосредственном участии врача-офтальмолога НИЦ офтальмологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова, к.м.н. Е.Х.Тахчиди.

Экспериментальные исследования *in vitro* были выполнены на базе ФГАОУ ВО Московского физико-технического института (Национальный исследовательский институт) в Лаборатории клеточных и молекулярных технологий (под руководством зав. лабораторией, зам. декана ФБМФ по науке и инновациям МФТИ, к.м.н. Е.В. Петерсен).

Экспериментальные исследования *in vivo* выполнены на базе Калужского филиала ФГАУ «НМИЦ "МНТК "Микрохирургия глаза" им. акад. С.Н. Федорова" Минздрава РФ (директор - д.м.н. А.В. Терещенко). Диссертация выполнена под руководством заместителя директора по научной работе д.м.н. И.Г. Трифаненковой.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

1.1. Система глазной поверхности. Местное побочное действие офтальмологических препаратов на глазную поверхность

Разработка препаратов для применения в офтальмологии подразумевает многократные исследования на доклиническом и клиническом этапах, что обеспечивает высокий профиль безопасности препарата при допуске его на фармацевтический рынок. Тем не менее, на сегодняшний день остается актуальной проблема непереносимости офтальмологических препаратов из-за развития побочных эффектов, как местного, так и системного характера, особенно у пациентов, вынужденных принимать офтальмологические препараты в течение длительного периода времени.

Первое упоминание о применении местных лекарственных средств для лечения глазной патологии встречается в древних папирусах Ebers из Древнего Египта, где описываются терапевтические действия свинца, морской соли, железа и серы при местных аппликациях [155]. В 1864 году Albercht von Graefe впервые описал клинический случай возникновения симптоматики токсического кератоконъюнктивита после инстилляции 1% раствора атропина [209].

В настоящее время понимание патогенетических механизмов развития множества офтальмологических заболеваний и развитие фармакологической индустрии позволяет пролонгировать период сохранения зрительных функций у пациентов с хроническими заболеваниями, а также повысить эффективность лечения и снизить риск развития послеоперационных осложнений. В связи с расширением диапазона применения лекарственных препаратов в офтальмологии, частота встречаемости токсических реакций со стороны глазной поверхности значительно выросла и стала представлять актуальную проблему современной офтальмологии [70,224].

В обсуждениях касательно заболеваний переднего отрезка глаза, в том числе токсического влияния препаратов на структуры глазной поверхности, в литературе все чаще встречаются термины «Система глазной поверхности» («Ocular Surface System») и «Заболевание глазной поверхности» («Ocular Surface Disease»), включенные в медицинскую номенклатуру в 2007 году после обсуждения вопроса на Международном Симпозиуме по синдрому сухого глаза (The 2007 International Dry Eye WorkShop, DEWS) и при поддержке Общества специалистов по изучению слезной пленки и глазной поверхности (The Tear Film & Ocular Surface Society, TFOS) [41,76,183].

Принятие того факта, что все структуры глазной поверхности объединены между собой посредством анатомической целостности и непрерывности эпителия, эмбриологической общности, физиологической и функциональной согласованности, единства иннервации и кровоснабжения, общности эндокринной и иммунной регуляции, потребовало пересмотра номенклатуры и интерпретации анатомических субъединиц [41,110]. Современное понятие «система глазной поверхности» включает эпителий конъюнктивы, эпителий роговицы, слезную пленку, эпителий слезной железы, добавочные слезные железы Вольфринга и Краузе, веки, железы Молля и Цейса, эпителий назолакримальной системы, а также компоненты нервной, эндокринной, иммунной и сосудистой систем, соответствующие перечисленным структурам [76]. В понятие «заболевание глазной поверхности» (ЗГП) входит широкий спектр симптоматических и клинических проявлений, затрагивающих все структуры глазной поверхности.

При объективном обследовании пациентов с ЗГП, наиболее частые клинические признаки представлены в виде гиперемии глазной поверхности в сочетании с эпителиопатией роговицы и конъюнктивы. Степень выраженности данных изменений напрямую зависит от длительности и агрессивности воздействия [54]. В литературе представлены данные о множественной вариабельности изменений роговицы на фоне хронического

применения офтальмологических препаратов, которые варьируют от незначительных эпителиальных дефектов до грубых изменений вплоть до развития перфорации роговицы [116,191,210]. Симптоматика и субъективные жалобы при ЗГП, как правило, не обладают специфичностью и проявляются в виде покраснения глаз, сухости, жжения, зуда, ощущением "инородного тела", и могут быть завуалированы проявлениями основного заболевания [207]. Поэтому для манифестации заболевания и установки точного диагноза необходим комплексный дифференцированный подход с детальным выяснением анамнеза заболевания, сопутствующей патологией и обследованием глазной поверхности с определением локализации и степени выраженности повреждения.

1.1.1. Повреждение глазной поверхности при местном использовании анестезирующих препаратов в офтальмологии

Тенденции к переходу стандартов лечения на амбулаторный режим терапии, высокие требования к срокам послеоперационной реабилитации, а также возрастающие требования пациентов к качеству уровня жизни, определяют поиск препаратов, сочетающих высокую активность и минимальную токсичность при проведении местной поверхностной анестезии глазного яблока [5]. Местные анестезирующие средства широко используются в современной офтальмологической практике для проведения диагностических, лечебных, хирургических и лазерных манипуляций.

В повседневной практике врача-офтальмолога кератиты, вызванные длительным применением анестезирующих веществ, встречаются достаточно редко и, как правило, ассоциированы с психическими заболеваниями пациентов [221]. Однако необходимо учитывать, что даже однократные или

единичные инстилляции могут вызвать токсическую реакцию со стороны глазной поверхности.

Н. Brewitt с соавторами (1980) в ходе экспериментального исследования с использованием электронной микроскопии установили, что инстиляция одной капли 0,2% раствора оксибупрокаина вызывает снижение плотности межклеточных контактов эпителиальных клеток, утрату микроскладок и микроворсинок [82]. Длительное применение местных анестезирующих препаратов может быть сопряжено с возникновением стойких эпителиальных дефектов роговицы, развитием стромального отека, повреждением эндотелия, а также может повысить риск вторичного инфицирования [69, 168,216].

Существует несколько теорий патогенеза токсичности местных анестетиков. Прямая цитотоксичность препаратов реализуется за счет непосредственного повреждения клеток эпителия, включая клетки лимбальных палисадов Фогта, что ингибирует миграцию клеток, замедляя процессы эпителизации [216,221]. Некоторые авторы считают, что токсическое действие реализуется из-за повреждения микроворсинок эпителиальных клеток, что снижает стабильность слезной пленки и повышает ее испаряемость. Кроме того, местные анестетики вызывают снижение частоты мигания из-за выключения эфферентной части рефлекторной дуги. Помимо прямого токсического действия анестетиков, большинство авторов сходятся на мнении, что в развитии токсического действия не малую роль играют, входящие в состав препаратов консерванты [40,192].

1.1.2 Повреждение глазной поверхности при местном использовании противовоспалительных препаратов в офтальмологии

Местные формы глюкокортикостероидов и нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВС) широко используются в

офтальмологической практике при лечении различных патологий, а также в послеоперационном периоде после кератопластики, хирургического лечения катаракты, глаукомы, кераторефракционных операций [122,132]. НПВС это группа лекарственных средств, обладающих доказанным местным обезболивающим и противовоспалительным эффектами. Большинство препаратов этой группы являются неселективными ингибиторами фермента циклооксигеназы, подавляя действие обеих его изоформ. Циклооксигеназа отвечает за выработку простагландинов и тромбксана из арахидоновой кислоты, которая в свою очередь получается из фосфолипидов клеточной мембраны за счёт фермента фосфолипаза А2. В офтальмологии НПВС применяются с начала 1990-х годов по настоящее время, и используются для поддержания интраоперационного мидриаза, лечения и профилактики послеоперационного воспаления, в послеоперационном периоде после фоторефракционных операций (ФРК). Также НПВС входят в схему лечения послеоперационного макулярного отека (синдром Ирвина-Гасса) [156]. Местные НПВС принято считать более безопасной альтернативой местным кортикостероидным препаратам, так как их применение позволяет избежать потенциальных побочных эффектов глюкокортикостероидов таких как: повышение уровня ВГД, развитие стероидной катаракты, повышение риска вторичной инфекции на фоне индуцированной иммуносупрессии. НПВС могут вызывать аллергические и токсические реакции со стороны глазной поверхности, описанные в виде задержки реэпителизации, формирования эрозии и даже язвы роговицы [64,184]. Описаны клинические случаи появления субэпителиальных стромальных инфильтратов после рефракционных операций на фоне местных инстилляций НПВС. Механизм формирования побочного действия НПВС некоторые авторы связывают с тем, что на фоне ингибирования циклооксигенного пути, арахидоновая кислота метаболизируется по липоксигенному пути с образованием лейкотриенов, которые являются сильными хемотаксантами для нейтрофилов [141]. В дополнение к хемотаксису лейкотриены стимулируют дегрануляцию

нейтрофилов, которые содержат коллагеназу и другие гидролитические ферменты [173]. В экспериментальных исследованиях инстилляций НПВС ингибировали пролиферацию кератоцитов, снижали скорость реэпителизации. К тому же, местные инстилляций НПВС приводят к повышенной экспрессии матриксных металлопротеиназ (ММП), которые оказывают избирательное действие по отношению к субстратам межклеточного матрикса и способны расщеплять преимущественно коллагены I, II и III типа [105].

1.1.3 Повреждение глазной поверхности при местном применении антибактериальных препаратов в офтальмологии

Антибактериальные препараты в офтальмологии являются неотъемлемым компонентом превентивной и патогенетически ориентированной терапии, а их применение во многом определяет исход хирургического и консервативного лечения. За последние годы подход к разработке антибактериальных препаратов претерпел множество изменений и современные требования к оптимальному препарату включают не только спектр антибактериального действия, но и достаточный профиль безопасности и токсичности. Именно поэтому в настоящее время офтальмологии наиболее часто используются антибактериальные средства из группы аминогликозидов и фторхинолонов. Несмотря на то, что лекарственные препараты проходят обязательные тесты на цитотоксичность на этапах разработки, в литературе встречаются убедительные данные о развитии побочных реакций со стороны глазной поверхности на фоне применения местных антибиотиков [104,148,166,167,218]. Частота возникновения и степень выраженности побочных реакций со стороны глазной поверхности имеет прямую корреляционную связь с длительностью терапии, а также с интенсивностью режима лечения [208]. Применение местных антибактериальных препаратов

может вызвать замедление скорости эпителизации дефекта роговицы [119,225]. Также в литературе представлены множественные клинические случаи образования интрастромальных отложений в роговице при лечении кератитов и инфицированных язв роговицы на фоне местных аппликаций раствора моксифлоксацина и раствора ципрофлоксацина [96,158,202,203]. S.Y. Kim и соавт. (2007) установили, что наряду с замедлением реэпителизации, через 24 часа экспозиции в левофлоксацине и моксифлоксацине вызывает снижение количества жизнеспособных клеток в культуре эпителиоцитов роговицы человека до 64% и 5%, соответственно [135].

1.1.4. Повреждение глазной поверхности при местном использовании гипотензивных препаратов в офтальмологии

Проблема снижения комплаентности у пациентов с глаукомой на фоне длительной медикаментозной терапии широко освещена в литературе и представляет большой научный интерес для многих исследователей [100,189,195]. Несмотря на значительный прогресс в понимании патогенеза глаукомы, терапией первого выбора по настоящее время остается местная медикаментозная терапия, направленная на снижение уровня внутриглазного давления [160,180,227]. Кроме того, медикаментозная терапия часто является терапией сопровождения при лазерном и хирургическом лечении глаукомы.

Высокая эффективность гипотензивной терапии во многом зависит от уровня комплаентности пациентов в виду необходимости применять терапию пожизненно. Развитие побочных эффектов, как местного, так и общего характера может значительно снижать приверженность пациентов к лечению и суммироваться с другими не маловажными факторами (такими как кратность инстилляций, необходимость регулярного контроля, адекватное психологическое восприятие своего заболевания) в формировании низкого уровня комплаентности [195]. Также длительная гипотензивная терапия

детерминирует возрастные изменения глазной поверхности, что может увеличивать степень выраженности субъективного дискомфорта и клинικο-морфологических изменений глазной поверхности.

По данным анкетирования в рамках многоцентрового клинического исследования на 4107 пациентах с глаукомой (Pisella P.J.,2002) 43% исследуемых предъявляли жалобы на дискомфорт в глазах, такие как сухость, жжение, ощущение инородного тела [176]. При этом в группе исследования бесконсервантных капель данные субъективные жалобы встречались в 2 раза реже. Эти данные согласуются с результатами, опубликованными N.Jaenen с соавторами (2007), полученными в ходе многоцентрового исследования в странах западной Европы на 9658 пациентах, получающих медикаментозную терапию по поводу глаукомы на протяжении длительного периода времени [126]. E.W. Leung с соавторами (2008) установили, что клинические проявления ЗГП встречаются от 22 до 78 % пациентов с глаукомой [149]. Процентный разброс частоты встречаемости авторы обосновывают разницей уровня специфичности и чувствительности диагностических методов, используемых для постановки диагноза.

К препаратам выбора первой линии относятся бета-блокаторы и аналоги простагландинов [180]. В 1978 году впервые был представлен Тимолол для местного применения с гипотензивной целью, который по настоящее время является одним из наиболее часто используемых препаратов, а также входит в состав большинства фиксированных комбинаций. Первое упоминание о признаках синдрома сухого глаза на фоне инстилляций Тимолола датируется 1979 годом, когда N.V.Nielsen и J.S.Eriksen впервые опубликовали результаты клинических наблюдений за 64 пациентами, у 7 из которых на фоне терапии отмечались выраженные признаки Синдрома Сухого Глаза с явлениями мелкоочечной диффузной эпителиопатии роговицы [164]. За годы использования Тимолола было проведено множество клинических и

экспериментальных исследований, подтверждающих токсическое действие бета-блокаторов на структуры глазной поверхности [8,81,146,187].

С 1996 года в офтальмологической практике стал применяться Латанопрост, первое соединение из группы аналогов простагландинов, используемое для лечения глаукомы и офтальмогипертензии, после чего стали использоваться Травопрост и Биматопрост (2001), позже Тафлупрост (2008). Высокая эффективность и минимальная кратность закапывания, а также отсутствие сопоставимых по выраженности с бета-блокаторами системных побочных действий вывели данную группу препаратов в первую линию выбора. Полученные данные в ходе сравнительных экспериментальных и клинических исследований о влиянии консервант-содержащих аналогов простагландинов и бесконсервантных препаратов этой же группы, несмотря на более выраженное токсическое действие консервантов, не исключают токсического воздействия действующего вещества исследуемых растворов на структуры глазной поверхности наряду с их провоспалительной активностью [61,134,138].

Анализ современных литературных источников показал, что, несмотря на доказанное негативное влияние действующих веществ фармакологических препаратов на структуры глазной поверхности, большинство авторов сходятся во мнении о преобладающем токсическом влиянии консервантов [39,70,106,154, 224].

1.2. Консерванты в офтальмологических препаратах.

1.2.1 Влияние бензалкония хлорида на структуры глазной поверхности.

К неотъемлемой составляющей в технологии производства офтальмологических препаратов относится добавление в их состав консервантов. Использование консервантов позволяет предотвратить

бактериальную контаминацию во флаконах многоразового использования [89,196]. Наличие консерванта в офтальмологических препаратах увеличивает биологическую доступность препаратов, способствует проникновению активной субстанции через труднопроницаемый корнеальный барьер [108,136,161], за счет нарушения плотных межклеточных контактов и разрушения актинового цитоскелета, что приводит к изменению барьерной функции роговицы [90,188].

За последние десятилетия были предложены различные классы химических соединений (хлорбутанол, нитрат фенил ртути, бензалкония хлорид (БХ), фенол, динатрия эдетат (ЭДТА), хлоргексидин, фенилэтиловый спирт), выполняющих функции консервантов. Однако наиболее часто предпочтение отдается использованию четвертичных аммониевых соединений, что обусловлено их экономической доступностью, а также более высоким профилем безопасности в сравнении с вышеуказанными группами химических соединений [74,196,197].

Наиболее часто используемым консервантом на современном рынке офтальмологических препаратов является бензалкония хлорид, достигая 70% соотношения на долю всех используемых препаратов [112]. Диапазон используемой концентрации бензалкония хлорида в офтальмологических препаратах варьируется от 0.003% до 0.025% [107].

Бензалкония хлорид обладает широким антибактериальным спектром, благодаря способности адсорбироваться на клеточных мембранах клеток, взаимодействуя с фосфолипидами и белками, что приводит к нарушению их целостности [89]. Бензалкония хлорид изменяет проходимость клеточных мембран и стенок, связываясь за счет электростатических взаимодействий с отрицательно заряженной поверхностью бактерий [74].

Молекулы консерванта не обладают селективностью к клеточной мембране бактерий, поэтому могут оказывать токсическое действие на

структуры глазной поверхности, несмотря на минимальные концентрации, применяемые в технологии производства офтальмологических препаратов [66,67,70,112].

Являясь поверхностно-активным веществом, БХ снижает поверхностное натяжение на границе раздела двух сред, увеличивает испаряемость слезной пленки, вызывает нарушение целостности липидного слоя прероговичной слезной пленки, что приводит к сокращению времени ее разрыва, чрезмерному испарению с глазной поверхности, осаждению компонентов муцинового слоя и, как следствие, повышению концентрации ионов в слезной жидкости, то есть повышению осмолярности [83,102,145]. Повышенная осмолярность провоцирует выход ионов из клетки по градиенту концентрации, что нарушает осмотический баланс клетки [120]. Таким образом, реализуется опосредованное повреждающее действие на ткани глазной поверхности, за счет выхода воды из клеток по градиенту концентрации с последующим их обезвоживанием и запуском механизмов апоптоза [29,135]. Также в литературе представлены данные о потенцировании токсического действия БХ на клетки эпителия роговицы и конъюнктивы человека в условиях повышенной осмолярности [92].

Повреждающее действие БХ носит дозозависимый характер, а характер изменений напрямую зависит от концентрации консерванта. Экспозиции БХ в низких концентрациях (0.001%-0.005%) способствуют снижению нормальной клеточной митотической активности с окислительным повреждением митохондрий, что в последующем запускает каскад последовательных событий запрограммированной клеточной гибели по типу апоптоза. Экспозиции высоких концентраций (0.01%) БХ вызывают немедленную клеточную гибель по типу некроза [95,97,98,185,214].

Помимо прямого цитотоксического действия С. Debbasch с соавторами (2001) определили, что БХ в концентрации 0,01% стимулирует повышенную

экспрессию активных форм кислорода, которые в дальнейшем активируют перекисное окисление липидов клеточных мембран [99]. Эти данные согласуются с результатами многочисленных последующих исследований [185,204,226].

Помимо гиперпродукции активных форм кислорода, местные аппликации БХ запускают механизм активации каспаз и рецепторов клеточного лизиса, а также стимулируют избыточную продукцию медиаторов воспаления, апоптоза и развитие митохондриальной дисфункции [99,113]. Характер клеточного ответа на воздействие бензалкония хлорида было изучено на реконструированной трехмерной системе эпителия роговицы (3D-reconstituted corneal epithelium system) [152]. Воздействие БХ на эпителиальные клетки роговицы вызывало количественное снижение жизнеспособных клеток, конденсации ядерного хроматина, изменении активности митохондрий и уменьшении глутатиона, способствуя развитию апоптоза, а также угнетение пролиферативной активности клеток. Так же доказано ДНК-повреждающее действие бензалкония хлорида на культуре клеток эпителия роговицы и конъюнктивы [219,226].

Поскольку эпителиальный слой является первым в пути контакта консерванта с глазной поверхностью, именно поверхностный эпителий наиболее часто подвергается поверхностной десквамации с последующим отеком. При детальном рассмотрении архитектоники роговицы после воздействия БХ было отмечено появление стромального отека и эндотелиальное структурное повреждение роговицы [90]. В литературе представлены данные о кумуляции БХ при хроническом применении не только в структурах глазной поверхности. В различные сроки наблюдения от 6 месяцев следы БХ определялись в трабекулярной сети, радужке, хрусталике, зрительном нерве и хориоидеи [71].

Бензалкония хлорид может оказывать токсическое воздействие на клетки трабекулярного аппарата *in vitro*: экспозиции малых концентраций бензалкония хлорида (0,02% и менее) подавляли рост трабекулярных клеток [73]. Степень проникновения БХ во влагу передней камеры достаточно низкая, чтобы при однократных инстилляциях оказывать цитотоксический эффект на структуры дренажной зоны. Однако, при хроническом применении препаратов молекулы БХ имеют свойства аккумулировать в тканях, тем самым потенцируя свое действие в дозозависимом аспекте [74].

Некоторые исследователи придерживаются гипотезы, что постоянные инстиллянии препаратов с БХ, способствуют систематическому поступлению консерванта во влагу передней камеры, проходящей через трабекулярный аппарат, а также стимуляция воспалительной реакции лимфоидной ткани конъюнктивы могут влиять на трофику клеток трабекулы, вызывая ретенцию клеток, что может негативно влиять на течение глаукоматозного процесса. [39].

Для получения экспериментальных данных, возможных экстраполировать на клинические условия, многие исследователи предпочитают использовать животные модели в силу того, что в культуре клеток невозможно воспроизвести весь комплекс защитно-приспособительных механизмов тканей, включая гликокаликс, муциновый слой, постоянную регенерацию эпителиальных клеток и слоистую структуру эпителия конъюнктивы.

Первые результаты исследования влияния раствора БХ на структуры глазной поверхности были опубликованы в 1975 году. W.S.Wilson с соавт. (1975) продемонстрировали в своем экспериментальном исследовании, что местные инстиллянии раствора БХ в концентрации 0,01% (наиболее часто используемая концентрация в офтальмологических препаратах) вызывает ускорение испарения слезной пленки, сокращая время образования очаговых

высыханий роговицы в 4 раза по сравнению с группой контроля [211]. В 1992 году Н. Ichijima с соавторами изучали влияние различных концентраций БХ (0,005%, 0,01% и 0,02% трижды с интервалом 5 минут) на роговицу кролика с использованием конфокальной и сканирующей электронной микроскопии [124]. На основании полученных результатов установлено, что инстилляцией даже самых низких концентраций (0,005%) БХ вызывает эпителиальный отек и повышенную десквамацию эпителиальных клеток. Эти данные согласуются с результатами, полученными группой авторов во главе с Н.Liang (2011), которые провели аналогичное исследование на кроликах с использованием Гейдельбергского ретинального томографа с роговичной насадкой, для изучения цитоархитектоники роговицы и лимфоидной ткани конъюнктивы. Помимо признаков повышенной десквамации, авторы зарегистрировали морфологические признаки воспалительной реакции в структурах глазной поверхности после 3х-кратных инстилляций БХ [150].

Р.Ј. Pisella с соавт. (2000) в своем экспериментальном исследовании на лабораторных животных (36 кроликов породы Альбино) определили, что инстилляцией бета-блокаторов в течение 60 дней, содержащих консерванты, вызывают сокращение времени разрыва слезной пленки в два раза в сравнении с аналогичными бесконсервантными аналогами [175].

В литературе представлено множество результатов исследования о токсическом влиянии БХ на структуры глазной поверхности с использованием электронной микроскопии и световой микроскопии с использованием иммуногистохимических маркеров, которые подтверждают данные предыдущих экспериментов [112]. Доказано, что длительное применение гипотензивных препаратов (латанопроста) с БХ в течение 30 дней вызывает достоверное снижение бокаловидных клеток по сравнению с группой сравнения, где инстиллировались бесконсервантные аналоги [129,174].

Анализ литературных источников показал, что создание экспериментальной модели на животных с использованием низких концентраций имеет определенные трудности, в связи с длительным наблюдением за животными [144]. Так, P. Furrer с соавторами (2001) выявили, что инстилляцией бета-блокаторов с консервантами (БХ 0,01 %) в течение 28 дней, вызывает эрозирование 9 % эпителия от общей поверхности роговицы [109]. В связи с этим многие исследователи изучали острое токсическое действие БХ на глазную поверхность, увеличив концентрацию в 1–50 раз. Увеличение концентрации раствора БХ согласуется с правилом Габера [193], используемого в токсикологии, применимым для веществ, обладающих кумулятивным действием. Согласно данному правилу, увеличение концентрации вещества позволяет сократить время воздействия с сохранением дозы токсического вещества в тканях. С. Xiong с соавторами (2008) разработали модель синдрома сухого глаза, полученную путем инстилляций 0,1 % раствора бензалкония хлорида в течение 14 дней [215]. Позднее L. Zhirong (2011) разработали модель синдрома сухого глаза на лабораторных крысах, сократив сроки получения экспериментальной модели до 7 дней за счет увеличения концентрации БХ до 0,2 % [228].

В эксперименте на 35 мышах F. Vesquet с соавторами (1998) определили, что инстилляцией 0,01% БХ стимулируют воспалительную инфильтрацию лимбальной зоны роговицы и стромы конъюнктивы иммунокомпетентными клетками [77], которые запускают каскад воспалительных реакций, сопровождающихся выбросом провоспалительных цитокинов. БХ вызывает опосредованную, через γ -интерферон, экспрессию молекул межклеточной адгезии (ICAM-1), что позволило отнести БХ к группе ко-стимулирующих факторов цитокинов, стимулирующих каскад воспалительных реакций [170]. Важно отметить, что даже при отсутствии симптоматики ЗГП у пациентов с глаукомой определяется чрезмерная экспрессия HLA-DR, ICAM-1 или интерлейкины IL-6, IL-8 и IL-10 в конъюнктивальной ткани [72,75, 212].

Наиболее актуальной проблема токсического влияния препаратов стоит у пациентов с глаукомой, вынужденных инстиллировать гипотензивные капли в течение длительного времени. Морфологические изменения в конъюнктиве и теноновой капсуле на фоне хронического воспаления проявляются, как правило, в виде увеличения плотности субэпителиального коллагена, фибробластов, иммунокомпетентных клеток, а также изменения ядерно-цитоплазматического соотношения в клетках [212,217]. Длительная предшествующая медикаментозная терапия антиглаукомными препаратами повышает уровень пролиферативной активности после хирургического лечения глаукомы, что приводит к формированию ретенции на различных уровнях сформированных путей оттока [54,84,88].

Кроме того, следует отдельно рассмотреть аспект токсического воздействия лекарственных препаратов на структуры глазной поверхности у пациентов с хроническими заболеваниями роговицы, а также у пациентов, перенесших кератопластику. Известно, что на процесс реэпителизации роговицы и формирование послеоперационных осложнений влияет степень недостаточности нейротрофических факторов, снижения активности MAP-киназного каскада сигнальных путей, плотности нервных сплетений в собственной ткани роговицы или трансплантате [12,13]. Учитывая доказанный факт токсичности консервантов, подход к терапии данной категории пациентов требует особенного внимания. Назначение длительной местной медикаментозной терапии после кератопластики обусловлено риском развития отторжения роговичного трансплантата, в следствии чего пациенты вынуждены инстиллировать противовоспалительные и иммуносупрессивные препараты. Течение послеоперационного периода может осложняться развитием дефицита слезопродукции на фоне нарушения целостности окончания в процессе формирования роговичного трансплантата, а также нарушению конгруэнтности поверхности роговицы. Помимо этого, известно, что инстилляции препаратов могут потенцировать патогенетические

механизмы ксеротических изменений и вызывать нарушение эпителизации [124,150].

1.2.2 Снижение побочных эффектов медикаментозной терапии. Новое поколение консервантов. Протекторная терапия сопровождения.

Одним из направлений путей достижения снижения токсичности является включение в состав препаратов консервантов, оказывающих менее агрессивное воздействие на структуры глазной поверхности.

Компания Alcon (США) разработала в 1987 году новый консервант Polyquad (polyquaterium-1), представляющий по химическому составу собой поверхностно-активное вещество, которое также оказывает бактерицидное действие за счет нарушения барьерных функций клеточных мембран и лизируя цитоплазматическое содержимое [165]. Разработчики утверждают, что снижение токсичности Polyquad достигается за счет увеличения молекулярной массы молекулы, что снижает способность консерванта нарушать целостность эпителиальных клеток [143].

Н. Liang с соавторами (2012) оценили у кроликов новую формулу 0,004% раствора Травопроста, содержащего в своем составе Polyquad с коммерчески доступными БХ-содержащими раствором 0,004% травопроста и 0,005% раствором латанопроста, продемонстрировав снижение токсичности нового консерванта на роговицу и конъюнктиву экспериментальных животных [151].

Консервант Sofzia (Novartis AG) представляет собой ионный буферный раствор, состоящий из бората, пропиленгликоля, сорбита и хлорида цинка [181,207]. В ходе многоцентрового проспективного рандомизированного open-label сравнительного исследования (Aihara M. 2013) с участием 220 пациентов было установлено, что замена гипотензивного режима с 0,05% БХ-содержащего Латанопроста на SofZia-содержащий 0,004% Травопрост

снижает частоту встречаемости эпителиопатии роговицы и конъюнктивы по сравнению с группой контроля [56].

Компания Allergan разработала консервант Purite, который является стабилизированным оксихлорокомплексом. После контакта с воздухом стабилизированный комплекс консерванта распадается на более безопасные компоненты (воду, кислород, натрий и ионы хлора), что повышает профиль безопасности препаратов [65,133]. Механизм действия Purite основывается на окислении глутатиона, что ингибирует синтез белка микроорганизмов. D.A. Ammar с соавторами (2011) исследовали потенциальную цитотоксичность гипотензивных препаратов, содержащих различные консерванты на культуре клеток трабекулярной ткани человека и культуре клеток эпителия роговицы человека, продемонстрировав, что замена БХ-содержащих препаратов на аналоги, содержащие новые поколения консервантов (SofZia и Polyquad) приводит к увеличению жизнеспособности культивируемых клеток [60]. Помимо снижения токсичности на клетки глазной поверхности, авторы обращают внимание на то, что замена препаратов на аналоги с консервантами нового поколения может потенциально снизить риск прогрессирования глаукомного процесса из-за БХ-индуцированного повреждения клеток трабекулярной сети.

Актуальным направлением современной офтальмофармакологии также является разработка препаратов, не содержащих консервантов, представленные в виде флаконов одноразового использования (моно-дозы), флаконов многократного использования в системе "АВАК" (дозатор глазных капель, закрытый фильтрующей мембраной с диаметром 0,2 мкм) или системе "Comod" (флакон со встроенной помпой, предотвращающей контакт раствора с воздухом). Использование бесконсервантных препаратов позволяет повысить качество жизни пациентов и их приверженность к лечению [52,125]. Однако, на современном этапе диапазон препаратов, представленных в виде бесконсервантных форм, охватывает лишь единичные классы лекарственных

средств. Не маловажно, что замена препарата на бесконсервантные аналоги повышает экономическую стоимость проводимого лечения [112].

Современные лекарственные средства кератопротекции представлены в виде препаратов, способствующих ускорению заживления дефектов эпителия роговицы, а также препаратов, регулирующих метаболические процессы в роговице.

Препарат Корнерегель (5% гель декспантенола с полиакриловой кислотой) обладает репаративным и слезозаместительным действием. В своем составе содержит консервант цетримид. Пантотеновая кислота, относящаяся к предшественникам декспантенола, нормализует клеточный метаболизм, оказывает слабовыраженное противоотечное действие за счет нормализации обмена углеводов и поддержания водного баланса в тканях, уменьшая выраженность реактивного отека. Репаративные свойства Корнерегеля реализуется за счет способности влиять на процессы миграции клеток со стороны интактного эпителия [7,24,25,49].

Активная субстанция препарата Солкосерил представлена в виде депротеинизированного экстракта из крови молодых телят, содержащего широкий спектр низкомолекулярных компонентов клеточной массы и сыворотки крови. Солкосерил оказывает стимулирующее действие на процессы регенерации за счет улучшения утилизации и обмена кислорода в тканях, что способствует ускорению синтеза аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) и повышению энергетических ресурсов клеток. В качестве консерванта препарат Солкосерил содержит бензалкония хлорид. В сравнении с препаратом Корнерегель, Солкосерил не оказывает выраженного активного воздействия на процесс миграции клеточных элементов при регенерации роговицы, но в тоже время оказывает выраженное пролиферативное действие [18].

Казанским объединением "Татхимфармпрепараты" совместно с Санкт-Петербургским ХФИ разработана лекарственная форма препарата Этаден для местного применения в офтальмологии в виде глазных капель. Этаден (2-[(6-Амино-9Н-пурин-8-ил) амино] этанола гидробромида моногидрат) относится к группе стимуляторов репаративной регенерации клеток, механизм действия, которого основывается на активизации биосинтеза и обмена нуклеиновых кислот [15].

В виде терапии сопровождения при лечении патологии роговицы, связанной с нарушением целостности эпителиального слоя, широко применяют препараты, улучшающие метаболические процессы в тканях роговицы

В литературе представлены данные об успешном применении антиоксидантной терапии в лечении воспалительных и дистрофических процессов роговицы. Клинические наблюдения позволили рекомендовать для практического использования глазные капли 4%-ного тауфона [32], глазные капли Офтан-катахром, глазные капли 5%-ного высокоочищенного натурального карнозина в комплексном лечении эпителиопатии и кератопатии различного генеза [31].

Фармакологическое действие эмоксипина основывается на стабилизирующем воздействии на клеточную мембрану, ингибировании агрегации тромбоцитов и нейтрофилов, снижении проницаемости сосудистой стенки, а также за счет фибринолитической активности. В основном сфера применения раствора эмоксипина в форме глазных капель ограничивается субконъюнктивальными кровоизлияниями. Однако в литературе имеются данные об успешном применении эмоксипина при диабетической ретинопатии, тромбозе центральной вены сетчатки и ее ветвей, а также в составе комплексной терапии дистрофических заболеваний, ожогах и травмах роговицы [36].

Дрожжевой цитохром С представляет собой ферментный препарат, полученный из биомассы дрожжей *Pichia membranaefaciens*, который оказывает выраженное действие по связыванию свободных радикалов, которые накапливаются в больших количествах при заболеваниях и повреждениях роговицы, особенно при термических ожогах и других обширных травмах. Цитохром С дрожжевой, улучшает тканевой метаболизм, стимулирует процессы тканевого дыхания, и тем самым способствует ускорению эпителизации и других репаративных процессов [35].

Супероксиддисмутаза (СОД) относится к классу металлопротеидов. СОД является основным ферментом специфической антиоксидантной защиты организма. При гипоксии наблюдается генерация активных форм кислорода, которые оказывают повреждающее влияние на ткани организма. Вызывая разрушение активных форм кислорода, СОД оказывает антиоксидантное и противовоспалительное действие [26].

Встречаются данные о местном применении витамина А (ретинол) при лечении кератопатий различного генеза и кератитов в стадии эпителизации. Ретинол участвует в обмене углеводов, белков, липидов и минералов, процессе фоторецепции, усиливает выработку липазы, трипсина. При местном применении усиливает пролиферацию эпителиоцитов, тормозит процессы кератинизации. Местные эффекты обусловлены наличием на поверхности эпителиальных клеток специфических ретинол-связывающих рецепторов [1].

В качестве стимуляторов репаративных процессов в роговице Хорошилова-Маслова И.П. (1995) применила два препарата (Хорошилова-Маслова И.П. 1995): «Энкад» — комплекс рибонуклеидов, применяемый в виде капель (Исаева Р.Т. 1982), и «Витасик» — препарат французской фирмы Faure, представляющий смесь нуклеозидов и нуклеотида тимидинмонофосфорной кислоты (ТМФ). Оба препарата обладают

стимулирующим эффектом на пролиферативную активность всех клеточных элементов роговицы, фибриллогенеза и перестройки рубца [14,22,23].

Одним из лекарственных препаратов, воздействующих на репаративные процессы, являются цитокины — медиаторы клеток. Механизм действия цитокинов представляется двумя значениями: прежде всего цитокины ускоряют заживление раны роговицы, а на более поздних этапах заживления способствуют активному выбросу коллагеназы, что, в свою очередь, способствует активному рассасыванию коллагена соединительной ткани рубца и уменьшению его объема [43,48]. Но широкого применения цитокинотерапия не получила, так как применять цитокины возможно только *ex tempore* из-за их быстрой инактивации.

В последние годы многие исследователи в экспериментальных условиях получили положительные результаты при использовании раствора гиалуроната натрия с целью снижения токсичности консервантов [59,213,220]. F.Yu с соавторами (2013) в ходе экспериментального исследования на кроликах установили, что инстилляцией 0,3% раствора гиалуроната натрия снижают токсическое действие 0,02% раствора БХ, что проявлялось в увеличении показателей пробы Ширмера и плотности бокаловидных клеток конъюнктивы, а также интенсивности прокрашивания эпителия глазной поверхности витальными красителями [222]. M.Ehrenberg с соавторами (2015) в эксперименте на животных продемонстрировали синергетическое протекторное действие 0,1% раствора гиалуроната натрия и 5% раствора поливинилпирролидона при токсическом воздействии бензалкония хлорида [103]. Комбинированное применение раствора Пранопрофена, Флуорометалона и Гиалуроната натрия повышает стабильность слезной пленки, снижает экспрессию воспалительного фактора некроза опухоли (ФНО-альфа) и увеличивает количество бокаловидных клеток конъюнктивы на модели синдрома сухого глаза мыши, индуцированной инстилляциями 0,25% раствора БХ [121].

Развивающимся направлением клеточной биологии является изучение механизмов взаимодействия клеток с внеклеточным матриксом. Применение сульфатированных гликозаминогликанов в кератопротекторной терапии потенциально вызывает интерес из-за наличия у них полифункциональной активности на многие клеточные события в тканях [87,159,205].

1.3 Сульфатированные гликозаминогликаны

Сульфатированные гликозаминогликаны — это полианионные гетеросахариды, состоящие из повторяющихся дисахаридных единиц. Основу дисахаридов, входящих в состав сГАГ составляют гексуроновая кислота (D-глюкуроновая кислота или L-идуруновая) и производное аминсахара (глюкозамина или галактозамина) с обязательным наличием сульфатных групп в виде O-эфиров или N-сульфата [42], что определяет их полианионное строение. Сульфатированные ГАГ в норме входят в состав протеогликанов, где соединены с центральным белком (кором). Протеогликаны являются структурными компонентами экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ), которые специфически взаимодействуют с белками межклеточного матрикса. ЭЦМ содержит специфическую информацию, которая передается через интегриновые рецепторы геному клетки. При этом меняется функция транскрипционных факторов ядерного матрикса и обеспечивается регуляция жизнедеятельности клетки, в том числе ее пролиферация и дифференцирование [28,53,114,223]. Сульфатированные ГАГ выполняют связывающую функцию между поверхностью клетки и компонентами ЭЦМ, они способны взаимодействовать с регуляторными молекулами, такими как факторы роста, усиливая или подавляя их действие [190,205].

Основная функция сГАГ - участие в формировании коллагеновых и эластиновых волокон соединительной ткани [87]. Помимо этого,

отрицательный заряд сГАГ позволяет им присоединять к своей структуре катионы, определяя, таким образом, прочность и упругость ткани. Сульфатированные ГАГ оказывают регуляцию транспорта электролитов и воды в тканях [10].

Биологическая активность сГАГ изучалась *in vitro* на клетках соединительной ткани роговицы человека и фибробластах кожи телят. Полученные при этом результаты показали, что сГАГ усиливают биосинтез РНК (синтез белка), стимулируют секрецию клетками коллагена и протеогликанов. Комплекс коллаген-сГАГ способствует адгезии клеток фибробластического ряда и увеличивает пролиферацию фибробластов более чем в 4 раза [19].

Влияние ГАГ на пролиферацию и дифференцировку клеток было изучено на культуре клеток миелоидной лейкемии человека U-937. N. Volpi с соавторами (1994 год) определили, что гепарин и его производные (от 0,1 до 100мкг/мл) ингибируют пролиферацию клеток, гепарансульфат (ГС) не вызывает никаких изменений, в то время как хондроитинсульфат (ХС) и дерматансульфат (ДС) (от 0.01 до 100 мкг/мл) стимулируют пролиферацию клеток. Дифференциацию клеток исследователи оценивали путем определения клеточных ферментов альфа-натрий бутиратэстеразы и определения анти-HLA-DR, анти-CD11b и анти-CD14 антител. Гепарин и его производные значительно увеличивали дифференциацию клеток, в то время как введение ХС и ДС вызывали сильное снижение маркеров дифференциации, а ГС сохранял свою инертность [206]. Экзогенно введенные сГАГ в культуру клеток фибробластов мыши линии L929 оказывают бимодальный эффект на пролиферацию клеток в зависимости от концентрации [46].

Сульфатированные ГАГ способствуют ориентированной укладке молекул тропоколлагена в фибриллах, что нашло отражение в экспериментах

in vitro. Смешивание растворов тропоколлагена с раствором сГАГ вызывает формирование коллагеновых волокон с характерной исчерченностью [37].

Полифункциональность влияния сГАГ продемонстрирована в экспериментальных работах по изучению ХС на канцерогенез раковых опухолей, где R.D Prinz с соавт. (2011) доказали, что ферментативное замещение эндогенного ХС при применении хондроитиназы АВС приводило к развитию вторичных опухолей и увеличению метастатического поражения легких [179]. Изучено влияние сГАГ (ХС) в построении основного вещества хрящевой и костной ткани, модулировании фосфорно–кальциевый обмена в хрящевой ткани, а также ингибировании протеолитических ферментов. Доказано, что сГАГ замедляют резорбцию костной ткани и ускоряют процессы репарации костной ткани [30,50]. В настоящее время сГАГ применяются в составе препаратов для лечения атеросклероза из-за их способности подавлять синтез липидов [33,85,139].

В литературе также представлены данные о противовоспалительном действии сГАГ, которое связано со способностью подавлять действие клеточных ферментов за счет изменения их конформации аллостерическим, мостиковым или подложковым способом [9,68,86], а также способности связывать положительно заряженные фрагменты поврежденных клеточных мембран, адсорбировать на себе продукты распада, тем самым блокируя хемотаксис [37,43,78]. Экзогенно введенные сГАГ блокируют Р-селектин и L-селектин опосредованную миграцию лейкоцитов, а также способны ингибировать сигнальные молекулы и хемокины [178, 200]. Имеются данные о антимикробном действии сГАГ [177] в отношении вирусов, грибов и бактерий за счет блокирования хозяин-патоген белок-белковых взаимодействий, однако, данный вопрос остается дискуссионным.

Существует несколько гипотез о механизме антиоксидантного действия сГАГ. К. Karlsson с соавторами (1988) обнаружили, что сГАГ способны

связываться с ферментом супероксиддисмутазой 3 (СОД3), внеклеточным ферментом, который катализирует превращение супероксид-анионов в молекулярный кислород и пероксид водорода. Комплекс сГАГ-СОД3 усиливает антиоксидантный эффект СОД3 за счет повышения сродства ковалентного конъюгата к клеточной стенке, за счет модификации фермента. Данная гипотеза нашла отражение при разработке антитромботических препаратов для лечения сосудистых патологий, в том числе атеросклероза [128]. Также существует мнение, что антиоксидантное действие сГАГ реализуется за счет стабилизации активности восстанавливающих никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ) дегидрогеназ и обмена ДНК [20].

Большинство исследователей находят объяснение антиоксидантной активности сГАГ в особенностях их химического строения, а именно, наличия в их составе карбоксильных и сульфатных групп, которые могут образовывать хелатные комплексы с ионами переходных металлов, таких как Cu^{2+} или Fe^{2+} , которые являются внеклеточными источниками активных форм кислорода путем инициации реакций Фентона и Габера-Вейса [57].

С. Ju с соавторами (2015) изучали антиоксидантное и антиапоптотическое влияние раствора ХС на клеточной линии нейробластомы человека SH-SY5Y в условиях токсического воздействия 6-гидроксидофамина (6-OHDA). Результаты данного исследования показали, что ХС оказывает протекторное действие на клетки нейробластомы, а также подавляет 6-гидроксидофамин-индуцированный апоптоз клеток нейробластом. Механизм антиоксидантного действия ХС исследователи связывают с ингибированием свободных форм кислорода, координации синтеза митохондриальных и ядерных субъединиц электронно-транспортной сети по средствам регулирования экспрессии ядерного респираторного фактора NRF2 [127].

В литературе представлены данные о протекторном действии отдельных классов сГАГ на клетки. Conroizer T. (1998) установил, что использование раствора ХС перед обработкой хондроцитов кролика закисью азота, в 70% случаев повышает жизнеспособность клеток на 28% [93].

Ранее в литературе были представлены данные о протекторном действии несulfатированных гликозаминогликанов (гиалуроновой кислоты) на эпителиальные клеточные линии [169]. Однако данные о протекторном действии сГАГ на клетки эпителия роговицы человека в литературе не встречаются. Уникальная полианионная химическая структура сГАГ позволяет им связывать токсические вещества в межклеточном матриксе, блокируя поступление их в клетку [27,38].

Также экзогенно введенные сГАГ могут создавать высокую концентрацию углеводов на клеточной поверхности клеток, что служит сетевым барьером для токсичных веществ, тем самым выполняя защитную функцию [33].

1.3.1. Применение sulfатированных гликозаминогликанов в офтальмологии

В офтальмологии препараты на основе сГАГ нашли широкое применение в лечении и профилактике различных заболеваний.

В хирургии катаракты широко применяются viscoэластики на основе сГАГ для защиты клеток эндотелия роговицы. Так, в арсенале хирургов имеются viscoэластики на основе ХС и гиалуроната натрия Viscoat (Alcon, США) с адгезивными свойствами и viscoэластик DisCoVisc, как с адгезивными, так и с когезивными свойствами [16].

В настоящее время для повышения жизнеспособности и стабилизации эндотелиальных клеток, донорских роговиц на этапе их консервации в Глазных банках и лабораториях консервации роговиц Российской Федерации широко применяется среда, разработанная группой отечественных ученых (С.А. Борзенко, З.И. Мороз и другие), содержащая в своем составе сГАГ (2,7% ХС) с оригинальным аминокислотным составом, оказывающим выраженное защитное действие на эндотелий роговицы [44]. В офтальмологии успешно применяется изделие медицинского назначения "Баларпан", которое обладает репаративными, противоотечными и противовоспалительными свойствами на основе смеси раствора сГАГ выделенной из прозрачной стромы роговиц свиней.

Анисимовым С.И. с соавторами (2008) опубликованы результаты успешного клинического применения препарата "Оквис" на основе гидроксиметилцеллюлозы и ХС у пациентов после хирургических вмешательств, лазерных кераторефракционных операций, а также у пациентов, находящихся на длительном местном медикаментозном лечении [3].

Сульфатированные ГАГ применяют в хирургии глаукомы для профилактики активной пролиферации созданных путей оттока внутриглазной жидкости. Научный и клинический интерес данного направления обусловлен способностью сГАГ регулировать фибробластические процессы в соединительной ткани. Анисимовым С.И. с соавторами (2006) был разработан дренаж из костного коллагена (ДКА), насыщенный сГАГ для профилактики склеро-склеральных сращений в послеоперационном периоде [4]. Экспериментальное изучение влияния смеси сГАГ (2011) на модели непроникающей глубокой склерэктомии подтверждает способность сГАГ влиять на ранозаживление [47].

В настоящее время имеются данные о протекторном, мембраностабилизирующем, противовоспалительном и умеренном противоотечном действии сГАГ на клетки пигментного эпителия сетчатки при повреждающем воздействии. Данное направление исследований является актуальным и перспективным, однако требует дальнейшего изучения для определения возможности применения данных веществ в офтальмохирургии [11,51].

Таким образом, основываясь на данных литературного анализа можно предположить, что на современном этапе развития офтальмологии, перспективным является разработка новых способов протекции клеток глазной поверхности для применения в качестве терапии сопровождения пациентам, вынужденных длительное время использовать местные офтальмологические препараты, а также пациентам с сопутствующей патологией роговицы. Многофункциональность свойств сульфатированных гликозаминогликанов определило выбор материала для последующих исследований.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диссертационная работа представляет собой серию экспериментальных и морфологических исследований, которые направлены на изучение местной токсичности смеси сульфатированных гликозаминогликанов на структуры глазной поверхности (*in vivo*); изучение функционального влияния смеси сГАГ на культуру клеток эпителия роговицы человека (*in vitro*) и на различные экспериментальные модели глаз кроликов породы Шиншилла (*in vivo*). Смесь сульфатированных гликозаминогликанов состоит из хондроитин-4-сульфатов, хондроитин-6-сульфатов и кератансульфатов (ООО НЭП «Микрохирургия глаза»). Характеристики смеси сГАГ регламентированы регистрационным удостоверением ЛСР-008142/10-160810. Смесь сГАГ изучалась в виде образцов раствора различных концентраций (0,1%, 0,5% и 1%).

2.1. Структура экспериментального исследования

Объем экспериментальных исследований включал программу доклинической оценки смеси сГАГ, состоящей из двух основных этапов.

Первым этапом эксперимента проводилось исследование *in vitro* на культуре клеток роговицы человека. Исследование *in vitro* включало 3 серии экспериментальных исследований. В первой серии эксперимента *in vitro* проводилось исследование на идентификацию и жизнеспособность эпителиальных клеток. Во второй серии изучались опытные образцы различных концентрации смеси сГАГ с целью выявления данных о наличии влияния смеси на пролиферацию клеток культуры эпителия роговицы человека. В третьей серии изучалось наличие протекторных свойств смеси сГАГ на культуру клеток эпителия роговицы в условиях токсического воздействия раствора бензалкония хлорида.

Вторым этапом эксперимента проводилось исследование *in vivo* на лабораторных животных, которое включало в себя 4 серии опытов. В первой серии опытов проводилось изучение местной токсичности смеси сГАГ, которое включало клиническое наблюдение за животными, влияние смеси сГАГ на ширину зрачка и уровень внутриглазного давления (ВГД) у опытных животных. Во второй серии исследований *in vivo* проводилось изучение регенераторных свойств смеси сГАГ на модели механической эрозии, что позволило определить наиболее эффективную концентрацию смеси из диапазона исследуемых. В третьей серии исследований *in vivo* проводилось изучение подобранной концентрации смеси сГАГ на модели токсической эрозии роговицы.

2.2. Серия экспериментальных исследований *in vitro*

Материалом для исследования *in vitro* послужили клетки переднего эпителия роговицы человека, выделенные из кадаверных глаз. Биоптат из лимба роговицы механически измельчали (1x1мм) и вносили в культуральные флаконы, дно которых было покрыто коллагеном 1 типа, и заливали ростовой средой. Клетки культивировались с использованием питательной среды DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки NuClone III, L-глутамин (4мМ) и антибиотиков пенициллин/стрептомицин (50 мкг/мл). Пассирование осуществляли с использованием раствора трипсина по достижению конфлюэнтности 92%.

2.2.1 Идентификация эпителиальных клеток

С ростом числа пассажей проводили идентификацию эпителиальных клеток и определение жизнеспособности по следующему протоколу:

1. Морфологическое исследование культуры методом световой микроскопии с фазовым контрастом (ФК) на инвертированном фазово-контрастном микроскопе Zeiss Axio Observer A1 (Zeiss, ФРГ).

2. Флуоресцентно-микроскопическое исследование с использованием флуоресцентного красителя DAPI (Invitrogen, США), окрашивающий А-Т регионы ДНК клеточных элементов.

3. Флуоресцентно-микроскопическое исследование со специфическим окрашиванием клеток моноклональными антителами на цитокератин 18 (СК18).

4. Фоторегистрация цифровой фотокамерой, интегрированной с инвертированным микроскопом (Zeiss, ФРГ).

В качестве контроля были использованы мезенхимальные стволовые клетки (МСК) жировой ткани. Посев клеток проводился аналогично с опытной группой

Обработка данных:

По окончании исследования оценивали морфологические характеристики культур клеток, фенотип клеток, представленных в культуре. При флуоресцентно-микроскопическом исследовании проводилась сравнительная качественная оценка на чувствительность к специфическим красителям.

2.2.2. Исследование пролиферативного и протекторного действия смеси сГАГ *in vitro*

Исследуемая клеточная культура эпителия роговицы человека 5-го пассажа была рассажена в лунки плоскодонного 24-луночного планшета в плотности $4,0 \cdot 10^4$ кл/лунка. Также, клеточная культура была рассажена в специальные планшеты для клеточного анализатора RTCA xCELLigence System в плотности $1,5 \cdot 10^4$ кл/лунка (Рис.1).



Рисунок 1 — Система многопараметрического анализа клеточных культур RTCA xCELLigence System

Система многопараметрического анализа клеточных культур RTCA xCELLigence System предназначена для исследования жизнеспособности клеток, в том числе после воздействия на них экспериментальными образцами растворов активных веществ. Определение жизнеспособности происходит при непрерывном измерении электрического сопротивления в образце, находящемся на поверхности электрода, который встроен в реакционный

модуль прибора. Мониторинг сопротивления на сенсорной поверхности проводится с помощью рабочей станции RTCA Station и управляющего компьютера. Все этапы исследования полностью автоматизированы. Подсчет результатов производился в режиме реального времени с помощью специализированного программного обеспечения RTCA xCelligence Software 2.0, входящего в комплектацию системы, и выражался в виде показателей клеточного индекса (КИ).

Измерение клеточного индекса (КИ) производили через каждые 15 минут в автоматическом режиме. Через 48 часов проводилась смена среды с добавлением исследуемых растворов.

В опытной группе №1 в культуральную среду добавляли смесь сГАГ в концентрации 0,1%. В опытной группе №2 в культуральную среду добавляли смесь сГАГ в концентрации 0,5%. В опытной группе №3 в культуральную среду добавляли смесь сГАГ в концентрации 1%. В группе контроля №1 замена среды проводилась без добавления растворов, посев клеток проводился аналогично посевам с опытными образцами. При интерпретации полученных данных в опытных группах №1, №2, №3 и контрольной группе №1 оценивалось пролиферативное действие смеси сГАГ на культуру клеток эпителия роговицы человека.

В опытной группе №4 в культуральную среду добавляли смесь сГАГ с концентрацией действующего вещества 0,1% и 0,01% раствор БХ. В опытной группе №5 в культуральную среду добавляли смесь сГАГ в концентрации 0,5% и 0,01% раствор БХ. В опытной группе №6 в культуральную среду добавляли смесь сГАГ в концентрации 1% и 0,01% раствор БХ. В качестве контроля №2 использовалась культура клеток, в среду которой добавляли 0,01% раствор БХ без добавления раствора сГАГ. При интерпретации полученных данных в опытных группах №4, №5, №6 и контрольной группе №2 оценивалось протекторное действие смеси сГАГ на культуру клеток

эпителия роговицы человека. Характер распределения опытных и контрольных групп в эксперименте *in vitro* представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Распределение опытных и контрольных групп в эксперименте *in vitro*

Экспериментальная группа	Раствор, добавляемый в культуральную среду
Исследование пролиферативного действия смеси сГАГ	
Опытная группа №1	сГАГ 0,1 %
Опытная группа №2	сГАГ 0,5 %
Опытная группа №3	сГАГ 1 %
Контрольная группа №1	Без добавления растворов
Исследование протекторного действия смеси сГАГ	
Опытная группа №4	сГАГ 0,1 % + БХ 0,01%
Опытная группа №5	сГАГ 0,5 % + БХ 0,01%
Опытная группа №6	сГАГ 1 % + БХ 0,01%
Контрольная группа №2	БХ 0,01%

Исследование пролиферативного и протекторного действия смеси сГАГ проводилось по следующему протоколу:

1. Морфологическое исследование культуры методом световой микроскопии с фазовым контрастом (ФК) на инвертированном фазово-контрастном микроскопе Zeiss Axio Observer A1 (Zeiss, ФРГ).
2. Анализ клеточной пролиферации с помощью клеточного анализатора RTCA xCELLigence System (ACEA, США).
3. Фоторегистрация цифровой фотокамерой, интегрированной с инвертированным микроскопом (Zeiss, ФРГ).

Обработка данных:

Изменение импеданса на микроэлектродах, обусловленного прикреплением и распластыванием клеток, выражали как клеточный индекс (КИ), величина которого автоматически вычисляется программой по формуле: $КИ = (R_n - R_b)/t$, где R_b – исходное значение импеданса в лунке, содержащей только ростовую для клеток среду, R_n – значение импеданса в любое время t в лунке, содержащей помимо ростовой среды тестируемые клетки. Полученные числовые значения клеточного индекса в опытных и контрольных группах суммировались в виде таблицы и подвергались статистической обработке. Те же данные представляли в виде графиков.

2.3 Серия экспериментальных исследований на лабораторных животных in vivo

2.3.1 Изучение местной токсичности смеси, влияние смеси на ширину зрачка и уровень внутриглазного давления у кроликов

Изучение местной токсичности смеси сГАГ проводили в хроническом опыте на 12 кроликах породы Шиншилла (24 глаза). У каждого кролика правый глаз был опытный, а левый глаз служил контролем. Все кролики были разделены и промаркированы на 3 опытные группы (12 глаз) и 1 группу контроля (12 глаз), согласно характеру проводимых инстилляций. В первой опытной группе (4 глаза) проводили инстилляцию 0,1% раствора смеси сГАГ 6 раз в день. Во второй опытной группе (4 глаза) проводили инстилляцию 0,5% раствора смеси сГАГ 6 раз в день. В третьей опытной группе (4 глаза) проводили инстилляцию 1% раствора смеси сГАГ 6 раз в день. В контрольной группе (12 глаз) проводили инстилляцию 0,9% раствора хлорида натрия. Срок наблюдения за животными составил 2 недели. Характер распределения опытных и контрольной групп при изучении местной токсичности, влияния смеси на ширину зрачка и уровень внутриглазного давления у кроликов представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Распределение глаз кроликов в опытных группах и группе контроля

Группы	Сроки наблюдения 2 недели
Опытная группа №1	4 OD 0,1% сГАГ
Опытная группа №2	4 OD 0,5% сГАГ
Опытная группа №3	4 OD 1% сГАГ
Контрольная группа	12 OS 0,9% NaCl

Во всех опытных группах и группе контроля наблюдение за экспериментальными животными проводили на 1,3,7 и 14 сутки с использованием биомикроскопии переднего отрезка глаза с помощью щелевой лампы фирмы «Opton» (ФРГ) и окрашиванием 0,5% раствором флюоресцеина натрия «Novartis pharma» (Швейцария) с последующей фоторегистацией на 12 МП фронтальную камеру iPhone 6S (США) с объективом для макросъемки. В сроки наблюдения проводилось измерение диаметра зрачка (пупиллометрия) в горизонтальном и вертикальном меридиане через 1 час после утренней инстиляции. Измерение уровня внутриглазного давления у животных проводили до начала эксперимента и на 14 сутки исследования с помощью тонометра Маклакова (груз массой 10 г). Перед измерением экспериментальных животных фиксировали в горизонтальном положении, проводили местные инстиляции анестетиков (1% раствор проксиметакаина) по 1 капле с интервалом 1-2 минуты двукратно. Подсчет уровня ВГД проводили с помощью линейки Полякова, выраженные в мм ртутного столба.

2.3.2 Изучение влияние смеси сульфатированных гликозаминогликанов на модели механической эрозии роговицы в эксперименте *in vivo*

Экспериментальное исследование было выполнено на 60 кроликах (120 глаз) породы Шиншилла массой 2,0-2,5 кг, серого окраса.

Экспериментальное исследование проводили по следующей методике: Всем лабораторным животным (60 животных, 120 глаз) под местной анестезией 0,3% раствора дикаина глазным шпателем проводилась скарификация переднего эпителия на всем протяжении роговицы. Затем все опытные животные были разделены на 3 опытные группы и группу контроля. В 1-ой опытной группе (20 глаз) выполняли инстилляцию 0,1% раствора сГАГ два раза в день (утром и вечером). Во 2-ой опытной группе (20 глаз) проводили инстилляцию 0,5% раствора сГАГ два раза в день (утром и вечером). В 3-й опытной группе (20 глаз) проводили инстилляцию 1% раствора сГАГ два раза в день (утром и вечером). Группой контроля послужили парные глаза (60 глаз), где проводили инстилляцию физиологического раствора два раза в день (утром и вечером). Клиническое наблюдение за животными проводилось ежедневно с интервалом 12 часов. Для оценки зоны повреждения эпителия роговицы проводилась биомикроскопия глаз животных (щелевая лампа «Opton», ФРГ) с окрашиванием роговицы 0,5% раствором флюоресцеина натрия «Novartis pharma» (Швейцария) и последующей фоторегистрацией на 12 МП фронтальную камеру iPhone 6S с объективом для макросъемки.

Обработка результатов

Подсчет площади эпителиального дефекта проводился в программе Adobe Photoshop CC. Полученные числовые значения в опытных и контрольных группах суммировались в виде таблицы и подвергались статистической обработке. После завершения экспериментального

исследования и получения результатов по изучению влияния смеси сГАГ на модели механической эрозии роговицы была определена концентрация смеси сГАГ с наиболее эффективными репаративными свойствами для проведения последующей серии экспериментального исследования на модели токсической эрозии роговицы.

2.3.3. Изучение влияния смеси сульфатированных гликозаминогликанов на экспериментальной модели токсической эрозии роговицы

В третьей серии экспериментальных исследований проводилось изучение влияние смеси сульфатированных гликозаминогликанов на модели токсической эрозии роговицы. Перед началом основного эксперимента, проводилось изучение влияния 0,1% раствора бензалкония хлорида на клинко-функциональное состояние роговицы у кролика с отработкой режима и времени инстилляций для получения модели токсической эрозии роговицы.

2.3.3.1. Изучение влияния 0,1% раствора бензалкония хлорида на клинко-функциональное состояние роговицы у кроликов (моделирование токсической эрозии)

Экспериментальное исследование было выполнено на 20 кроликах (40 глаз) породы Шиншилла, разделенных на 2 группы (опытная и контрольная группы). В опытной группе (20 глаз) ежедневно проводили 4-кратные инстилляций 0,1% раствора БХ; в контрольной группе (парные глаза каждого кролика- 20 глаз) проводили инстилляций физиологического раствора NaCl 0,9% 4 раза в день. Динамическое наблюдение за животными проводили каждые 24 часа с использованием следующего протокола исследования:

1. Клиническое наблюдение за животными
2. Биомикроскопия переднего отрезка глаза с помощью щелевой лампы фирмы «Opton» (ФРГ)
3. Окрашивание роговицы 0,5% раствором флюоресцеина натрия «Novartis pharma» (Швейцария)
4. Фоторегистрация на 12 МП фронтальную камеру iPhone 6S с объективом для макросъемки.
5. Конфокальная микроскопия роговицы на приборе Confoscan 4 (Nidek, Япония).

Обработка результатов:

Подсчет площади десквамированного эпителия проводился по полученным фотографиям в программе Adobe Photoshop CC. Полученные числовые значения размера площади десквамированного эпителия в опытной и контрольной группах суммировались в виде таблицы и подвергались статистической обработке. По данным конфокальной микроскопии проводилось протоколирование состояния цитоархитектоники роговицы во все сроки наблюдения.

2.3.3.2. Изучение регенераторных и протекторных свойств сульфатированных гликозаминогликанов на экспериментальной модели токсической эрозии роговицы

Экспериментальное исследование было выполнено на 40 кроликах (80 глаз) породы Шиншилла.

Для экспериментального моделирования токсической эрозии роговицы проводили инстилляцию 0,1% раствора БХ 4 раза в день в течение 7 дней по

отработанной ранее методике. После моделирования токсической эрозии роговицы все животные были разделены на 2 опытные и контрольную группы в зависимости от характера проводимых далее инстилляций, согласно разработанному дизайну исследования (табл. 3).

Таблица 3 — Характер инстилляций в экспериментальных группах (модель токсической эрозии роговицы)

Группа исследования	Характер инстилляций
Опытная группа №1	0,1% БХ+ 0,5% сГАГ
Опытная группа №2	0,5% сГАГ
Контрольная группа	0,9% NaCl

В 1-ой опытной группе (20 глаз) продолжили инстиллянии 0,1% раствора БХ с добавлением инстилляций 0,5% раствора сГАГ. Во 2-ой опытной группе (20 глаз) инстиллировали 0,5 % раствор сГАГ, инстиллянии раствора БХ были прекращены. В контрольной группе (40 глаз) инстиллировали физиологический раствор 0,9% хлорида натрия. Инстиллянии исследуемых растворов проводили 2 раза в день с дальнейшей оценкой зоны повреждения эпителия роговицы с использованием биомикроскопии глаз животных с помощью щелевой лампы фирмы «Opton» (ФРГ) и окрашиванием 0,5% раствором флюоресцеина натрия «Novartis pharma» (Швейцария) с последующей фоторегистрацией на 12 МП фронтальную камеру iPhone 6S с объективом для макросъемки. Для контроля морфологических изменений в ходе эксперимента проводили конфокальную микроскопию роговицы на приборе Confoscan 4 (Nidek, Япония).

Обработка результатов

Подсчет площади эпителиального дефекта проводился в программе Adobe Photoshop CC. Полученные числовые значения в опытных и

контрольных группах суммировались в виде таблицы и подвергались статистической обработке. По данным конфокальной микроскопии проводилось протоколирование состояния цитоархитектоники роговицы во все сроки наблюдения.

2.4 Статистические методы исследования

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием компьютерных программ Statistica 13.3 («StatSoft», США) и Microsoft Office Excel 2007 («Microsoft», США). Характер распределения данных оценивали с помощью критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка, асимметрии и эксцесс. Все критерии показали, что исследуемые группы не имеют нормального распределения. Данные с распределением отличным от нормального, представлены в формате $Me (Q25; Q75)$, где Me – медиана, $Q25$, $Q75$ – нижний и верхний квартиль. Для количественных параметров для сопоставления двух групп использовали непараметрический критерий Манн-Уитни. Для сравнения данных в различные сроки наблюдения использовали критерий Уилкоксона. Статистически достоверными признавали различия, при которых уровень достоверности (p) $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК IN VITRO

Целью данной главы явилась комплексная оценка функционального влияния смеси сульфатированных гликозаминогликанов на культуру клеток эпителия роговицы. Для этого было необходимо выполнить морфологическое и гистохимическое исследование изучаемой клеточной культуры для определения ее жизнеспособности и наличия эпителиального фенотипа. После проведения этапа идентификации культуры клеток, изучалось наличие пролиферативной активности клеток эпителия роговицы под влиянием различных концентраций сГАГ, основываясь на клинико-морфологических методах исследования, подсчете количества жизнеспособных клеток и статистической обработке, полученных результатов. В последней серии эксперимента *in vitro* изучалось наличие протекторного действия сГАГ на клетки эпителия роговицы человека в условиях токсического действия раствора бензалкония хлорида. Интерпретация полученных результатов основывалась на количественном определении жизнеспособных клеток, подтвержденных морфологическим исследованием, а также проводился статистический анализ для подтверждения достоверности данных.

3.1. Результаты идентификации эпителиальных клеток

Первым этапом проводили морфологическую оценку клеток методом световой микроскопии с фазовым контрастом. Культура клеток переднего эпителия роговицы формировала монослой, представленный популяцией округлых и полигональных клеток эпителиального фенотипа, плотно прилегающих друг к другу с единичными биполярными клетками фибропластического типа (рис. 2).



Рисунок 2 — Морфологическое исследование культуры клеток переднего эпителия роговицы.

Световая микроскопия с фазовым контрастом,
ув. x 100

В качестве контрольной группы использовалась культура мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из жировой ткани, где визуализировались гомогенные культуры клеток, характеризующиеся веретеновидной фибробластоподобной морфологией с четко различимым ядром, ядрышками и цитоплазматической перинуклеарной зернистостью (рисунок 3).

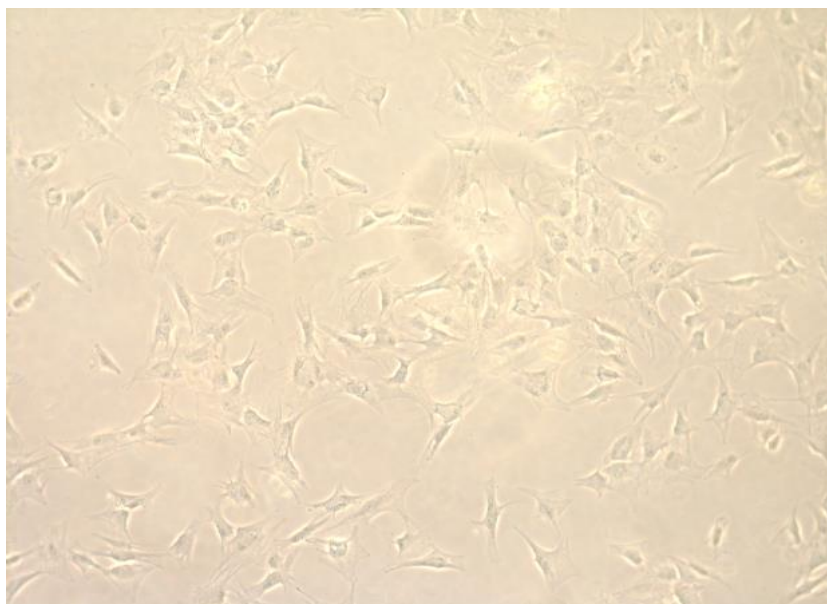


Рисунок 3 — Морфологическое исследование культуры клеток мезенхимальных стволовых клеток.

Световая микроскопия с фазовым контрастом,
ув. x 200

Вторым этапом проводили флуоресцентно-микроскопическое исследование с использованием флуоресцентного красителя DAPI, обладающего селективностью к двуцепочечной ДНК, для прижизненной окраски клеточных ядер, изучения их локализации и морфологии ядра. При визуальной оценке выявлено, что распределение и интенсивность флуоресценции клеточных ядер в поле зрения равномерны, что подтверждает жизнеспособность клеток в обеих клеточных культурах (рисунок 4).

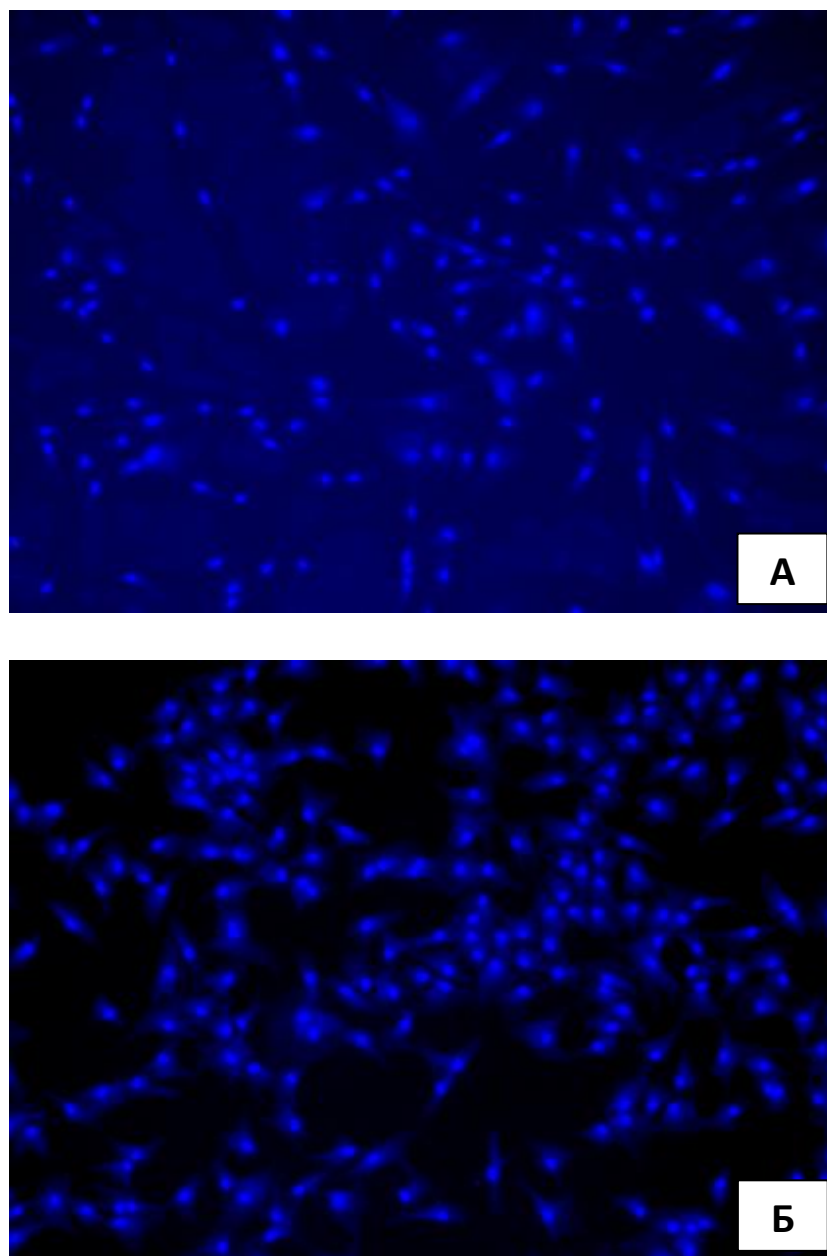


Рисунок 4 — Флуоресцентно-микроскопическое исследование с красителем DAPI : а) опытная группа (культура клеток эпителия роговицы); б) контрольная группа (культура мезенхимальных стволовых клеток).

Флуоресцентная микроскопия,
ув. x 200

Учитывая наличие при морфологическом исследовании в опытной группе единичных клеток фибробластоподобного фенотипа, был проведен

третий этап идентификации эпителиальных клеток, включающий флуоресцентно-микроскопическое исследование клеток со специфическим окрашиванием моноклональными антителами на Цитокератин 18.

В опытной группе у большинства клеток в поле зрения отмечалась позитивная реакция на Цитокератин 18. В культуре контроля была зарегистрирована негативная реакция на специфическое окрашивание моноклональными антителами (рисунок 5).

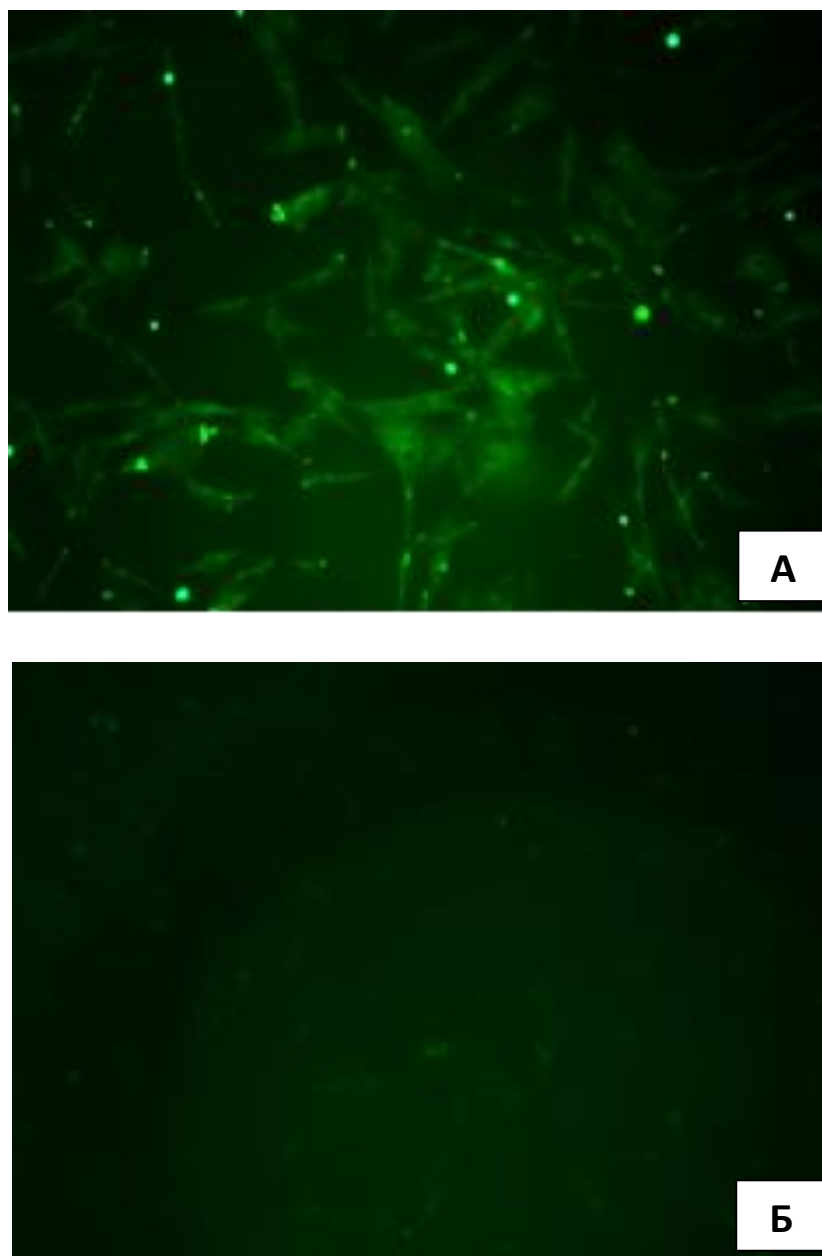


Рисунок 5 — Флуоресцентно-микроскопическое исследование со специфическим окрашиванием моноклональными антителами на Цитокератин 18: а) опытная группа (культура клеток эпителия роговицы); б) контрольная группа (культура мезенхимальных стволовых клеток).

Флуоресцентная микроскопия,
ув. x 100

Таким образом, по данным морфологического исследования в опытной группе визуализировались клетки с эпителиальным фенотипом. При флуоресцентно-микроскопическом исследовании с использованием красителя DAPI отмечалось равномерное распределение и интенсивность флуоресценции, что подтвердило наличие жизнеспособных клеток в обеих клеточных культурах. При специфическом окрашивании моноклональными антителами на цитокератин 18, в опытной группе отмечалась позитивная флуоресцентная реакция, что подтвердило наличие эпителиальных клеток в культуре.

3.2. Исследование пролиферативного действия смеси сульфатированных гликозаминогликанов на культуру эпителия роговицы человека в эксперименте *in vitro*

При изучении функционального влияния различных концентраций сГАГ на культуру клеток эпителия роговицы учитывали два критерия: количественный - изменение КИ в режиме реального времени, и качественный - морфологический контроль клеток в культуре под действием различных концентраций сГАГ в динамике исследования.

По истечении 48 часов от начала эксперимента показатели клеточного индекса во всех исследуемых культурах не имели статистического различия между собой, после чего проводилась замена среды с добавлением исследуемых растворов, согласно представленному дизайну исследования. Через 2 часа после введения исследуемых растворов (50 часов от начала эксперимента) были выявлены различия между показателями клеточного индекса как в опыте, при добавлении смеси сГАГ, так и в группе контроля. В опытной группе №1, №2, №3 отмечалось достоверное, статистически

значимое увеличение показателей КИ по сравнению с группой контроля ($p=0,000003$, $p=0,000000$, $p=0,000000$, соответственно). Наибольшее внимание привлекли опытная группа №2 (сГАГ 0,5%), где показатель клеточного индекса был наибольшим- Ме 2,6454 (2,5813;2,7769), прирост показателей составил 45,40%, и опытная группа №3 (сГАГ 1%), где показатель клеточного индекса составлял Ме 2,5504 (2,5283;2,5782), прирост показателей составил 39,17%, различия между показателями КИ в опытной группе №2 и опытной группе №3 были статистически значимыми ($p=0.001625$). В опытной группе №1(сГАГ 0,1%) и контрольной группе №1 показатели клеточного индекса и его прироста были наименьшими и составляли Ме 2,3961(2,3530;2,4065), прирост показателей -30,45% и Ме 2,1688(2,1567;2,1817), прирост показателей- 17,67%, соответственно (таблица 4).

Таблица 4 — Показатели клеточного индекса в культуре клеток эпителия роговицы человека в зависимости от времени инкубации с исследуемыми образцами растворов сГАГ, Me (Q1; Q3)

	Клеточный индекс			
	48ч	49ч	50ч	51ч
Опытная группа №1 (сГАГ 0,1%) (n=20)	1,8678 (1,7518;1,9888)	1,3383 (1,3294;1,3393) ^{1,4}	2,3961 (2,3530;2,4065) ^{1,3,4}	2,5186 (2,4975;2,5922) ^{1,3,4}
Опытная группа №2 (сГАГ 0,5%) (n=20)	1,8322 (1,8050;1,8440)	1,3724 (1,3324;1,4388) ^{1,4}	2,6454 (2,5813;2,7769) ^{1,2,4}	2,6521 (2,5866;2,7921) ^{1,2,4}
Опытная группа №3 (сГАГ 1%) (n=20)	1,8561 (1,8370;1,8750)	1,2452 (1,2306;1,2717) ^{1,2,3}	2,5504 (2,5283;2,5782) ^{1,2,3}	2,8578 (2,8419;2,8738) ^{1,2,3}
Контрольная группа №1 (без добавления сГАГ) (n=20)	1,8456 (1,8139;1,9006)	1,5421 (1,5238;1,5648) _{2,3,4}	2,1688 (2,1567;2,1817) ^{2,3,4}	2,3801 (2,3672;2,4084) ^{2,3,4}

¹ -отличие от контрольной группы №1 достоверно с $P<0,05$; ²- отличие от опытной группы №1 достоверно с $P<0,05$; ³ - отличие от опытной группы №2 достоверно с $P<0,05$, ⁴- отличие от опытной группы №3 достоверно с $P<0,05$

При морфологическом исследовании методом световой микроскопии с фазовым контрастом во всех опытных группах были зафиксированы следующие изменения: во всех опытных группах клетки вытягивались, становились биполярными, приобретали фибробластоподобный фенотип, что свидетельствовало о вовлечении клеток в процесс эпителиомезенхимальной трансформации. Наличие делящихся клеток указывало на наличие пролиферативной активности в момент исследования, что подтверждает полученные результаты изменения клеточного индекса в различные сроки эксперимента (рисунок 6).

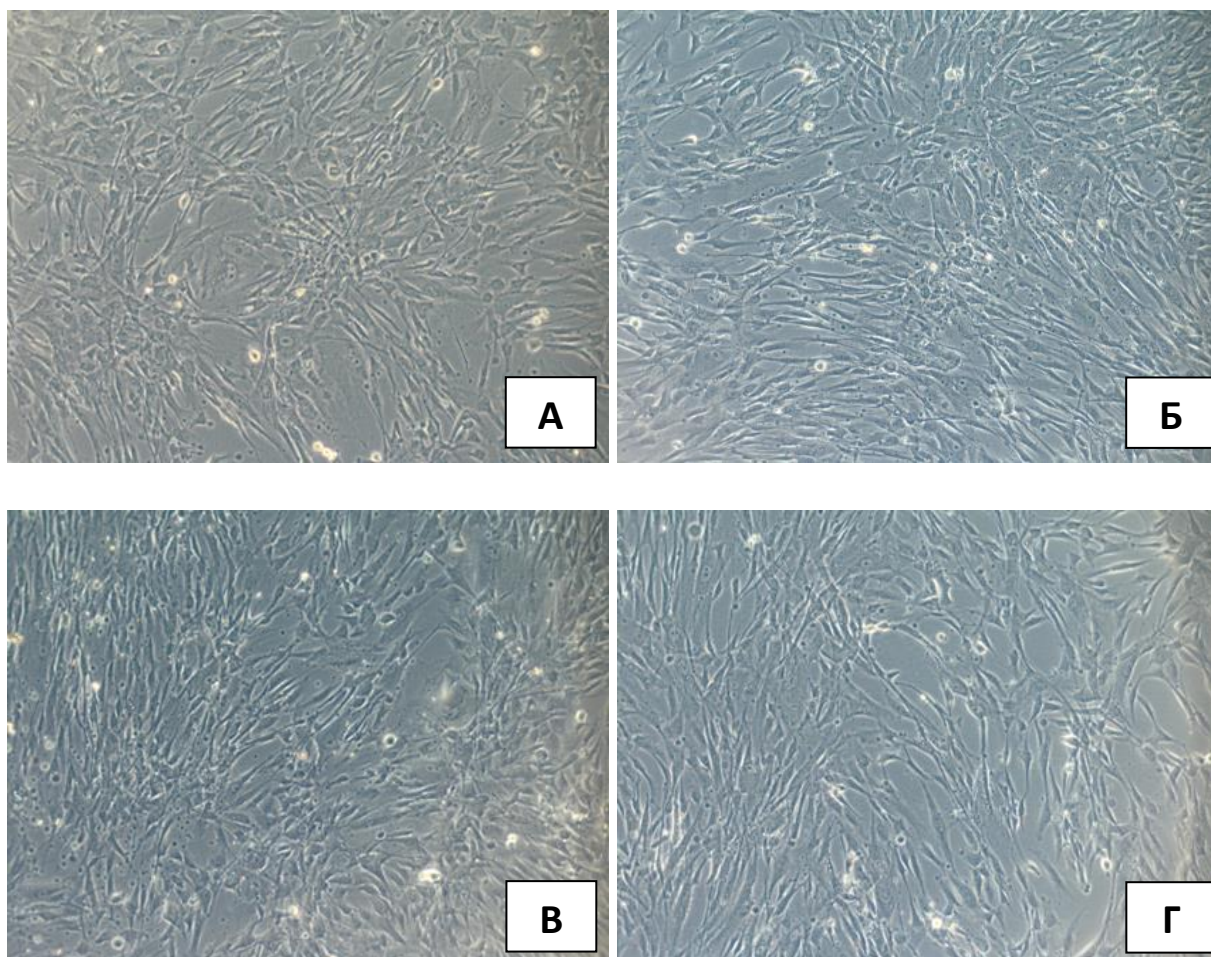


Рисунок 6 — Морфологический контроль клеток в культуре под действием различных концентраций сГАГ: а) опытная группа №1 (сГАГ 0,1%); б) опытная группа №2 (сГАГ 0,5%); в) опытная группа №3 (сГАГ 1%); г) контрольная группа №1 (культура клеток).

Световая микроскопия с фазовым контрастом
ув. x 100

Через 3 часа от начала эксперимента (51 час наблюдения) в опытных группах №1, №2 и №3 показатели клеточного индекса последовательно повышались и оставались достоверно высокими в сравнении с контрольной группой ($p=0,000023$; $p=0,000001$; $p=0,000000$, соответственно). Наибольшие показатели клеточного индекса были отмечены в опытной группе с 1% сГАГ

и составляли Me 2,8578 (2,8419;2,8738), прирост показателей составил - 55,59%. В опытной группе с 0,5% сГАГ показатели клеточного индекса составляли Me 2,6521 (2,5866;2,7921), прирост показателей 45,95%. Наименьшие показатели КИ были зарегистрированы в опытной группе №1 с 0,1% сГАГ и группе контроля №1, где данные показатели составляли Me 2,5186 (2,4975;2,5922), прирост показателей-38,37%, и Me 2,3801 (2,3672;2,4084), прирост показателей -29,63%, соответственно.

Во всех опытных группах через 51 час от начала эксперимента наблюдалось достижение пика пролиферативной активности и сохранность ее в течение последующих 1,5 часов наблюдения, вследствие чего эксперимент был прекращен.

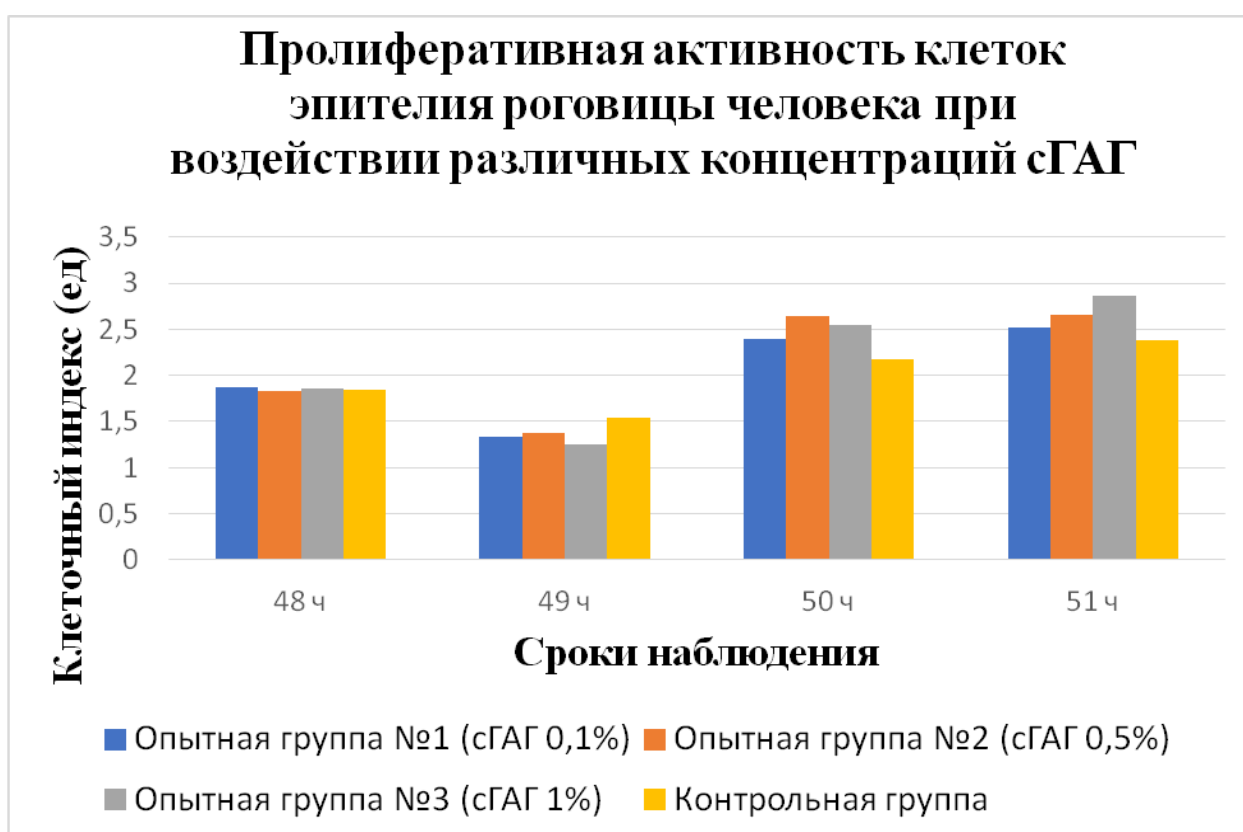


Рисунок 7 — Зависимость показателей клеточного индекса от сроков наблюдения в опытных группах и группе контроля

На построенном графике (рис. 7) видно, что введение растворов смеси сГАГ в концентрации 0,1%, 0,5% и 1% в культуральную среду стимулирует пролиферацию клеток эпителия роговицы человека по сравнению с группой контроля, о чем можно судить по показателям КИ в разные сроки эксперимента. Конечные показатели КИ указывают на то, что растворы смеси сГАГ в концентрации 0,5% и 1% оказывают более выраженное пролиферативное действие на клетки эпителия роговицы человека *in vitro* из диапазона исследуемых концентраций.

Таким образом, при интерпретации полученных результатов, закономерно сделать вывод, что введение сульфатированных гликозаминогликанов в культуральную среду стимулирует пролиферацию клеток эпителия роговицы человека. Статистический анализ полученных данных указывает на более выраженное пролиферативное действия сГАГ в концентрации 0,5% и 1% из диапазона исследуемых.

3.3 Изучение протекторного действия смеси сульфатированных гликозаминогликанов на культуру эпителия роговицы в условиях токсического воздействия раствора бензалкония хлорида в эксперименте *in vitro*

При изучении функционального влияния различных концентраций сГАГ на культуру клеток эпителия роговицы в условиях токсического воздействия раствора БХ учитывали два критерия: количественный - изменение клеточного индекса в режиме реального времени, и качественный - морфологический контроль клеток в культуре под действием различных концентраций сГАГ в условиях токсического воздействия раствора БХ в динамике исследования. Изменение показателей КИ клеток эпителия роговицы человека в динамике представлены в таблице 5:

Таблица 5 — Показатели клеточного индекса в культуре клеток эпителия роговицы человека в зависимости от времени инкубации с исследуемыми образцами растворов сГАГ в условиях токсического действия раствора БХ, Ме (Q1;Q3)

	Клеточный индекс			
	48 часов (введение растворов)	49 часов	50 часов	51 час
Опытная группа №4 (сГАГ 0,1% + БХ) (n=20)	1,8383 (1,8319;1,8507)	0,8812 (0,8729;0,8814) ^{1,4}	0,0749 (0,0699;0,0866) ₄	0,0085 (0,0078;0,0089) _{3,4}
Опытная группа №5 (сГАГ 0,5%+ БХ) (n=20)	1,8421 (1,8412;1,8483)	0,9134 (0,8992;0,9250) _{1,4}	0,1587 (0,1477;0,1669) ₄	0,0171 (0,0156;0,0193) _{1,2,4}
Опытная группа №6 (сГАГ 1% + БХ) (n=20)	1,8325 (1,8225;1,8417)	1,3534 (1,3070;1,3720) _{1,2,3}	0,2830 (0,2780;0,2944) _{1,2,3}	0,0679 (0,0638;0,0736) _{1,2,3}
Контрольная группа №2 (БХ) (n=20)	1,8400 (1,8177;1,8635)	0,7083 (0,6804;0,7388) _{2,3,4}	0,07495 (0,0700;0,0814) ₄	0,0080 (0,0076;0,0084) _{3,4}

¹- отличие от контрольной группы №2 достоверно $p < 0,05$; ²- отличие от опытной группы №4 достоверно $p < 0,05$; ³- отличие от опытной группы №5 достоверно $p < 0,05$; ⁴- отличие от опытной группы №6 достоверно $p < 0,05$

По истечении 48 часов от начала эксперимента показатели КИ во всех исследуемых культурах не имели статистического различия между собой, после чего в культуральную среду вводились исследуемые растворы, согласно представленному дизайну исследования.

Через 1 час после введения исследуемых растворов (49 часов от начала эксперимента), в состав которых входил БХ, во всех опытных группах и группе контроля отмечалось резкое снижение показателей клеточного индекса. Однако, показатели клеточного индекса в опытной группе №4, опытной группе №5 и опытной группе №6 были достоверно выше, чем в группе контроля ($p=0,000222$, $p=0,000148$ и $p=0,000148$, соответственно). Наибольшие показатели были в опытных группах с концентрациями 1% сГАГ (опытная группа № 6) – Me 1,3534(1,3070;1,3720) (снижение показателей по сравнению с исходными данными на 26,62%) и 0,5% сГАГ (опытная группа №5) – Me 0,9134 (0,8992;0,9250) (снижение показателей по сравнению с исходными данными - 50,24%). В опытной группе №4 (сГАГ 0,1%) и контрольной группе №2 показатели КИ были наименьшими, а снижение показателей по сравнению с исходными данными – наибольшими: Me 0,8812 (0,8729;0,8814), (снижение показателей- 52,70%) и Me 0,7083 (0,6804;0,7388), (снижение показателей- 60,60%), соответственно. Однако, показатели в опытной группе №4 и в опытной группе №5 не имели статистически значимых различий ($p=0.49954$).

Через 2 часа после введения исследуемых образцов (50 часов от начала эксперимента) во всех экспериментальных группах отмечалось постепенное снижение показателей клеточного импеданса клеток, что указывало на снижение количества жизнеспособных клеток в культуре. Показатели КИ в опытной группе №6 оставались достоверно выше в сравнении с группой контроля ($p=0,000148$). Показатели КИ в опытной группе были наибольшими (1% сГАГ) и составляли Me 0,2830 (0,27810;0,2944) (снижение показателей по сравнению с исходными данными 84,83%). В опытной группе №5 (0,5% сГАГ)

показатели клеточного индекса составляли $Me\ 0,1587\ (0,1477;0,1669)$ (снижение показателей по сравнению с исходными данными 91,59%). Наименьшие показатели КИ отмечались в опытной группе №4(0,1% сГАГ) и группе контроля №2, где данные показатели составляли $Me\ 0,0749\ (0,0699;0,0866)$ (снижение показателей- 95,92%) и $Me\ 0,0749\ (0,0700;0,0814)$ (снижение показателей- 95,93 %) соответственно.

Через 3,5 часа с момента введения исследуемых растворов в опытных и контрольной группах при морфологическом изучении методом световой микроскопии с фазовым контрастом жизнеспособные клетки не визуализировались, вследствие чего эксперимент был прекращен (рисунок 8).

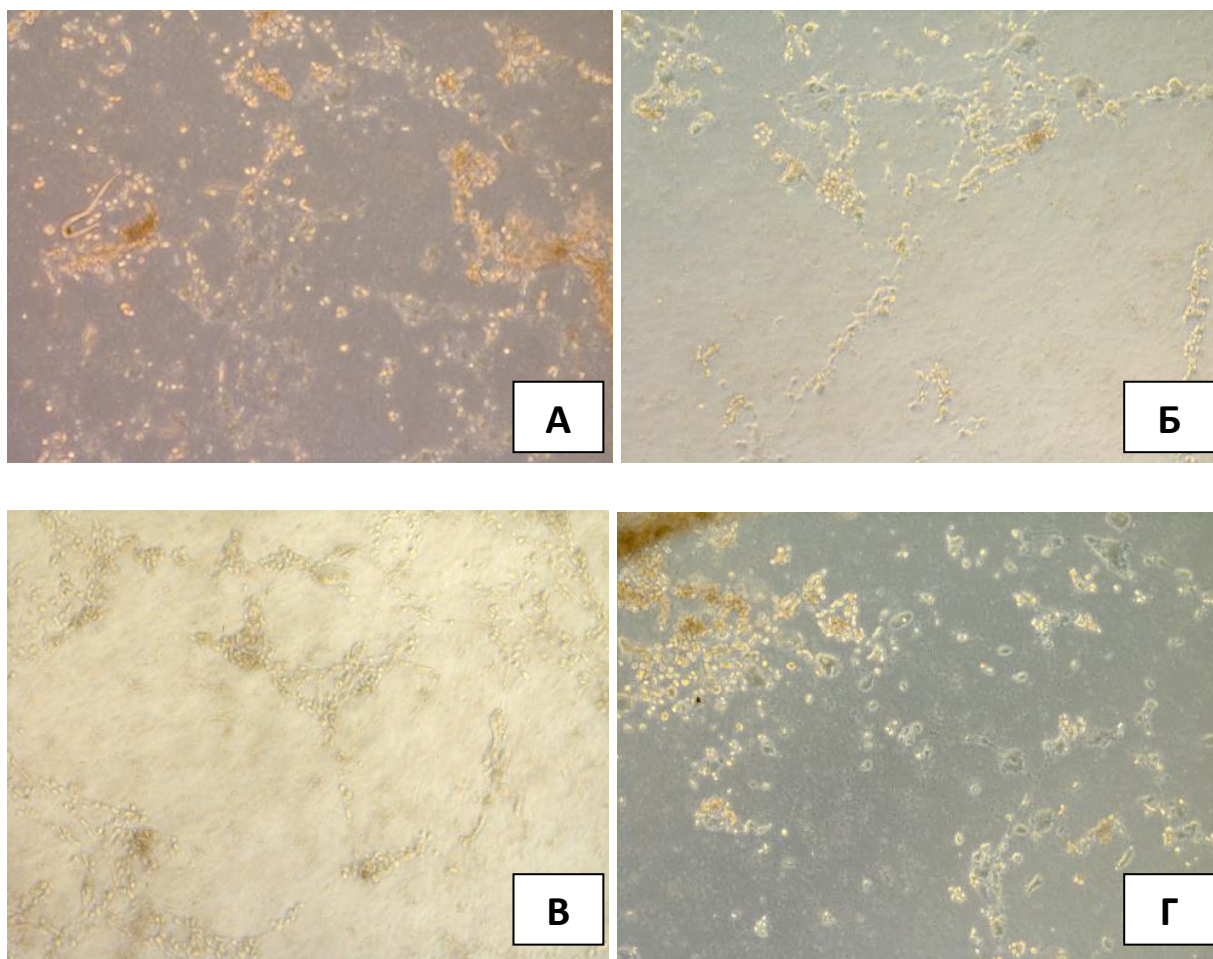


Рисунок 8 — Морфологический контроль клеток в культуре под действием различных концентраций сГАГ в условиях токсического воздействия раствора бензалкония хлорида: а) опытная группа №4 (сГАГ 0,1% +БХ); б) опытная группа №5 (сГАГ 0,5%+ БХ); в) опытная группа №6 (сГАГ 1%+ БХ); г) контрольная группа №2 (БХ)

Световая микроскопия с фазовым контрастом,
ув. X 10

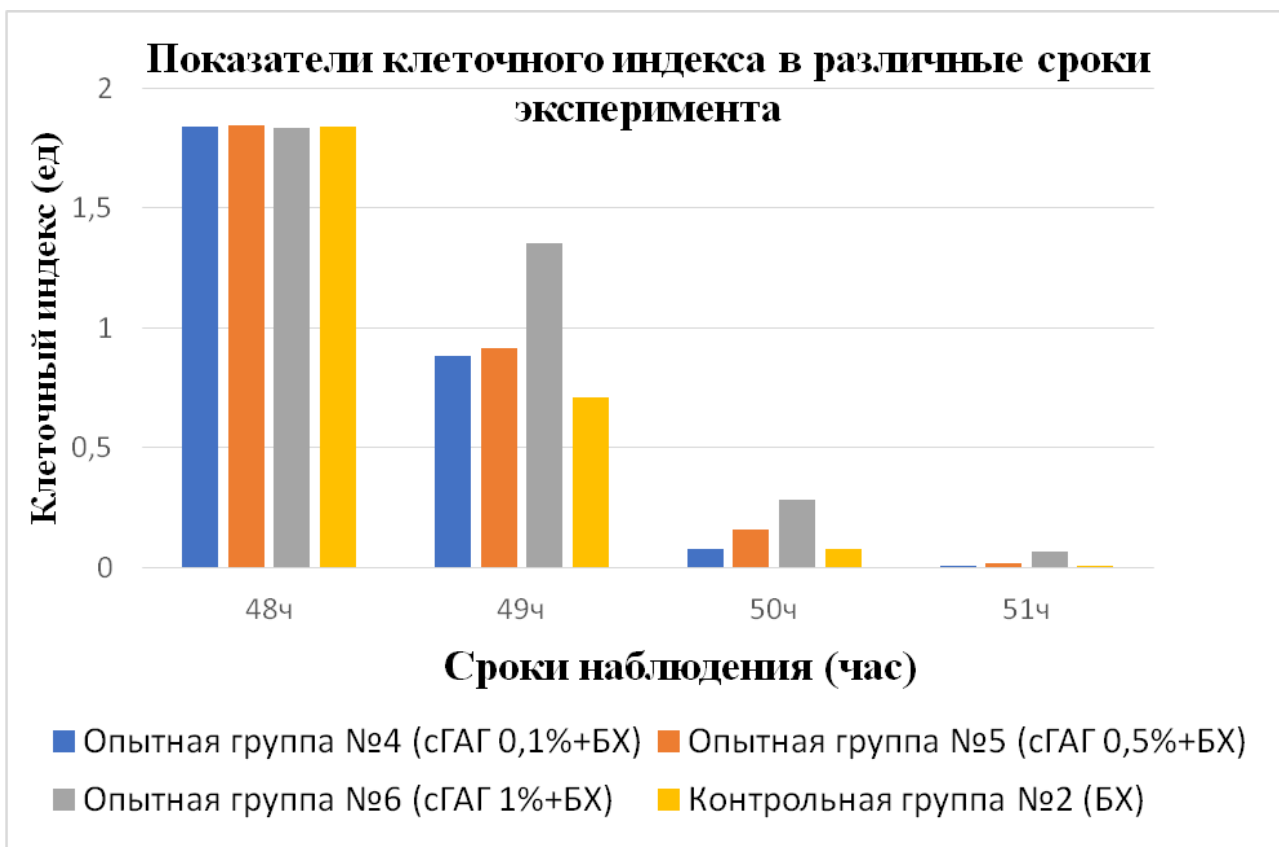


Рисунок 9 — Зависимость показателей клеточного индекса от времени инкубации с исследуемыми образцами смеси растворов сГАГ в условиях токсического воздействия раствора бензалкония хлорида

На построенном графике видно, что введение растворов смеси сГАГ в концентрации 0,5% и 1% в культуральную среду оказывает протекторное действие на культуру клеток эпителия роговицы человека по сравнению с группой контроля, о чем можно судить по конечным показателям клеточного индекса в эксперименте.

Таким образом, при интерпретации полученных результатов, закономерно сделать вывод, что введение сульфатированных гликозаминогликанов в культуральную среду в диапазоне концентрации 0,5%-1% может оказать протекторное действие на клетки эпителия роговицы человека в условиях токсического действия. Статистический анализ

полученных данных указывает на более выраженное протекторное действия сГАГ в концентрации 1% из диапазона исследуемых.

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ IN VIVO

Целью данной главы экспериментального исследования явилось изучение клинико-функционального влияния смеси сульфатированных гликозаминогликанов на репаративные свойства роговицы лабораторных животных (кроликов породы Шиншиллы). Для комплексной оценки клинико-функционального влияния необходимо было изучить наличие местной токсичности сГАГ на роговицу кролика и определить эффективность применения различных концентраций сГАГ на репаративные свойства роговицы с использованием клинико-функциональных методов наблюдения. Так же необходимо было изучить протекторное действие смеси сГАГ в условиях токсического воздействия бензалкония хлорида.

4.1. Результаты изучения местной токсичности смеси сульфатированных гликозаминогликанов и определение эффективности применения сульфатированных гликозаминогликанов на модели механической эрозии роговицы кролика

Для решения задачи изучения местной токсичности смеси сГАГ и определения эффективности ее применения на модели механической эрозии роговицы кролика, необходимо было провести наблюдение за животными с использованием функциональных методов исследования, изучить влияние смеси сГАГ на ширину зрачка и уровень внутриглазного давления. Для определения эффективности применения различных концентраций сГАГ на репаративные свойства роговицы, всем опытным животным была воспроизведена модель механической эрозии для динамического наблюдения за реэпителизацией.

4.1.1. Результаты биомикроскопии переднего отрезка глаза

Во всех опытных группах №1, №2, №3 и группе контроля за весь период наблюдения (2 недели) глаза оставались спокойные, признаков токсико-аллергической реакции со стороны переднего отрезка глаза выявлено не было. Конъюнктивa век и глазного яблока сохраняли нормальную окраску, гиперемии не отмечалось, роговица во все сроки сохраняла свою прозрачность, раствором флюоресцеина не окрашивалась, рисунок радужки не изменялся, хрусталик оставался прозрачный, рефлекс с глазного дна был розовый (рисунок 10).

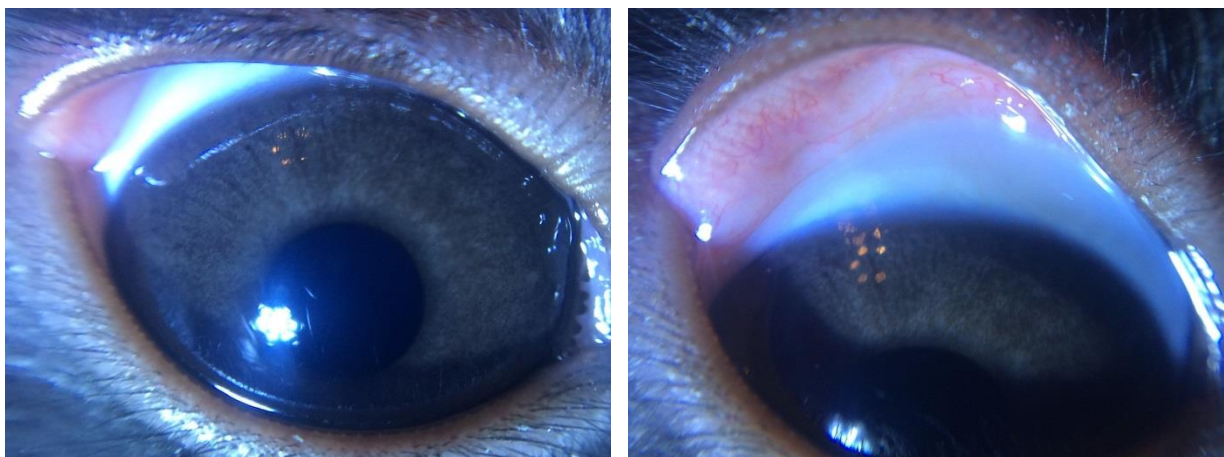


Рисунок 10 — Биомикроскопия переднего отрезка глаза кроликов через 2 недели клинического наблюдения

4.1.2. Влияние смеси сульфатированных гликозаминогликанов на ширину зрачка (пупиллометрия)

Во всех опытных группах и группе контроля за весь период наблюдения (2 недели) показатели вертикального и горизонтального меридиана зрачка были без изменений (таблица 6).

Таблица 6 — Результаты пупиллометрии (мм) в вертикальном меридиане (ВМ) и горизонтальном меридиане (ГМ) у кроликов на фоне инстилляций смеси сГАГ в хроническом опыте

Сроки (сутки)	Опытная группа №1 (0,1% сГАГ)	Опытная группа №2 (0,5% сГАГ)	Опытная группа №3 (1% сГАГ)	Контрольная группа (0,9% NaCl)
0	ВМ- 8,57±0,09 ГМ- 9,47 ±0,05	ВМ- 8,55±0,06 ГМ- 9,47 ±0,05	ВМ- 8,57±0,09 ГМ- 9,52 ±0,09	ВМ- 8,56 ±0,08 ГМ- 9,50 ±0,06
1	ВМ- 8,55±0,05 ГМ- 9,47 ±0,05	ВМ- 8,55±0,05 ГМ- 9,47 ±0,05	ВМ- 8,55±0,05 ГМ- 9,45 ±0,05	ВМ- 8,55 ±0,06 ГМ- 9,50 ±0,06
3	ВМ- 8,57±0,05 ГМ- 9,52 ±0,09	ВМ- 8,55±0,05 ГМ- 9,50 ±0,08	ВМ- 8,57±0,05 ГМ- 9,47 ±0,05	ВМ- 8,57 ±0,06 ГМ- 9,50 ±0,07
7	ВМ- 8,57±0,05 ГМ- 9,47 ±0,05	ВМ- 8,55±0,05 ГМ- 9,47 ±0,05	ВМ- 8,55±0,05 ГМ- 9,47 ±0,05	ВМ- 8,55 ±0,05 ГМ- 9,51 ±0,05
14	ВМ- 8,57±0,09 ГМ- 9,55 ±0,10	ВМ- 8,55±0,07 ГМ- 9,47 ±0,05	ВМ- 8,55±0,05 ГМ- 9,52 ±0,08	ВМ- 8,56 ±0,06 ГМ- 9,52 ±0,06

4.1.3. Влияние смеси сульфатированных гликозаминогликанов на уровень внутриглазного давления

Данные, полученные при анализе результатов тонометрии в опытных группах, были сопоставимы с данными, полученными в группах контроля, и не отличались между собой (таблица 7).

Таблица 7— Уровень внутриглазного давления (ВГД) в мм. рт. ст. у кроликов в опытных и контрольной группах в различные сроки наблюдения

Сроки (сутки)	Опытная группа №1 (0,1% сГАГ)	Опытная группа №2 (0,5% сГАГ)	Опытная группа №3 (1% сГАГ)	Контрольная группа (0,9% NaCl)
0	8,20 ±0,12	8,32±0,23	8,22 ±0,23	8,25 ±0,21
14	8,27 ±0,05	8,35±0,23	8,22 ±0,25	8,30 ±0,18

Таким образом, суммируя результаты клинического наблюдения за животными и функционального обследования, было выявлено, что смесь сульфатированных гликозаминогликанов не оказывает токсического влияния на структуры глазной поверхности, что позволило перейти в следующем этапе эксперимента.

4.1.4 Изучение влияния смеси сГАГ на модели механической эрозии роговицы в эксперименте *in vivo*

Динамическое наблюдение за реэпителизацией роговицы проводили ежедневно с интервалом 12 часов. Сразу после скарификации во всех

экспериментальных группах глазная щель была сужена, глаза раздражены с явлениями перикорнеальной инъекции. Во всех опытных группах зона десквамации занимала всю площадь поверхности роговицы и прокрашивалась 0,5% раствором флюоресцеина натрия, площадь десквамации эпителия в опытной группе №1, в опытной группе №2 и в опытной группе №3 не имела статистически значимых отличий от группы контроля ($p=0,55$, $p=0.79$ и $p=0.38$, соответственно).

Через 12 часов от начала эксперимента во всех опытных глазах было зарегистрировано появление каймы эпителизации концентрично лимбу. В опытной группе №1 и опытной группе №2 площадь десквамации была наименьшей, и составляла Me 91,70 (88,26;95,66) мм² и Me 93,15 (89,02;96,03) мм², соответственно, статистически значимой разницы между группами выявлено не было ($p=0.60$). В опытной группе №3 площадь роговицы, прокрашиваемой флюоресцеином натрия, составляла Me 95,36 (94,08;98,64) мм², а в группе контроля Me 98,02 (96,99;98,94) мм² ($p=0.03$).

Через 36 часов наибольшим по площади дефект эпителия сохранялся в опытной группе №3 и в контрольной группе и составлял Me 68,74 (67,01;70,22) мм² и Me 69,64 (68,01;70,17) мм², соответственно. Различия между показателями опытной группы №3 и контрольной группой статистически значимы не были ($p=0,45$). В опытной группе №1 и №2 зона эрозии сократилась по площади и составляла Me 59,06 (57,18;63,24) мм² и Me 61,12 (58,65;63,66) мм², соответственно, что достоверно отличалось от показателей площади зоны роговицы в опытной группе №3 и группой контроля ($p<0,05$), статистически значимой разницы между показателями опытной группы №1 и опытной группой №2 не отмечалось ($p=0.303$). Во всех группах эксперимента сохранялись явления раздражения глаз, в виде незначительного отека поверхностных слоев стромы роговицы и перикорнеальной инъекции сосудов.

Через 60 часов от начала эксперимента в группе контроля, без использования сГАГ отмечались явления раздражения глаз, реэпителизация роговицы проходила концентрично лимбу, сохранялся дефект эпителия в центральной зоне роговицы в виде овала с неровными краями и по площади составлял $Me\ 40,18\ (39,15;41,02)\ \text{мм}^2$. Дефект эпителия в контрольной группе был достоверно больше в сравнении со всеми опытными группами ($p < 0,05$). Через 108 часов наблюдения площадь дефекта эпителия роговицы составляла $Me\ 1,83\ (1,59;2,01)\ \text{мм}^2$, полное восстановление прозрачности и целостности эпителия во всех контрольных глазах было отмечено через 5 суток от начала эксперимента (120 часов).

После инстилляций раствора 1% сГАГ (3-я опытная группа) через 60 часов отмечалось сокращение площади зоны десквамации до $29,26\ (29,99;30,14)\ \text{мм}^2$, дефект эпителия сохранялся в центральной зоне роговицы в виде овала. Сохранялась умеренная перикорнеальная инъеция, отек поверхностных слоев стромы. Полная эпителизация с восстановлением прозрачности роговицы в 3-й опытной группе наступила через 96 часов от начала эксперимента.

В 1ой опытной группе на фоне инстилляций 0,1% раствора сГАГ реэпителизация роговицы проходила концентрично лимбу и через 60 часов от начала эксперимента составляла $Me\ 17,34\ (16,21;19,85)\ \text{мм}^2$, полная эпителизация роговицы наблюдалась во всех опытных глазах через 84 часа от начала эксперимента. После инстилляций 0,5% раствора сГАГ (2-ая опытная группа) через 60 часов от начала эксперимента зона десквамации эпителия сохранялась в центральной зоне роговицы в виде овала с ровными краями и по площади была наименьшей – $Me\ 12,45\ (9,78;15,05)\ \text{мм}^2$. Полная эпителизация с восстановлением прозрачности роговицы после инстилляций 0,5% раствора сГАГ (2-ая опытная группа) во всех опытных глазах была зарегистрирована через 84 часа от начала эксперимента. Результаты клинических наблюдений

за животными и динамика реэпитализации роговицы в различные сроки наблюдения представлены в таблицах 8 и 9.

Таблица 8 — Площадь поверхности дефекта эпителия (мм²) в различные сроки наблюдения, Me (Q1;Q3)

Экспериментальные группы	Сроки наблюдения (час)							
	0 час	12 час	24 час	36 час	60ч	72 час	84	108ч
Опытная группа №1 (сГАГ 0,1%) (n=20)	132,03 (130,34;136,20)	91,70 (88,26;95,66) 1,4	63,10 (60,61;68,44) 1,4	59,06 (57,18;63,24) 1,4	17,34 (16,21;19,85) 1,3,4	1,93 (1,52;2,10) 1,4	0	0
Опытная группа №2 (сГАГ 0,5%)(n=20)	133,05 (130,86;135,38)	93,15 (89,02;96,03) 1,4	64,91 (62,79;69,53) 1,4	61,12 (58,65;63,66) 1,4	12,45 (9,78;15,05) 1,2,4	1,57 (1,06;2,89) 1,4	0	0
Опытная группа №3 (сГАГ 1%)(n=20)	134,11 (132,24;136,13)	95,36 (94,08;98,64) 1,2,3	74,18 (71,42;78,64) 1,2,3	68,74 (67,01;70,22) 2,3	29,26 (29,99;30,14) 1,2,3	17,17 (16,95;17,95) 1,2,3	6,15 (5,86;7,21) 1,2,3	0
Контрольная группа (NaCl)(n=20)	133,20 (130,86;135,77)	98,02 (96,99;98,94) 2,3,4	72,62 (71,35;73,40) 2,3,4	69,64 (68,01;70,17) 2,3	40,18 (39,15;41,02) 2,3,4	30,15 (29,66;31,02) 2,3,4	20,18 (19,86;21,76) 2,3,4	1,83 (1,59;2,01)

¹ -отличие от контрольной группы достоверно $P<0,05$, ²- отличие от опытной группы №1 группы достоверно $P<0,05$, ³ – отличие от опытной группы №2 достоверно $P<0,05$, ⁴- отличие от опытной группы №3 достоверно $P<0,05$




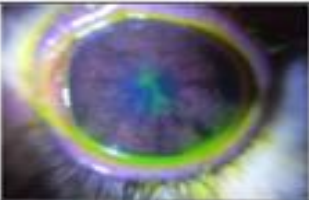








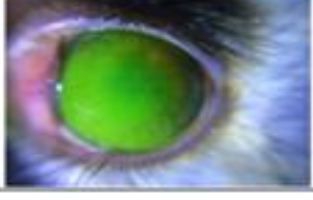

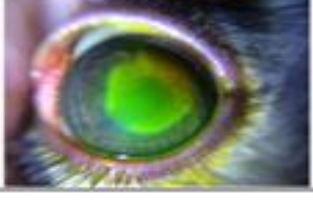

Экспериментальные группы	Сроки наблюдения (час)			
	0	24	48	72
Опытная группа №1 (0,1% <u>сГАГ</u>)				
Опытная группа №2 (0,5% <u>сГАГ</u>)				
Опытная группа №3 (1% <u>сГАГ</u>)				
Контрольная группа (<u>NaCl</u>)				

Таблица 9 — Результаты биомикроскопии глаз кроликов с окрашиванием 0,5% раствором флюоресцеина натрия с последующей фоторегистацией

Таким образом, данные полученные при анализе результатов проведенных серий эксперимента позволили сделать вывод, что исследуемая смесь сГАГ в концентрациях 0,1%, 0,5% и 1% не оказывает местного токсического действия на глазную поверхность кролика, не влияет на ширину зрачка и на уровень внутриглазного давления. Полученные результаты экспериментального исследования подтверждают наличие пролиферативной активности растворов сГАГ в диапазоне исследуемых концентраций, а сроки полной эпителизации и восстановления прозрачности роговицы позволяют предположить, что использование раствора сГАГ в концентрации 0,5% является наиболее эффективным в эксперименте *in vivo* на модели механической эрозии роговицы кролика. Опытные образцы смеси с наибольшей пролиферативной активностью (0,5%) использовались в последующей серии экспериментального исследования по изучению репаративных и протекторных свойств смеси сГАГ на модели токсической эрозии роговицы .

4.2 Результаты эксперимента по изучению функционального влияния смеси сульфатированных гликозаминогликанов на модели токсической эрозии роговицы

Основной целью данного исследования явилось изучение протекторного действия сГАГ на клетки эпителия роговицы. Для этого было необходимо, на основании литературных данных, разработать экспериментальную модель токсической эрозии роговицы с использованием клинико-функциональных методов исследования, и на разработанной модели изучить наличие протекторных свойств сГАГ.

4.2.1. Результаты экспериментального исследования влияния 0,1% раствора бензалкония хлорида на состояние роговицы у кроликов (моделирование токсической эрозии роговицы)

Выбор концентраций БХ в этом эксперименте был основан на клинической практике и экспериментальных исследованиях, представленных в литературе. Наиболее часто применяемая концентрация БХ в офтальмологических препаратах 0,01 % (в диапазоне от 0,004 % до 0,02 %) [175]. Создание экспериментальной модели на животных с использованием 0,01 % концентрации имеет определенные трудности, в связи с длительным наблюдением за животными [142]. Так, Furrer с соавторами (2001) выявили, что инстилляцией бета-блокаторов с консервантами (БХ 0,01 %) в течение 28 дней, вызывает эрозирование 9 % эпителия от общей поверхности роговицы [107]. В связи с этим многие исследователи изучали острое токсическое действие БХ на глазную поверхность, увеличив концентрацию в 1–50 раз [191]. Согласно правилу Габера, используемого в токсикологии, увеличение концентрации раствора бензалкония хлорида позволяет сократить время воздействия с сохранением дозы токсического вещества в тканях. В настоящем эксперименте наиболее часто применяемая концентрация БХ 0,01% была увеличена до 0,1%. Физиологический раствор (0,9 % NaCl) был выбран в качестве раствора сравнения, как интактный.

Во все сроки наблюдения в группе контроля глаза оставались спокойные без признаков раздражения, раствором флюоресцеина натрия не окрашивались. При анализе морфологической картины роговицы, полученной при конфокальной микроскопии, отклонений от нормы выявлено не было.

В опытной группе на фоне инстилляций 0,1% раствора бензалкония хлорида характер изменений глазной поверхности носили дозозависимый характер, что проявлялось в динамическом нарастании клинико-морфологических изменений в зависимости от сроков наблюдения.

Через 24 часа от начала эксперимента в опытной группе глаза оставались спокойные. Конъюнктива всех глаз сохраняла бледно-розовый оттенок, инъекции сосудов отмечено не было. Роговица сохраняла свою прозрачность, раствором флюоресцеина натрия не окрашивалась. При изучении морфологической картины роговицы методом конфокальной микроскопии отклонений от нормы выявлено не было: визуализировались жизнеспособные клетки поверхностных слоев эпителия, правильной формы с четкими границами, слаборефлективными ядрами. В передних и задних слоях стромы отмечались кератоциты правильной формы без патологической рефлективности на фоне прозрачного экстрацеллюлярного матрикса. Эндотелиальный слой роговицы был представлен в виде клеток правильной формы, с четкими границами, без патологических включений и признаков отека.

Через 96 часов от начала эксперимента в опытной группе у всех животных отмечались признаки умеренного раздражения, которые проявлялись в виде слезотечения и блефароспазма. При биомикроскопии переднего отрезка глаз отмечалась умеренная конъюнктивальная инъекция, при окрашивании флюоресцеином натрия, прокрашивались единичные точечные очаги десквамированного эпителия во всех опытных глазах. Площадь прокрашивания составляла $3,81 \pm 1,22$ мм².

Через 120 часов от начала эксперимента в опытной группе признаки раздражения нарастали. При биомикроскопии переднего отрезка глаз отмечалась умеренная конъюнктивальная инъекция, шероховатость роговицы. При окраске раствором флюоресцеина в центральной зоне отмечались поверхностные очаги десквамации эпителия роговицы в виде мелкоточечных множественных очагов прокрашивания раствором флюоресцеина, суммарная площадь составляла $76,66 \pm 5,39$ мм². По данным конфокальной микроскопии отмечалось появление в поверхностных слоях эпителия клеток с неполной прозрачностью цитоплазмы, единичные десквамированные эпителиоциты с

гиперрефлекторными ядрами с некоторой размытостью межклеточных границ. В стромальных отделах и эндотелиальном слое роговицы морфологическая картина не имела существенного отличия от группы контроля.

На 7 сутки эксперимента (144 часа) сохранялись слезотечение и блефароспазм у всех опытных животных. Конъюнктивa всех глаз была отечна, гиперемирована. Отмечалось снижение прозрачности, за счет умеренного отека поверхностных слоев стромы, при окраске раствором флюоресцеина роговица диффузно прокрашивалась в виде мелкоточечной диффузной эпителиопатии, площадь повреждения составляла $134,40 \pm 1,22$ мм² (рисунок 10), что соответствовало всей площади роговицы (статистически значимой разницы с площадью интактной роговицы до начала эксперимента во всех опытных глазах и группе контроля не отмечалось ($p=0,507$)).

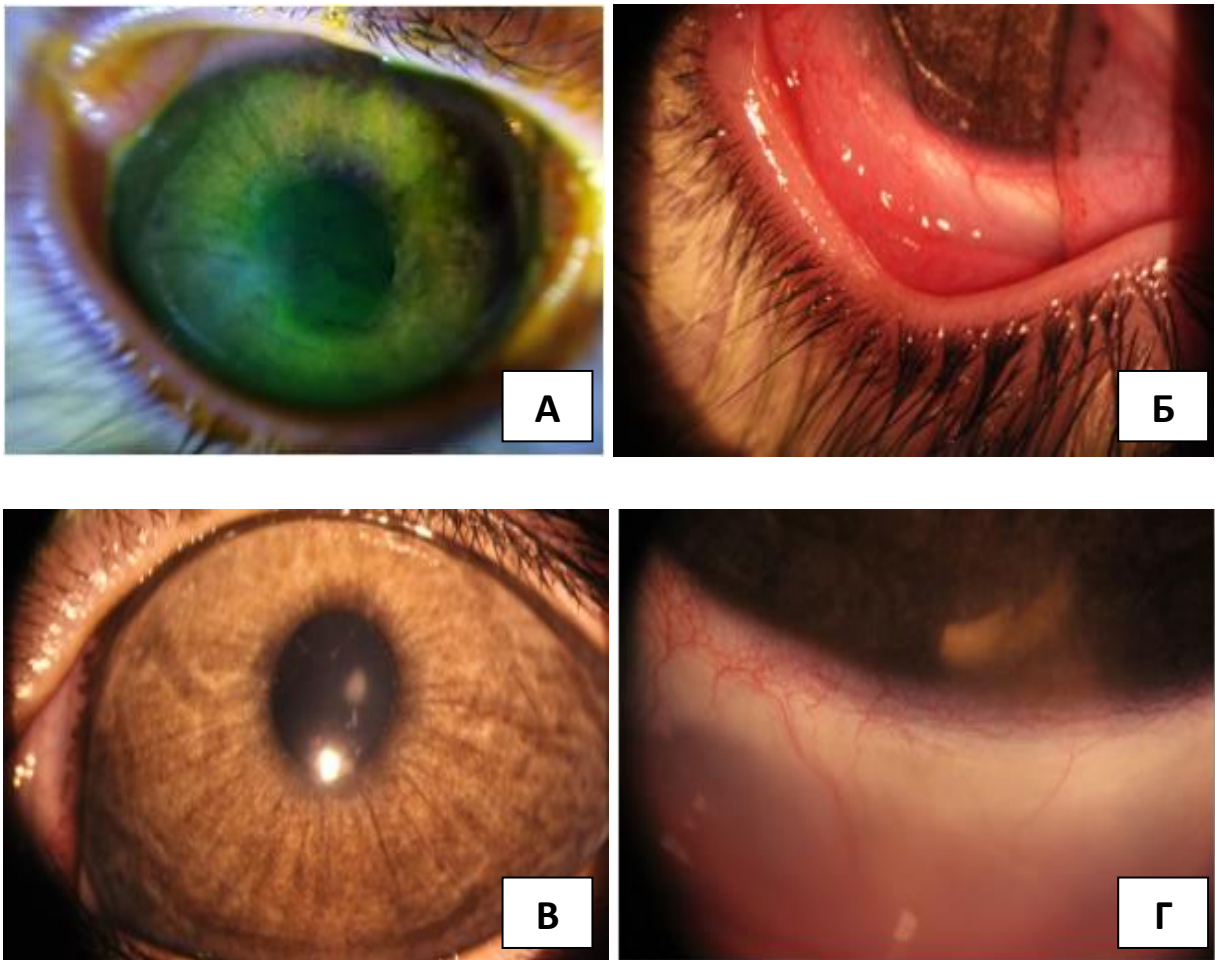


Рисунок 11 — Биомикроскопия переднего отрезка глаза (7 сутки эксперимента): а) опытная группа (БХ 0,1%): роговица отечная, снижение прозрачности роговицы за счет отека в верхних стромальных отделах, диффузное прокрашивание роговицы раствором флюоресцеина; б) опытная группа (БХ 0,1%): выраженная инъекция, отечность в нижнем конъюнктивальном своде; в) контрольная группа (0,9% NaCl): роговица прозрачная, блестящая, сферичная, раствором флюоресцеина натрия не прокрашивается; г) контрольная группа (0,9% NaCl): конъюнктивa спокойная, бледно-розовая

По данным конфокальной микроскопии роговицы было зафиксировано наличие во всех опытных глазах повышенной десквамации эпителия и псевдокератинизации. В поверхностном слое эпителия роговицы отмечалась размытость межклеточных границ с повышенной рефлексивностью ядер и

цитоплазмы клеток, наблюдались единичные эпителиальные дефекты. В передних слоях стромы роговицы наблюдались явления клеточного стромального отека, что проявлялось в виде повышения рефлексивности ядер и цитоплазмы кератоцитов и визуализации их отростков. Также отмечалось снижение прозрачности экстрацеллюлярного матрикса и увеличение количества активных кератоцитов. Морфологическая картина глубоких стромальных и эндотелиального слоев роговицы не имела существенного отличия от группы контроля (рисунок 12).

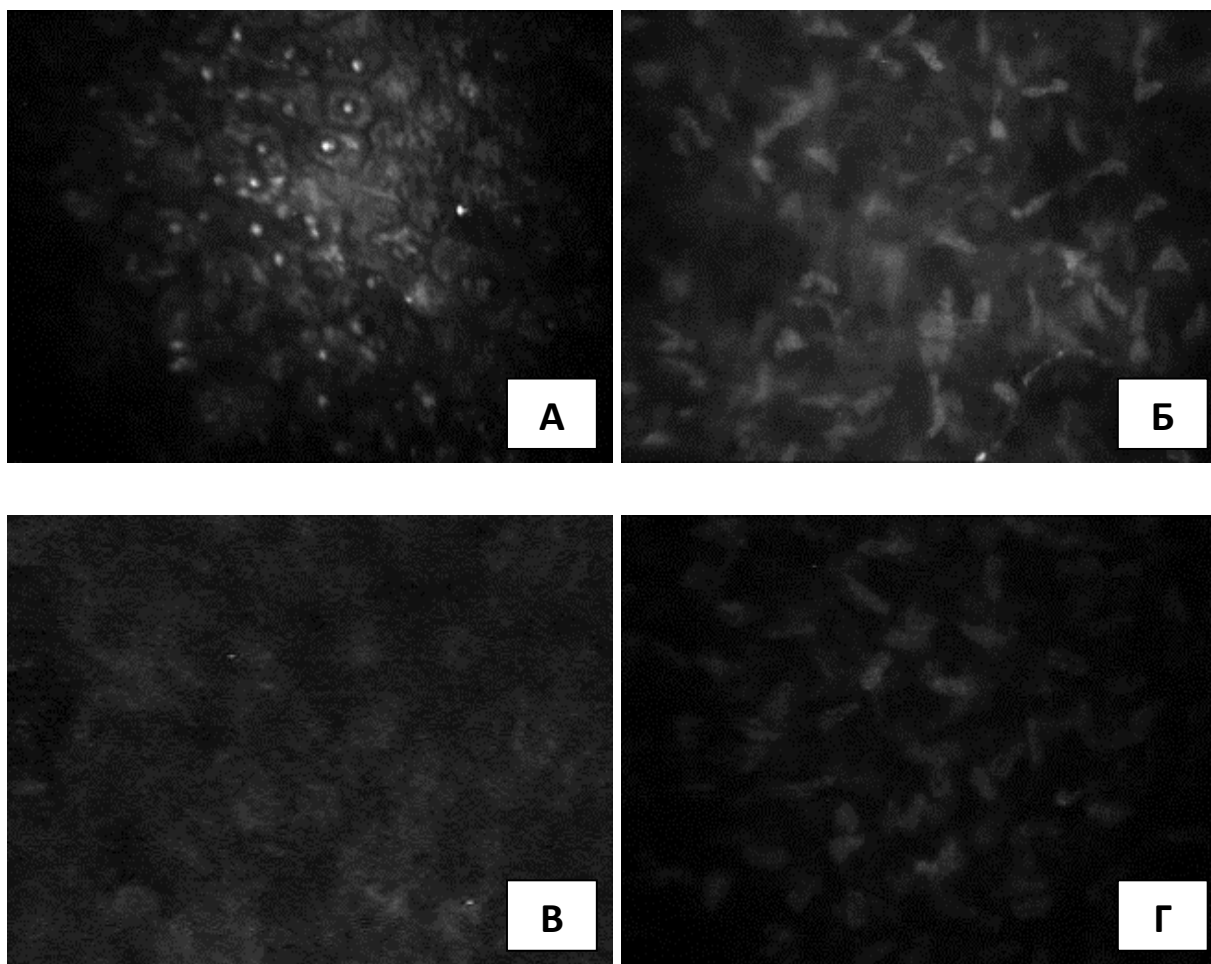


Рисунок 12 — Конфокальная микроскопия роговицы (7 сутки эксперимента): а) опытная группа (БХ 0,1%): в поверхностном слое эпителия роговицы размытость межклеточных границ с повышенной рефлексивностью ядер и цитоплазмы клеток, единичные эпителиальные дефекты; б) опытная группа (БХ 0,1%): в передних слоях стромы роговицы повышение рефлексивности ядер и цитоплазмы кератоцитов, визуализируются отростки кератоцитов, снижение прозрачности экстрацеллюлярного матрикса, увеличение количества активных кератоцитов; в) контрольная группа (0,9% NaCl): клетки эпителия роговицы правильной формы, с четкими границами; г) контрольная группа (0,9% NaCl): цитоархитектоника поверхностных слоев стромы не изменена, экстрацеллюлярный матрикс прозрачный.

Отмена раствора БХ после 7-дневных инстилляций приводило к полному восстановлению морфологической структуры роговицы и купированию видимых признаков воспаления через 144 часа.

Продолжение инстилляций раствора БХ более 7 суток вызывало нарастание клинической симптоматики повреждения глазной поверхности. На 14-е сутки наблюдения во всех опытных глазах отмечался выраженный хемоз конъюнктивы, диффузный отек всех слоев роговицы, концентрично лимбу отмечается рост поверхностных сосудов по направлению к оптической зоне на 2мм. Поскольку изменения глазной поверхности приобретали характер необратимых, эксперимент в данной группе был прекращен.

Таким образом, результаты настоящего исследования подтверждают цитотоксическое действие раствора БХ на клетки глазной поверхности, что проявляется в развитии токсической эпителиальной эрозии на 7 сутки эксперимента. Полученные изменения характеризуется легкой воспроизводимостью, малой травматичностью, неинвазивностью, дозируемостью, а также являются устойчивыми во временных параметрах.

4.2.2 Изучение влияния смеси сульфатированных гликозаминогликанов на экспериментальной модели токсической эрозии роговицы кролика в эксперименте *in vivo*

При моделировании токсической эрозии роговицы проводили двукратные инстилляции 0,1% раствора БХ в течение 7 дней по отработанной ранее методике. При клинико-морфологическом исследовании во всех опытных группах на 7 сутки эксперимента были зарегистрированы следующие изменения: у всех животных отмечалось слезотечение и блефароспазм. Конъюнктивa всех глаз была отечная, гиперемирована. Отмечалось снижение

прозрачности роговицы, за счет умеренного отека поверхностных слоев стромы, при окраске 0,5% раствором флюоресцеина натрия, роговица диффузно прокрашивалась в виде мелкоточечных эпителиальных дефектов.

По данным конфокальной микроскопии роговицы было зафиксировано наличие во всех опытных глазах повышенной десквамации эпителия и псевдокератинизации. В поверхностном слое эпителия роговицы отмечалась размытость межклеточных границ с повышенной рефлексивностью ядер и цитоплазмы клеток, наблюдались единичные эпителиальные дефекты. В передних слоях стромы роговицы наблюдались явления клеточного стромального отека, что проявлялось в виде повышения рефлексивности ядер и цитоплазмы кератоцитов и визуализации их отростков. Также отмечалось снижение прозрачности экстрацеллюлярного матрикса и увеличение количества активных кератоцитов. При анализе морфологической картины глубоких стромальных и эндотелиального слоев роговицы изменений выявлено не было.

После получения клинико-морфологических изменений роговицы всем опытным животными проводились инстилляции, согласно представленному ранее дизайну исследования.

Через 24 часа от начала эксперимента во всех экспериментальных группах отмечались признаки раздражения, сохранялось слезотечение, светобоязнь. Конъюнктива оставалась гиперемированной. Наименьшая по площади зона дезэпителизированной роговицы наблюдалась в 1-ой и 2-ой опытной группах и составляла Me 46,50 (43,75;48,39) мм² и Me 15,00 (14,15;15,93) мм², соответственно. Различия между показателями опытной группы №1 и опытной группой №2 были статистически значимы ($p < 0.05$). Через 36 часов наблюдения в 1-ой опытной группе зона дезэпителизированной роговицы составляла Me 34,07 (33,04;36,53) мм², через 48 часов наблюдения площадь эпителиального дефекта составляла Me 26,08 (25,02;27,44) мм. Во все

сроки наблюдения показатели площади дезэпителизации роговицы были достоверно ниже в сравнении с группой контроля ($p < 0,05$). Полная эпителизация с восстановлением прозрачности роговицы наступила через 120 часов (рисунок 13).

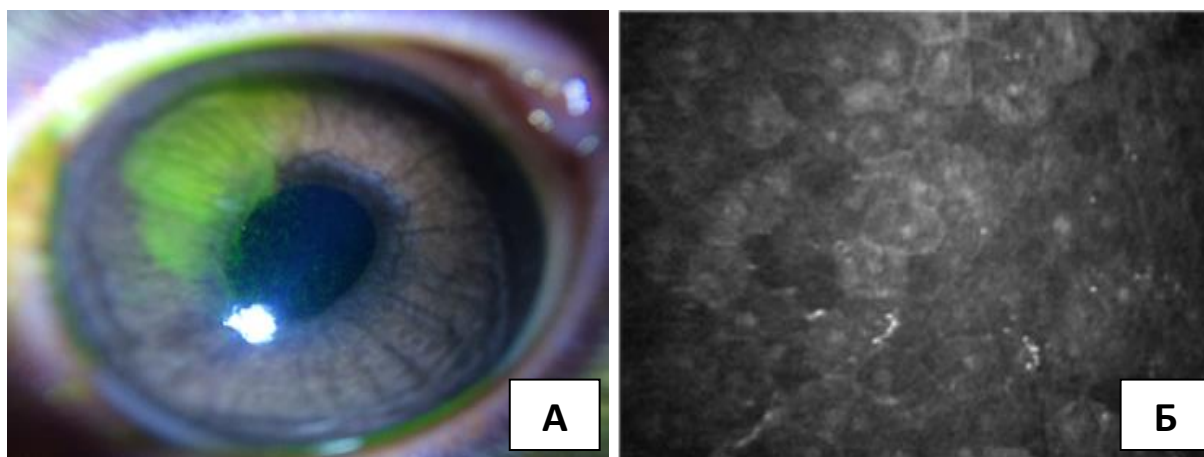


Рисунок 13 — Биомикроскопия роговицы кролика (а) и данные конфокальной микроскопии (б) через 24 часа от начала эксперимента в 1-й опытной группе (0,1% БХ+ 0,5% сГАГ)

Наибольшее внимание привлекли сроки реэпителизации и восстановления прозрачности роговицы во второй опытной группе. Через 24 часа от начала эксперимента в опытной группе №2 зона десквамации эпителия была наименьшей, и составляла $Me\ 15,00\ (14,15; 15,93)\ \text{мм}^2$, достоверно ниже в сравнении с группой контроля ($p < 0,05$). Полная эпителизация отмечалась во всех опытных глазах через 48 часов от начала эксперимента. На конфокальной микроскопии через 48 часов наблюдения во 2-й опытной группе было выявлено восстановление морфологической структуры переднего эпителия роговицы, визуализировались клетки правильной формы, с четкими границами без патологической рефлексивности ядер и цитоплазмы. При изучении поверхностных слоев стромы отмечалось восстановление

прозрачности экстрацеллюлярного матрикса, снижение количества активированных кератоцитов, сохранялась визуализация отростков единичных кератоцитов. В задних стромальных отделах и эндотелиальном слое роговицы изменений выявлено не было. При наступлении полной эпителизации роговицы и восстановления её морфологической структуры эксперимент был прекращен (рисунок 14).

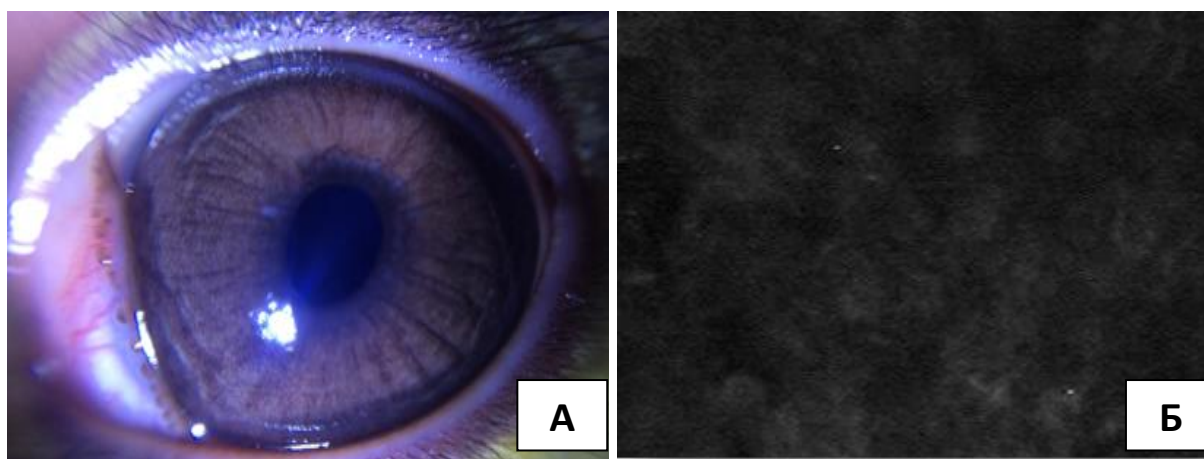


Рисунок 14 — Биомикроскопия роговицы кролика (а) и данные Конфокальной микроскопии (б) через 24 часа от начала эксперимента во 2-й Опытной группе (0,5% сГАГ)

В контрольной группе на фоне инстилляций 0,9% физиологического раствора NaCl во все сроки наблюдения площадь деэпителизации роговицы была достоверно больше, чем во всех опытных группах ($p < 0,05$). Через 24 часов от начала эксперимента сохранились признаки умеренного раздражения, которые проявлялись в виде смешанной инъекции конъюнктивы, отека поверхностных слоев стромы роговицы, зона деэпителизации сократилась до 95,59 (94,60;97,22) мм². На конфокальной микроскопии сохранялись признаки повышенной десквамации эпителия роговицы, отмечалось количественное снижение эпителиальных клеток,

остальные эпителиоциты были с гиперрефлективной цитоплазмой и ядром. В передних отделах стромы сохранялась низкая прозрачность экстрацеллюлярного матрикса с повышенным скоплением активированных кератоцитов, что свидетельствовало о сохранении стромального отека роговицы (рисунок 15).

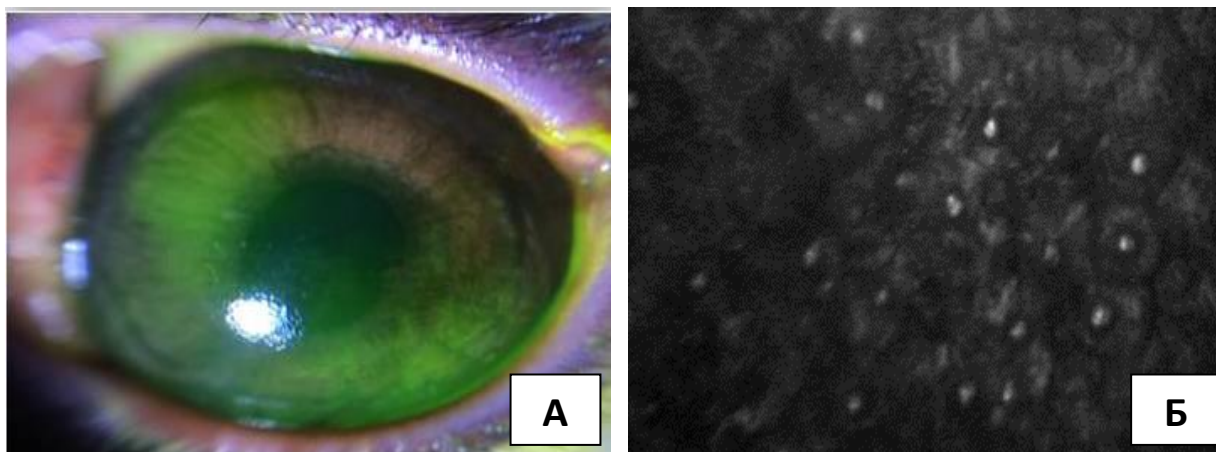


Рисунок 15 — Биомикроскопия роговицы кролика (а) и данные конфокальной микроскопии (б) через 24 часа от начала эксперимента в контрольной группе (0,9% NaCl).

Реэпителизация роговицы проходила концентрично лимбу, через 48 часов наблюдения зона десквамации сократилась до $Me\ 78,76\ (76,21;80,60)$ мм². Полное восстановление прозрачности роговицы с закрытием эпителиальных дефектов наступило через 132 часа. Результаты динамического наблюдения за реэпителизацией роговицы в исследуемых группах представлены в таблице 10.

Таблица 10 — Динамика реэпителизации роговицы по площади эпителиального дефекта, Ме (Q1;Q3)

Сроки наблюдения (час)/ Экспериментальная группа	Площадь эпителиального дефекта (мм ²)		Полная эпителизация с восстановлением прозрачности
	24ч	48ч	
Опытная группа №1 (0,1%БХ+0,5%сГАГ)	46,50 (43,75;48,39) ^{1,3}	26,08 (25,02;27,44) ¹	120ч
Опытная группа №2 (0,5% сГАГ)	15,00 (14,15; 15,93) ^{1,2}	0	48ч
Контрольная группа (0,9% NaCl)	95,59 (94,60; 97,22) ^{2,3}	78,76 (76,21;80,60) ²	132ч

¹ -отличие от контрольной группы достоверно $P < 0,05$, ²- отличие от опытной группы №1, ³- отличие от опытной группы №2

Таким образом, сроки полного восстановления клиничко-функциональных параметров роговицы в опытных и контрольной группах, указывают на наличие выраженных регенераторных свойств 0,5% раствора сГАГ на клетки эпителия роговицы. Сроки восстановления прозрачности роговицы и полной ее эпителизации в опытной группе №1 в сравнении с контрольной группой позволяют сделать закономерный вывод о наличии протекторного действия сГАГ на клетки эпителия роговицы при токсическом воздействии раствора бензалкония хлорида в условиях эксперимента *in vivo*.

По результатам 4 главы была последовательно проанализирована эффективность влияния инстилляций раствора смеси сГАГ на роговицу лабораторных животных, проведено комплексное клинико-функциональное исследование по определению токсичности смеси и влиянию смеси сГАГ на репаративные свойства роговицы кролика. На основании полученных данных была определена наиболее эффективная концентрация смеси сГАГ с наиболее выраженными регенераторными свойствами, которая последовательно была применена в следующей серии экспериментального исследования. На разработанной модели токсической эрозии роговицы по данным клинико-функционального исследования установлено, что помимо выраженного репаративного действия, возможен механизм протекторного действия сГАГ в условиях воздействия токсических веществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стремительное развитие современной медицины, в том числе офтальмологии, привело к внедрению в клиническую практику широкого спектра лекарственных препаратов с высокой биологической активностью.

При назначении лекарственной терапии немаловажен аспект безопасности, токсичности и переносимости фармацевтических препаратов, что наряду с многочисленными дополнительными факторами формирует уровень приверженности пациентов к лечению, а также может влиять на клинико-функциональный результат терапии [131,157,163].

Многочисленные исследования демонстрируют цитотоксическое действие лекарственных средств, применяемых в офтальмологии, на структуры глазной поверхности. Токсическое влияние могут оказывать действующее вещество местных анестетиков [168], антибактериальных [66,79], противовоспалительных [63,117,162], противогрибковых [137], противоглаукомных препаратов [55]. Однако, наибольший токсический эффект ассоциирован с прямым или опосредованным цитотоксическим действием консервантов, входящих в состав глазных капель [112].

В настоящее время самым распространенным консервантом является бензалкония хлорид. Многочисленные клинические и экспериментальные исследования подтверждают наличие токсического действия бензалкония хлорида на роговицу и другие структуры глазного яблока [31,98,99,201,219].

Для снижения риска реализации побочных эффектов со стороны глазной поверхности, закономерными являются рекомендации по подбору бесконсервантных аналогов препаратов в схеме лечения у пациентов с хроническими заболеваниями глаз или с сопутствующей патологией роговицы.

В настоящее время активно ведутся поиски решения данной проблемы за счет создания бесконсервантных аналогов препаратов или создания новых менее токсичных консервантов, однако на современном фармацевтическом рынке диапазон препаратов, представленных в виде бесконсервантных форм, охватывает лишь единичные классы лекарственных средств. К тому же замена препарата на бесконсервантные аналоги повышает экономическую стоимость проводимого лечения.

Существует ряд нозологий офтальмологического профиля, когда отмена медикаментозного лечения или использование бесконсервантных аналогов не всегда представляется возможным, что определяет актуальность разработки новых подходов к лечению пациентов с патологией роговицы или пациентов, вынужденных находиться на длительной местной терапии офтальмологическими препаратами.

Выбор смеси сульфатированных гликозаминогликанов, как материала для исследования, основывался на анализе литературных данных, где выдвигается множество гипотез о полифункциональном влиянии сГАГ на различные ткани и клеточные структуры, в том числе о способности сГАГ влиять на пролиферацию клеток [45]. Диапазон исследуемых концентраций сГАГ в настоящем эксперименте основывался на исследовании данной смеси на культуре клеток фибробластов мыши линии L929[46]. Группой авторов был выявлен бимодальный эффект экзогенно введенных сГАГ на пролиферацию клеток в зависимости от концентрации смеси: низкие концентрации сГАГ (0,1-0,5%) стимулировали пролиферацию фибробластов, а высокие концентрации сГАГ (1-5%) оказывали антипролиферативный эффект.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния смеси сульфатированных гликозаминогликанов на клетки эпителия роговицы в эксперименте *in vitro* и на различных моделях эрозии роговицы *in vivo*

В работе последовательно выполнены серии экспериментальных и морфологических исследований в соответствии с порядком поставленных задач. Первым этапом выполнялась серия экспериментальных исследований на культуре клеток *in vitro*, вторым этапом была выполнена последовательная серия экспериментальных исследований на лабораторных животных *in vivo*.

Материалом для серий экспериментальных исследований *in vitro* послужили клетки переднего эпителия роговицы человека, выделенные из кадаверных глаз. Биоптат из лимба роговицы механически измельчали (1x1мм) и вносили в культуральные флаконы, дно которых было покрыто коллагеном 1 типа, и заливали ростовой средой. Клетки культивировались с использованием питательной среды DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки HyClone III, L-глутамин (4мМ) и антибиотиков пенициллин/стрептомицин (50 мкг/мл). Пассирование осуществляли с использованием раствора трипсина по достижению конфлюэнтности 92%.

В первой серии эксперимента *in vitro* было выполнено определение жизнеспособности клеток исследуемой культуры и их идентификация со специфическим окрашиванием клеток моноклональными антителами на цитокератин 18. Для морфологического контроля исследуемой культуры проводили световую микроскопию с фазовым контрастом. В качестве отрицательного контроля были использованы мезенхимальные стволовые клетки (МСК) жировой ткани. При изучении клеточной культуры клеток эпителия роговицы визуализировались клетки эпителиального фенотипа, которые формировали монослой и плотно прилегали друг к другу, в отличие от контрольной группы, где визуализировались гомогенные культуры клеток, характеризующиеся веретеновидной фибробластоподобной морфологией с четко различимым ядром, ядрышком и цитоплазматической перинуклеарной зернистостью. При флуоресцентно-микроскопическом исследовании с использованием флуоресцентного красителя DAPI в обеих клеточных

культурах визуализировалось равномерное распределение и интенсивность флуоресценции клеточных ядер, что подтвердило жизнеспособность клеток в обеих клеточных культурах. В клеточной культуре клеток переднего эпителия роговицы отмечалась позитивная реакция на специфическое окрашивание Цитокератин 18. В работе продемонстрирована противоположная отрицательная реакция на специфическое окрашивание в культуре мезенхимальных стволовых клеток. На данном этапе исследования была подтверждена жизнеспособность клеток в исследуемой культуре, а морфологическое исследование клеток и специфическое окрашивание на цитокератин 18 подтвердило сохранность эпителиального фенотипа. Данную серию исследования было необходимо провести перед последующими этапами, так как известно, что используемая в эксперименте культуральная среда может вызывать процесс эпителиально-мезенхимальной трансформации клеток [17,101].

Во второй серии эксперимента *in vitro* проводилось изучение пролиферативной активности клеток эпителия роговицы человека под влиянием различных концентраций сГАГ. Для этого исследуемая клеточная культура эпителия роговицы человека 5-го пассажа была посеяна в лунки плоскодонного 24-луночного планшета в плотности $4,0 \cdot 10^4$ кл/лунка. Также, клеточная культура была посеяна в специальные планшеты для клеточного анализатора RTCA xCELLigence System в плотности $1,5 \cdot 10^4$ кл/лунка. Через 48 часов проводилась смена среды с добавлением исследуемых растворов. В опытной группе №1 в культуральную среду добавляли смесь сГАГ в концентрации 0,1%. В опытной группе №2 в культуральную среду добавляли смесь сГАГ в концентрации 0,5%. В опытной группе №3 в культуральную среду добавляли смесь сГАГ в концентрации 1%. В группе контроля №1 замена среды проводилась без добавления растворов, посев клеток проводился аналогично посевам с опытными образцами. По истечении 48 часов от начала эксперимента показатели клеточного индекса во всех исследуемых культурах

не имели статистического различия между собой, после чего проводилась замена среды с добавлением исследуемых растворов, согласно представленному дизайну исследования. Через 2 часа после введения исследуемых растворов (50 часов от начала эксперимента) были выявлены различия между показателями клеточного индекса как в опытных группах, при добавлении смеси сГАГ, так и в группе контроля. В опытной группе №1, №2, №3 отмечалось достоверное, статистически значимое увеличение показателей КИ по сравнению с группой контроля ($p=0,000003$, $p=0,000000$, $p=0,000000$, соответственно). Наибольшее внимание привлекли опытная группа №2 (сГАГ 0,5%), где показатель клеточного индекса был наибольшим - Ме 2,6454 (2,5813;2,7769), прирост показателей составил 45,40%, и опытная группа №3 (сГАГ 1%), где показатель клеточного индекса составлял Ме 2,5504 (2,5283;2,5782), прирост показателей составил 39,17%, различия между показателями КИ в опытной группе №2 и опытной группе №3 были статистически значимыми ($p=0.001625$). В опытной группе №1 (сГАГ 0,1%) и контрольной группе №1 показатели клеточного индекса и его прироста были наименьшими и составляли Ме 2,3961 (2,3530;2,4065), прирост показателей - 30,45% и Ме 2,1688 (2,1567;2,1817), прирост показателей - 17,67%, соответственно. Через 3 часа от начала эксперимента (51 час наблюдения) в опытных группах №1, №2 и №3 показатели клеточного индекса последовательно повышались и оставались достоверно высокими в сравнении с контрольной группой ($p=0,000023$; $p=0,000001$; $p=0.000000$, соответственно). Наибольшие показатели клеточного индекса были отмечены в опытной группе с 1% сГАГ и составляли Ме 2,8578 (2,8419;2,8738), прирост показателей составил -55,59%. В опытной группе с 0,5% сГАГ показатели клеточного индекса составляли Ме 2,6521 (2,5866;2,7921), прирост показателей 45,95%. Наименьшие показатели КИ были зарегистрированы в опытной группе №1 с 0,1% сГАГ и группе контроля №1, где данные показатели составляли Ме 2,5186 (2,4975;2,5922), прирост показателей -38,37%, и Ме 2,3801 (2,3672;2,4084), прирост показателей -29,63%, соответственно.

Во всех опытных группах через 51 час от начала эксперимента наблюдалось достижение пика пролиферативной активности и сохранность ее в течение последующих 1,5 часов наблюдения, вследствие чего эксперимент был прекращен. При интерпретации полученных данных в опытных группах №1, №2, №3 и контрольной группе №1 оценивалось пролиферативное действие смеси сГАГ на культуру клеток эпителия роговицы человека.

Ранее влияние сГАГ на пролиферацию и дифференцировку клеток было изучено на культуре клеток миелоидной лейкемии человека U-937 [206]. N. Volpi с соавторами (1994) определили, что хондроитинсульфат и дерматансульфат (от 0.01 до 100 мкг/мл) стимулируют пролиферацию клеток. Также биологическая активность сГАГ изучалась *in vitro* на клетках соединительной ткани роговицы человека и фибробластах кожи телят. Полученные при этом результаты показали, что сГАГ усиливают биосинтез РНК (синтез белка), стимулируют секрецию клетками коллагена и протеогликанов. Комплекс коллаген-сГАГ способствует адгезии клеток фибробластического ряда и увеличивает пролиферацию фибробластов более чем в 4 раза [19]. Ранее также выдвигалась гипотеза о репаративном действии сГАГ на роговицу человека за счет усиления миграции эпителиальных клеток с неповрежденных участков и увеличения митотической активности базальных клеток [6]. В настоящем исследовании было доказано стимулирующее влияние оригинальной смеси сГАГ на пролиферацию эпителия роговицы человека. Введение смеси сГАГ в культуральную среду вызывало достоверное увеличение пролиферативной активности эпителиальных клеток во всех опытных группах по сравнению с группой контроля. Проллиферативное действие сГАГ на клетки эпителия роговицы в эксперименте *in vitro* в настоящем эксперименте было изучено впервые. Статистический анализ полученных данных указывает на более выраженное пролиферативное действие сГАГ в концентрации 0,5% и 1% из диапазона исследуемых.

В следующей серии эксперимента *in vitro* проводилось изучение протекторного действия смеси сГАГ на культуру клеток эпителия роговицы человека в условиях токсического воздействия. Для этого исследуемая клеточная культура эпителия роговицы человека 5-го пассажа была засеяна в лунки плоскодонного 24-луночного планшета в плотности $4,0 \cdot 10^4$ кл/лунка. Также, клеточная культура была засеяна в специальные планшеты для клеточного анализатора RTCA xCELLigence System в плотности $1,5 \cdot 10^4$ кл/лунка. По истечении 48 часов от начала эксперимента показатели КИ во всех исследуемых культурах не имели статистического различия между собой, после чего в культуральную среду вводились исследуемые растворы, согласно представленному дизайну исследования. В опытной группе №4 в культуральную среду добавляли смесь сГАГ с концентрацией действующего вещества 0,1% и 0,01% раствор БХ. В опытной группе №5 в культуральную среду добавляли смесь сГАГ в концентрации 0,5% и 0,01% раствор БХ. В опытной группе №6 в культуральную среду добавляли смесь сГАГ в концентрации 1% и 0,01% раствор БХ. В качестве контроля №2 использовалась культура клеток, в среду которой добавляли 0,01% раствор БХ без добавления раствора сГАГ.

Через 1 час после введения исследуемых растворов (49 часов от начала эксперимента), в состав которых входил БХ, во всех опытных группах и группе контроля отмечалось резкое снижение показателей клеточного индекса. Однако, показатели клеточного индекса в опытной группе №4, опытной группе №5 и опытной группе №6 были достоверно выше, чем в группе контроля ($p=0,000222$, $p=0,000148$ и $p=0,000148$, соответственно). Наибольшие показатели были в опытных группах с концентрациями 1% сГАГ (опытная группа №6) – Me 1,3534(1,3070;1,3720) (снижение показателей по сравнению с исходными данными на 26,62%) и 0,5% сГАГ (опытная группа №5) – Me 0,9134 (0,8992;0,9250) (снижение показателей по сравнению с исходными данными - 50,24%). В опытной группе №4 (сГАГ 0,1%) и

контрольной группе №2 показатели КИ были наименьшими, а снижение показателей по сравнению с исходными данными – наибольшими: Me 0,8812 (0,8729;0,8814), (снижение показателей- 52,70%) и Me 0,7083 (0,6804;0,7388), (снижение показателей- 60,60%), соответственно. Однако, показатели в опытной группе №4 и в опытной группе №5 не имели статистически значимых различий ($p=0.49954$).

Через 2 часа после введения исследуемых образцов (50 часов от начала эксперимента) во всех экспериментальных группах отмечалось постепенное снижение показателей клеточного импеданса клеток, что указывало на снижение количества жизнеспособных клеток в культуре. Показатели КИ в опытной группе №6 оставались достоверно выше в сравнении с группой контроля ($p=0,000148$). Показатели КИ в опытной группе были наибольшими (1% сГАГ) и составляли Me 0,2830 (0,27810;0,2944) (снижение показателей по сравнению с исходными данными 84,83%). В опытной группе №5 (0,5% сГАГ) показатели клеточного индекса составляли Me 0,1587 (0,1477;0,1669) (снижение показателей по сравнению с исходными данными 91,59%). Наименьшие показатели КИ отмечались в опытной группе №4(0,1% сГАГ) и группе контроля №2, где данные показатели составляли Me 0,0749 (0,0699;0,0866) (снижение показателей- 95,92%) и Me 0,0749 (0,0700;0,0814) (снижение показателей- 95,93 %) соответственно.

Через 3,5 часа с момента введения исследуемых растворов в опытных и контрольной группах при морфологическом изучении методом световой микроскопии с фазовым контрастом жизнеспособные клетки не визуализировались, вследствие чего эксперимент был прекращен.

Данные, полученные при анализе результатов во второй серии эксперимента *in vitro*, подтверждают выраженное токсическое действие раствора БХ, что проявлялось в резком снижении показателей клеточного индекса. Однако, введение в среду различных концентраций сГАГ

способствовало снижению клеточной гибели в опытных образцах, что указывает на наличие протекторного действия сГАГ на клетки эпителия роговицы в условиях токсического воздействия бензалкония хлорида.

Ранее в литературе были представлены данные о протекторном действии несультатированных гликозаминогликанов (гиалуроновой кислоты) на эпителиальные клеточные линии [59,169]. Протекторное действие сультатированных гликозаминогликанов на клетки эпителия роговицы человека в настоящем исследовании было изучено впервые. Полианионная химическая структура сГАГ позволяет им связывать токсические вещества в межклеточном матриксе, блокируя поступление их в клетку [27,38]. Также экзогенно введенные сГАГ могут создавать высокую концентрацию углеводов на клеточной поверхности клеток, что служит сетевым барьером для токсичных веществ, тем самым выполняя защитную функцию [33,205]. В литературе также представлены данные о противовоспалительном действии сГАГ, которое связано со способностью подавлять действие клеточных ферментов за счет изменения их конформации аллостерическим, мостиковым или подложковым способом [9,68], а также способности связывать положительно заряженные фрагменты поврежденных клеточных мембран, адсорбировать на себе продукты распада, тем самым блокируя хемотаксис [37,43,78].

Кроме вышеупомянутых гипотез, реализацию протекторного действия сГАГ можно предположить за счет их антиоксидантного действия, которое реализуется за счет стабилизации активности восстанавливающих НАДФ дегидрогеназ [20] за счет наличия в их составе карбоксильных и сульфатных групп, сГАГ могут образовывать хелатные комплексы с ионами переходных металлов, таких как Cu^{2+} или Fe^{2+} , которые являются внеклеточными источниками активных форм кислорода путем инициации реакций Фентона и Габера-Вейса [57]. По полученным результатам в настоящем исследовании, закономерно сделать вывод, что введение сультатированных

гликозаминогликанов в культуральную среду может оказать протекторное действие на клетки эпителия роговицы человека в условиях токсического действия. Статистический анализ полученных данных указывает на более выраженное протекторное действия сГАГ в концентрации 1% из диапазона исследуемых.

Учитывая тот факт, что в условиях изолированной культуры невозможно воспроизвести весь комплекс адаптационных и защитных механизмов эпителия, последующие серии экспериментальных исследований были выполнены на лабораторных животных.

В первой серии исследования *in vivo* проводилось изучение местной токсичности смеси сГАГ и определение эффективности применения различных концентраций сГАГ на репаративные свойства роговицы на модели механической эрозии роговицы в эксперименте *in vivo*. Изучение местной токсичности смеси сГАГ проводили в хроническом опыте на 12 кроликах породы Шиншилла (24 глаз). У каждого кролика правый глаз был опытный, а левый глаз служил контролем. Все кролики были разделены и промаркированы на 3 опытные группы (12 глаз) и 1 группу контроля (12 глаз), согласно характеру проводимых инстилляций. В первой опытной группе (4 глаза) проводили инстилляцию 0,1% раствора смеси сГАГ 6 раз в день. Во второй опытной группе (4 глаза) проводили инстилляцию 0,5% раствора смеси сГАГ 6 раз в день. В третьей опытной группе (4 глаза) проводили инстилляцию 1% раствора смеси сГАГ в 6 раз в день. В контрольной группе (12 глаз) проводили инстилляцию 0,9% раствора хлорида натрия. Срок наблюдения за животными составил 2 недели. При определении местной токсичности смеси сГАГ было установлено, что инстилляцией разработанной композиции в интенсивном режиме в условиях хронического опыта (2 недели) не оказывают токсического воздействия на структуры глазной поверхности, не оказывают влияние на ширину зрачка и уровень ВГД у опытных животных. Ранее в литературе данных о изучении местной токсичности оригинальной смеси

сГАГ, влиянии ее на диаметр зрачка и уровень ВГД у лабораторных животных представлено не было. После изучения местной токсичности смеси, проводилось изучение регенераторных свойств смеси сГАГ на модели механической эрозии. Экспериментальное исследование проводили по следующей методике: всем лабораторным животным (60 животных, 120 глаз) под местной анестезией 0,3% раствора дикаина глазным шпателем проводилась скарификация переднего эпителия на всем протяжении роговицы. Затем все опытные животные были разделены на 3 опытные группы и группу контроля. В 1-ой опытной группе (20 глаз) выполняли инстилляциии 0,1% раствора сГАГ два раза в день (утром и вечером). Во 2-ой опытной группе (20 глаз) проводили инстилляциии 0,5% раствора сГАГ два раза в день (утром и вечером). В 3-й опытной группе (20 глаз) проводили инстилляциии 1% раствора сГАГ два раза в день (утром и вечером). Группой контроля послужили парные глаза (60 глаз), где проводили инстилляциии физиологического раствора два раза в день (утром и вечером). Клиническое наблюдение за животными проводилось ежедневно с интервалом 12 часов. Для оценки зоны повреждения эпителия роговицы проводилась биомикроскопия глаз животных (щелевая лампа «Opton»,ФРГ) с окрашиванием роговицы 0,5% раствором флюоресцеина натрия «Novartis pharma» (Швейцария) и последующей фоторегистрацией на 12 МП фронтальную камеру iPhone 6S с объективом для макросъемки. Подсчет площади эпителиального дефекта проводился в программе Adobe Photoshop СС. Полученные числовые значения в опытных и контрольных группах суммировались в виде таблицы и подвергались статистической обработке. В начале эксперимента во всех опытных группах зона десквамации занимала всю площадь поверхности роговицы и прокрашивалась 0,5% раствором флюоресцеина натрия, площадь десквамации эпителия в опытной группе №1, в опытной группе №2 и в опытной группе №3 не имела статистически значимых отличий от группы контроля ($p=0,55$, $p=0,79$ и $p=0,38$, соответственно). Через 12 часов от начала эксперимента во всех опытных

глазах было зарегистрировано появление каймы эпителизации концентрично лимбу. В опытной группе №1 и опытной группе №2 площадь десквамации была наименьшей, и составляла Me 91,70 (88,26;95,66) мм² и Me 93,15 (89,02;96,03) мм², соответственно, статистически значимой разницы между группами выявлено не было (p=0.60). В опытной группе №3 площадь роговицы, прокрашиваемой флюоресцеином натрия, составляла Me 95,36 (94,08;98,64) мм², а в группе контроля Me 98,02 (96,99;98,94) мм² (p=0.03).

Через 36 часов наибольшим по площади дефект эпителия сохранялся в опытной группе №3 и в контрольной группе и составлял Me 68,74 (67,01;70,22) мм² и Me 69,64 (68,01;70,17) мм², соответственно. Различия между показателями опытной группы №3 и контрольной группой статистически значимы не были (p=0,45). В опытной группе №1 и №2 зона эрозии сократилась по площади и составляла Me 59,06 (57,18;63,24) мм² и Me 61,12 (58,65;63,66) мм², соответственно, что достоверно отличалось от показателей площади зоны роговицы в опытной группе №3 и группой контроля (p<0,05), статистически значимой разницы между показателями опытной группы №1 и опытной группой №2 не отмечалось (p=0.303). Во всех группах эксперимента сохранялись явления раздражения глаз, в виде незначительного отека поверхностных слоев стромы роговицы и перикорнеальной инъекции сосудов. Через 60 часов от начала эксперимента в группе контроля, без использования сГАГ отмечались явления раздражения глаз, реэпителизация роговицы проходила концентрично лимбу, сохранялся дефект эпителия в центральной зоне роговицы в виде овала с неровными краями и по площади составлял Me 40.18 (39,15;41,02) мм². Дефект эпителия в контрольной группе был достоверно больше в сравнении со всеми опытными группами (p<0,05). Через 108 часов наблюдения площадь дефекта эпителия роговицы составляла Me 1,83 (1,59;2,01) мм², полное восстановление прозрачности и целостности эпителия во всех контрольных глазах было отмечено через 5 суток от начала эксперимента (120 часов).

После инстилляций раствора 1% сГАГ (3-я опытная группа) через 60 часов отмечалось сокращение площади зоны десквамации до 29,26 (29,99;30,14) мм², дефект эпителия сохранялся в центральной зоне роговицы в виде овала. Сохранялась умеренная перикорнеальная инъекция, отек поверхностных слоев стромы. Полная эпителизация с восстановлением прозрачности роговицы в 3-й опытной группе наступила через 96 часов от начала эксперимента.

В 1ой опытной группе на фоне инстилляций 0,1% раствора сГАГ реэпителизация роговицы проходила концентрично лимбу и через 60 часов от начала эксперимента составляла Me 17,34 (16,21;19,85) мм², полная эпителизация роговицы наблюдалась во всех опытных глазах через 84 часа от начала эксперимента. После инстилляций 0,5% раствора сГАГ (2-ая опытная группа) через 60 часов от начала эксперимента зона десквамации эпителия сохранялась в центральной зоне роговицы в виде овала с ровными краями и по площади была наименьшей – Me 12,45 (9,78;15.05) мм². Полная эпителизация с восстановлением прозрачности роговицы после инстилляций 0,5% раствора сГАГ (2-ая опытная группа) во всех опытных глазах была зарегистрирована через 84 часа от начала эксперимента. Полученные результаты экспериментального исследования подтверждают наличие пролиферативной активности растворов сГАГ в диапазоне исследуемых концентраций, а сроки полной эпителизации и восстановления прозрачности роговицы позволяют предположить, что использование раствора сГАГ в концентрации 0,5% является наиболее эффективным в эксперименте *in vivo* на модели механической эрозии роговицы кролика. Помимо прямого влияния сГАГ на пролиферативную активность клеток, выдвигаются гипотезы, что влияние сГАГ на стимуляцию регенеративных процессов в роговице осуществляется также за счет усиления миграции эпителиальных клеток с неповрежденных участков и увеличения митотической активности базальных клеток [6]. По результатам данной серии эксперимента, можно сделать вывод, что

инстилляцией сГАГ оказывает стимулирующее влияние на репаративные процессы в эпителии роговицы кролика, а статистический анализ полученных результатов позволяет предположить, что использование раствора в концентрации 0,5% является наиболее эффективным.

В следующей серии эксперимента *in vivo* проводилось изучение подобранной концентрации смеси сГАГ на модели токсической эрозии роговицы. Сначала проводилось изучение влияния 0,1% раствора БХ на клинично-функциональное состояние роговицы кролика, а также проводилась отработка режима и времени инстилляций для получения модели токсической эрозии. Экспериментальное исследование было выполнено на 40 кроликах (80 глаз) породы Шиншилла. Для экспериментального моделирования токсической эрозии роговицы проводили инстилляцию 0,1% раствора БХ 4 раза в день в течение 7 дней по отработанной ранее методике. После моделирования токсической эрозии роговицы все животные были разделены на 2 опытные и контрольную группы в зависимости от характера проводимых далее инстилляций, согласно разработанному дизайну исследования. В 1-ой опытной группе (20 глаз) продолжили инстилляцию 0,1% раствора БХ с добавлением инстилляций 0,5% раствора сГАГ. Во 2-ой опытной группе (20 глаз) инстиллировали 0,5 % раствор сГАГ, инстилляцию раствора БХ были прекращены. В контрольной группе (40 глаз) инстиллировали физиологический раствор 0,9% хлорида натрия. Инстилляцию исследуемых растворов проводили 2 раза в день с дальнейшей оценкой зоны повреждения эпителия роговицы с использованием биомикроскопии глаз животных окрашиванием 0,5% раствором флюоресцеина натрия с последующей фоторегистрацией. Для контроля морфологических изменений в ходе эксперимента проводили конфокальную микроскопию роговицы на приборе Confoscan 4 (Nidek, Япония). Подсчет площади эпителиального дефекта проводился в программе Adobe Photoshop CS. Полученные числовые значения в опытных и контрольных группах суммировались в виде таблицы и

подвергались статистической обработке. По данным конфокальной микроскопии проводилось протоколирование состояния цитоархитектоники роговицы во все сроки наблюдения.

Выбор концентраций БХ в этом эксперименте был основан на клинической практике и экспериментальных исследованиях, представленных в литературе. Наиболее часто применяемая концентрация БХ в офтальмологических препаратах 0,01 % (в диапазоне от 0,004 % до 0,02 %) [39,176]. Создание экспериментальной модели на животных с использованием 0,01 % концентрации имеет определенные трудности, в связи с длительным наблюдением за животными [144]. Так, Furrer с соавторами выявили, что инстилляцией бета-блокаторов с консервантами (БХ 0,01 %) в течение 28 дней, вызывает эрозирование 9 % эпителия от общей поверхности роговицы [109]. В связи с этим многие исследователи изучали острое токсическое действие БХ на глазную поверхность, увеличив концентрацию в 1–50 раз [21]. Согласно правилу Габера, используемого в токсикологии, увеличение концентрации раствора бензалкония хлорида позволяет сократить время воздействия с сохранением дозы токсического вещества в тканях [193].

Ранее в литературе были представлены экспериментальные модели повреждения роговицы, полученные путем инстилляций высоких концентраций 0,1% и 0,2% раствора БХ, которые носили название «модель синдрома сухого глаза» [215,228]. Ибрагимова Д.И. с соавторами изучали влияние 0,01 % и 0,2 % растворов бензалкония хлорида на состояние роговицы и слезопродукцию у кроликов. По данным исследователей во всех опытных группах наблюдались явления эпителиопатии роговицы различной степени выраженности (от единичных эпителиальных дефектов до тотальной эрозии роговицы) в зависимости от сроков наблюдения и концентрации раствора [21]. Однако, показатели пробы Ширмера I в опытных группах во все сроки наблюдения превышали показатели условно принятой нормы. При моделировании эрозии у всех кроликов, начиная с 3 суток наблюдения,

отмечались выраженные признаки раздражения в виде блефароспазма и слезотечения, в связи с чем, состояние слезопродукции не оценивалось. Полученные данные ставят под сомнение возможность моделирования дефицита слезопродукции путем инстилляций высоких концентраций раствора бензалкония хлорида, учитывая ярко выраженное раздражающее действие последнего. В настоящем исследовании впервые была получена токсическая эрозия роговицы путем ежедневных 4х кратных инстилляций 0,1 % раствора БХ, что, по нашему мнению, позволяет в короткие сроки получить устойчивые во временных параметрах изменения роговицы обратимого характера. На 7 сутки эксперимента во всех опытных глазах отмечались признаки токсической эрозии роговицы. Кроме того, использование конфокальной микроскопии, помимо стандартных методик оценки состояния роговицы, позволяет оценить состояние citoархитектоники роговицы во всех ее слоях без выведения животных из эксперимента, а также максимально приблизить оценку результатов к клинической практике, что является неоспоримым преимуществом [124,171].

Результаты настоящего исследования подтвердили цитотоксическое действие раствора БХ на клетки глазной поверхности, что проявляется в развитии токсической эпителиальной эрозии на 7 сутки эксперимента. Ярко выраженное раздражающее действие 0,1 % раствора БХ не позволяет оценить слезопродукцию у экспериментальных животных из-за выраженного слезотечения. Полученные изменения характеризуются легкой воспроизводимостью, малой травматичностью, неинвазивностью, дозируемостью, а также являются устойчивыми во временных параметрах.

После воспроизведения экспериментальной модели токсической эрозии, проводилось изучение регенераторных и протекторных свойств смеси сГАГ на полученной модели. Результаты настоящего исследования продемонстрировали, что раствор оригинальной смеси сГАГ в концентрации 0,5% стимулировали репаративную регенерацию в клетках эпителия роговицы

(опытная группа №1). Это согласуется с ранее представленными данными в литературе, где указано, что экзогенно введенные сГАГ в низких концентрациях оказывают пролиферативное действие на клетки фибробластов мышцы линии L929 [46] и полученными нами результатами в эксперименте *in vitro*. Изучение репаративной активности оригинальной смеси сГАГ в концентрации 0,5% на модели токсической эрозии роговицы кролика было изучено впервые. Не маловажный аспект в современных исследованиях уделяют противовоспалительному и антиоксидантному действию сГАГ [9,68,178,200]. В настоящем исследовании противовоспалительная активность и антиоксидантное действие сГАГ не изучалось, однако, сроки восстановления прозрачности экстрацеллюлярного матрикса и цитоархитектоники роговицы по данным конфокальной микроскопии, а также купирование видимых признаков воспаления в опытных группах позволяют косвенно предположить наличие данного механизма.

В литературе также встречаются данные о протекторном действии несультатированных гликозаминогликанов на клетки глазной поверхности кроликов в условиях токсического воздействия бензалкония хлорида [222]. Протекторное действие сульфатированных гликозаминогликанов на клетки эпителия роговицы кролика ранее не изучалось. Сроки эпителизации в опытной группе №1 (0,5% сГАГ+ 0,1% БХ) в сравнении с контрольной группой (0,9% NaCl) позволяют предположить наличие выраженного протекторного действия смеси сГАГ, так как эпителизация на фоне инстилляций сГАГ в условиях токсического воздействия БХ наступила в более короткие сроки, чем в группе контроля. Это согласуется с полученными данными в ходе серии экспериментов *in vitro*. Разработанная экспериментальная модель легко воспроизводима, неинвазивна, не требует длительного наблюдения за животными, а также не требует выведения животных из эксперимента. На разработанной модели токсической эрозии подтверждено токсическое действие раствора бензалкония хлорида, а сроки

восстановления цитоархитектоники и полной реэпителизации роговицы, позволяют сделать закономерный вывод о наличии выраженных регенераторных и протекторных свойств сульфатированных гликозаминогликанов в условиях токсического воздействия.

Стоит отметить, что в литературе имеются данные о противовоспалительном и антиоксидантном влиянии сГАГ на различные клеточные культуры, что является перспективным вектором исследовательской деятельности по изучению смеси для более обширного понимания патогенетических механизмов влияния сульфатированных гликозаминогликанов на структуры глазной поверхности.

В настоящей экспериментальной работе последовательно изучены особенности влияния смеси сГАГ на пролиферацию клеток эпителия роговицы в эксперименте *in vitro* и *in vivo*. Полученные результаты неоспоримо указывают на наличие стимулирующего влияния смеси сГАГ на пролиферацию клеток эпителия роговицы, а результаты, полученные в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, не противоречат между собой. Кроме того, большая часть работы посвящена определению наличия протекторных свойств сульфатированных гликозаминогликанов на клетки эпителия роговицы, что ранее изучено не было. В настоящем исследовании представлены убедительные результаты, которые позволяют сделать закономерный вывод о наличии протекторных свойств сГАГ на клетки эпителия роговицы, а полученные результаты в эксперименте *in vitro* и *in vivo* также не имеют противоречий. Полученные данные открывают перспективы для дальнейших доклинических и клинических испытаний смеси сГАГ.

ВЫВОДЫ

1. Клетки культуры эпителия роговицы, культивированные с использованием питательной среды DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки NuClone III, L-глутамина (4мМ) и антибиотиков пенициллин/стрептомицин (50 мкг/мл) жизнеспособны, имеют эпителиальный фенотип и положительную реакцию на СК 18, что изучено с использованием морфологического исследования методом световой микроскопии с фазовым контрастом, флуоресцентно-микроскопического исследования с использованием флуоресцентного красителя DAPI и со специфическим окрашиванием клеток моноклональными антителами на цитокератин 18 (СК18).

2. Введение смеси сГАГ в культуральную среду вызывает достоверное увеличение пролиферативной активности эпителиальных клеток во всех опытных группах по сравнению с группой контроля. Сравнительный анализ показателей клеточного индекса в разных опытных группах указывает на более выраженное пролиферативное действие сГАГ в концентрации 0,5% и 1% из диапазона исследуемых.

3. Введение сульфатированных гликозаминогликанов в культуральную среду может оказывать протекторное действие на клетки эпителия роговицы человека в условиях токсического действия, что выражается в снижении клеточной гибели. При сравнительном анализе полученных данных выявлено, что достаточное протекторное действие в условиях клеточной культуры оказывает исследуемый раствор сульфатированных гликозаминогликанов в концентрации 1%.

4. Смесь сГАГ в концентрации 0,1%, 0,5% и 1% не оказывает токсико-аллергического воздействия на роговицу, не оказывает влияния на ширину зрачка, уровень внутриглазного давления и не обладает цитотоксичностью. Инстилляцией сГАГ в диапазоне исследуемых концентраций ускоряют реэпителизацию роговицы, а сроки полной

эпителизации и восстановления прозрачности роговицы позволяют предположить, что использование раствора сГАГ в концентрации 0,5% является наиболее эффективным в эксперименте *in vivo*.

5. Разработанная экспериментальная модель токсической эрозии роговицы, заключающаяся в инстилляции 0,1% раствора БХ 4 раза в день в течение 7 дней в конъюнктивальную полость кролика, позволяет в короткие сроки получить устойчивые во временных параметрах изменения роговицы обратимого характера. Изучение регенераторных и протекторных свойств сГАГ на разработанной модели токсической эрозии роговицы показало, что раствор смеси сГАГ в концентрации 0,5% стимулирует репаративную регенерацию в клетках эпителия роговицы, а сроки эпителизации позволяют предположить наличие выраженного протекторного действия смеси сГАГ, так как эпителизация на фоне инстилляций сГАГ в условиях токсического воздействия БХ наступила в более короткие сроки, чем в группе контроля.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Использование питательной среды DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки NuClone III, L-глутамина (4 мМ) и антибиотиков пенициллин/стрептомицин (50 мкг/мл) при культивировании клеток возможно, но требует дополнительного этапа идентификации перед основным экспериментом, включающим изучение морфологического фенотипа клеток, определение их жизнеспособности и флуоресцентно-микроскопическое исследование со специфическим окрашиванием клеток моноклональными антителами на СК18, так как эпителиальные клеточные линии имеют слабую сохранность фенотипа и могут вовлекаться в процесс эпителиально-мезенхимальной трансформации.

2. Использование прибора RTCA xCelligence при изучении протекторных свойств и влияния различных растворов на пролиферацию клеток позволяет в режиме реального времени, без использования красителей и других дополнительных методов оценивать жизнеспособность клеточных культур, а также производить точный расчет показателей числовых значений клеточного индекса для дальнейшего статистического анализа, полученных результатов.

3. Разработанная экспериментальная модель токсической эрозии роговицы, заключающаяся в 4-кратных инстилляциях 0,1 % раствора бензалкония хлорида в течение 7 дней, легко воспроизводима, неинвазивна, не требует выведения животных из эксперимента и позволяет обосновать применение различных растворов для лечения и профилактики токсического повреждения роговицы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – Аденозинтрифосфорная кислота

БХ – Бензалкония хлорид

ВГД – Внутриглазное давление

ГАГ – Гликозаминогликаны

ГС – Гепарансульфат

ДНК - Дезоксирибонуклеиновая кислота

ДС – Дерматансульфат

ЗГП – Заболевания глазной поверхности

КИ – Клеточный индекс

ММП – Матриксные металлопротеиназы

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

НАДФ – Никотинамидадениндинуклеотидфосфат

НПВС – Нестероидные противовоспалительные средства

РНК – Рибонуклеиновая кислота

сГАГ – Сульфатированные гликозаминогликаны

СК 18 – Цитокератин 18

СОД – Супероксиддисмутаза

ТМФ – Тимидинмонофосфорная кислота

ФК – Фазовый контраст

ФНО – Фактор некроза опухоли

ФРК - Фоторефракционная кератэктомия

ХС – Хондроитинсульфат

ЭЦМ – Экстрацеллюлярный матрикс

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абсаликова, Д.К. Современные подходы к диагностике и лечению синдрома сухого глаза (обзор литературы) / Д.К. Абсаликова, В.Б. Мальханов.– Текст: непосредственный // Сборник научных публикаций конференции Восток-Запад.–2012.–Т.1.– С.318.
2. Алексеев, И.Б. Бесконсервантные гипотензивные препараты: преимущества терапии / И.Б.Алексеев, И.А. Королева И.А.– Текст: непосредственный // РМЖ. Клиническая офтальмология.– 2019.– Том 19.– №3– С. 137-142.
3. Анисимов,С.И. Клинический опыт применения препаратов на основе сульфатированных гликозаминогликанов / С.И.Анисимов, С.Ю.Анисимова, М.Д. Пожарицкий [и др.]– Текст: непосредственный // Глаукома. – 2008. – №3.– С. 25–28.
4. Анисимова, С.Ю. Морфологические исследования после имплантации антиглаукоматозного коллагенового дренажа /С.Ю.Анисимова, С.И.Анисимов, Е.В. Ларионов, Г.Г.Автандилов. – Текст: непосредственный // Российские медицинские вести.–2005.– №3.– С.53–56.
5. Астахов, Ю.В. Сравнительное изучение действия местных анестетиков /Ю.В. Астахов, А.А. Шахназарова.– Текст: непосредственный // Русский медицинский журнал. –2000. –№ 24. – С. 44—48.
6. Астахов, Ю.С. Препараты, стимулирующие трофические и регенерационные процессы (для местного применения) / Ю.С.Астахов.– Текст: непосредственный // Лекарственный справочник врача офтальмолога. — СПб.– 2012. – С. 42-44.

7. Бржеский, В.В. Профилактика и лечение дегенеративных изменений эпителия глазной поверхности при синдроме «сухого глаза»/ В.В.Бржеский, В.Ю.Попов, Н.М.Калинина, И.В.Бржеская. – Текст: непосредственный // Вестник офтальмологии.– 2018.–Т.134. – №5. – С.126-134.
8. Бржеский,В.В. Глаукома и синдром «сухого глаза»/ В.В. Бржеский, М. Радхуан.– Текст: непосредственный// Офтальмологические ведомости. – 2014.–Т.7.–№2.–С.37-49.
9. Буйлова,Т.В. Открытое рандомизированное исследование эффективности и безопасности препарата «Хондроксид» в комплексном лечении больных с хронической вертеброгенной люмбоишалгией/ Т.В. Буйлова.– Текст: непосредственный // Русский медицинский журнал. – 2010. – № 17. – С. 1678–1686.
10. Быков, В.Л. // Цитология и общая гистология/ В.Л. Быков.– Текст: непосредственный – Санкт-Петербург.– 2001. – С.520.
11. Веселкова, М.П. Экспериментальное исследование влияния сульфатированных гликозаминогликанов на культуру клеток пигментного эпителия сетчатки человека при воздействии ультразвука (предварительные результаты)/ М.П. Веселкова, С.В. Новиков, Н.М. Кислицына, Е.В. Петерсен, И.А.Трусова, А.С.Дух.– Текст: непосредственный // Современные технологии в офтальмологии.–2015.– №3.– С.35-38.
12. Гаврилова, Н.А. Причины нарушения эпителизации и формирования персистирующих язв трансплантата у пациентов с деструктивными процессами роговицы после сквозной кератопластики/ Н.А. Гаврилова, А.В. Ревещин, С.А. Борзенко, Ю.Ю. Калинин Ю.Ю. [и др.]. – Текст: непосредственный // Современные технологии в офтальмологии. – 2018. – №3. – С.206-210.

13. Гаврилова, Н.А. Патогенетические механизмы нарушения эпителизации и формирования персистирующих язв трансплантата у пациентов с деструктивными процессами роговицы после сквозной кератопластики/ Н.А. Гаврилова, А.В.Ревущин А.В., С.А. Борзенко, Ю.Ю. Калинин [и др]. – Текст: непосредственный // Офтальмохирургия.- 2018.-№2.-С.36-41.
14. Горлина, Н.К. Влияние фактора, выделяемого клетками амниона человека на пролиферативную активность нормальных и трансформированных фибробластов/Н.К.Горлина,М.Н. Головестинов.– Текст: непосредственный // Онтогенез.— 1981.– № 2.– С. 195-197.
15. Гумеров, Р.Х. Этаден — эффективный стимулятор репаративных процессов/ Р.Х.Гумеров, Т.Н.Галиуллина, С.Н. Егорова.– Текст: непосредственный // Новые лекарства. –2003.– № 1.– С.3-5
16. Гусев,Ю.А. Дисковиск и новые возможности применения применения вискоэластиков в хирургии катаракты / Ю.А.Гусев.– Текст: непосредственный // Материалы научно-практической конференции «Актуальные проблемы офтальмологии» – Москва.– 2007 – С.11-17.
17. Дворяшина И.А. Эпителиально-мезенхимальный переход I типа как важный биологический процесс в эмбриогенезе/ И.А. Дворяшина, Ю.И.Великородная Ю.И., А.В. Терентьев А.В. // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2021. – № 2 (78). – С. 37-45
18. Егоров, Е.А. Новые стимуляторы репаративной регенерации роговицы/Е.А.Егоров,Н.И.Калинин.,А.П.Киясов.–Текст: непосредственный // Вестник офтальмологии – 1999.–Т.115.–№6.– С.13-15.
19. Ерохин, А.И. Использование культуры фибробластов человека при хирургическом лечении воспалительных заболеваний пародонта /А.И.Ерохин.– Текст: непосредственный // Автореферат дисс ... канд. мед. наук. –Москва. – 2002. – С.23.

20. Зимницкий, А.Н. Гликозаминогликаны в биохимических механизмах адаптации организма к некоторым физиологическим и патологическим состояниям /А.Н. Зимницкий, С.А.Башкатов.– Текст: непосредственный // Фармацевтический Бюллетень.– 2004. – С. 235.
21. Ибрагимова, Д.И. Выбор алгоритма терапии различных форм поражения роговицы при синдроме сухого глаза (экспериментально-клиническое исследование) /Д.И. Ибрагимова.– Текст: непосредственный // Автореф. дисс..... канд.мед.наук.– Москва.– 2014.
22. Исаева, Р.Т., Новые возможности воздействия на репаративные процессы при проникающих ранах роговой оболочки /Р.Т.Исаева, И.П. Хорошилова-Маслова.– Текст: непосредственный // Офтальмологический журнал.–1981.– №5.– С.294-296.
23. Исаева, Р.Т., Изучение препарата ЭНКАД как фармакологического регулятора репаративных процессов в роговице (экспериментально-радиологическое исследование)/ Р.Т. Исаева, И.П.Хорошилова-Маслова, Б.Б.Фукс, М.Е.Шабанова.– Текст: непосредственный // Вестник офтальмологии–1982.–№ 1.–С. 21-26.
24. Кадышев В.В. Репаративная терапия при экзогенном повреждении роговой оболочки / В.В. Кадышев, З.Халлуф.– Текст: непосредственный // РМЖ. Клиническая Офтальмология.–2016.– №4.–С.200-203.
25. Каспаров, А.А. Лечение синдрома «сухого глаза» после сквозной и послойной пересадки роговицы препаратами Корнерегель и Видисик /А.А.Каспаров, Г.С. Полунин, Е.Г.Полунина, Т.Н.Сафонова.– Текст: непосредственный // Синдром сухого глаза. – 2003. - №4. – С.17-20.
26. Колесников, А.В. Коррекция свободнорадикального статуса роговицы препаратом «Мексидол» после поверхностной эксимерлазерной абляции (ФРК, ЕПИ-ЛАСИК) в эксперименте/ А.В. Колесников, М.Н. Никролаев, О.И. Буренина, М.А. Щулькина.– Текст: непосредственный // Сборник научных публикаций конференции Восток-Запад.–2011.–Т.1.– С.76.

27. Лабори, Г. Регуляция обменных процессов (теоретический, экспериментальный, фармакологический и терапевтический аспекты)/ Г. Лабори.– Текст: непосредственный // Медицина.- Москва.- 1970. – С. 384.
28. Ларионов, Е.В. Роль сульфатированных гликозаминогликанов (сГАГ) в физиологии и патофизиологии тканей пародонта / Е.В. Ларионов, Т.А. Глыбина.– Текст: непосредственный // Стоматология сегодня. –Москва: Полимедиа-Пресс. –2007. –С.32-33.
29. Лобанова, О.С Инновационный способ диагностики и мониторинга лечения болезни глазной поверхности в практике врача-офтальмолога/ О.С. Лобанова.– Текст: непосредственный // Современная оптометрия.– 2010.–№2.–С.18-21.
30. Майко, О.Ю. Функциональные индексы при оценке эффективности лечения гонартроза препаратами структум и хондролон/ О.Ю.Майко, Г.Г.Багирова.– Текст: непосредственный // Терапевтический архив. – 2006. –Т. 78. –№ 6.–С. 47-52.
31. Майчук, Ю.Ф Эффективность применения капель карнозина в терапии заболеваний и при эксимерлазерной хирургии роговицы/ Ю.Ф.Майчук, В.В.Куренков, Д.Ю. Майчук.– Текст: непосредственный // Офтальмологический журнал.- 2000. -№4.- С.24—25
32. Майчук, Ю.Ф. Тауфон в лечении глазных болезней (Обзор литературы и собственные наблюдения)/ Ю.Ф. Майчук.– Текст: непосредственный // Катарактальная и рефракционная хирургия. – 2011. – Т. 11 №1. – С. 56-61.
33. Максименко, А.В. Эффекты гликозаминогликанов в сосудистых событиях/ А.В. Максименко.– Текст: непосредственный // Химико-фармацевтический журнал.– 2008.–Том 42.– № 10.–С.10-14.

34. Макогон, С.И. Анализ причин низкой приверженности к лечению у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой/ С.И. Макогон, А.С. Макогон.– Текст: непосредственный // Вестник современной клинической медицины. – Т.8.– №6.–2015.–52-57.
35. Никитина, А.Ф. Антиоксидантная система зрительного анализатора и антиоксиданты, применяемые в офтальмологии (обзор литературы)/ А.Ф. Никитина, Д.К. Абсаликова, Н.А. Никитин.– Текст: непосредственный // Сборник научных публикаций конференции Восток-Запад.–2011.–Т.1.– С.536.
36. Никитина, А.Ф. Сравнительный анализ антиоксидантной активности лекарственных средств различных групп/ А.Ф. Никитина, Р.Р. Фархутдинов.– Текст: непосредственный // Сборник научных публикаций конф. Восток-Запад.–2012.–Т.1.– С.461.
37. Панасюк, А.Ф. Хондроитинсульфаты и их роль в обмене хондроцитов и межклеточного матрикса хрящевой ткани/ А.Ф. Панасюк, Е.В. Ларионов.– Текст: непосредственный // Научно-практическая ревматология. – 2000. – № 2. – С. 46-55.
38. Переверзев, А.Е. Кроветворные колониеобразующие клетки и физические стресс-факторы/ А.Е. Переверзев.– Текст: непосредственный // Л.: Наука.–1986. – С.172.
39. Петров, С.Ю. Консерванты в офтальмологических препаратах: от бензалкония хлорида к поликватернию/ С.Ю. Петров, Д.М. Сафонова.– Текст: непосредственный // РМЖ «Клиническая Офтальмология». -2014. -№2.- С. 97.
40. Погорелова, В.В. Профилактика и лечение транзиторного синдрома «сухого глаза» после эксимерлазерной коррекции/ В.В. Погорелова, И.С. Малютина, Р.Р.Должич, Е.Г. Харченко [и др.].– Текст: непосредственный // Офтальмология. –2014.–Т. 11, N.4.– С. 76–78.

41. Сафонова, Т.Н. Система глазной поверхности / Т.Н.Сафонова, Л.С. Патеюк.– Текст: непосредственный // Вестник офтальмологии. – 2015. – № 1. – С. 96-102.
42. Северина, Е.С. Биохимия: Учеб. для вузов. 5-е изд./ Е.С.Северина.– Москва: ГЭОТАР-Медиа –2009.–С.703-704.– Текст: непосредственный.
43. Серов, В.В. Соединительная ткань /В.В. Серов, А.Б.Шехтер. – Москва.- 1981. – 321.- С.21.– Текст: непосредственный
44. Стадников, А.А. К вопросу о консервации донорской роговицы: современные направления, экспериментально морфологические обоснования/ А.А.Стадников, В.Н.Канюков, О.М.Трубина, Р.Н.Подопригора, А.Н. Казеннов – Текст: непосредственный // Вестник ОГУ. – 2011. – № 14.– С. 249-151.
45. Тахчиди, Е.Х. Применение сульфатированных гликозаминогликанов в офтальмологии/ Е.Х. Тахчиди, К.С. Горбунова.– Текст: непосредственный // Вестник ОГУ. – 2012.- Т.148.–№12 – С.201-204.
46. Тахчиди, Х.П. Особенности функционального значения комплекса сульфатированных гликозаминогликанов в регулировании пролиферации фибробластов *in vitro*/ Х.П. Тахчиди, С.В. Новиков, А.В. Шацких [и др.]– Текст: непосредственный // Морфология. –2012. –Т. 142.– №5. – С. 49-54.
47. Тахчиди, Х.П. Интраоперационная профилактика рубцевания при антиглаукомных операциях в эксперименте *in vivo*/ Х.П. Тахчиди, Е.Х. Тахчиди, С.В. Новиков, А.В. Шацких, К.С. Горбунова.– Текст: непосредственный // Сборник научных статей IX международной конференции Глаукома: теории, тенденции, технологии HRT клуб Россия – 2011. – С. 322-326.

48. Хорошилова-Маслова, И.П. Механизмы регуляции заживления проникающих ранений роговицы с помощью естественного комплекса цитокинов/ И.П.Хорошилова-Маслова, Л.В. Ковальчук, Л.В. Ганковская.– // Вест. офтальмологии. –1995. – № 4. –С.14-18.
49. Чернакова, Г.М. Корнерегель в комплексном лечении поражений роговицы/ Г.М. Чернакова.– Текст: непосредственный // Синдром сухого глаза. – 2002. –№ 1. – С. 19
50. Чичасова, Н.В. Хондроитин сульфат (Структум) в лечении остеоартроза: патогенетическое действие и клиническая эффективность/ Н.В. Чичасова.– Текст: непосредственный // Русский Медицинский журнал. –2009. –№ 3.–С. 170
51. Щеглова, Н.С. Экспериментальное исследование воздействия сульфатированных гликозаминогликанов на поврежденную сетчатую оболочку глаза (предварительное сообщение)/ Н.С. Щеглова, Н.М. Кислицына, С.В. Новиков, А.В. Шацких, С.Н. Огородникова, Е.К. Педанова.– Текст: непосредственный // Материалы научно-практической конференции «Актуальные проблемы офтальмологии». Сборник научных трудов. –2012. –С.231.
52. Abegao, P.L. Improvement in glaucoma patient quality of life by therapy switch to preservative-free timolol/dorzolamide fixed combination/ P.L.Abegao, E.Vandewalle, L. Gerlier, I.Stalmans.– Text:unmediated // Ophthalmologica. – 2014.– Vol. 231.–№3.– P.166-171. doi: 10.1159/000356468
53. Adams, J.C. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix/ J.C.Adams, P.M.Watt.– Text:unmediated // Development. – 1993. – Vol. 117. – P. 1183-1198. doi: 10.1242/dev.117.4.1183.

54. Agnifili, L. The ocular surface after successful glaucoma filtration surgery: a clinical, in vivo confocal microscopy, and immune-cytology study/ L.Agnifili, L.Brescia, F.Oddone [et al].– Text:unmediated // Scientific Reports –2019.– V.9.–N.1.– Article: 11299. doi: 10.1038/s41598-019-47823-z.
55. Aguayo Bonniard, A. Ocular surface toxicity from glaucoma topical medications and associated preservatives such as benzalkonium chloride (BAK)/ A. Aguayo Bonniard, J.Y. Yeung, C.C. Chan, C.M. Birt.– Text:unmediated // Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology – 2016.–Vol.18.– P. 1-11. doi: 10.1080/17425255.2016.1209481.
56. Aihara, M. Effects of SofZia-preserved travoprost and benzalkonium chloride-preserved latanoprost on the ocular surface - a multicentre randomized single-masked study/ M. Aihara, H. Oshima,M. Araie.– Text:unmediated // Acta Ophthalmologica – 2013.– Vol. 91.–N.1.–P.7-14. doi: 10.1111/j.1755-3768.2012.02565.x.
57. Ajisaka, K. Effect of the chelation of metal cation on the antioxidant activity of chondroitin sulfates / K. Ajisaka, Y. Oyanagi, T. Miyazaki, Y. Suzuki. – Text:unmediated //Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 2016. –T.80. –N.6 –P.1179-1185. doi: 10.1080/09168451.2016.1141036.
58. Aldave, A.J. Ocular surface toxicity associated with topical interferon alpha-2b /A.J. Aldave, A. Nguyen.– Text:unmediated // British Journal of Ophthalmology. –2007.–Vol. 91.–N.8.–P.1087-1088. doi: 10.1136/bjo.2006.107482.
59. Ali, S. Crosslinked Hyaluronic Acid with Liposomes and Crocin Confers Cytoprotection in an Experimental Model of Dry Eye / S. Ali, S. Davinelli, R. Mencucci, F. Fusi [et al].–Text: unmediated // Molecules. –2021. – Vol.26–N.4. –P.849. doi: 10.3390/molecules26040849.

60. Ammar, D.A. Effects of benzalkonium chloride or polyquad-preserved fixed combination glaucoma medications on human trabecular meshwork cells / D.A. Ammar, M.Y. Kahook.– Text:unmediated // *Molecular Vision*. – 2011.–Vol. 17.– P.1806-1813.
61. Ansari, E. Treatment of open-angle glaucoma and ocular hypertension with preservative-free tafluprost/timolol fixed-dose combination therapy: 6 case reports and clinical outcomes/ E.Ansari, S. Chappiti, J. Pavicic-Astalos, J.C. Pinto-Bonilla, I. Riva, M. Sacchi, F. Saenz-Frances. – Text: unmediated // *BMC Ophthalmology*. –2022. –Vol.22.–N.1.–P.152. doi: 10.1186/s12886-022-02361-7.
62. Araki-Sasaki, K. The effects of oral and topical corticosteroid in rabbit corneas / K. Araki-Sasaki, O. Katsuta, H. Mano, T. Nagano, M. Nakamura.– Text : unmediated // *BMC Ophthalmology*. –2016.– Vol.16.–N.1.–P.160. doi: 10.1186/s12886-016-0339-5.
63. Asai, T. Three cases of corneal melting after instillation of a new nonsteroidal anti-inflammatory drug/ T. Asai, T. Nakagami, M. Mochizuki, N. Hata, T. Tsuchiya, Y. Hotta.– Text: unmediated // *Cornea*. –2006.–Vol. 25.–N.2.–P.224-227. doi: 10.1097/01.ico.0000177835.93130.d4.
64. Ashena, Z. Prophylactic Use of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs after Cataract Surgery and Corneal Melt /Z. Ashena, M.A. Nanavaty, A.S. Bardan, R. Thaker, L. Bascaran. – Text: unmediated // *Journal of Current Ophthalmology*.–2022.–V.33.–N.4.–P.485-491. doi:10.4103/joco.joco_107_21.
65. Aydemir, G.A. The Effect of Long-Term Usage of Single-Agent Antiglaucomatous Drops with Different Preservatives on Cornea Biomechanics / G.A. Aydemir, G. Demirok, U. Eksioglu, M. Yakin, F. Ornek.– Text: unmediated // *Beyoglu Eye Journal*. – 2021.– V.6.– N.1.– P. 24-30. doi: 10.14744/bej.2021.76376.

66. Ayaki, M. In vitro assessment of the cytotoxicity of six topical antibiotics to four cultured ocular surface cell lines / M. Ayaki, A. Iwasawa, Y. Niwano.– Text: unmediated // Biocontrol Science and technology. –2012.–Vol.17.– N.2.– P.93-99. doi: 10.4265/bio.17.93.
67. Ayaki, M. Comparative study of in vitro ocular surface cytotoxicity of a fixed combination of 0.5% timolol/1% dorzolamide eyedrop and its components with 0.005% benzalkonium chloride /M. Ayaki, A. Iwasawa, Y. Niwano.– Text: unmediated // Biocontrol science and technology. – 2012.– Vol.17.–№3.–P.115-120. doi: 10.4265/bio.17.115.
68. Baici, A. Inhibition of human elastase from polymorphonuclear leucocytes by a glycosaminoglycan polysulfate (Arteparon)/ A. Baici, P. Salgam, K. Fehr, A. Boni.– Text: unmediated // Biochemical Pharmacology. -1980.-T.15.- Vol.12.- N. 29.- P.1723-1727. doi: 10.1016/0006-2952(80)90131-8.
69. Baradad-Jurjo, M.C. Topical anesthetic abuse keratopathy in a contact lens wearer/ M.C. Baradad-Jurjo, N. Planas-Domenech, N. Barnils-Garcia, M. Lopez-Lopez, T. Marti-Huguet.– Text: unmediated // Journal Francais D Ophtalmologie – 2022.–V.45.–N.1.–P.154-156. doi: 10.1016/j.jfo.2021.06.013
70. Baudouin, C. Detrimental effect of preservatives in eyedrops: implications for the treatment of glaucoma/ C. Baudouin. – Text: unmediated // Acta Ophthalmologica.–2008.–N.86.–P.716-726. doi: 10.1111/j.1755-3768.2008.01250.x.
71. Baudouin, C. Ocular Surface and External Filtration Surgery: Mutual Relationships/ C.Baudouin. – Text: unmediated // Development in Ophthalmology – 2017.–N.50.–P. 64-78. doi: 10.1159/000458487

72. Baudouin, C. Conjunctival epithelial cell expression of interleukins and inflammatory markers in glaucoma patients treated over the long term/ C. Baudouin, P. Hamard, H. Liang, C. Creuzot-Garcher, L. Bensoussan, F. Brignole.– Text: unmediated // *Ophthalmology*. –2004.–№ 111.– P. 2186–2192. doi: 10.1016/j.ophtha.2004.06.023.
73. Baudouin, C. Inflammation in Glaucoma: From the back to the front of the eye, and beyond / C. Baudouin, M. Kolko, S. Melik-Parsadaniantz, E.M. Messmer. – Text: electronic // *Progress in Retinal and Eye Research*. –2021.– V.83.–Article:100916. doi: 10.1016/j.preteyeres.2020.100916.
74. Baudouin, C. Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly /C. Baudouin, A. Labbe, H. Liang, PaulyA., F. Brignole-Baudouin.–Text: unmediated // *Progress in Retinal Eye Research*. –2010.–Vol. 29.–N.4.– P.312-334. doi: 10.1016/j.preteyeres.2010.03.001.
75. Baudouin, C. The ocular surface of glaucoma patients treated over the long term expresses inflammatory markers related to both T-helper 1 and T-helper 2 pathways / C. Baudouin, H. Liang, P. Hamard, L. Riancho, C. Creuzot-Garcher, J.M. Warnet, F. Brignole-Baudouin. – Text: unmediated // *Ophthalmology*.–2008.–N.115.–P.109-115. doi: 10.1016/j.ophtha.2007.01.036.
76. Bron, A.J. TFOS DEWS II pathophysiology report / A.J. Bron, C.S. De Paiva, S.K. Chauhan [et al].– Text: unmediated // *Ocular Surface*. –2017.– V.15. –P. 438–510. doi: 10.1016/j.jtos.2017.05.011.
77. Becquet, F. Histopathological effects of topical ophthalmic preservatives on rat corneoconjunctival surface / F. Becquet, M. Goldschild, M.S. Moldovan, M. Ettaiche, P. Gastaud, C. Baudouin.–Text: unmediated // *Current Eye Research*. –1998.– Vol.4.– N.17.–P.419-425. doi: 10.1080/02713689808951223.

78. Billings, P.C. Interactions of signaling proteins, growth factors and other proteins with heparin sulfate: mechanisms and mysteries / P.C. Billings, M. Pacifici.– Text: unmediated // *Tissue Reserach*. –2015. – Vol. 56, N.4. – P. 272-280. doi: 10.3109/03008207.2015.1045066.
79. Blavin, J. A comparison of azithromycin and tobramycin eye drops on epithelial wound healing and tolerance after penetrating keratoplasty/ J.Blavin, A. Sauer, M. Saleh, D. Gaucher, C. Speeg-Schatz, T. Bourcier. – Text: unmediated // *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. – 2012.–Vol.28.–N.4.–P.428-432. doi: 10.1089/jop.2011.0171.
80. Bodor, N. Effect of a novel soft steroid on the wound healing of rabbit cornea / N.Bodor, M.Varga.– Text: unmediated // *Experimental Eye Research*. –1990.–Vol.50.–N.2.–P.183-187. doi: 10.1016/0014-4835(90)90229-n.
81. Bonomi, L. Comparison of the Effects of Nine Beta-Adrenergic Blocking Agents on Intraocular Pressure in Rabbits / L. Bonomi, S. Perfetti, E. Noya, R. Bellucci, U.F. Massa.– Text: unmediated // *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*–1979.–N.210.–P.1-8. doi: 10.1007/BF00414784.
82. Brewitt, H. Morphological changes of the corneal epithelium after application of topical anaesthetic ointments /H. Brewitt, E. Bonatz, H. Honegger. – Text: unmediated // *Ophthalmologica*. –1980.–Vol. 180.–N.4.– P.198-206. doi: 10.1159/000308974.
83. Broadway, D.C Adverse effects of topical antiglaucoma medication I. The conjunctival cell profile /D.C. Broadway, I. Grierson, C. O'Brien, R.A. Hitchings.– Text: unmediated // *Archives of Ophthalmology*. –1994.–Vol. 112.–N.11.–P.1437-1445. doi: 10.1001/archopht.1994.01090230051020.
84. Broadway, D.C. Adverse effects of topical antiglaucoma medication. II. The outcome of filtration surgery / D.C. Broadway, I. Grierson, C. O'Brien, R.A. Hitchings.– Text: unmediated // *Archives of Ophthalmology*. –1994.– Vol.112.–N.11.–P.1446-1454. doi: 10.1001/archopht.1994.01090230060021.

85. Camejo, G. Modification of copper-catalyzed oxidation of low-density lipoprotein by proteoglycans and glycosaminoglycans / G. Camejo, E. Hurt-damejo, B. Rosengren [et al.].– Text: unmediated // Journal of Lipid Research. – 1991.- N.32.-1983-1991.
86. Campo, G.M. Antioxidant activity of chondroitin sulfate / G.M. Campo, A. Avenoso, S. Campo, A.M. Ferlazzo, A. Calatroni.– Text: unmediated // Advances in Pharmacology. – 2006. – T.53. – P. 417-431. doi: 10.1016/S1054-3589(05)53020-5.
87. Caterson, B. Keratan sulfate, a complex glycosaminoglycan with unique functional capability / B. Caterson, J. Melrose.– Text: unmediated // Glycobiology. – 2018. – V.28.–N.4.–P.182-206. doi: 10.1093/glycob/cwy003.
88. Chamard, C. Preservative-free versus preserved glaucoma eye drops and occurrence of glaucoma surgery. A retrospective study based on the French national health insurance information system / C. Chamard, S. Larrieu, C. Baudouin, A. Bron, M. Villain, V. Daien. – Text: unmediated // Acta Ophthalmologica. – 2020.– V.98.–N.7.–P.876-881. doi: 10.1111/aos.14410.
89. Charnock, C. Are multidose over-the-counter artificial tears adequately preserved? / C. Charnock. – Text: unmediated // Cornea. –2006. –Vol. 25. – P. 432-437. doi: 10.1097/01.ico.0000183538.53017.69.
90. Chen, W. Corneal alterations induced by topical application of commercial latanoprost, travoprost and bimatoprost in rabbit / W. Chen, N. Dong, C. Huang.– Text: electronic // Plos one. – 2014.–Vol.9. – N.3.–Article: 89205. doi: 10.1371/journal.pone.0089205.
91. Chung, S.H. Impact of short-term exposure of commercial eyedrops preserved with benzalkonium chloride on precorneal mucin / S.H Chung, S.K. Lee, S.M. Cristol [et al.]. –Text unmediated // Molecular vision. –2006.– N.12.–P.415-421.

92. Clouzeau, C. Hyperosmolarity potentiates toxic effects of benzalkonium chloride on conjunctival epithelial cells in vitro / C. Clouzeau, D. Godefroy, L. Riancho, W. Rostene, C. Baudouin, F. Brignole-Baudouin.– Text: unmediated // Molecular vision. –2012.–N.18.– P. 851-863.
93. Conrozier, T. Death of articular chondrocytes. Mechanisms and protection/ T. Conrozier T. – Text: unmediated// Presse Medicale. –1998.– T.21.–Vol.36.–N.27.– P.1859-1861.
94. Cvenkel, B. Symptoms and signs of ocular surface disease related to topical medication in patients with glaucoma / B. Cvenkel, S. Stunf, I. Srebotnik Kirbis, M. Strojjan Flezar. – Text: unmediated // Clinical Ophthalmology. –2015. –№9.–P.625–631. doi: 10.2147/OPHTH.S81247
95. Datta, S. The Eye Drop Preservative Benzalkonium Chloride Potently Induces Mitochondrial Dysfunction and Preferentially Affects LHON Mutant Cells/ S. Datta, C. Baudouin, F. Brignole-Baudouin, A. Denoyer, G.A. Cortopassi. – Text: unmediated //Investigative Ophthalmology&Visual Science. –2017. – Vol.58.–N.4.–P.2406-2412. doi: 10.1167/iovs.16-20903.
96. De Benedetti, G. Corneal deposit of ciprofloxacin after laser assisted subepithelial keratomileusis procedure: a case report/ G. De Benedetti, A. Brancaccio. – Text electronic // Journal of Ophthalmology. - 2010.– Article ID 296034, P.3. doi: 10.1155/2010/296034.
97. De Saint Jean, M. Effects of benzalkonium chloride on growth and survival of Chang conjunctival cells/ M. De Saint Jean, F. Brignole, A.F. Bringuier, A. Bauchet, G. Feldmann, C. Baudouin. – Text: unmediated // Investigative Ophthalmology & Visual Science. –1999.–T.40.–N.3.–P.619-630.
98. Debbasch, C. Mitochondrial activity and glutathione injury in apoptosis induced by unpreserved and preserved beta-blockers on Chang conjunctival cells/ C. Debbasch, P.J. Pisella, M. De Saint Jean [et al].– Text: unmediated // Investigative ophthalmology & Visual science. –2001.–Vol.42.–N.11.– P.2525-2533.

99. Debbasch, C. Quaternary ammoniums and other preservatives contribution in oxidative stress and apoptosis on Chang conjunctival cells/ C. Debbasch, F. Brignole, P.J. Pisella. – Text: unmediated // Investigative ophthalmology&Visual science. –2001.–Vol. 42.– N.3.– P.642-652.
100. Dreer, L.E. Determinants of Medication Adherence to Topical Glaucoma Therapy/ E.L. Dreer, Girkin Ch., L. S.L. Mansberger. –Text: unmediated// Journal Glaucoma. –2012.–Vol.21.–N.4.–P.234–240. doi: 10.1097/IJG.0b013e31821dac86.
101. Dulbecco R., Henahan M., Bowman M., et al. Generation of fibroblast-like cells from cloned epithelial mammary cells in vitro: A possible new cell type // Proc. Natl. Acad. Sci. –1981. – No. 78. – P. 2345–2349.
102. Economou, M.A. Better tolerance of preservative-free latanoprost compared to preserved glaucoma eye drops: the 12-month real-life FREE study / M.A. Economou, H.K. Laukeland, I. Grabska-Liberek, J.F. Rouland. – Text: unmediated//Clinical Ophthalmology. – 2018.– N.12.–P.2399-2407. doi: 10.2147/OPHTH.S176605.
103. Ehrenberg, M. Combining Sodium Hyaluronate and Polyvinylpyrrolidone Therapies for the Rabbit Cornea: A New Approach to Relief of the Human Dry Eye Syndrome/ M. Ehrenberg, E. Zolotariov, E. Loeb, V. Poliansky, A. Levy. Text: unmediated// Current Eye Research – 2015.–Vol. 40.–N.9.–P. 913-922. doi: 10.3109/02713683.2014.969810
104. Fan T.J. Apoptotic effects of norfloxacin on corneal endothelial cells / T.J. Fan, S.X. Wu, G.J. Jiang. – Text: unmediated // Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology. – 2020. – Vol.393.–N.1.–P.77-88. doi: 10.1007/s00210-019-01711-5.
105. Fini, E.M. Proteolytic mechanisms in corneal ulceration and repair / E.M. Fini, J.R. Cook, R. Mohan. – Text: unmediated//Archives Dermatology Research. –1998. –N.290.–P.12–23. doi: 10.1007/pl00007449.

106. Fogagnolo, P. Tear Film Osmolarity, Ocular Surface Disease and Glaucoma: A Review / P. Fogagnolo, G. Torregrossa, L. Tranchina, A. Ferreras, S. De Cilla, A. Labbe, M. Figus [et al].– Text: unmediated// Current Medical Chemistry. – 2019.–Vol.26.–N.22.– P.4241-4252. doi: 10.2174/0929867326666190725160621.
107. Freeman, P.D. Preservatives in topical ophthalmic medications: Historical and clinical perspectives/ P.D. Freeman, M.Y. Kahook.– Text: unmediated // Expert Review of Ophthalmology. –2014.–Vol. 4.– N.4.–P.59-64.
108. Fukuda, M. The transcorneal penetration of commercial ophthalmic formulations containing timolol maleate in rabbit eyes/ M. Fukuda, H. Sasaki. –Text: unmediated// Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics. – 2015.–Vol. 31.–N1.–P.57-60. doi: 10.1089/jop.2014.0015
109. Furrer, P. A comparative study of the ocular tolerance of three timolol-based preparations: the influence of preservatives on ocular tolerance/ P. Furrer, J. Berger, J.M. Mayer, R.A. Gurny // Journal Francais D Ophthalmologie. – 2001.–N. 24.–P.13–19.
110. Galletti, J.G. The ocular surface immune system through the eyes of aging/ J.G. Galletti, C.S. De Paiva. – Text: unmediated // Ocular Surface. – 2021.– N.20.– P.139-162. doi: 10.1016/j.jtos.2021.02.007.
111. Giannaccare, G. Iatrogenic Ocular Surface Diseases Occurring during and/or after Different Treatments for Ocular Tumours. / G. Giannaccare, F.Bernabei, M.Angi, M. Pellegrini, A. Maestri, V. Romano, V. Scorcia, P.R. Rothschild.– Text: unmediated //Cancers. –2021.–Vol.13.–V.8.–P.1933. doi: 10.3390/cancers13081933.
112. Goldstein, M.H. Ocular benzalkonium chloride exposure: problems and solutions/ M.H.Goldstein, F.Q. Silva, N. Blender, T.Tran, S. Vantipalli. – Text: unmediated //Eye. – 2022. – T.36– N.2. –P.361-368.

113. Gonzalez-Cela-Casamayor, M.A. Novel osmoprotective DOPC-DMPC liposomes loaded with antihypertensive drugs as potential strategy for glaucoma treatment / M.A. Gonzalez-Cela-Casamayor, J.J. Lopez-Cano, I. Bravo-Osuna [et al.].– Text: unmediated // *Pharmaceutics*. –2022.–Vol.14.–N.7.–P.1405. doi: 10.3390/pharmaceutics14071405.
114. Globus, R.K. Fibronectin is a survival factor for differentiated osteoblasts / R.K. Globus, S.B. Doty, J.G. Lull, E. Holmuhamedov, M.J. Humphries, C.H. Damsky.– Text: unmediated // *Journal of Cell Science*. – 1998. – Vol. 111. – P. 1385-1393. doi: 10.1242/jcs.111.10.1385.
115. Grace, L.P. Toxic Keratoconjunctivitis (Review)/ L.P. Grace, A.J. Lubniewski, J.J. Reidy, A.V. Farooq.– Text: unmediated // *Eye and Contact Lens: Science & Clinical Practice*–2018.–Vol.1–N.1.–P.13-16. doi: 10.1097/ICL.0000000000000392.
116. Graue-Hernandez, E.O. Toxic keratoconjunctivitis / E.O.Graue-Hernandez, A. Navas, A. Ramirez-Miranda.–Text: unmediated // *Ocular Surface Disease: Cornea, Conjunctiva and Tear Film*. – 2013.- P.189–193.
117. Guidera, A.C. Keratitis, Ulceration, and Perforation Associated with Topical Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs/ A.C. Guidera, J.I. Luchs, I.J.Udell. – Text: unmediated // *Ophthalmology*. –2001.–Vol.108.–N.5.–P.936-944.
118. Guzman-Aranguez, A. In vitro effects of preserved and unpreserved anti-allergic drugs on human corneal epithelial cells/ A.Guzman-Aranguez, P. Calvo, I. Roperro, J.Pintor.– Text: unmediated // *Journal of Ocular Pharmacology and Therapy*. –2014.–Vol. 9.–N. 30.–P.790-798. doi: 10.1089/jop.2014.0030.
119. Han, K.E. Epithelial wound healing after cataract surgery comparing two different topical fluoroquinolones / K.E. Han, W.S. Chung, T.I. Kim, S.Kim, T. Kim, E.K. Kim.– Text: unmediated // *Yonsei Medical Journal*. – 2014.– Vol.55.–N.1.–P.197-202. doi: 10.3349/ymj.2014.55.1.197.

120. He, H. PPAR- α Agonist Fenofibrate Suppressed the Formation of Ocular Surface Squamous Metaplasia Induced by Topical Benzalkonium Chloride / H.He, M. Liang, L.Li [et al].—Text: unmediated // Investigative Ophthalmology & Vision Science. – 2020.— Vol.61.-N.3.—P.54. doi: 10.1167/iovs.61.3.54.
121. He H. Therapeutic effects of Pyranoprofen on the mouse dry eye induced by topical medication of Benzalkonium Chloride/ H.He, Z.G. Liu, Z.R. Lin, X.C. Liu, H.He, Q.S. Xiao.—Text: unmediated // Zhonghua Yan Ke Za Zhi. —2012.—Vol.48.— N.1.- P.33-40.
122. Hecht, I. Anti-inflammatory Medication After Cataract Surgery and Posterior Capsular Opacification / I.Hecht, P. Karesvuo, A. Achiron, U. Elbaz, I. Laine, R. Tuuminen.—Text: unmediated// American Journal of Ophthalmology. —2020.—N.215.—P.104-111. doi: 10.1016/j.ajo.2020.02.007.
123. Holland, E.J. Ocular Surface Disease: Cornea, Conjunctiva and Tear Film / E.J. Holland, M.J. Mannis, W.B. Lee.—Text: unmediated // Elsevier – 2013. – P. 189–193. doi: 10.1016/B978-1-4557-2876-3.00055-9
124. Ichijima, H. Confocal microscopic studies of living rabbit cornea treated with benzalkonium chloride / H. 120. Ichijima, W.M. Petroll, J.V. Jester, H.D. Cavanagh. Text: unmediated// Cornea. –1992.—Vol. 3.— N.11.— P.221-225.
125. Iester, M. Beta-Blocker Study Group. Ocular surface changes in glaucomatous patients treated with and without preservatives beta-blockers / M.Iester, S. Telani, P. Frezzotti, I. Motolese, M. Figus, P. Fogagnolo, A. Perdicchi.— Text: unmediated // Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics. —2014.—Vol.6.—N. 30.—P.476-481.
126. Jaenen, N. Ocular symptoms and signs with preserved and preservative-free glaucoma medications/ N.Jaenen, C. Baudouin, P. Pouliquen, G.Manni, A. Figueiredo, T. Zeyen.— Text: unmediated // European Journal of Ophthalmology. —2007.—Vol.17.—N.3.—P.341–349. doi: 10.1177/112067210701700311.

127. Ju, C. Anti-oxidation and Antiapoptotic Effects of Chondroitin Sulfate on 6-Hydroxydopamine-Induced Injury Through the Up-Regulation of Nrf2 and Inhibition of Mitochondria-Mediated Pathway/ C.Ju, L.Hou, F.Sun, L. Zhang, Z. Zhang, H. Gao, L.Wang, Y.Lv,X. Zhao. – Text: unmediated// Neurochemical Research. –2015.– Vol.40.– N.7.– P.1509-1519. doi: 10.1007/s11064-015-1628-8.
128. Kadmiel, M. Glucocorticoid action in human corneal epithelial cells establishes roles for corticosteroids in wound healing and barrier function of the eye/ M. Kadmiel, A. Janoshazi, X. Xu, J.A. Cidlowski.– Text: unmediated // Experimental Eye Research. –2016.–N.152.–P.10-33. doi: 10.1016/j.exer.2016.08.020.
129. Kahook, M.Y. Quantitative analysis of conjunctival goblet cells after chronic application of topical drops/ M.Y. Kahook, R. Noecker.– Text: unmediated // Advances in Therapy. –2008.–Vol. 8.–N.25.– P.743-751. doi: 10.1007/s12325-008-0078-y.
130. Karlsson K. Binding of human extracellular superoxide dismutase C to sulphated glycosaminoglycans/ K. Karlsson, U. Lindant, S.L. Marklund.– Text: unmediated // Biochemical Journal. –1988.–N.256.–P.29-33. doi: 10.1042/bj2560029.
131. Kastelan S. How ocular surface disease impacts the glaucoma treatment outcome/ S. Kastelan, M. Tomic, K. Metez Soldo, J. Salopek-Rabatic. – Text: electronic // Biomed Research International. –2013.–Article: 696328. doi: 10.1155/2013/696328.
132. Kato, K. Management of Postoperative Inflammation and Dry Eye After Cataract Surgery/ K.Kato, K.Miyake, K.Hirano, M.Kondo.– Text: unmediated // Cornea. –2019. –Vol. 38. –N.1.–P.25-33. doi: 10.1097/ICO.0000000000002125.
133. Katz, L.J. Twelve-month evaluation of brimonidine-purite versus brimonidine in patients with glaucoma or ocular hypertension / L.J. Katz. – Text: unmediated // Journal of glaucoma. – 2002.–Vol.11.–N.2.–P.119-126.

134. Kim, J.W. Prostaglandin agonist effect on matrix metalloproteinase aqueous levels in glaucoma patients / J.W. Kim, Z.S. Pradhan, R.A. Dalvi, T.Lai, C. Kranemann, S. Boyd, C.M. Birt.–Text: unmediated// Canadian Journal of Ophthalmology. –2015.–Vol. 50.–N.1.- P.6-10.
135. Kim, S.Y. Comparison of antibiotic effect and corneal epithelial toxicity between levofloxacin and moxifloxacin in vitro/ S.Y. Kim, J.A. Lim, J.S. Choi.– Text: unmediated // Cornea. – 2007.– Vol.26.– P.720–725. doi: 10.1097/ICO.0b013e3180515251.
136. Kim, Y.H. Comparison of the efficacy of fluorometholone with and without benzalkonium chloride in ocular surface disease/ Y.H. Kim, J.C. Jung, S.Y. Jung, S.Yu, K.W. Lee, Y.J.Park.– Text: unmediated // Cornea. – 2016.– Vol.35.–N.2.– P.234-242. doi: 10.1097/ICO.0000000000000695.
137. Kimakura, M. Toxicity of topical antifungal agents to stratified human cultivated corneal epithelial sheets/ M.Kimakura, T.Usui, S. Yokoo, S. Nakagawa, S. Yamagami, S.Amano.– Text: unmediated // Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics –2014. –Vol.30.– N.10.–P.810-814. doi: 10.1089/jop.2014.0044.
138. Kocabeyoglu, S. Decreased keratocyte density and central corneal thickness in primary open-angle glaucoma patients undergoing treatment with topical prostaglandin analogues/ S.Kocabeyoglu, M.C. Mocan, M. Irkec.– Text: unmediated// Indian Journal of Ophthalmology-2015.–Vol.63.–N.1.– P.15-19. doi: 10.4103/0301-4738.151456.
139. Konador A. Changes in chondroitin sulfate concentration in rabbit blood plasma depending on the method of its administration/ A.Konador, J. Kawiak.– Text: unmediated // Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis–1977. –N.25.–P.895-903.

140. Konstas, A.G. The treatment of glaucoma using topical preservative-free agents: an evaluation of safety and tolerability/ A.G.Konstas, A. Labbe, A. Katsanos, F. Meier-Gibbons [et al.].—Text: unmediated // Expert Opinion on Drug Safety. – 2021.—Vol.20.—N.4.—P.453-466. doi: 10.1080/14740338.2021.1873947.
141. Ku, E.C. Effect of diclofenac sodium on the arachidonic cascade/ E.C. Ku, W.Lee, H.V. Kothari, D.W. Scholer.— Text: unmediated// American Journal of Medicine. –1986.— №80.—P.18 –23.
142. Kumar, S. Correlation of Ocular Surface Disease and Quality of Life in Indian Glaucoma Patients: BAC-preserved versus BAC-free Travoprost/ S. Kumar, T. Singh, P. Ichhpujani, S. Vohra, S. Thakur.— Text: unmediated // Turkish Journal of Ophthalmology. – 2020.—Vol.50.—N.2.—P.75-81. doi: 10.4274/tjo.galenos.2019.29000.
143. Kumar, S. Ocular Surface Disease with BAK preserved Travoprost and Polyquaternium 1(Polyquad) preserved Travoprost / S. Kumar, T. Singh, P. Ichhpujani, S. Vohra.—Text: unmediated // Romanian Journal of Ophthalmology. –2019.—Vol.63.—N.3.—P.249-256.
144. Labbe A. Comparison of toxicological profiles of benzalkonium chloride and polyquaternium-1: an experimental study/ A.Labbe, A. Pauly, H.Liang, F. Brignole-Baudouin.—Text: unmediated // Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics. –2006.—Vol. 22.—N.4.—P.267-278. doi: 10.1089/jop.2006.22.267.
145. Lazreg, S. Efficacy and safety of preservative-free timolol 0.1% gel in open-angle glaucoma and ocular hypertension in treatment-naïve patients and patients intolerant to other hypotensive medications / S. Lazreg, Z. Merad, M.T. Nouri [et al]— Text: unmediated // Journal Francais D Ophtalmologie. – 2018.—Vol. 41.—N.10.—P.945-954. doi: 10.1016/j.jfo.2018.04.012.

146. Lee, S.M. Effect of topical glaucoma medication on tear lipid layer thickness in patients with unilateral glaucoma/ S.M. Lee, J.E. Lee, S.I. Kim, J.H. Jung, J.Shin.– Text: unmediated // Indian Journal of Ophthalmology. – 2019.– Vol.67.–N.8.–P.1297-1302. doi: 10.4103/ijo.IJO_2100_18.
147. Lemij, H.G. Patient satisfaction with glaucoma therapy: reality or myth?/ H.G. Lemij, J.G. Hoevenaars, C. Van der Windt, C. Baudouin.– Text: unmediated // Clinical Ophthalmology. –2015.–Vol.4.–N.9.–P.785-793. doi: 10.2147/OPHTH.S78918.
148. Leonardi, A. In vitro effects of fluoroquinolone and aminoglycoside antibiotics on human keratocytes/ A. Leonardi, V. Papa, I. Fregona, P.Russo, G. De Franchis, G. Milazzo.–Text: unmediated // Cornea. – 2006.–Vol. 1.–N. 25.–P.85-90. doi: 10.1097/01.ico.0000164782.10667.ed.
149. Leung, E.W Prevalence of ocular surface disease in glaucoma patients/ E.W. Leung, F.A. Medeiros, R.N. Wenreb.– Text: unmediated// Journal of Glaucoma. –2008.–Vol.17.–P 350-355. doi: 10.1097/IJG.0b013e31815c5f4f.
150. Liang, H. Polyquad-preserved travoprost/timolol, benzalkonium chloride (BAK)-preserved travoprost/timolol, and latanoprost/timolol in fixed combinations: a rabbit ocular surface study/ H.Liang, F. Brignole-Baudouin, A. Pauly, L. Riancho, C.Baudouin.–Text: unmediated // Advances of Therapy. –2011.–Vol. 28.–N.4.–P.311-325. doi: 10.1007/s12325-011-0003-7.
151. Liang, H. Reduced in vivo ocular surface toxicity with polyquad-preserved travoprost versus benzalkonium-preserved travoprost or latanoprost ophthalmic solutions/ H.Liang, F.Brignole-Baudouin, L. Riancho, C. Baudouin.– Text: unmediated // Ophthalmic Research. -2012.–Vol. 48.–№2.–P.89-101. doi: 10.1159/000335984.

152. Liang, H. Toxicological evaluation of preservative-containing and preservative-free topical prostaglandin analogues on a three-dimensional-reconstituted corneal epithelium system/ H. Liang, A. Pauly, L. Riancho.– Text: unmediated// The British journal of ophthalmology. –2011.–Vol. 95.– N.6.–P.869-875. doi: 10.1136/bjo.2010.189449.
153. Loma, P. Diadenosine tetraphosphate induces tight junction disassembly thus increasing corneal epithelial permeability/ P. Loma, A. Guzman-Aranguez, M.J. Perez de Lara, J. Pintor.– Text: unmediated// The British journal of ophthalmology. – 2015.- Vol.172.- N.4.- P.1045-1058. doi: 10.1111/bph.12972.
154. Lopes, N.L. Ocular Surface Evaluation After the Substitution of Benzalkonium Chloride Preserved Prostaglandin Eye Drops by a Preservative-free Prostaglandin Analogue/ N.L. Lopes, C.P.Gracitelli, M.R. Chalita, N.V.De Faria.– Text: unmediated // Medical Hypothesis Discovery Innovation in Ophthalmology. –2019.–Vol.8.–N.1.–P.52-56.
155. Magnus H. Ophthalmology of the ancients. // Hirschberg history of ophthalmology. – 2018.– Vol. 4. – P.4-12.
156. Mamalis N. Prevention of cystoid macular edema after cataract surgery/ N. Mamalis.– Text: unmediated // Journal of Cataract and Refractive Surgery. –2018.–Vol.44.–N4.–P.419-420. doi: 10.1016/j.jcrs.2018.04.010.
157. Mammo, D.A. Inpatient Adherence to Topical Glaucoma Medications before and after an Educational Intervention/ D.A. Mammo, M. Strampe, A. Naravane, P.W. Mallory, J. Boysen, M.M. Wright.– Text: unmediated // Ophthalmology Glaucoma. –2020. –Vol.3.– N.5.– P.339-342. doi: 10.1016/j.ogla.2020.04.007.

158. McDonald, E.M. Topical antibiotics for the management of bacterial keratitis: an evidence-based review of high quality randomised controlled trials/ E.M. McDonald, F.S.Ram/ E.M. McDonald, F.S. Ram, D.V. Patel, C.N.McGhee.– Text: unmediated // British Journal of Ophthalmology. – 2014.– Vol. 11.– N.98.– P.1470-1477. doi: 10.1136/bjophthalmol-2013-304660.
159. Merry, C.L. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans/ C.L.Merry, U.Lindahl, J. Couchman, J.D. Esko.– Text: unmediated // Essentials of Glycobiology. – 4th ed. – Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 2022. – Ch.17
160. Miller, P.E. Medical anti-glaucoma therapy: Beyond the drop/ P.E.Miller, J.S.Eaton. –Text: unmediated // Veterinary Ophthalmology. – 2021.–Vol. 24.– N.1.– P.2-15. doi: 10.1111/vop.12843. Epub 2020 Nov 9.
161. Mohapatra, R. Transcorneal permeation of diclofenac as a function of temperature from film formulation in presence of triethanolamine and benzalkonium chloride / R. Mohaparta, S. Senapati, C. Sahoo, S. Mallick.– Text: unmediated// Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. –2014.–Vol. 1.– N.123.–P.170-180. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.09.012.
162. Nagai,N. A nanoparticle formulation reduces the corneal toxicity of indomethacin eye drops and enhances its corneal permeability/ N. Nagai, Y. Ito, N. Okamoto, Y. Shimomura.–Text: unmediated // Toxicology. –2014– Vol. 7.- N.319.–P.53-62. doi: 10.1016/j.tox.2014.02.012.
163. Newman-Casey P.A. The Most Common Barriers to Glaucoma Medication adherence: A Cross-Sectional Survey/ P.A. Newman-Casey, A.L. Robin, T. Blachley, K. Farris, M. Heisler, K. Resnicow, P.P.Lee // Ophthalmology. –2015.–Vol.7.–N.122.–P.1308-1316. doi: 10.1016/j.ophtha.2015.03.026.

164. Nielsen, N.V. Timolol transitory manifestations of dry eyes in long term treatment/ N.V.Nielsen, J.S. Eriksen.– Text: unmediated // Acta Ophthalmologica. –1979. –Vol. 3.–N.57.– P. 418–424. doi: 10.1111/j.1755-3768.1979.tb01824.x.
165. Paimela, T. The preservative polyquaternium-1 increases cytotoxicity and NF-kappaB linked inflammation in human corneal epithelial cells/ T. Paimela, T. Ryhanen, A. Kauppinen.– Text: unmediated // Molecular vision. –2012.–Vol.18.–P.1189-1196.
166. Papa, V. Effect of ofloxacin and netilmicin on human corneal and conjunctival cells in vitro/ V.Papa, A. Leonardi, C. Getuli, V. Pacelli, P. Russo, G. Milazzo.– Text: unmediated// Journal of Ocular Pharmacology and Therapy. –2003.–Vol. 6.–N.19.–P.535-545. doi: 10.1089/108076803322660459.
167. Park, J.H. Evaluation of moxifloxacin-induced cytotoxicity on human corneal endothelial cell/ J.H.Park, M.Kim, R.S. Chuck, C.Y. Park.– Text: electronic // Scientific Reports. –2021.– Vol.11.–N.1.–Article: 6250. doi: 10.1038/s41598-021-85834-x.
168. Patel, M. Toxicity of topical ophthalmic anesthetics/ M.Patel, F.W. Fraunfelder. – Text: unmediated // Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology. –2013.–Vol.9.–N.8.–P.983-988. doi: 10.1517/17425255.2013.794219.
169. Pauloin T. In vitro modulation of preservative toxicity: high molecular weight hyaluronan decreases apoptosis and oxidative stress induced by benzalkonium chloride/ T.Pauloin, M. Dutot, J.M. Warnet, P. Rat.– Text: unmediated // European Journal of Pharmaceuticals Sciences. –2008.–Vol. 7.–№34.–P. 263-273. doi: 10.1016/j.ejps.2008.04.006.

170. Pauly A., Brignole-Baudouin F., Guenoun J.M., et al. Comparative study of topical anti-allergic eye drops on human conjunctiva-derived cells: responses to histamine and IFN gamma and toxicological profiles // Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology. –2007.–Vol. 4.–N.245.–P.534-546 doi: 10.1007/s00417-006-0353-z.
171. Pauly A., Brignole-Baudouin F., Labbe A., Liang H., Warnet J.M., Baudouin C. New tools for the evaluation of toxic ocular surface changes in the rat // Investigative Ophthalmology & Vision Science. –2007.–Vol.48.–N.12.–P.5473-5483. doi: 10.1167/iovs.06-0728.
172. Pharmakakis N.M., Katsimpris J.M., Melachrinou M.P., Koliopoulos J.X. Corneal complications following abuse of topical anesthetics. // European Journal of Ophthalmology. –2002.- Vol. 5.- N.12.- P.373-378 doi: 10.1177/112067210201200505.
173. Phillips, A.F. Arachidonic acid metabolites after excimer laser corneal surgery/ A.F.Phillips, K. Szereny, M. Campos [et al.]– Text: unmediated // Archives of Ophthalmology. –1993.–N.111.–P.1273–1278 doi: 10.1001/archophth.1993.01090090125030.
174. Pisella P.J., Conjunctival proinflammatory and proapoptotic effects of latano-prost and preserved and unpreserved timolol: an ex vivo and in vitro study / P.J. Pisella, C.Debbasch, P.Hamard, C. Creuzot-Garcher, P.Rat, F. Brignole, C. Baudouin.– Text:unmediated// Investigative Ophthalmology& Vision Science. –2004.–N.45.–P.1360–1368 doi: 10.1167/iovs.03-1067.
175. Pisella, P.J. Comparison of the effects of preserved and unpreserved formulations of timolol on the ocular surface of albino rabbits/ K. Fillacier, P.P. Elena, C.Debbasch, C. Baudouin.– Text: unmediated // Ophthalmic Research. - 2000.- Vol. 1.- N.32.- P.3-8 doi: 10.1159/000055579.
176. Pisella, P.J. Prevalence of ocular symptoms and signs with preserved and preservative free glaucoma medication/ P.J. Pisella, P. Pouliquen, C. Baudouin // British Journey of Ophthalmology. –2002.– Vol.86.– N.4.–P.418-423. doi: 10.1136/bjo.86.4.418.

177. Pomin, V.H. Antimicrobial Sulfated Glycans: Structure and Function / V.N. Pomin.– Text: unmediated// Current Topics in Medicinal Chemistry. – 2017.–Vol.3.–N.17.–P.319-330. doi: 10.2174/1568026615666150605104444.
178. Pomin, V.H. Sulfated glycans in inflammation/ V.H. Pomin.– Text: unmediated// European Journal of Medical Chemistry. –2015.–Vol. 6.–N.92.–P.353-369. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.01.002.
179. Prinz, R.D. Elimination of breast tumor–associated chondroitin sulfate promotes metastasis/ R.D. Prinz, C.M. Willis, A. Vilorio–Petit, M. Kluppel.– Text: unmediated // Genetics and Molecular Research. –2011.–Vol. 10.–N. 4. –P. 3901–3913.
180. Prum, B.E. Primary Open-Angle Glaucoma Preferred Practice Pattern Guideline/ B.E. Prum, L.F. Rosenberg, S.J. Gedde, S.L. Mansberger, J.D. Stein [et. al].– Text: unmediated //Ophthalmology. –2016.–Vol.1.–N. 123.–P.41-111. doi: 10.1016/j.ophtha.2015.10.053.
181. Rahmatnejad, K. The Effects of Latanoprost with Benzalkonium Chloride Versus Travoprost with SofZia on the Ocular Surface / K.Rahmatnejad, C.J. Rapuan, P. Ichhpujani [et al].– Text: unmediated// Eye Contact Lens. –2018.– V.44.– N.2.–P.93-98. doi: 10.1097/ICL.0000000000000405.
182. Ramli, N. Ocular Surface Disease in Glaucoma: Effect of Polypharmacy and Preservatives / N. Ramli, G. Supramaniam, A. Samsudin, A. Juana, M.Zahari, M.M. Choo // Optometry and Vision Science. –2015–Vol. 9–N. 92.–P.222-226 doi: 10.1097/OPX.0000000000000542.
183. Report of the International Dry Eye WorkShop (DEWS) / No author listed. – Text: unmediated// Ocular Surface- 2007.–Vol. 5.–N. 2.–P.65-204. doi: 10.1016/s1542-0124(12)70086-1.
184. Rigas, B. NSAID-induced corneal melt: Clinical importance, pathogenesis, and risk mitigation/ B. Rigas, W. Huang, R. Honkanen. – Text:

- unmediated // Survey of Ophthalmology. –2020.– Vol.65.– N.1.–P.1-11. doi: 10.1016/j.survophthal.2019.07.001.
185. Rogov, A.G. Mitochondrial Dysfunctions May Be One of the Major Causative Factors Underlying Detrimental Effects of Benzalkonium Chloride.– A.G. Rogov, T.N. Goleva, E.I. Sukhanova.– Text: electronic // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. –2020.–Article:8956504. doi: 10.1155/2020/8956504
186. Rosenwasser G.O. Complications of topical ocular anesthetics / G.O. Rosenwasser.– Text: unmediated // International Ophthalmology Clinic. – 1989.–Vol.3.–N.29.–P.153-158. doi: 10.1097/00004397-198902930-00005.
187. Rossi,G.C. Dry eye syndrome-related quality of life in glaucoma patients / G.C. Rossi, C. Tineli, G.M. Pasinetti, G.Milano, P.E. Bianchi.– Text: unmediated// European Journal of Ophthalmology. –2009.–Vol.19.– N.4.–P.572-579. doi: 10.1177/112067210901900409.
188. Saisyo A. The Risk of Microbial Contamination in Multiple-Dose Preservative-Free Ophthalmic Preparations / A.Saisyo, R. Shimon, S. Oie, K. Kimur, H. Furukawa.– Text: unmediated // Biological and Pharmaceutical Bulletin. –2017.–Vol.40.–N.2.–P.182-186. doi: 10.1248/bpb.b16-00688.
189. Scelfo,C. Ocular Surface Disease in Glaucoma Patients/ C. Scelfo, R.H. El Sheikh, M.M. Shamim, J. Abbasian, A. Ghaffarieh, A.M. Elhusseiny.– Text: unmediated // Current Eye Research. –2022.– N.22.–P.1-12. doi: 10.1080/02713683.2022.2041041.
190. Schnabelrauch, M. Sulfated glycosaminoglycans as promising artificial extracellular matrix components to improve the regeneration of tissues/ M.Schnabelrauch, D. Scharnweber, J.Schiller.– Text: unmediated // Current Medical Chemistry. –2013.– Vol.20.–N.20.–P.2501-2523. doi: 10.2174/0929867311320200001.
191. Seino, S. Effects of Benzalkonium Chloride in Ophthalmic Eyedrop Medications on Corneal Epithelium/ S. Seino, Y.Takada, S. Saika.– Text:

- unmediated // *Yakugaku Zasshi*. –2021.– Vol.141.–N.1.– P.35-39. doi: 10.1248/yakushi.20-00177-1.
192. Shen, H.C. Toxic keratopathy associated with topical abuse of low-concentration anesthetics: A report of two cases / H.C. Shen, Y.C. Hou.– Text: unmediated // *Indian Journal of Ophthalmology*. – 2020.– Vol.68.–N.5.– 903-904. doi: 10.4103/ijo.IJO_1323_19.
193. Shustermann, D. Does Haber's Law Apply to Human Sensory Irritation?/ D.Shustermann, E. Matovinovic, A.Salmon.– Text: unmediated // *Inhalation Toxicology*. –2006.–N.18.–P. 457–471. doi: 10.1080/08958370600602322.
194. Sobolewska, B. Cytotoxic Effect of Voriconazole on Human Corneal Epithelial Cells/ B.Sobolewska, G. Guerel, J. Hofmann, B.Tarek, K.U. Bartz-Schmidt, E. Yoeruek // *Ophthalmic Research*. –2015.–Vol.54.–N.1.–P.41-47. doi: 10.1159/000371712.
195. Stalmans, I. Goal study group. Signs and Symptoms of Ocular Surface Disease: The Reasons for Patient Dissatisfaction with Glaucoma Treatments/ I. Stalmans, H. Lemij, J. Clarke, C. Baudouin // *Clinical Ophthalmology*. – 2020.–N.14.– P.3675-3680. doi: 10.2147/OPHTH.S269586.
196. Stanton, D. A Novel Method to Eliminate Preservatives in Eye Drops/ D. Stanton, C Batich, G. Schultz [et al.]// *Journal of Ocular Pharmacology and Therapy*. –2018.– Vol. 34.– N.8.– P.584-589. doi: 10.1089/jop.2018.0042.
197. Steven D.W. Preservatives in glaucoma medication/ D.W. Steven, P. Alagband, K.S. Lim. – Text: unmediated// *British Journal of Ophthalmology*. – 2018. –Vol.102.–N.11.–P.1497-1503. doi: 10.1136/bjophthalmol-2017-311544.
198. Talamo, J.H. Delayed Epithelial Closure After PRK Associated with Topical Besifloxacin Use/ J.H. Talamo, K.M. Hatch, E.C. Woodcock.– Text: unmediated // *Cornea*. –2013.–Vol. 32.–N.10.–P.1365-1368. doi: 10.1097/ICO.0b013e31829e1e8c.

199. Tapply, I. Improving Adherence to Topical Medication in Patients with Glaucoma/ I. Tapply, D.C. Broadway.– Text: unmediated// Patient Preferences and Adherence. – 2021. –N.15.–P.1477-1489. doi: 10.2147/PPA.S264926.
200. Taylor, K.R. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation/ K.R. Taylor, R.L. Gallo.– Text: unmediated // The FASEB Journal. – 2006. – Vol. 20.- №1.- P.9-22. doi: 10.1096/fj.05-4682rev.
201. Tripathi, B.J. Cytotoxic effects of benzalkonium chloride and chlorobutanol on human corneal epithelial cells in vitro / B.J. Tripathi, R.C.Tripathi // Lens and eye toxicity research. –1989.–Vol.6.–№3.–P.395-403.
202. Vignesh A.P. A Case Report of Severe Corneal Toxicity following 0.5% Topical Moxifloxacin Use / A.P. Vignesh, R. Srinivasan, S. Karanth.– Text: unmediated // Case Reports in Ophthalmology. –2015.–Vol.6.–N.1.–P.63-65. doi: 10.1159/000376606.
203. Vijay Zawar, S. Corneal deposit after topical ciprofloxacin as postoperative medication after cataract surgery/ S.Vijay Zawar, S. Mahadik.– Text: unmediated // Canadian Journal of Ophthalmology. –2014.–Vol.49.–N.4.–P.392-394. doi: 10.1016/j.jcjo.2014.04.013.
204. Vitoux, M.A. Benzalkonium chloride-induced direct and indirect toxicity on corneal epithelial and trigeminal neuronal cells: proinflammatory and apoptotic responses in vitro/ M.A. Vitoux, K. Kessal, S. Melik Parsadaniantz [et al.]– Text: unmediated // Toxicology Letters. –2020.–N.319.– P.74-84. doi: 10.1016/j.toxlet.2019.10.014.
205. Volpi, N. Chondroitin Sulfate Safety and Quality/ N. Volpi.– Text: unmediated// Molecules. – 2019.– Vol. 24. – N.8.– P.1447. doi: 10.3390/molecules24081447.
206. Volpi, N. Effects of glycosaminoglycans on U-937 leukemia cell proliferation and differentiation: structure-function relationship/ N. Volpi, M.

- Petrini, A. Conte, P. Venturelli, L. Bolognani, G. Ronca.– Text: unmediated // *Experimental Cell Research*. –1994.–Vol.1.–N.215.– P.119-130. doi: 10.1006/excr.1994.1323.
207. Walsh, K. The use of preservatives in dry eye drops/ K.Walsh, L.Jones. – Text: unmediated // *Clinical Ophthalmology*. –2019. –N. 13.–P.1409-1425. doi: 10.2147/OPTH.S211611.
208. Wang, L. Characteristics of Toxic Keratopathy, an In Vivo Confocal Microscopy Study./ L.Wang, Y. Zhang, Z. Wei, K. Cao, G. Su, P. Hamrah, A. LAbbe, Q. Liang.– Text: unmediated // *Translation Vision Science & Technology*. –2021. –Vol.10. – N.11. –P.11. doi: 10.1167/tvst.10.11.11.
209. Wilson, F.M. Adverse external ocular effects of topical ophthalmic therapy: an epidemiologic, laboratory, and clinical study/ F.M. Wilson. – Text: unmediated // *Transactions of the American Ophthalmological Society*. –1983.–Vol.81.–P.854-965.
210. Wilson, F.M. II. Adverse external ocular effects of topical ophthalmic medications/ F.M. Wilson.– Text: unmediated // *Survey of Ophthalmology*. – 1979.–Vol. 24.–P.57–88. doi: 10.1016/0039-6257(79)90125-5.
211. Wilson, W.S. Effect of benzalkonium chloride on the stability of the precorneal tear film in rabbit and man/ W.S. Wilson, A.J. Duncan, J.L. Jay.– Text: unmediated // *British Journal of Ophthalmology*. –1975– Vol 11.– N. 59.– P. 667-669. doi: 10.1136/bjo.59.11.667.
212. Wong, J.K. Evaluation of Adverse Effects of Topical Glaucoma Medications on Trabeculectomy Outcomes Using the Glaucoma Medications Intensity Index/ J.K. Wong, T.K. Leung, J.S. Lai, J.C. Chan.– Text: unmediated // *Ophthalmology and Therapy*. – 2022.– Vol.11.– N.1.– P.387-401. doi: 10.1007/s40123-021-00447-x.
213. Wu, H. Genoprotective effect of hyaluronic acid against benzalkonium chloride-induced DNA damage in human corneal epithelial cells / H.Wu, H.Zhang, C. Wang, Y. Wu, J. Xie, X. Jin, J. Yang, J.Ye.– Text: unmediated// *Molecular Vision*. – 2011.–Vol.17.– P.3364-3370.

214. Wu, H. Effects of benzalkonium chloride on growth and survival of Chang conjunctival cells/ H.Wu, H. Zhang, Ch. Wang [et al.].– Text: unmediated // Investigative Ophthalmology & Vision Science. – 1999. – T.40. – №3. – P.619-630.
215. Xiong, C. A Rabbit Dry Eye Model Induced by Topical Medication of a Preservative Benzalkonium Chloride/ C. Xiong, D. Chen, J. Liu, B. Liu. – Text: unmediated // Investigative Ophthalmology & Vision Science. – 2008.– Vol. 49.–P.1850-1856. doi: 10.1167/iovs.07-0720.
216. Yagci, A. Topical anesthetic abuse keratopathy: a commonly overlooked health care problem/ A.Yagci, B. Bozkurt, S. Egrilmez.– Text: unmediated // Cornea. – 2011.–Vol. 30.–№5.–P.571-575. doi: 10.1097/ico.0b013e3182000af9.
217. Yamashiro C. Benzalkonium chloride-induced myofibroblastic transdifferentiation of Tenon's capsule fibroblasts is inhibited by coculture with corneal epithelial cells or by interleukin-10/ C. Yamashiro, K. Tokuda, Y. Kobayashi [et al.].– Text: unmediated // Scientific Report. – 2021. – T.11.– N.1.–P.16096. doi: 10.1038/s41598-021-94852-8.
218. Yang, T. Norfloxacin induces apoptosis and necroptosis in human corneal epithelial cells/ T.Yang, T.J. Fan, B.Xu.– Text: unmediated // Toxicology In Vitro. – 2020.– N.66.– Article: 104868. doi: 10.1016/j.tiv.2020.104868.
219. Ye, J. Role of benzalkonium chloride in DNA strand breaks in human corneal epithelial cells/ J.Ye, H.Wu, H. Zhang.– Text: unmediated // Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology. – 2011.–Vol. 249.– N.11.–P.1681-1687. doi: 10.1007/s00417-011-1755-0.
220. Ye, J. Cytoprotective effect of hyaluronic acid and hydroxypropyl methylcellulose against DNA damage induced by thimerosal in Chang conjunctival cells/ J. Ye, H. Zhang, H.Wu, C. Wang, X. Shi X., J. Xie, J.He, J.Yang.– Text: unmediated // Graefe's Archive for Clinical and Experimental

- Ophthalmology–2012.–Vol.250.–N.10.–P.1459-1466. doi: 10.1007/s00417-012-2087-4.
221. Yeniad, B. Toxic keratopathy due to abuse of topical anesthetic drugs/ B. Yeniad, S. Canturk, F. Ozdemir.– Text: unmediated// Cutaneous and Ocular Toxicology. – 2010.–Vol.29.–N.2.– P.105-109. doi: 10.3109/15569521003631752.
222. Yu F., Liu X., Zhong Y., Guo X., Li M., Mao Z., Xiao H., Yang S. Sodium hyaluronate decreases ocular surface toxicity induced by benzalkonium chloride-preserved latanoprost: an in vivo study/ F.Yu, X.Liu, Y. Zhong, X.Guo, M.Li, Z.Mao, H.Xiao, S.Yang.– Text: unmediated// Investigative Ophthalmology & Vision Science. – 2013. – Vol.9. – N.54.– P.3385-3393. doi: 10.1167/iovs.12-11181.
223. Yu, Z. A human cornea-on-a-chip for the study of epithelial wound healing by extracellular vesicles/ Z. Yu, R. Hao, J.Du [et al.].– Text: unmediated// iScience.–2022.–Vol.25.–N.5.–P. 104200. doi: 10.1016/j.isci.2022.104200.
224. Zhang, X. Ocular Surface Disease and Glaucoma Medications: A Clinical Approach/ X. Zhang, S. Vadoothker, W.M. Munir, O.Saedi. – Text: unmediated // Eye Contact Lens. – 2019.– Vol.45.–N.1.–P.11–18. doi: 10.1097/ICL.0000000000000544.
225. Zhang, E. Effects of Regular/Dilute Proparacaine Anesthetic Eye Drops in Combination with Ophthalmic Antibiotics on Corneal Wound Healing/ E.Zhang, S. Gupta, E. Olson, P.R. Sinha, N.P. Hesemann, F.W. Fraunfelder, R.R. Mohan.– Text: unmediated // Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics. –2022.– Vol.38.–N.3.–P.232-239. doi: 10.1089/jop.2021.0116.
226. Zhang H., Wu H., Yang J., Ye J. Sodium perbarate and benzalkonium chloride induce DNA damage in Chang conjunctival epithelial cells/ H. Zhang, H.Wu, J.Yang, J. Ye.– Text: unmediated // Cutaneous and Ocular Toxicology. – 2017.–Vol.36.–N.4.–P.336-342. doi: 10.1080/15569527.2017.1291664.

227. Zhou, X. A Narrative Review of Ocular Surface Disease Related to Anti-Glaucomatous Medications/ X.Zhou, X. Zhang, D. Zhou, X. Duan.– Text: unmediated // Ophthalmology and Therapy. –2022. doi: 10.1007/s40123-022-00557-0.
228. Zhirong, L. A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride/ L. Zhirong, L. Xiaochen, Zh. Tong, W. Yihui. Text: unmediated// Molecular Vision. – 2011.–Vol. 25.–N.17.–P.257–264.