

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

**КОДУНОВ АЛЕКСЕЙ МИХАЙЛОВИЧ**

**ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ПОСТОЖОГОВОЙ  
НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ РОГОВИЦЫ У ЖИВОТНЫХ  
В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

3.1.5. – Офтальмология

3.3.3. – Патологическая физиология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Терещенко Александр Владимирович,

доктор медицинских наук

Темнов Андрей Александрович

Калуга – 2022

## Оглавление

<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>5</b>
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1. Роль патологического ангиогенеза в структуре заболеваний роговицы.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2. Физиологический ангиогенез .....</b>	<b>15</b>
<b>1.2.1. Биомеханические факторы, регулирующие ангиогенез.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2.2. Биологически активные вещества, стимулирующие ангиогенез .....</b>	<b>17</b>
<b>1.2.3. Биологически активные вещества, ингибирующие ангиогенез.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2.4. Метаболическая регуляция ангиогенеза .....</b>	<b>19</b>
<b>1.3. Неоваскулогенез в роговице .....</b>	<b>21</b>
<b>1.3.1. Роль патологического ангиогенеза в ожогах глаз.....</b>	<b>22</b>
<b>1.3.2. Роль НАДФ-оксидазы в патологическом ангиогенезе роговицы .....</b>	<b>22</b>
<b>1.4. Виды ожогов глаз .....</b>	<b>24</b>
<b>1.4.1. Термический ожог .....</b>	<b>25</b>
<b>1.4.2. Химические ожоги .....</b>	<b>26</b>
<b>1.4.3. Кислотный ожог .....</b>	<b>27</b>
<b>1.4.4. Щелочной ожог.....</b>	<b>28</b>
<b>1.5. Лечение ожогов глаз.....</b>	<b>29</b>
<b>1.6. Лечение постожоговой неоваскуляризации роговицы .....</b>	<b>31</b>
<b>1.6.1. АнтиVEGF-терапия в лечении роговичной неоваскуляризации.....</b>	<b>32</b>
<b>1.6.2. Роль стволовых клеток в лечении роговичной неоваскуляризации.....</b>	<b>33</b>
<b>1.7. Роль паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в лечении роговичной неоваскуляризации .....</b>	<b>35</b>
<b>1.7.1. Прорегенераторный эффект стволовых клеток.....</b>	<b>36</b>
<b>1.7.2. Антиапоптотический эффект стволовых клеток.....</b>	<b>37</b>
<b>1.7.3. Противовоспалительный эффект стволовых клеток .....</b>	<b>38</b>

1.8. Применение пептидов, полученных из мезенхимальных стволовых клеток, в лечении ожогов глаз .....	38
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ .....</b>	<b>41</b>
2.1. Общая характеристика этапов эксперимента .....	41
2.2. Получение белково-пептидного комплекса из культивированных стволовых клеток.....	45
2.3. Этап 1. Моделирование и лечение центрального термического ожога роговицы кроликов с применением белково-пептидного комплекса .....	48
2.4. Этап 2. Моделирование и лечение периферического термического ожога с повреждением лимбальной зоны роговицы кроликов с применением белково-пептидного комплекса.....	50
2.5. Этап 3. Разработка модели постожогового неоваскулярного бельма роговицы крыс и характеристика этапов его развития .....	52
2.6. Этап 4. Лечение постожогового неоваскулярного бельма роговицы крыс с применением белково-пептидного комплекса.....	53
2.7. Методы инструментальных исследований.....	55
2.8. Методы гистологического и морфологического исследования роговицы экспериментальных животных.....	56
2.9. Хемилюминисцентный анализ активности НАДФ-оксидазы.....	57
2.10. Статистические методы исследования.....	58
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ ТЕРМИЧЕСКИХ ОЖОГОВ РОГОВИЦЫ И ПРОФИЛАКТИКИ РАЗВИТИЯ НЕОВАСКУЛЯРНОГО ПОМУТНЕНИЯ РОГОВИЦЫ .....</b>	<b>59</b>
3.1 Результаты применения белково-пептидного комплекса для лечения термического ожога центральной зоны роговицы кролика (этап 1) .....	59
3.1.1 Оценка состояния роговицы и глубжележащих сред по данным инструментальных и лабораторных исследований.....	60
3.1.2. Результаты гистологического исследования .....	71
3.2. Результаты применения белково-пептидного комплекса для профилактики неоваскуляризации роговицы при термическом ожоге периферической зоны роговицы кроликов (этап 2) .....	73

3.2.1 Оценка состояния роговицы и глубжележащих сред по данным инструментальных и лабораторных исследований.....	73
3.2.2. Результаты гистологического исследования .....	80
<b>ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ ПОСТОЖОГОВОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ РОГОВИЦЫ .....</b>	<b>86</b>
4.1. Результаты применения белково-пептидного комплекса при лечении постожогового неоваскулярного бельма роговицы (этап 4) ...	86
4.1.1. Разработка модели постожогового неоваскулярного бельма роговицы и характеристика этапов его развития (этап 3).....	87
4.1.1.1. Результаты биомикроскопического исследования.....	87
4.1.1.2. Результаты оптической когерентной томографии переднего отрезка глаза .....	89
4.1.1.3. Результаты исследования площади поражения роговицы.....	93
4.1.1.4. Результаты гистологического исследования .....	95
4.1.2. Оценка состояния роговицы и глубжележащих сред по данным инструментальных и лабораторных исследований при лечении постожогового неоваскулярного бельма роговицы.....	99
4.1.2.1. Результаты оптической когерентной томографии роговицы при лечении постожогового неоваскулярного бельма роговицы (этап 4) .....	103
4.1.2.2. Результаты исследования площади поражения роговицы при лечении постожогового неоваскулярного бельма роговицы (этап 4) .....	107
4.1.2.3. Результаты гистологического исследования при лечении постожогового неоваскулярного бельма роговицы (этап 4).....	109
4.1.3. Результаты влияния белково-пептидного комплекса на активность НАДФ-оксидазы.....	111
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>116</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>132</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>	<b>134</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>136</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>137</b>

# ВВЕДЕНИЕ

## Актуальность темы исследования

Патологии роговицы являются одной из основных причин потери зрения. В настоящее время от заболеваний роговицы страдают более 10 миллионов человек в мире (Керимов К.Т., 2005; Куликов А.Н., Черныш В.Ф., Чурашов С.В., 2020). Возникновение патологических изменений роговицы может быть обусловлено различными этиологическими факторами: травматические повреждения, ожоги глаз, инфекции, ятрогенные причины и дефицит лимбальных стволовых клеток (возрастная дегенерация и дистрофия роговицы).

Ожоги относятся к одному из самых тяжелых повреждений органа зрения и составляют от 16,1% до 38% всех травм глаза (Алексеева Г.Ф., 1995, Ахмедов А.А., Основные аспекты травмы зрения, труды МНИИГБ им.Гельмгольца. М., стр. 171-172, 1998). Тяжесть ожоговой травмы обуславливается характером изменений в тканях и нередким повреждением обоих глаз. Несмотря на огромный опыт лечения ожогов в отечественной и зарубежной офтальмологии, более 40% пострадавших становятся инвалидами (, Гусейнова А.А., Мирсакулова Л.П.Комплексная антиоксидантная терапия при ожогах органа зрения, Офтальмология, №3, стр 34-42, Керимов К.Т., 1997).

Борьба с последствиями ожогов трудна, требует сложных многократных пластических операций и далеко не всегда приводит к успеху. Одной из причин наиболее серьезных осложнений является неоваскуляризация роговицы (Черныш, В.Ф, Бойко Э.В., 2017; Керимов К.Т., Джафаров А.И., Гахраманов Ф.С., 2005). В настоящее время распространенность неоваскуляризации роговицы в США оценивается в 1,4% случаев среди всех заболеваний органа зрения (Dobrowolsky D., Orzechowska-Wylegala B.,

Wylegala E., 2011). В России частота встречаемости васкуляризированных бельм органа зрения в 2001 году составила 25,4% случаев среди всех исходов травм глаз (Алексеева Г.Ф., Бордюгова Г.Г., 2001). Самым эффективным вариантом лечения неоваскулярных бельм роговицы на сегодняшний день является ее трансплантация, самым часто используемым методом – кератопластика. Однако существуют проблемы, связанные с доступностью донорской ткани, ограниченной выживаемостью аллотрансплантата и длительным использованием иммуносупрессоров. Кроме того, трансплантация роговицы недоступна многим пациентам из-за высоких затрат на хирургическое вмешательство и последующую реабилитацию.

Современные варианты лечения неоваскуляризации роговицы включают местную противовоспалительную терапию, главным образом, кортикостероиды, и местное введение ингибиторов VEGF (Avisar I., Weinberger D., Kremer, I., 2010; Sener E., Yuksel N., Yildiz D.K., Yilmaz B., Ozdemir O., Caglar Y., Degirmenci E., 2011). Оба варианта могут быть эффективными в некоторых случаях, но имеют существенные ограничения. Побочные эффекты, вызванные кортикостероидами, исключают их длительное применение, кроме того, даже кратковременное применение во многих ситуациях может способствовать пролонгации воспаления и снижению регенерации тканей. Поддержание достаточного уровня анти-VEGF препаратов в тканях роговицы не только сложно контролируемо, но и потенциально может негативно повлиять на процессы восстановления тканей. Во многих работах (O'Reilly M.S., et al. 1994; Galie P.A., et al., 2014) утверждается, что, несмотря на значительный регресс новообразованных сосудов после 30-дневного курса ингибирования ангиогенеза с помощью анти-VEGF терапии в тканях роговицы сохраняются новообразованные сосуды со значительно суженным диаметром русла и содержащимися в них единичными эритроцитами. Данные сосуды облегчают повторную реваскуляризацию ткани путем запуска процесса гипердилатации, прорастают и остаются в роговице,

несмотря на агрессивную антиангиогенную терапию, сохраняя свои неповрежденные стенки с анормальным эндотелием.

Примечательно, что обратный ангиогенез после прекращения анти-VEGF терапии проявляется уже в течении 24 часов. На клеточном уровне он характеризуется возвращением перицитов в стенки ранее запустевших сосудов, что быстро восстанавливает нормальную функционирующую структуру этих сосудов, а это, в свою очередь, увеличивает их перфузию и кровоток (Erdurmus M., Yagci R., Yilmaz B., Hepsen I.F., Turkmen C., Aydin B., Karadag R., 2007) никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ) оксидазы (Li S.M., 2010). НАДФН-оксидаза – это важный источник АФК, который опосредует передачу сигналов при окислительно-восстановительной реакции в процессах заживления (Chan E., 2014). Таким образом, существует сложное взаимодействие между выработкой АФК и передачей VEGF-сигналов, и окончательная роль НАДФ-оксидазы в этом процессе еще не определена.

Постожоговый патологический неоангиогенез роговицы резко ухудшает прогноз лечения неоваскулярных бельм, а также исход кератопластики. Для успешной приживляемости трансплантата требуется проведение комплекса мер по подавлению или устранению новообразованных сосудов роговицы.

Одним из перспективных направлений в лечении неоваскуляризации роговицы может быть использование стволовых или прогениторных клеток, получаемых как из костного мозга, так и из лимбальной области. В литературе описано активное использование данных клеток в лечении термических травм не только глаз, но и других органов (Самойлов А.С., Астрелина Т.А., Аксененко А.В. и др., 2019). Паракринные факторы, выделяемые стволовыми клетками, обладают противовоспалительным, антиапоптотическим и прорегенераторным действием. Однако существуют препятствия для клинического применения данного метода. Так, в случае ожоговой травмы трансплантацию клеток в поврежденную область необходимо провести в течение первых 12 часов, что делает невозможным использование аутологичных (собственных) стволовых клеток в связи с нехваткой времени

для их выделения и культивирования, а применение аллогенных клеток возможно только после их предварительного криоконсервирования и последующей разморозки перед трансплантацией, что негативным образом влияет на жизнеспособность и функциональную активность трансплантированных клеток. (Хубутия М.С. с соавт., 2014). Кроме того, в литературе отсутствуют данные об эффективности стволовых клеток для лечения уже сформированных сосудов в роговице.

Таким образом, в настоящее время не существует эффективного способа профилактики и лечения постожоговой неоваскуляризации роговицы, однако данные о применении лимбальных и мезенхимальных стволовых клеток говорят о перспективности этого направления. Вероятным путем решения этой проблемы может быть использование паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Эти факторы возможно выделить из культивированных в условиях особого микроокружения стволовых клеток, которые вырабатывают в окружающую среду необычайно высокие титры биологически активных веществ. Получаемый белково-пептидный комплекс с высокой концентрацией паракринных факторов возможно использовать для профилактики и лечения постожогового неоангиогенеза роговицы (Хубутия М.С., Вагабов А.В., Темнов А.А., Склифас А.Н., 2014).

### **Цель исследования**

обосновать применение паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса в профилактике и лечении постожоговой неоваскуляризации роговицы и оценить их эффективность в эксперименте.

### **Задачи исследования:**

1. На основании клинических и гистологических методов исследования на модели центральной термической ожоговой травмы роговицы оценить эффективность влияния паракринных факторов мезенхимальных стволовых



клеток в составе белково-пептидного комплекса на репаративные свойства роговицы.

2. На основании клинических и гистологических методов исследования на модели периферической термической ожоговой травмы роговицы с захватом лимбальной зоны оценить эффективность паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса в профилактике периферического постожогового ангиогенеза роговицы.

3. На модели хронической постожоговой неоваскуляризации роговицы, вызванной химическим повреждением, на основании клинических и гистологических методов исследования оценить эффективность применения паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса в достижении обратного ангиогенеза сосудов роговицы.

4. Провести сравнительный анализ эффективности применения разных фракций белково-пептидного комплекса на модели хронической постожоговой неоваскуляризации роговицы в достижении обратного ангиогенеза сосудов роговицы.

5. Обосновать применение паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса для профилактики и лечения постожоговой неоваскуляризации роговицы на основе оценки активности никотинамидадениндинуклеотидфосфат оксидазы.

### **Научная новизна**

1. Впервые установлено, что применение паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса улучшают репаративные свойства и оказывают антиангиогенный эффект при центральном ожоге роговицы и периферическом ожоге с захватом лимбальной области с восстановлением прозрачности роговицы к 14-м суткам и толщины роговицы к 30-м суткам после термического воздействия за счет подавления воспалительной реакции.

2. Впервые показано, что паракринные факторы мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса приводят к обратному развитию патологических сосудов, восстановлению прозрачности и толщины роговицы в модели хронической постожоговой неоваскуляризации к 30-м суткам после химического воздействия.
3. Продемонстрировано, что фракция белково-пептидного комплекса до 30 кДа обладает основным антиангиогенным потенциалом, сопоставимым по своей активности с общей фракцией.
4. Впервые посредством хемилюминисцентного анализа обосновано, что общая фракция белково-пептидного комплекса и фракция до 30 кДа в соизмеримой степени подавляют активность никотинамидадениндинуклеотидфосфат оксидазы в очаге воспаления.

### **Практическая значимость**

1. Разработана модель химического повреждения роговицы с захватом лимбальной области и конъюнктивы, которая является воспроизводимой, позволяет добиться устойчивой неоваскуляризации поврежденных тканей роговицы и может использоваться для дальнейшего изучения неоваскуляризации роговицы.
2. Доказана эффективность применения паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток путем инстилляций в конъюнктивальную полость белково-пептидного комплекса для профилактики постожоговой неоваскуляризации роговицы.
3. Доказана эффективность применения паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток путем инстилляций в конъюнктивальную полость белково-пептидного комплекса в лечении сформированного неоваскулярного бельма посредством запуска процесса инволюции новообразованных сосудов роговицы.

4. Доказана сопоставимая с общей фракцией белково-пептидного комплекса антиангиогенная активность фракции до 30 кДа в лечении постожоговой неоваскуляризации роговицы в эксперименте.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Разработанная технология профилактики и лечения постожоговой неоваскуляризации роговицы, заключающаяся в инстилляциях в конъюнктивальную полость белково-пептидного комплекса, позволяет ускорить репаративные процессы в тканях роговицы при центральном термическом ожоге и предотвратить формирование неоваскулярного бельма роговицы при периферическом ожоге с захватом лимбальной области, а также стимулирует процессы обратного ангиогенеза в модели хронической постожоговой неоваскуляризации роговицы при использовании как общей фракции белково-пептидного комплекса, так и фракции до 30 кДа.

2. Использование паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса, по данным хемилюминисцентного анализа, подавляет хронический постожоговый воспалительный процесс посредством снижения активности никотинамидадениндинуклеотидфосфат оксидазы и запускает процессы обратного ангиогенеза патологических сосудов роговицы.

### **Внедрение в практику**

Разработанные методы профилактики постожоговой неоваскуляризации роговицы при термическом ожоге и терапии при уже сформировавшемся неоваскулярном бельме при лечении постожоговой неоваскуляризации роговицы внедрены в практику исследовательских работ на экспериментальных животных в Калужском филиале Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства

здравоохранения Российской Федерации (ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России) и в научной лаборатории Института биофизики клетки Российской академии наук (ИБК РАН) Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

### **Апробация работы**

Основные материалы работы доложены и обсуждены на I Международном медико-биологическом конгрессе критических состояний (Москва, 2016); XV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Федоровские чтения-2018» (Москва, 2018); Международной конференции по офтальмологии «Восток-Запад-2019» (Уфа, 2019); XII Съезде общества офтальмологов России (Москва, 2020); онлайн конференции «Лига молодых офтальмологов» (Уфа, онлайн, 2021); XXXII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Оренбургская Конференция Офтальмологов - 2021» (Оренбург, онлайн, 2021).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликованы 13 работ, из них 7 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ, а также 1 публикация в зарубежном издании, индексируемом в Web of Science и Scopus; получен 1 патент на изобретение №2635540.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 157 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, двух глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложения. Работа иллюстрирована 51

рисунком и 11 таблицами. Список литературы содержит 159 источников, из них 32 публикации отечественных и 127 – иностранных авторов.

Работа выполнена на базе Калужского филиала ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, научной лаборатории «Института биофизики клетки» Российской академии наук ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Потеря зрения – это глобальная проблема современности.

По оценкам экспертов, число людей с различными нарушениями зрения или слепотой составляет 285 миллионов человек во всем мире, причем 39 миллионов из этого числа – абсолютно слепые люди [28]. Самым печальным является увеличение количества слепых на 1-2 млн каждый год [12]. Эти люди теряют свою работоспособность и обычно имеют низкое качество жизни.

Болезни роговицы являются основной причиной потери зрения. По данным эпидемиологического анализа, частота встречаемости патологий роговицы коррелирует с уровнем экономического развития страны и составляет от 10 до 50% среди общего числа слепых и слабовидящих [31, 8, 10]. На данный момент более 10 миллионов человек в мире имеют низкое зрение именно из-за болезней и поражений роговицы. Эти заболевания могут быть вызваны различными клиническими состояниями, включая травматическое повреждение, химические ожоги (кислотное и щелочное воздействие), инфекционные поражения роговицы, различные ятрогенные причины, а также дефицит лимбальных стволовых клеток, следствием которого являются такие заболевания роговицы, как ее возрастная дегенерация и дистрофия [12].

Подсчитано, что непосредственные ежегодные затраты здравоохранения в группе пациентов с заболеваниями роговицы в 2010 году превысили 11 000 долларов США на человека в развитых странах мира (данные анализа эффективности затрат Канадской службы крови за 2010 год) [57, 85].

## **1.1. Роль патологического ангиогенеза в структуре заболеваний роговицы**

Патологический ангиогенез может привести к серьезному ухудшению прогноза заболеваний роговицы и обычно не имеет специфического лечения. Именно наличие новообразованных сосудов затрудняет процесс восстановления тканей роговицы и глубжележащих тканей глаза. А образование неоваскулярного бельма значительно снижает перспективы восстановления зрительных функций глаза.

В основе роста новообразованных сосудов в тканях глаза лежат сложные биохимические и иммунологические механизмы [61, 150, 143, 100, 47, 70, 69]. Вопрос о том, что является причиной врастания сосудов в роговицу, по сей день является спорным и не до конца изученным. Нарушение баланса между проангиогенными и антиангиогенными медиаторами неоваскуляризации в сторону доминирования первых может обуславливать или сопровождать развитие различных патофизиологических процессов. Такой сдвиг обеспечивает постоянную индукцию процесса неоваскуляризации [77, 78, 88, 70, 82, 112, 89, 94, 96].

Но для того чтобы говорить о неоваскуляризации, стоит понять, что такое васкуляризация. Непосредственно васкуляризация тканей осуществляется васкулогенезом и ангиогенезом. Васкулогенез представляет собой образование кровеносных сосудов из мезенхимальных клеток в эмбриогенезе или эндотелиальных клеток-предшественников, мигрирующих из красного костного мозга в постнатальном периоде (постнатальный васкулогенез) [80].

## **1.2. Физиологический ангиогенез**

Ангиогенез – процесс формирования новых сосудов из существующих обеспечивает расширение и ремоделирование сосудистой сети [158, 128].

Ключевыми участниками ангиогенеза являются эндотелиальные клетки, которые за счет миграции и пролиферации, а также взаимодействия с клетками других типов (в частности, перицитами) обеспечивают формирование новых кровеносных сосудов [158, 91]. В обычных условиях во взрослом организме интенсивность ангиогенеза невелика. Его резкая активация происходит при росте и развитии организма, регенераторных процессах, включая заживление ран [130]. В то же время нарушения ангиогенеза представляют собой важное патогенетическое звено целого ряда заболеваний, как было показано ранее.

В настоящее время регуляторы ангиогенеза могут быть разделены на механические (биомеханические) и химические [131, 158, 154]. Химические факторы, в свою очередь, включают широкий спектр биологически активных веществ, которые могут как стимулировать, так и угнетать ангиогенез, и метаболиты [80].

### **1.2.1. Биомеханические факторы, регулирующие ангиогенез**

Эндотелиальные клетки подвергаются различным механическим воздействиям, связанным с током крови: напряжению сдвига, трансэндотелиальному току жидкости, циклической деформации и др. В исследованиях различных авторов было показано, что параметры гемодинамики регулируют ангиогенные реакции эндотелиальных клеток [141, 128]. Согласно современным представлениям постоянный ламинарный поток (постоянное напряжение сдвига) способствует ангиогенной стабилизации сосудов, что обеспечивает как завершение активного ангиогенеза, так и поддержание ангиогенного покоя. Напротив, турбулентный ток крови, неадекватные параметры напряжения сдвига, повышение трансэндотелиального тока жидкости представляют собой факторы, способствующие активации ангиогенеза [16, 30].

В настоящее время установлено, что биомеханические факторы изменяют экспрессию генов и регулируют не только миграцию,



пролиферацию и апоптоз эндотелиальных клеток, но и продукцию ими химических ангиогенных факторов [142, 113, 157].

### **1.2.2. Биологически активные вещества, стимулирующие ангиогенез**

Вещества, обладающие биологической активностью и воздействующие на рост сосудов, в зависимости от оказываемого эффекта подразделяются на стимуляторы и ингибиторы [80].

Активный рост сосудов стимулирует семейство факторов роста эндотелия сосудов (VEGF), родственные к нему плацентарные факторы роста (PlGF- 1,2), основной фактор роста фибробластов (FGF-2), интерлейкин-8 (IL-8), ангиопоэтины (ANGPT-1,2), тромбоцитарные факторы роста (PDGF), трансформирующий фактор роста-бета (TGF- $\beta$ ) и другие [144].

Представители семейства VEGF и родственные к нему PlGF играют одну из ключевых ролей среди стимуляторов роста сосудов. Семейство VEGF включает VEGF-A, B, C и D. VEGF-A связывается с рецепторами VEGF (VEGFR) первого типа и VEGFR-2. VEGF-C и D, но не VEGF-A, являются лигандами для третьего рецептора VEGFR-3. VEGF-A стимулирует миграцию, пролиферацию и обеспечивает выживание эндотелиальных клеток, а большинство его эффектов связано с активацией рецепторов VEGFR-2 [68]. VEGF-C способствует формированию анастомозов между растущими сосудами [145].

PlGF-1 и -2 (плацентарные факторы роста) способны взаимодействовать с VEGFR-1 и, конкурентно связывая этот рецептор, потенцировать эффекты взаимодействия VEGF-A с VEGFR-2 [140].

Факторы роста фибробластов и, в основном FGF2, взаимодействуя с рецепторами – FGFR-1, 2, 3, 4, являются мощными митогенами для эндотелиальных клеток и стимуляторами их миграции [159].

Инсулиноподобный фактор роста (IGF-1) также оказывает стимулирующее влияние на рост кровеносных сосудов, посредством

увеличения продукции IL-8. Кроме того, *in vitro* была продемонстрирована способность IGF-1 стабилизировать новообразованные сосуды [135].

IL-8 - это независимый VEGF-стимулятор ангиогенеза - индуцирует пролиферацию, миграцию и выживание эндотелиальных клеток [116].

PDGF-BB (тромбоцитарный фактор роста), небольшие дозы TGF-бета, гепаринсвязывающий фактор роста (EGF-HB) способствуют стабилизации образованных сосудов [86].

Влияние на ангиогенез ANGPT-1 и -2 происходит посредством взаимодействия с рецепторами эндотелиальных клеток Tie-2. ANGPT-1 способствует выживанию эндотелиальных клеток, образованию между этими клетками контактов, взаимодействию с перицитами, что позволяет стабилизировать образованные сосуды. ANGPT-2 является антагонистом ANGPT-1 и препятствует стабилизации сосудов. Его эффект на процессы ангиогенеза напрямую зависит от концентрации VEGF-A. В отсутствие VEGF-A ANGPT-2 стимулирует апоптоз и способствует регрессии сосудистого русла, напротив, при повышении концентрации VEGFA – стимулирует ангиогенез [134].

### **1.2.3. Биологически активные вещества, ингибирующие ангиогенез**

В настоящее время известен ряд биологически активных веществ, которые ингибируют ангиогенез. К ним относятся вазогибин-1 (VASH-1), тромбоспондины-1,2 (TSP-1,2), ангиостатины и эндостатин [16].

Тромбоспондин-1 стал одним из первых описанных в литературе эндогенных ингибиторов ангиогенеза. TSP представляют собой гликопротеиды межклеточного матрикса. TSP-1-2 обладают выраженной антиангиогенной активностью, которая реализуется за счет прямого воздействия на клетки эндотелия сосудов и за счет подавления активности проангиогенных факторов. Прямое действие тромбоспондинов подавляет миграцию, пролиферацию и индуцирует апоптоз эндотелиальных клеток. В

работе М.О. Куртуковой, И.О. Бугаевой и А.Н. Иванова было продемонстрировано, что TSP-1 проявляет антагонизм к VEGF, связывая VEGF и препятствуя его выходу из межклеточного матрикса, а также подавляя фосфорилирование VEGFR-2 [137]. Кроме того, авторы указывают на тот факт, что TSP-1 связывает и модулирует активность и других стимуляторов ангиогенеза FGF-2, PDGF и др. [16, 137].

Представляющие собой протеолитические фрагменты плазминогена ангиостатины обладают способностью подавлять ангиогенез в опухолях [118]. Они снижают миграцию, пролиферацию и увеличивает апоптоз эндотелиальных клеток, а также снижают продукцию VEGF в клетках опухоли [34]. Ангиостатины образуются в плазме, межклеточном матриксе и на поверхности клеток при участии матриксных металлопротеаз, катепсина, эластазы нейтрофилов [119].

Эндостатин представляет собой С-концевой фрагмент коллагена XVIII, он ингибирует пролиферацию эндотелиальных клеток и тубулогенез [120, 117].

Еще один фермент, ингибирующий ангиогенез, вазогибин-1 (VASH-1) образуется в эндотелиальных клетках при действии на них VEGF, FGF-2. Однако его индукции в эндотелиоцитах не происходит в условиях кислородного голодания или в присутствии таких воспалительных белков, как фактор некроза опухоли-альфа и интерлейкина-1. VASH-1 ингибирует миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток, негативно регулируя экспрессию VEGFR-2 [53].

Ингибирующие эффекты на ангиогенез были также выявлены у ряда цитокинов, в частности у IL-4 [147, 101].

#### **1.2.4. Метаболическая регуляция ангиогенеза**

Основной функцией сердечно-сосудистой системы является доставка тканям кислорода и питательных веществ, поэтому регуляция состояния сосудистой сети осуществляется и рядом метаболических условий. При этом

важнейшую роль среди метаболитов имеет кислород, а нехватка кислорода в тканях является одним из основных, запускающих ангиогенез звеньев [87].

Под влиянием гипоксии в клетках происходит активация семейства транскрипционных факторов. К ним относятся HIF-1-альфа и HIF-2-альфа. Эти транскрипционные факторы запускают синтез целого ряда стимуляторов ангиогенеза, в частности VEGF [149, 107]. Следует отметить, что HIF обеспечивают регуляцию синтеза не только VEGF, но и целого ряда стимуляторов роста сосудов, в частности PlGF, ANGPT-1-2, FGF-2, TGF-бета, IL-8, PDGFB и других [44, 86, 148]. Кроме того, состояние гипоксии в клетках модулирует продукцию антиангиогенных факторов, таких, как эндостатин и TSP1 [137, 133].

Активные формы кислорода (АФК) также являются значимыми регуляторами ангиогенеза [123]. Избыточная продукция активных форм кислорода представляет собой универсальный механизм возникновения патологических клеточных реакций, который реализуется при целом ряде заболеваний [36]. АФК стимулируют индукцию VEGF в различных типах клеток, включая гладкомышечные и эндотелиальные клетки, а также способствуют их пролиферации и миграции [123]. Кроме того, АФК являются одним из внутриклеточных сигнальных путей реализации эффектов VEGF, FGF и ANG-1.

Продукты гликолиза также являются посредниками перехода эндотелиальных клеток от фенотипа ангиогенного покоя к активному ангиогенезу [59]. В частности, показано, что лактат является одним из стимуляторов ангиогенеза. Повышенная концентрация лактата потенцирует активацию Tie-2 (рецепторов ANGPT) и VEGFR-2 [109].

Можно сказать, что ангиогенез регулируется сложной системой влияющих друг на друга механизмов. Смена периодов покоя и активного ангиогенеза обеспечивается комплексом гемодинамических и метаболических условий, а также балансом разнообразных биологически активных веществ. Биомеханическая и метаболическая регуляция ангиогенеза находится в тесной

связи с продукцией биологически активных веществ, влияющих на рост сосудов.

Кроме того, биомеханические и метаболические условия способны изменять чувствительность эндотелиальных клеток к обладающим различной ангиогенной активностью веществам. Комплексная регуляция ангиогенеза вышеперечисленными факторами обеспечивает четкую координацию его звеньев, что необходимо для ремоделирования сосудистого русла в соответствии с потребностями тканей в кровоснабжении и, безусловно, является сложнодостижимым процессом.

### **1.3. Неоваскулогенез в роговице**

Если говорить о неоваскулогенезе в роговице, то, безусловно, можно утверждать, что многие авторы рассматривают его как защитную реакцию на воспалительный агент [57, 145, 118, 101]. Последовательность событий в процессе неоваскуляризации роговицы следующая: латентный период после повреждения роговицы; последующее расширение просвета кровеносных сосудов; сокращение эндотелиоцитов и расширение контактов между ними, ведущее к повышению проницаемости сосудистой стенки, отеку стромы роговицы, деградации базальной мембраны эндотелиальных клеток; их миграция и репликация; формирование сосудистых «почек», их разрастание, образование просвета, анастомозов и базальной мембраны; регрессия части капилляров и созревание новых сосудов [130]. То есть данный процесс является повторением физиологического ангиогенеза. И для правильного лечения на патофизиологическом уровне необходимо исследование фактора или факторов, с которых запускается процесс неоваскулогенеза роговицы в результате ожоговых или других повреждений глаза.

### **1.3.1. Роль патологического ангиогенеза в ожогах глаз**

Химическое или термическое повреждение роговицы обычно приводит к обширному повреждению всего переднего сегмента глаза и остается основной причиной неоваскулогенеза роговицы [12].

Изучение патологического процесса в глазу, возникающего под влиянием повреждающего фактора, а также ответных реакций организма на ожоговую травму, представляется весьма важным в связи с возможностью установления патогенетически направленных методов лечения ожогов глаз [1, 12].

Механизм действия всех ожоговых агентов различен. Однако уже через несколько часов после ожога все меньше сохраняется индивидуальных характеристик ожогового повреждения ткани роговицы. Как бы ни была специфична денатурация белков различными поражающими агентами, в конечном счете она заканчивается разрушением молекул с образованием продуктов распада или возникновением новой антигенной специфичности белков, не свойственной нативным молекулам, а именно, образованием аутоантигенов. Однотипны и нарушения обмена веществ в тканях глаза, так как эти нарушения определяются, главным образом, гибелью клеток, в которых осуществляются процессы метаболизма [12].

### **1.3.2. Роль НАДФ-оксидазы в патологическом ангиогенезе роговицы**

Хорошо известно, что окислительный стресс, воспаление и неоваскуляризация играют решающую роль в повреждении роговицы, вызванном ожоговым фактором [31]. Ожоговое повреждение стимулируют выработку активных форм кислорода (АФК) в клетках роговицы [8]. Если продукция АФК не высокая, то окислительный стресс обычно предотвращается такими внутриклеточными антиоксидантными системами, как супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатионпероксидазы и

пероксиредоксины. АФК активно участвуют в таких различных клеточных процессах, как пролиферация, дифференцировка и вовлеченность клеток в воспалительный процесс [10, 15]. Однако, если выработка АФК превышает антиоксидантную способность клетки, высокий уровень окислительного стресса вызывает нарушение митохондриальной проницаемости и нарушает перенос электронов на мембранах митохондрий, что в конечном итоге приводит к апоптозу или некрозу. Эти данные были подтверждены рядом авторов, в работах которых было продемонстрировано, что высокий уровень окислительного стресса участвует в патогенезе таких заболеваний, как диабетическая ретинопатия [16, 40], возрастная макулярная дегенерация [153] и химическое повреждение роговицы [57].

С другой стороны, АФК действуют как вторичные посредники в запуске воспалительной реакции через активацию ядерного фактора-кВ (NF-кВ) и впоследствии стимулируют высвобождение воспалительных цитокинов [76], экспрессию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [61] и выработку матриксных металлопротеиназ (ММР). В свою очередь, воспалительный процесс, а также VEGF и ММР играют важную роль в патологической неоваскуляризации после ожогов роговицы [150].

В свою очередь, АФК в основном генерируются митохондриями и такими ферментами, как НАДФН-оксидаза, которая опосредует передачу сигналов за счет регулирования окислительно-восстановительных реакций в процессе заживления области повреждения [54]. На сегодняшний день идентифицировано несколько изоформ НАДФН-оксидазы. Они включают в себя мембраносвязанные субъединицы Nox2, Nox4 и p22phox, а также цитозольные субъединицы p40phox, p47phox, p67phox. Выработка АФК активируется в основном за счет катализации домена Nox2 [98]. Кроме того, известно, что Nox2 может запускать передачу сигналов VEGF с целью регуляции ангиогенеза, увеличивать проницаемость сосудов за счет повышения экспрессии VEGF [129].

На данный момент существует множество данных о том, что ожоговое повреждение увеличивает экспрессию изоформ НАДФ-оксидазы Nox2 и Nox4 в тканях роговицы [75], что сопровождается активным ростом новообразованных сосудов. Однако Gu XJ, Liu X, Chen YY и соавторами отмечено, что при ингибировании выработки НАДФ-оксидазы роста новообразованных сосудов не наблюдается.

Роль Nox4 в процессах восстановления роговицы после ожога щелочью была продемонстрирована Nora Y. Nakami, Gregory J. Dusting и соавторами [79]. Ими было показано, что блокирование Nox4 существенно замедляет неоваскуляризацию роговицы, снижает воспаление и фиброз, а также снижает показатель непрозрачности тканей роговицы. Эти результаты показывают, что подавление НАДФ-оксидазы может стать новой целью терапии при ожоговых повреждениях роговицы.

Несмотря на все современные исследования, роль НАДФН-оксидазы в постожоговом патологическом ангиогенезе до сих пор остается не до конца изученной [60, 150]. Существует сложное взаимодействие между АФК, VEGF и различными изоформами НАДФ-оксидазы, и, возможно, роль НАДФ-оксидазы в патологическом ангиогенезе заключается именно в их взаимодействии.

Для понимания этой роли требуется более детально углубиться в течение ожоговых процессов не только на тканевом, но и на морфологическом уровне.

#### **1.4. Виды ожогов глаз**

Изучение патологического процесса в глазу, возникающего под влиянием повреждающего фактора, а также ответных реакций организма на ожоговую травму, представляется весьма важным в связи с возможностью установления патогенетически направленных методов лечения ожогов глаз [32].



В офтальмологической литературе по этиологии принято различать две основные группы ожогов: ожоги, вызванные физическими факторами, и ожоги, вызванные контактами с химическими веществами [13].

#### **1.4.1. Термический ожог**

Термические ожоги возникают при повреждающем действии высокой температуры. Наиболее часто термические ожоги вызывают расплавленные металлы, горячий шлак, пламя, горячая вода и пар. Уже при температуре 47° через 1-2 минуты эпителий роговицы становится мутным, при 65° страдает строма, наблюдается отёк всех слоев роговицы, при 80° происходят отчётливые изменения в эндотелии, повреждаются ткани радужной оболочки и хрусталика [9, 12].

Описаны морфологические нарушения в роговице, возникающие непосредственно после экспериментального ожога. Прежде всего при термическом ожоге повреждаются эпителий и боуменова оболочка [18]. Десцеметова оболочка, несмотря на незначительную толщину (0,006 мм), нередко после ожога оказывается относительно резистентной. Только в крайних случаях, чаще в более поздние сроки, она не выдерживает внутриглазного давления, растягивается и прорывается.

Поражающее действие термического фактора сказывается не только при повышении, но и при понижении температуры, приводящем к денатурации белка и деструкции клеток. В случае глубокого повреждения в исходе процесса и возникают сосудистые бельма и другие подобные осложнения [19, 24].

При ожоге, вызванном любым повреждающим фактором, когда повреждается эпителий, резко нарушаются обменные процессы во всех тканях роговицы. Возникает дефицит аскорбиновой кислоты, рибофлавина, глутатитона, нуклеиновых кислот, липопротеинов, разрушаются ферменты, уничтожается гликоген [24].

С разрушением ферментов угнетается функция дыхания, окисления и восстановления. При гистохимических наблюдениях установлено изменение состояния коллагена под влиянием термического фактора [3]. Происходящая денатурация белков приводит к появлению в тканях токсических продуктов, таких как различные простагландины, плазмин, кислые мукополисахариды.

Итак, для первичного повреждения, вызванного термическим фактором, характерны гибель на более или менее обширном участке роговицы эпителиальных клеток и паранекроз клеток, находящихся в непосредственной близости от места поражения. Состояние паранекроза расширяется и углубляется уже после того, как действие термического агента прекращено.

К прогрессированию поражения тканей могут приводить следующие факторы: нарушение обменных процессов, вызванное потерей эпителиальных клеток; нарушение водного баланса в связи с повреждением пограничных слоёв эпителия и эндотелия; возникновение токсических продуктов из обломков молекул повреждённых клеток; возникновение новой антигенной характеристики белковых молекул, подвергшихся термической денатурации, что может привести к аутосенсбилизации.

Учитывая особое анатомо-физиологическое положение роговицы, отсутствие в ней кровеносных сосудов, приносящих к тканям необходимые для жизнедеятельности вещества и уносящих из нее продукты распада, можно предположить, что накопление токсических продуктов после ожога роговицы будет относительно более интенсивным, чем после ожога другой области, и вторичное поражающее действие их может иметь выраженный характер, несмотря на небольшую площадь поражения.

#### **1.4.2. Химические ожоги**

Химические ожоги встречаются чаще, чем термические (в США, по данным на 2004 год, в 4,5 раза чаще). Химические вещества, способные вызвать химический ожог, разнообразны. В практике часто ограничивают

химические ожоги двумя этиологическими факторами: кислотными и щелочными [51, 46].

### **1.4.3. Кислотный ожог**

Тяжесть ожога, вызванного кислотами, зависит от концентрации и времени действия кислоты, а также от её аниона [50]. Анионы некоторых кислот имеют большое сродство к белкам, вследствие чего поражающий эффект наступает при не очень низких значениях рН.

По мнению ряда авторов, [4, 67] ожог роговицы кислотой вызывает не прогрессирующий характер повреждений. Основой для такого суждения являются сведения о том, что при действии кислоты наступает химическое преобразование белков в нерастворимые кислоты - альбуминаты, составляющие барьер, предупреждающий проникновение кислоты в глубь ткани. Однако повреждение эпителиальных клеток, вызванное кислотным ожогом, как и при термическом ожоге, приводит к глубокому дефициту активных биохимических компонентов, содержащихся в эпителиальном слое [12].

Первичное поражение роговицы, вызванное действием кислоты, имеет ряд характерных признаков. Кислота при контакте с тканью повреждает клетки, изменяя рН внутренней среды, что приводит к кислотной денатурации белков, которая может осуществляться двояким способом: за счет присоединения к молекуле аниона или за счет изменения пространственной структуры молекулы. Дегидратационное действие кислоты и нарушение состояния коллоидов также приводят к повреждению клеток. При достаточной концентрации кислоты клетки разрушаются мгновенно. Благодаря создавшемуся валу коагулированных белков кислота не проникает в глубжележащие слои ткани. Однако зона паранекроза увеличивается и углубляется, приводя к нарушению обменных процессов [12].

#### 1.4.4. Щелочной ожог

При ожоге глаз различными щелочами тип поражения одинаков. Разница может быть только в скорости развития и интенсивности поражения.

Щелочные ожоги глаз возникают в результате того, что раствор щелочи, омыляя жиры и жироподобные вещества клеточных мембран, проникает непосредственно в клетки, изменяет рН клеточного вещества, приводит к коагуляции белков и проникает в глубь ткани. При тяжелом ожоге глаз повреждению роговицы и конъюнктивы сопутствует процесс, охватывающий и внутренние оболочки глаза, что может привести к полной деструкции тканей переднего отдела глаза. Щелочные ожоги составляют 7% среди всех травм глаза, по данным исследования, среди всех больниц неотложной помощи США [155]. По статистике одного из исследований эпидемиологии химических ожогов [81], среди 900 отделений неотложной помощи (144149 случаев химических ожогов) наиболее высокие показатели данной травмы выявлены среди детей до 1 года и детей от 1 до 2 лет (28,6% и 23,49% на 100 000 населения соответственно). В этом же исследовании щелочные ожоги оказались более распространенными, чем кислотные [50]. По данным других исследований, также было показано, что щелочные ожоги встречаются чаще, особенно среди мужчин 20-40 лет, работающих на химических заводах или лабораториях [136].

Литературные данные свидетельствуют о том, что гибель эпителиальных клеток после ожога щёлочью наступает почти мгновенно [7,12]. В первые три минуты ядра эпителиальных клеток оказываются смещёнными кверху, после чего отмечается десквамация всех слоёв эпителия. В этот же период наступает отек стромы, фрагментация и исчезновение ее клеток, что нарушает синтез полисахаридов. Возникают деполимеризация и гидратация кислотных мукополисахаридов (МПС), приводящая к дезорганизации коллагеновых волокон. Клеточная инфильтрация возникает

через 6 часов, а в дальнейшем может начаться васкуляризация, почву для которой подготавливают стромальные нарушения [9].

### **1.5. Лечение ожогов глаз**

Самым эффективным вариантом лечения неоваскулярных бельм роговицы, на сегодняшний день является ее трансплантация. Это обусловлено тем, что роговица является идеальной тканью для трансплантационной хирургии благодаря своей иммунной обособленности и бессосудистой природе [76]. Пересадка роговицы является наиболее частым видом трансплантационной хирургии в мире. Ежегодно проводится около 180 000 трансплантаций роговицы [153]. Хотя общее количество донорских роговиц увеличивалось в последние годы (в 2013 г. их было на 5,2% больше, чем в 2012 г., Американская ассоциация глазных банков), спрос всегда превышает доступность трансплантируемой донорской ткани [40].

Самым часто используемым методом трансплантации роговицы является кератопластика. Ее проведение сопряжено со сложностью забора донорского материала, а также имеет ряд таких отрицательных сторон, как недостаточная эффективность хирургического вмешательства (при первичной операции частота прозрачного приживления трансплантата составляет 70-80%, при повторной 33-74,6%) и все та же низкая доступность донорского материала (в РФ, по статистике, на 500 реципиентов приходится 43 донорских роговицы [20]). Помимо этого, при пересадке роговицы, особенно по поводу ожоговых васкуляризированных бельм, часто возникает иммунологический конфликт [17, 25, 26]. При возникновении данного конфликта пациентам необходимо проведение иммунотерапии. А при ожогах глаз иммунотерапия является весьма сложной задачей, т.к. зависит от характера, степени нарушения иммунологических показателей и требует индивидуального подхода [22, 24].

Несмотря на значительные успехи в трансплантации роговицы за последнее десятилетие, существуют проблемы, связанные с доступностью донорской ткани, ограниченной выживаемостью аллотрансплантата и длительным использованием иммуносупрессоров [16, 40]. Кроме того, трансплантация роговицы недоступна многим пациентам из-за высоких затрат на хирургическое вмешательство и последующую реабилитацию.

В связи с неудовлетворительными результатами пересадки роговицы в последнее время проводится активный поиск новых методов лечения.

Современные варианты лечения неоваскуляризации роговицы включают местную противовоспалительную терапию, главным образом кортикостероиды, и местное введение ингибиторов VEGF [51, 102, 143]. Хотя оба варианта могут быть эффективными в некоторых ситуациях, но они также имеют существенные ограничения. Побочные эффекты, вызванные кортикостероидами, исключают их длительное применение, кроме того, даже кратковременное применение во многих случаях может способствовать пролонгации воспаления и снижению регенерации тканей. Анти-VEGF препараты, которые используются не по назначению при неоваскуляризации роговицы, сложны в технике их применения. Поддержание достаточного уровня анти-VEGF препаратов в тканях роговицы не только сложно контролируемо, но и потенциально может негативно повлиять на процессы восстановления тканей, учитывая плеiotропную природу передачи сигналов VEGF [70].

У многих пациентов развивается неоваскуляризация роговицы, несмотря на максимальную стандартную терапию, подчеркивая и без того явную необходимость поиска более безопасных и более эффективных вариантов лечения неоваскуляризации роговицы в клинической практике.

Несмотря на огромный арсенал медикаментозных средств и хирургических методов лечения ожоговой болезни глаза, необходимы дальнейшие исследования, направленные на поиск новых препаратов,

комплексное применение которых корригировало бы дисбаланс всех систем организма, вовлеченных в ожоговый процесс.

### **1.6. Лечение постожоговой неоваскуляризации роговицы**

Принимая во внимание тот факт, что одним из наиболее серьезных осложнений ожогов глаз является неоваскуляризация роговицы [12], необходимо отдельно остановиться на современных тенденциях ее лечения.

В настоящее время распространенность неоваскуляризации роговицы в США оценивается в 1,4% случаев [60], в России частота встречаемости васкуляризированных белых органов зрения в 2001 году составила 25,4% случаев среди всех исходов травм глаз [1].

По данным литературы, как в экспериментах, так и в клинической практике применяют различные виды лечения роговичной неоваскуляризации [10, 57, 150, 157, 118, 101]. Так, уже более 50 лет известно, что местное применение кортикостероидов способно подавлять региональную неоваскуляризацию. С этой целью применяют следующие препараты: кортизон, дексаметазон, метилпреднизолон, преднизолон, тикабезона пропионат и триамцинолон. Хотя антиангиогенный эффект кортикостероидов в роговице не совсем ясен, полагают, что он связан с их противовоспалительным действием [118, 101]. Однако как в клинических, так и в экспериментальных условиях эффективность кортикостероидов при подавлении васкуляризации роговицы оказалась недостаточной. Вследствие этого, а также в связи с побочными эффектами как местных, так и системных кортикостероидов, в настоящее время ведутся поиски новых препаратов, лишенных этих недостатков.

Другими зарегистрированными средствами для подавления васкуляризации роговицы являются нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП). Однако антиангиогенный эффект от применения НПВП в

роговице изменчив и непредсказуем, поэтому они обычно не используются в клинической практике для этой цели [118, 101].

Краткосрочные результаты успешного лечения васкуляризации роговицы в условиях эксперимента были получены при использовании криотерапии, термического прижигания, создания барьера из рубцовой ткани для затруднения роста кровеносных сосудов и иссечения кровеносных сосудов у лимба [118]. Но эти методы не используются в клинике, так как их эффект является временным и незначительным.

### **1.6.1. АнтиVEGF-терапия в лечении роговичной неоваскуляризации**

В настоящее время существуют сведения о влиянии VEGF на развитие новообразованных сосудов роговицы при различных ее заболеваниях. Они представлены в немногочисленных публикациях и требуют дальнейшего изучения и анализа [93, 104].

Одни из первых сообщений о применении ингибиторов ангиогенеза в офтальмологии датированы 1994 годом. Майкл О'Рейли выделил из мочи мышей с привитой карциномой вещество, которое подавляло рост капилляров. Оно представляло собой фрагмент молекулы плазминогена, состоящего из 1-5 кринглов (kringles 1-5). Соединение назвали «ангиостатином» (стабилизирующим сосуды). Оно является фрагментом плазминогена размером 38 кД, содержащим 12 дисульфидных связей [119]. В серии экспериментов *in vitro* было доказано, что ангиостатин вызывает супрессию роста сосудов. Среди специфических ингибиторов, действующих на пролиферирующие эндотелиальные клетки сосудов, ангиостатин был признан одним из самых мощных полипептидов [14, 159, 137, 53, 101, 87]. Таким образом, было сделано заключение, что ангиостатин - это природный ингибитор ангиогенеза, который имеет большой период полужизни и действует подобно гормонам, системно подавляя пролиферацию эндотелиальных клеток. В связи с этим продолжилось изучение возможности



местного (субконъюнктивального) применения ангиостатина и его влияния на новообразованные сосуды глаза. К недостаткам выделенного в 1994 году препарата относилась его высокая стоимость и скорость разложения [66, 118].

В последующие годы был достигнут огромный прогресс анти-VEGF терапии, но, несмотря на значительные успехи в этой области, для полной ремиссии новообразованных сосудов применение отдельно только анти-VEGF или медикаментозной терапии является недостаточным [39, 44].

Коррекция дисрегуляции ангиогенеза в патологических условиях может выступать в качестве точки приложения терапевтических стратегий при патологической васкуляризации роговицы различного генеза.

### **1.6.2. Роль стволовых клеток в лечении роговичной неоваскуляризации**

Одним из перспективных направлений в лечении неоваскуляризации роговицы может быть использование стволовых или прогениторных клеток (Mesenchymal stem cells, MSC), получаемых как из костного мозга, так и из лимбальной области [30, 92]. В России большого успеха в решении этого вопроса достигли Борзенко С. А., Тонаева Х. Д., Комах Ю. А. и соавторы [5, 6]. Авторам удалось не только разработать технологию выделения и культивирования аллогенных лимбальных мезенхимальных клеток человека для сотрансплантации с донорской роговицей, но и получить высокие функциональные результаты при кератопластике высокого риска.

Мезенхимальные стволовые клетки уже давно исследуются в качестве способа специфической терапии для широкого спектра заболеваний. Эти исследования проводились в связи с выраженными иммуномодулирующими, противовоспалительными, антифибротическими и другими свойствами MSC на различные ткани организма [27, 30, 92].

В настоящее время многие авторы подтверждают эффективность использования MSC как в экспериментальных моделях, так и в клинической практике при лечении ожогов глаз, сопровождающихся признаками

воспаления и острой органной недостаточности. Существует достаточно сведений, описывающих положительный эффект трансплантации мезенхимальных стволовых клеток при самой различной глазной патологии. Данные, полученные *in vitro*, *in* и *ex vivo*, а в некоторых случаях и в клинических испытаниях [86, 116], демонстрируют высокий потенциал МСК в сохранении зрительных функций при офтальмологических заболеваниях разнообразной этиологии [40, 57, 76].

Было показано, что одним из основных механизмов действия МСК является их взаимодействие с иммунной системой, в частности с макрофагами [80, 128]. В исследовании Medi Eslani и соавторов [64] была выдвинута гипотеза о том, что полученные из роговицы МСК (сMSC) могут модулировать иммунофенотип и ангиогенные свойства макрофагов. Этот эффект происходит за счет стимуляции фенотипа макрофагов, которые начинают секретировать более высокие уровни противовоспалительных и антиангиогенных факторов.

Хорошо известно, что терапевтические эффекты МСК, полученных из костного мозга, опосредованы в основном их иммуномодулирующими и противовоспалительными свойствами [86, 137].

В литературе имеются данные о том, что МСК модулируют врожденные и адаптивные иммунные механизмы [34, 117, 119, 120], а также участвуют в ангиогенезе и заживлении ран [53, 101, 147].

Несмотря на все положительные стороны МСК, их использование достаточно затруднительно и существует, по крайней мере, два значительных фактора, ограничивающих клиническую возможность применения МСК. Во-первых, в случае необходимости трансплантацию клеток в поврежденную область желательно провести в течение первых 12 часов, что делает невозможным применение аутологичных (собственных) стволовых клеток (т.к. нет времени для выделения и культивирования). Во-вторых, применение аллогенных клеток связано с риском инфекционного заражения и развития тяжелых вирусных осложнений в поврежденной роговице. Кроме того,

использование аллогенных клеток возможно только после их предварительного криоконсервирования и разморозки перед трансплантацией, что негативным образом повлияет на жизнеспособность и функциональную активность трансплантированных клеток.

### **1.7. Роль паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в лечении роговичной неоваскуляризации**

В последние годы многие ученые стали акцентировать свое внимание на паракринной функции стволовых клеток, придавая ей все большее значение в наблюдаемом при пересадке МСК положительном эффекте. Этот вывод сделали на основании данных, полученных при использовании кондиционированной среды мезенхимальных стволовых клеток (МСК-СМ) без пересадки самих клеток (МСК). Так, Eliopoulos и соавт. показали, что использование МСК-СМ значительно повышает выживаемость клеток *in vitro* [62].

Эта и многие подобные работы [30, 92] привели к тому, что сегодня весьма детально проводятся исследования паракринных факторов, выделяемых стволовыми клетками.

Было показано, что использование кондиционированной среды мезенхимальных стволовых клеток для лечения острых патологических состояний в экспериментах по своей эффективности практически не уступает использованию собственно стволовых клеток [47, 106], что говорит о неотъемлемом участии паракринных факторов в купировании патологического процесса. На сегодняшний день известно, что данные паракринные факторы представляют собой различные группы цитокинов, обладающих выраженными противовоспалительными, антиапоптотическими, прогенеративными свойствами [30, 76, 92, 147].

В последнее время появляется все больше информации, что паракринная функция МСК обусловлена, в частности, их способностью реагировать на

экзогенные воздействия и, в зависимости от этого, модулировать синтез определенных цитокинов [30].

Неотъемлемой частью системы цитокинов являются цитокиновые рецепторы, которые в большинстве случаев представляют собой мембранные гликопротеины I типа, состоящие из одного трансмембранного домена, который может содержать несколько субъединиц [16, 30].

Сегодня считается, что после связывания цитокина с рецептором происходит внутриклеточная передача сигнала за счет агрегации субъединиц рецепторов, что запускает дальнейший нисходящий каскад сигнализации. Таким образом, работая непосредственно с ДНК, цитокины способны модулировать экспрессию самых различных генов и, следовательно, синтез самых различных агентов. Поэтому любое нарушение баланса в цитокиновой сети, как недостаточность какого-либо цитокина, так и избыточное его выделение, может приводить к серьезным патологическим проявлениям [30].

### **1.7.1. Прорегенераторный эффект стволовых клеток**

Данный эффект связывают со способностью МСК в большом количестве продуцировать такие различные факторы роста, как HGF, VEGF, KGF, FGF и другие. Повышенная экспрессия факторов роста неоднократно была зафиксирована в исследованиях [16, 62, 90]. Кроме того, было показано, что экспрессия этих факторов индуцируется в ответ на повреждение. Так, Morigi и др. в своей работе проводили совместное культивирование стволовых пуловинных клеток, обработанных цисплатином, и выявили значительное повышение таких концентраций ростовых факторов, как FGF, HB-EGF, VEGF, HGF (в 2, 7, 5 и 12 раз соответственно), в ответ на повреждающее действие цисплатина [106].

На сегодняшний день представляется весьма вероятным, что факторы роста, выделяемые стволовыми клетками, являются важной составляющей протекционного действия стволовых клеток. Продуцируя вокруг себя среду с

обилием данных паракринных агентов, МСК создают хорошие условия для восстановления пролиферации клеток, что было показано при исследовании ядерного антигена пролиферирующих клеток PNCА [47, 106] и регенерации поврежденной ткани.

Кроме того, считается, что некоторые факторы роста, например VEGF, способны активировать мощные факторы-ингибиторы клеточной гибели, такие, как протеинкиназа- В (серин-треонин-киназа, Akt), с чем, в том числе, связывают антиапоптотический эффект МСК.

### **1.7.2. Антиапоптотический эффект стволовых клеток**

Непосредственно антиапоптотическое действие МСК пока остается весьма малоизученной и дискуссионной темой. С одной стороны, имеются данные, что важнейшим механизмом апоптоза (в особенности цисплатин-индуцированного) является действие активных форм кислорода [99]. Как возможный механизм антиапоптотического воздействия МСК можно рассмотреть способность ростовых факторов предотвращать оксидативный стресс, нормализуя активность антиоксидантных ферментов и функцию митохондрий по расходу кислорода [71]. Так, было показано, что внесение HGF увеличивает выживаемость клеток при оксидативном стрессе [115]. С другой стороны, имеются данные, что такие факторы роста, как VEGF, способны активировать Akt [95]. Так, при введении анти-VEGF антител падает активность Akt *in vitro* и возрастает степень апоптоза.

На данный момент намечено большое поле для изучения антиапоптотического действия МСК, и роль в этом эффекте паракринных факторов, выделяемых этими клетками, по-видимому, весьма значительна.

### **1.7.3. Противовоспалительный эффект стволовых клеток**

Данный эффект связан с эффектом резкого снижения концентрации провоспалительных цитокинов (IL-1, 6, макрофагальный воспалительный протеин (MIP)-2, G-CSF, TNF) при лечении МСК *in vitro* и *in vivo*.

Сегодня появляется все больше работ, описывающих противовоспалительный эффект, приписываемый МСК и их паракринным факторам [30]. Обобщает эти исследования общее признание способности МСК динамически реагировать на изменения своего микроокружения.

Повышение в среде воспалительных факторов приводит к увеличению экспрессии генов провоспалительных цитокинов и повышенной их секреции. Однако интересно то, что была зафиксирована способность МСК повышать экспрессию генов и провоспалительных цитокинов, таких, как IL-1бета, IL-6 и IL-8 [105]. Это явление связывают с наличием на MSC Toll-like рецепторов (TLR, в особенности TLR4), которые активируются при связывании с фрагментами бактерий (ЛПС), вирусов и грибов, что ведет к синтезу провоспалительных цитокинов. Возможно, это один из механизмов обратной отрицательной связи в регуляции воспаления [30].

### **1.8. Применение пептидов, полученных из мезенхимальных стволовых клеток, в лечении ожогов глаз**

Возможным путем решения постожоговой неоваскуляризации роговицы может быть использование пептидов, полученных из культивированных стволовых клеток [30]. Данный препарат содержит кондиционированную культуральную среду, полученную при культивировании лейкоцитов периферической крови и стволовых и/или прогениторных клеток в культуральной среде, лизат культивируемых клеток, а также композицию, полученную после того, как к культивируемым клеткам добавляется

тканеспецифический антиген, получаемый из тканей того органа, регенерацию которого надо улучшить [30, 92].

Предпосылками создания пептидного препарата послужил тот факт, что в процессе регенерации поврежденного органа происходит активация лейкоцитов крови веществами, образующимися при разрушении тканей и органов. В результате проведенных исследований стало известно, что резекция паренхиматозных органов у экспериментальных животных вызывает изменение метаболической активности лейкоцитов, в особенности лимфоцитов. Лимфоциты, в свою очередь, начинают продуцировать вещества, способные изменять скорость пролиферации и дифференцировки других, не лимфоидных клеток, как правило, стволовых и прогениторных клеток костного мозга, а также стволовых клеток, находящихся в паренхиматозных органах. Эта клеточная культура в процессе культивирования продуцирует медиаторы и ростовые факторы, которые, как правило, призваны обеспечить оптимальные условия для пролиферации культивируемых клеток. Спектр продуцируемых веществ напрямую зависит от фенотипического состава культивируемых клеток, а также от факторов роста, которые были исходно привнесены в культуральную среду. Таким образом, в процессе культивирования клетки модифицируют культуральную среду, обогащая ее продуктами своей жизнедеятельности. В результате получается пептидный препарат или композиция, состоящая из культуральной среды, обогащенной клеточными метаболитами, секретлируемыми культивируемыми клетками, а также из клеточного лизата, содержащего внутриклеточные белки, в том числе белки секреторных гранул [30, 92].

Пептидный препарат открывает новые возможности в лечении ожогов глаз. Главным преимуществом этого препарата является отсутствие всех негативных сторон МСК при наличии большинства свойств, присущих стволовым клеткам. Данный препарат содержит различные клеточные метаболиты: секреторные, например, биологически активные факторы роста, медиаторы воспаления и другие внеклеточные белки. Одни из них это VEGF

(сосудистый эндотелиальный фактор роста), FGF (фактор роста тромбоцитов) и IGF (инсулиноподобный фактор роста) [16, 73].

Таким образом, профилактика и лечение постожоговой неоваскуляризации роговицы до настоящего времени является не решенной задачей современной офтальмологии. Множество существующих терапевтических методик позволяют добиться успеха лишь на небольшом временном отрезке и лишь в отдельных случаях. Поиск новых способов лечения патологической роговичной неоваскуляризации на сегодняшний день ведется преимущественно в области клеточной и регенераторной медицины и приведенные выше данные указывают на то, что паракринные факторы, полученные из стволовых клеток, являются перспективными и могут стать основой для создания новых высокоэффективных препаратов для лечения ожоговой болезни глаза.



## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В основу диссертационного исследования положены данные комплексного обследования 132 животных (132 глаза) с центральными и периферическими термическими повреждениями роговицы и тотальными химическими поражениями роговицы и конъюнктивы. Кроме того, для проведения анализа по методу хемилюминисценции было использовано дополнительно 10 особей животных. Дизайн работы включал в себя обработку данных диагностических методов обследования, морфологического и хемилюминисцентного исследования.

### 2.1. Общая характеристика этапов эксперимента

В работе последовательно выполнена серия экспериментов *in vivo* в соответствии с порядком поставленных задач. Решение каждой задачи позволяло перейти к следующему этапу работы, аккумулировав полученные ранее результаты для решения новой.

В экспериментах использовались кролики-самцы породы Шиншилла весом от 2,5 до 3 кг в возрасте 5-6 месяцев, а также крысы-самцы стока Wistar весом от 300 до 350 г в возрасте 6-7 месяцев. Все процедуры с животными проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» Хельсинской декларации и рекомендациями Директив Европейского Сообщества (№ 86/609 ЕС).

Для достижения поставленной цели работа была разделена на несколько последовательных этапов (табл. 1), соответствующих задачам исследования.

Таблица 1 – Дизайн исследования

	<b>Тип повреждения</b>	<b>Группа</b>	<b>Количество животных/глаз</b>	<b>Применяемое лечение</b>
<b>I этап</b>	Термическое центральной области	Опытная группа	20 кроликов (20 глаз)	Пептидный препарат общая фракция
		Контрольная группа	20 кроликов (20 глаз)	Стандартные методики
<b>II этап</b>	Термическое лимбальной области	Опытная группа	20 кроликов (20 глаз)	Пептидный препарат общая фракция
		Контрольная группа	20 кроликов (20 глаз)	Стандартные методики
<b>III этап</b>	Химический ожог (роговицы и конъюнктивы)		52 крысы (52 глаза)	
<b>IV этап</b>	Химический ожог (роговицы и конъюнктивы)	Опытная подгруппа 1	16 крыс (16 глаз)	Пептидный препарат общая фракция
		Опытная подгруппа 2	16 крыс (16 глаз)	Пептидный препарат фракция до 30 кДа
		Контрольная группа	16 крыс (16 глаз)	Культуральная среда

**Первым** этапом работы являлась оценка эффективности инстилляций в конъюнктивальную полость белково-пептидного комплекса, содержащего паракринные факторы мезенхимальных стволовых клеток, на модели центрального термического ожога роговицы глаз кроликов. Работа выполнена на базе Калужского Филиала ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. Исследование было проведено на 40 кроликах (40 глаз). *Опытная* (в качестве лечения применяли белково-пептидный комплекс общей фракции) и *контрольная* (применяли стандартные методы лечения, используемые при термических ожогах глаз) группы включали в себя по 20 животных (20 глаз).

**Второй** этап – оценка эффективности инстилляций в конъюнктивальную полость белково-пептидного комплекса, содержащего

паракринные факторы мезенхимальных стволовых клеток, на модели периферического термического ожога с повреждением лимбальной зоны роговицы глаз кроликов. Работа проводилась на базе Калужского филиала ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. Исследования проведены на 40 кроликах (40 глаз). *Опытная* (в качестве лечения применяли белково-пептидный комплекс общей фракции) и *контрольная* (применяли стандартные методы лечения, используемые при термических ожогах глаз) группы включали в себя по 20 животных (20 глаз).

На **третьем этапе** выполняли моделирование постожогового неоваскулярного бельма роговицы крыс-самцов стока Wistar на базе научной лаборатории «Института биофизики клетки» Российской академии наук. В исследовании участвовали 52 крысы (52 глаза).

На этом этапе эксперимента в качестве экспериментальных животных были использованы крысы. Данное решение было принято в связи со следующими факторами: доступность вивария с большим количеством подопытных животных, возможность смоделировать ожоговую модель на оба глаза с целью нивелирования индивидуальных различий и относительно простая наркотизация животных. Кроме того, возможность проведения эксперимента на другом виде животных позволила подтвердить положительное действие белково-пептидного комплекса (БПК), независимо от видоспецифичности объекта лечения.

На **четвёртом этапе** проводилась оценка эффективности БПК разных фракций на процессы обратного ангиогенеза при лечении уже сформированного на 3 этапе постожогового неоваскулярного бельма роговицы крыс.

Основанием для использования двух фракций БПК явился тот факт, что современные антиVEGF препараты имеют молекулярную массу в диапазоне от 90 до 100 кДа, и они обладают недостаточной антиангиогенной эффективностью при лечении неоваскуляризации роговицы, однако

молекулярная масса одного из первых препаратов, обладающих антиангиогенной активностью в лечении неоваскуляризации роговицы, - ангиостатина - составила 38 кДа. Поэтому в настоящей работе использовали общую фракцию (молекулярной массой до 100 кДа) и фракцию до 30 кДа, что позволит определить фракцию БКП с максимальной антиангиогенной активностью.

Для исключения влияния белковых комплексов культуральной среды на процессы ангиогенеза проводилась сравнительная оценка влияния БКП и культуральной среды. Этап был выполнен на базе научной лаборатории «Института биофизики клетки» Российской академии наук.

Экспериментальное исследование выполнено на 48 крысах (48 глаз), которые были разделены на опытную (32 крысы) и контрольную (16 крыс) группы. В свою очередь, опытная группа была разделена на 2 подгруппы по 16 крыс. В *первой подгруппе* в качестве лечения применяли белково-пептидный комплекс общей фракции. Во *второй подгруппе* в качестве лечения применяли белково-пептидный комплекс фракции до 30 кДа. В *контрольной группе* для лечения ожогов применяли культуральную среду.

Экспериментальные исследования проводились автором самостоятельно под руководством директора Калужского филиала ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России д.м.н. Терещенко Александра Владимировича и ведущего научного сотрудника Института биофизики клетки Российской академии наук Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» д.м.н. Темнова Андрея Александровича.

Стволовые клетки костного мозга получались и культивировались д.м.н. Темновым А.А. на базе научной лаборатории «Института биофизики клетки» Российской академии наук. На базе данной лаборатории также был получен и фракционирован белково-пептидный комплекс.

Подготовка гистологических препаратов тканей переднего отрезка глаза выполнена в Лаборатории патологической анатомии и гистологии глаза ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России (г. Москва). Анализ препаратов проводился заведующей лабораторией патологической анатомии и гистологии глаза к.м.н. Шацких Анной Викторовной.

Хемилюминцентный анализ проводился автором самостоятельно под руководством д.м.н. Темнова Андрея Александровича на базе научной лаборатории «Института биофизики клетки» Российской академии наук.

## **2.2. Получение белково-пептидного комплекса из культивированных стволовых клеток**

### ***Выделение МСК из костного мозга животных***

Для выделения МСК из подопытных животных случайным образом выбирали по одной особи. Во время процедуры животные находились под общим наркозом. У кролика костный мозг получали из тазовой кости, для чего в условиях операционной рассекали кожу над гребнем тазовой кости, пробивали кортикальный слой иглой и аспирировали 10-15 мл костного мозга. У крысы костный мозг получали из бедренной кости (в условиях операционной производился надрез кожи над бедренной костью, затем иглой пробивался кортикальный слой кости и производилась аспирация костного мозга).

Мононуклеарную фракцию клеток костного мозга выделяли на градиенте плотности с использованием стандартного раствора Lympholyte-H (фирма Cedarlane, Canada). После получения суспензию мононуклеарных клеток высевали на чашки Петри и культивировали в среде DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium, ООО «ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco).

Для подтверждения того, что используемые клетки обладают свойствами МСК, была проведена их остеогенная, хондрогенная и адипогенная дифференцировка по стандартной методике.

Остеогенная дифференцировка (с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 мкМ дексаметазона, 0,1 мМ аскорбиновой кислоты и 10 нМ  $\beta$ -глицерофосфата) была подтверждена наличием щелочной фосфатазы в культуре клеток с использованием стандартных реактивов (Sigma-Aldrich, USA). Хондрогенная дифференцировка (с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 мкМ дексаметазона и 0,1 мкг/мл TGF- $\beta$ ) была подтверждена с использованием окраски альциановым голубым. Адипогенная дифференцировка (с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 10 мкМ дексаметазон, 10 мкг/мл инсулина и 100 мкг/мл IBMX) была подтверждена окрашиванием с использованием Oil Red-O.

#### ***Культивирование МСК***

У крыс клеточный монослой культивировали при условиях нормоксии (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) и гипоксии (10% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>). У кроликов – только в условиях гипоксии (10% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>).

#### ***Получение кондиционированной среды культивированных мезенхимальных стволовых клеток (кМСК)***

После получения клеточного монослоя проводили полную смену культуральной среды и через 3 суток кондиционированную культуральную среду объединяли с лизатом МСК.

#### ***Получение лизата кМСК***

Для получения лизатов МСК клетки разрушали, используя метод замораживания-оттаивания (по 2 цикла замораживания до -4 °С и оттаивания до 20 °С).

#### ***Получение фракций кондиционированной среды лизата кМСК***

Для разделения кондиционированной среды использовали метод ультрафильтрации. 10 мл исследуемой кондиционированной среды помещали в концентратор Amicon Ultra-15,50000 NMWL (Millipore, Ireland), после чего

центрифугировали в центрифуге с бакет-ротором в течение 25 минут при температуре +4°C. Верхнюю фракцию трижды промывали 10 мл 1X PBS (Amresco, США), после чего переносили в новую пробирку и доводили объем до 10 мл с помощью 1X PBS. Фильтрат, полученный при первом фильтровании, переносили в концентратор 30000 NMWL.

Процедуру фильтрования проводили так же, как описано выше, за исключением того, что верхнюю фракцию разбавляли до объема фильтрата, изначально внесенного в концентратор. Таким образом были получены нормализованные по объему фракции, содержащие преимущественно белки с массами >30 и до 30 кДа.

#### ***Приготовление капельной формы белково-пептидного комплекса (БПК) для эксперимента***

Стерильные фракции кондиционированной среды лизата кМСК растворяли в дистиллированной воде. Конечная концентрация белка составила 8 мг\мл. Готовый препарат пептидов представлял собой прозрачную гомогенизированную жидкость малинового цвета (рис. 1).



Рисунок 1 – Готовый белково-пептидный комплекс

### **2.3. Этап 1. Моделирование и лечение центрального термического ожога роговицы кроликов с применением белково-пептидного комплекса**

На первом этапе проводили сравнение эффективности лечения термических ожогов роговицы центральной локализации с применением БПК и классических средств (5% раствора моксифлоксацина («Вигамокс») и геля «Солкосерил») на разработанной модели центрального термического ожога роговицы кроликов.

Эксперимент проводили на 40 кроликах (40 глаз), животные были разделены на опытную и контрольную группы по 20 голов (20 глаз) в каждой.

В *опытной группе* инстилляций БПК в конъюнктивальную полость выполняли по следующей схеме: с первых по 14-е сутки – шестикратно в течение часа, с 14-х по 30-е сутки – четырехкратно в течение часа один раз в день.

В *контрольной группе* лечение термического ожога роговицы заключалось в четырехкратном в течение дня закапывании 0,5% раствора моксифлоксацина («Вигамокс») и четырехкратном закладывании геля «Солкосерил» за нижнее веко в течение 30 дней.

Продолжительность эксперимента составила 30 дней. До нанесения ожога осуществляли разделение животных на опытную и контрольную группы, проводили офтальмоскопию и исследование на Pentacam с определением средней толщины и прозрачности роговицы. На 3-, 7-, 14-, 30-е сутки проводили фоторегистрацию, биомикроскопию и исследование на Pentacam с определением минимальной и максимальной толщины и прозрачности роговицы. При этом минимальная толщина роговицы давала представление о глубине дефекта, сформировавшегося в результате ожогового воздействия, а максимальная – о выраженности отека роговицы и, как следствие, воспалительной реакции после её ожогового повреждения.



Для проведения гистологического исследования на 3-, 7-, 14-, 30-е сутки выводили из эксперимента по 2 особи животных.

### ***Технология моделирования термического ожога в центральной зоне роговицы***

Термическое воздействие на центральную зону роговицы осуществляли посредством специального устройства, представляющего собой металлический цилиндр с плоским основанием (диаметр основания 4 мм) (рис. 2), подключенного к источнику переменного тока, максимальный пик температуры составлял 210°C.

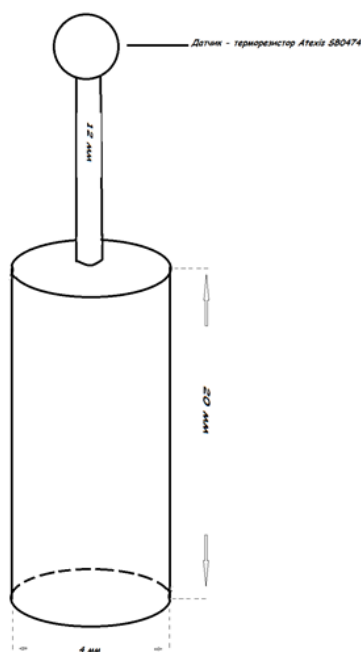


Рисунок 2. – Устройство для нанесения термического ожога роговицы

Животное фиксировали посредством плотной ткани, и ассистент удерживал его. Термическое воздействие осуществляли после инстилляции в конъюнктивальную полость 0,5% раствора проксиметакаина и установки векорасширителя.

Устройство устанавливалось перпендикулярно роговице, время воздействия составило 2 секунды.

Сразу после термического воздействия всем кроликам за нижнее веко закладывали мазь 0,3% офлоксацин («Флоксал»).

На 1-е сутки после нанесения термического ожога всем животным проводили скарификацию струпа роговицы. Кролика также фиксировали посредством плотной ткани, и его удерживал ассистент. После инстилляций 0,5% раствора проксиметакаина под щелевой лампой HS (Haag-streit international) на глаз устанавливали векорасширитель. Удаление струпа роговицы проводили при помощи глазного скарификатора (AlmaMed, Россия).

#### **2.4. Этап 2. Моделирование и лечение периферического термического ожога с повреждением лимбальной зоны роговицы кроликов с применением белково-пептидного комплекса**

На втором этапе проводили сравнение эффективности лечения периферического термического ожога роговицы кроликов с повреждением лимбальной зоны с использованием БПК и классических средств (5% раствора моксифлоксацина («Вигамокс») и геля «Солкосерил»).

Эксперимент проводили на 40 кроликах (40 глаз), животные были разделены на опытную и контрольную группы по 20 кроликов (20 глаз) в каждой.

В *опытной группе* инстилляцией БПК в конъюнктивальную полость выполняли по следующей схеме: с первых по 14-е сутки – шестикратно в течение часа, с 14-х по 30-е сутки – четырехкратно в течение часа один раз в день.

В *контрольной группе* лечение термического ожога роговицы заключалось в четырехкратном в течение дня закапывании 0,5% раствора моксифлоксацина («Вигамокс») и четырехкратном закладывании геля «Солкосерил» за нижнее веко в течение 30 дней.

Продолжительность эксперимента составила 30 дней. До нанесения ожога осуществляли деление животных на опытную и контрольную

группы, проводили офтальмоскопию и исследование на Pentacam с определением прозрачности роговицы. На 3-, 7-, 14-, 30-е сутки проводили фоторегистрацию, биомикроскопию и исследование на Pentacam с определением прозрачности роговицы. Для гистологического исследования на 3-, 7-, 14-, 30-е сутки выводили из эксперимента по 2 особи животных.

### ***Технология моделирования термического ожога на периферии роговицы***

Для нанесения ожога использовали устройство (рис. 2), описанное в п. 2.3. Перед нанесением ожога животное фиксировали посредством плотной ткани, и его удерживал ассистент. Термическое воздействие осуществляли после инстилляции в конъюнктивальную полость 0,5% раствора проксиметакаина и установки векорасширителя.

При моделировании данного ожога с повреждением лимбальной области наносили 2 аппликата диаметром 4 мм каждый с перекрытием их на 1 мм (рис 3). Устройство устанавливали перпендикулярно роговице. Время воздействия составило 2 секунды.

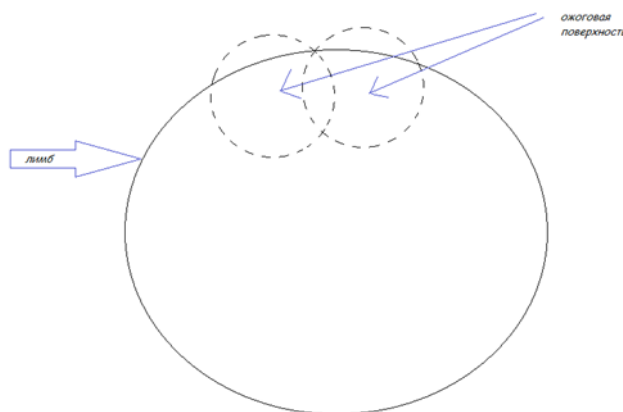


Рисунок 3 – Схема нанесения периферического ожога роговицы

Сразу после термического воздействия всем кроликам за нижнее веко закладывали мазь 0,3% офлоксацин («Флоксал»).

На 1-е сутки после нанесения термического ожога всем животным проводили скарификации струпа роговицы. Кролика также фиксировали посредством плотной ткани, и его удерживал ассистент. После инстилляции 0,5% раствора проксиметакаина под щелевой лампой HS (Haag-streit international) на глаз устанавливали векорасширитель. Удаление струпа роговицы проводили при помощи глазного скарификатора (AlmaMed, Россия).

Схема экспериментального исследования на **первом** и **втором** этапах представлена на рисунке 4.



Рисунок 4 – Схема экспериментального исследования  
на **первом** и **втором** этапах

### 2.5. Этап 3. Разработка модели постожогового неоваскулярного бельма роговицы крыс и характеристика этапов его развития

На третьем этапе разрабатывали модель хронической постожоговой неоваскуляризации роговицы и проводили характеристику этапов ее течения.

Эксперимент проводили на 52 крысах (52 глаза) породы Wistar, подразделения на группы не проводилось. В качестве экспериментальной модели химического ожога роговицы крыс применяли метод Обенберга.

Химический ожог формировали под местной анестезией (0,4% инокаином) аппликацией фильтровальной бумаги (в виде круга диаметром 5 мм), смоченной 90% этанолом, с экспозицией 60 секунд на роговицу и конъюнктиву. Площадь диска фильтровальной бумаги была достаточной для захвата роговицы и конъюнктивы подопытных животных.

Предварительно перед моделированием ожога животных наркотизировали препаратом Золетил®100 (ВИРБАК, Франция) путем подкожного введения 0,1 мл.

Продолжительность эксперимента составила 30 дней. До нанесения ожога проводили офтальмоскопию, исследование на Pentacam с определением прозрачности роговицы и оптическую когерентную томографию роговицы. На 3-, 7-, 14-, 30-е сутки проводили фоторегистрацию, биомикроскопию и оптическую когерентную томографию роговицы. Все процедуры проводили после предварительной наркотизации животных препаратом Золетил®100 (ВИРБАК, Франция).

Для гистологического исследования на 3-, 7-, 14-, 30-е сутки из эксперимента выводили по 1 особи животных.

#### **2.6. Этап 4. Лечение постожогового неоваскулярного бельма роговицы крыс с применением белково-пептидного комплекса**

Четвертый этап экспериментального исследования заключался в лечении уже сформированного постожогового неоваскулярного помутнения роговицы препаратами БПК разных фракций. Для исключения влияния белковых комплексов культуральной среды на процессы ангиогенеза было изучено ее действие.

Экспериментальное исследование выполнено на 48 крысах (48 глаз). Опытная группа была разделена на 2 подгруппы. В *первую подгруппу* вошли 16 крыс (16 глаз), которым в качестве лечения применяли БПК общей фракции. Во *вторую подгруппу* вошли также 16 крыс (16 глаз), которым в качестве

лечения применяли БПК фракцией до 30 кДа. В *контрольную группу*, в которой для лечения ожогов применяли культуральную среду, вошли также 16 крыс (16 глаз).

В *опытных подгруппах* инстилляцией в конъюнктивальную полость выполняли по следующей схеме: с первых по 30-е сутки – четырехкратно в течение часа.

В *контрольной группе* лечение термического ожога роговицы заключалось в четырехкратном закапывании культуральной среды в конъюнктивальную полость в течение 30 дней.

Продолжительность эксперимента составила 30 дней. До нанесения ожога проводили предварительное деление на группы и подгруппы. На первые сутки наблюдения на 4-м этапе, которые соответствовали 30 суткам 3-го этапа работы, проводили деление животных на группы и подгруппы. На 14-, 30-е сутки проводили фоторегистрацию, биомикроскопию и оптическую когерентную томографию роговицы. Все процедуры выполняли после предварительной наркотизации животных препаратом Золетил®100 (ВИРБАК, Франция).

Для гистологического исследования на 14-, 30-е сутки выводили из эксперимента по 4 животных.

Для проведения хемилюминисцентного анализа по оценке влияния белково-пептидного комплекса на активность НАДФ-оксидазы забор гистологического материала проводили у десяти мышей. Выбор мышей обусловлен доступностью этого вида животных.

Схема экспериментального исследования на **третьем и четвертом** этапах представлена на рисунке 5.



Рисунок 5 – Схема экспериментального исследования на третьем и четвертом этапах

## 2.7. Методы инструментальных исследований

Фоторегистрацию и биомикроскопию проводили на щелевой лампе HS (Haag-streit international) с адаптированным к оптической системе щелевой лампы фотоаппаратом Canon EOS 70D. Для более детального изучения состояния роговицы, степени ожогового повреждения тканей, степени их воспаления, выраженности и локализации помутнения роговицы, а также выраженности неоваскуляризации роговицы при биомикроскопии использовали различные степени увеличения.

Исследование пахиметрии и оптических свойств глаз подопытных животных проводили на ротационной Шаймпфлюг-камере для компьютерной топографии роговицы и комплексного исследования переднего сегмента глазного яблока Pentacam HR Typ 70900 (Oculus, Германия). Прозрачность роговицы измеряли в центре ожогового воздействия в условных единицах: значение 100 соответствовало абсолютной непрозрачности; значение 0 –

абсолютной прозрачности исследуемой области. Прозрачность роговицы интактных животных составляла 22 единицы у крыс и 24 единицы у кроликов.

Пахиметрические и кератотопографические карты строили также с помощью Pentacam HR Тур 70900. На третьем и четвертом этапах в связи с малым диаметром роговицы крыс рефракционную карту с помощью алгоритмов прибора построить не удавалось.

Оптическую когерентную томографию проводили на оптическом когерентном томографе RTVue-100 (Optovue, США) для оценки архитектоники слоев роговицы и её толщины (в случаях невозможности использования Pentacam), а также оценки состояния влаги передней камеры.

С целью оценки эффективности БПК для лечения постожогового неоваскулярного бельма роговицы на четвертом этапе исследования определяли площадь роговицы, поврежденной новообразованными сосудами, с помощью программы IP Square.

## **2.8. Методы гистологического и морфологического исследования роговицы экспериментальных животных**

Животных выводили из эксперимента внутривенным введением фенобарбитала. Глаза животных энуклеировали и проводили обработку материала для гистологического исследования. Роговую оболочку вырезали по окружности лимба. Для гистологического исследования материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, промывали проточной водой обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин, выполняли серии гистологических срезов с применением окраски гематоксилин-эозином. Полученный диск роговицы разрезали пополам, перпендикулярно по отношению к сосудам. Оба фрагмента стандартным способом обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Срезы толщиной 3 мкм изготавливали на микротоме и окрашивали гематоксилином и эозином. Препараты изучали под микроскопом фирмы



Leica DM LB2 (Германия) при x50, x100, x200, x400, x630 кратном увеличении с последующим фотографированием.

## **2.9. Хемилюминисцентный анализ активности НАДФ-оксидазы**

Влияние белково-пептидного комплекса на функциональную активность нейтрофилов (активность НАДФ-оксидазы) оценивали, используя хемилюминисцентный анализ перитонеальных нейтрофилов. Анализ проводился на используемых в эксперименте крысах. Всего было использовано 4 животных.

### ***Получение перитонеальных нейтрофилов***

Для получения перитонеальных нейтрофилов были использованы мыши в количестве 10 особей.

Первым шагом моделировалось воспаление путем внутрибрюшинной инъекцией суспензии зимозана (5 мг / мл, 150 мкл на животное).

Группе опытных животных одновременно с зимозаном подкожно вводили 0,5 мл белково-пептидного комплекса.

Группе контрольных животных одновременно с зимозаном подкожно вводили 0,5 мл культуральной среды.

### ***Хемилюминисцентный анализ***

Активность НАДФ-оксидазного комплекса оценивали по интенсивности генерации активных форм кислорода (АФК) в люминолзависимой хемилюминисценции.

После определения базового уровня интенсивности хемилюминисценции добавляли бактериальный пептид N-формил-Met-Leu-Phe (fMLF) fMLF в концентрации 5 мкМ для инициирования респираторного взрыва. Запись вели последовательно для всех мини-чашек в течение 2,5 с и продолжали в течение 10-30 мин. Суммарную продукцию АФК рассчитывали как площадь под кривой интенсивности хемилюминисценции во времени. Эффект БПК рассчитывали как отношение параметров клеток обработанных

животных к параметрам клеток контрольных животных. Каждый независимый эксперимент проводили с клетками отдельного животного.

## **2.10. Статистические методы исследования**

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программы STATISTICA 13.3 («StatSoft», США). Для определения нормальности распределения использовали критерий Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Оба этих критерия (Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка) показали, что исследуемые группы параметров не имеют нормального распределения. Для количественных параметров для сопоставления двух групп (основной и контрольной) использовали непараметрический критерий Манн-Уитни. Для сравнения групп до и в различные сроки после операции использовали непараметрический критерий Уилкоксона. Статистически значимыми считали различия данных при  $p < 0,05$ .

### **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ ТЕРМИЧЕСКИХ ОЖОГОВ РОГОВИЦЫ И ПРОФИЛАКТИКИ РАЗВИТИЯ НЕОВАСКУЛЯРНОГО ПОМУТНЕНИЯ РОГОВИЦЫ**

Целью данной главы экспериментальных исследований была оценка влияния паракринных факторов МСК в составе белково-пептидного комплекса на репаративные свойства роговицы кроликов в лечении модели центральной ожоговой травмы роговицы и оценка эффективности паракринных факторов МСК в составе БПК на профилактику развития постожогового ангиогенеза роговицы при лечении модели периферической ожоговой травмы с повреждением лимбальной области.

Необходимо отметить, что результаты исследования, представленные в данной и последующих главах, следует рассматривать в приведенном в работе порядке, так как именно за счет поступательного увеличения тяжести повреждения роговицы подопытных животных из главы в главу раскрывался спектр свойств БПК.

#### **3.1 Результаты применения белково-пептидного комплекса для лечения термического ожога центральной зоны роговицы кролика (этап 1)**

Решение задачи оценки влияния белково-пептидного комплекса на репаративные свойства роговицы выполнялось посредством проведения клинических методов исследования и изучения данных гистологической картины.

### **3.1.1 Оценка состояния роговицы и глубжележащих сред по данным инструментальных и лабораторных исследований**

До нанесения ожога в контрольной и опытной группах офтальмоскопически глаза были спокойные, роговица прозрачная, влага передней камеры прозрачная, радужка структурна, хрусталик прозрачный.

В контрольной и опытной группах сразу после нанесения ожога офтальмоскопически оценить состояние роговицы и глубжележащих сред не представлялось возможным из-за наличия выраженного блефароспазма.

Одновременно с осмотром на 1-е сутки животным обеих групп проводили скарификацию струпа роговицы. У всех животных наблюдали выраженный блефароспазм.

На 3-и сутки у животных контрольной группы, по данным офтальмоскопии, глаза были значительно раздражены, наблюдался блефароспазм и хемоз конъюнктивы. Роговица была непрозрачной в зонах, поврежденных за счет стромальных помутнений, которые распространялись на  $1,0 \pm 0,1$  мм за пределы термического воздействия (рис. 6). Эпителизация роговицы начиналась не во всех краевых сегментах (ни у одного животного в наружном сегменте ее отмечено не было). По данным кератотопахитопографического исследования (Pentacam), роговица в зоне термического воздействия была непрозрачной (среднее значение составляло  $100 \pm 0$ , что соответствовало абсолютной непрозрачности).

К 3-м суткам в опытной группе при офтальмоскопии глаза были умеренно раздражены, наблюдался хемоз конъюнктивы и диффузный отек роговицы с помутнением стромы в области ожогового воздействия. В центральной оптической области роговицы отмечался деэпителизированный участок. По данным Pentacam, данный участок являлся абсолютно непрозрачным (среднее значение соответствовало  $83,4 \pm 0,3$ ) (рис. 7), толщина данной области достигала в среднем  $485,05 \pm 1,00$  микрон.

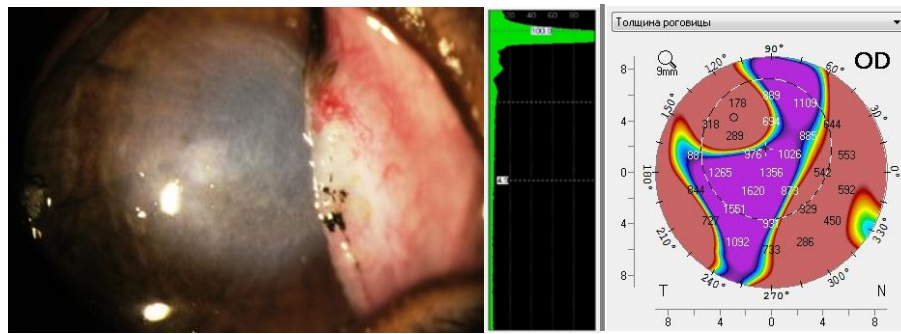


Рисунок 6 – Результаты фоторегистрации переднего отрезка и данные Pentacam. Центральный ожог. Контрольная группа. 3 сутки

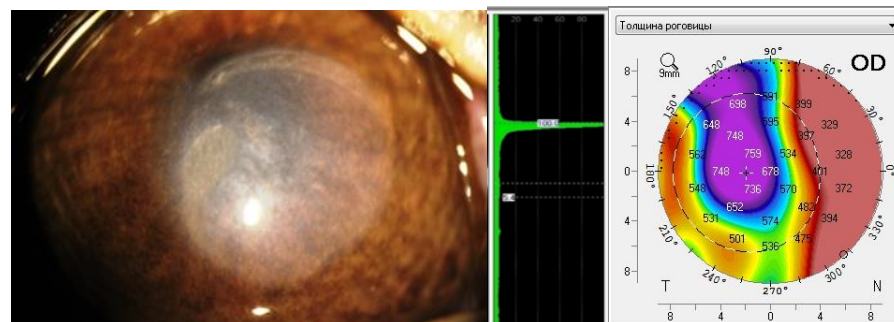


Рисунок 7 – Результаты фоторегистрации переднего отрезка и данные Pentacam. Центральный ожог. Опытная группа. 3 сутки

На 7-е сутки, по данным офтальмоскопии, в контрольной группе эпителий эрозирован. Глаза животных были умеренно раздражены. Роговица в толще стромы в зоне ранее перенесенного термического воздействия на 7-е сутки экспериментального исследования была тотально помутнена (средний показатель прозрачности –  $99,5 \pm 0,2$ ). По данным Pentacam, выявлялось значительное снижение толщины роговицы в зоне ожога (средний показатель толщины –  $377,17 \pm 2,120$  мкм) и выраженное нарушение светопроводимости по сравнению с группой исследования (средние показатель прозрачности –  $37,2 \pm 0,1$ ) (рис. 8).

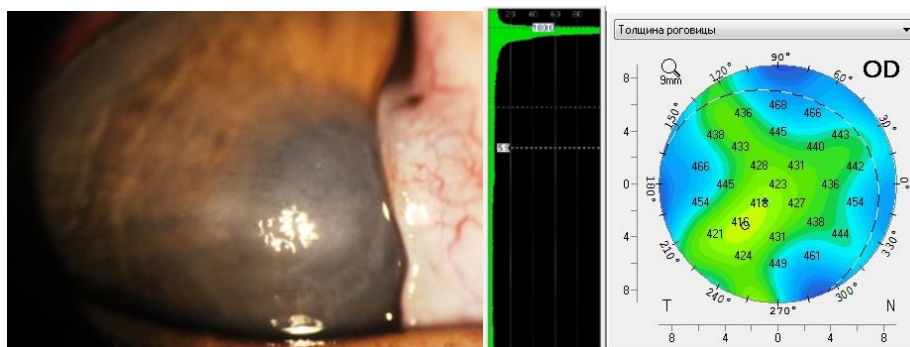


Рисунок 8 – Результаты фоторегистрации переднего отрезка и данные Pentacam. Центральный ожог. Контрольная группа. 7 сутки

На 7-е сутки у животных опытной группы офтальмоскопически данный дефект полностью был эпителизирован, хемоза конъюнктивы и отека окружающих тканей не наблюдалось, в центре дефекта сохранялся участок истончения роговицы (среднее значение –  $380,67 \pm 4,470$  мкм), о чем свидетельствовали данные Pentacam. Кроме того, сохранялось нарушение светопроводящих свойств роговицы (среднее значение –  $37,2 \pm 0,2$ ) (рис. 9).

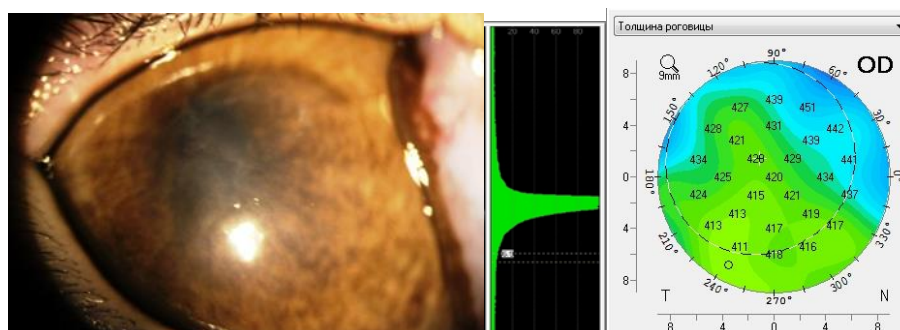


Рисунок 9 – Результаты фоторегистрации переднего отрезка и данные Pentacam. Центральный ожог. Опытная группа. 7 сутки

На 14-е сутки, по данным офтальмоскопии, в контрольной группе отмечалась эпителизация дефекта. Глаза были спокойными. Роговица в толще стромы в зоне ранее перенесенного термического воздействия была тотально помутнена. По данным Pentacam, в контрольной группе показатели толщины (средний показатель –  $451,00 \pm 0,360$  мкм) и светопроводимости роговицы (средний показатель –  $82,6 \pm 0,41$ ) были ниже, чем в группе исследования

(средний показатель толщины –  $511,67 \pm 0,954$  мкм, средний показатель прозрачности –  $20,1 \pm 0,13$ ).

На 14-е сутки глаза опытных животных, по данным офтальмоскопического исследования, были спокойными. Эпителизация роговицы была полностью завершена у всех животных. В толще стромы в месте термического воздействия визуализировалось локальное облаковидное помутнение роговицы в оптической зоне диаметром  $1,0 \pm 0,3$  мм. По данным Pentacam, наблюдалось значительное улучшение светопроводящих свойств роговицы (среднее значение –  $20,1 \pm 0,3$ ) животных и приближение толщины роговицы к нормальным значениям, по данным пахиметрии (средний показатель –  $511,67 \pm 0,954$  мкм).

На 30-е сутки у животных контрольной группы офтальмоскопически в области термического воздействия наблюдалось обширное облаковидное помутнение, значительно снижающее оптические свойства роговицы, что подтверждали данные Pentacam. По результатам этого исследования, показатели прозрачности (средний показатель –  $24 \pm 0,39$ ) и толщины роговицы ( $488,00 \pm 1,520$  мкм) были значительно нарушены (рис. 10).

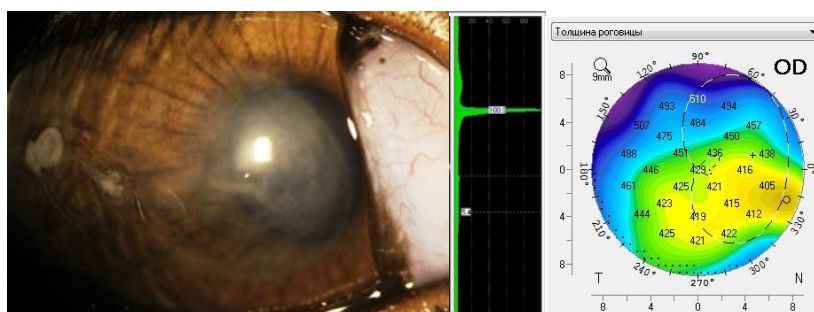


Рисунок 10 – Результаты фоторегистрации переднего отрезка и данные Pentacam. Центральный ожог. Контрольная группа. 30 сутки

На 30-е сутки, по данным офтальмоскопии, состояние глаз животных опытной группы практически соответствовало нормальным значениям. В зоне ранее наблюдавшихся стромальных помутнений сохранялось локальное облаковидное помутнение с тенденцией к его исчезновению. Ранее

поврежденный участок роговицы вернулся к нормальным показателям прозрачности, по результатам Pentacam (среднее значение –  $20,6 \pm 0,12$ ), толщина роговицы восстановилась полностью (среднее значение –  $526,83 \pm 0,167$  мкм), а данные пахиметрии перилимбальной области превышали исходные значения в среднем на 17 микрометров (рис. 11).

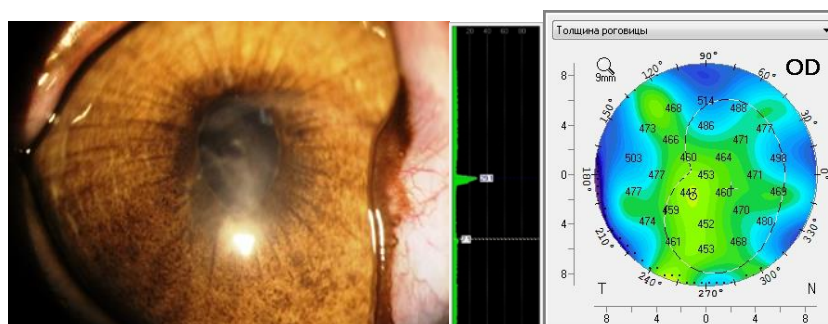


Рисунок 11 – Результаты фоторегистрации переднего отрезка и данные Pentacam. Центральный ожог. Опытная группа. 30 сутки

Показатели прозрачности роговицы основной и контрольной групп до нанесения ожога и на различных сроках наблюдения представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Средние показатели прозрачности роговицы основной и контрольной групп, по данным Pentacam на первом этапе эксперимента, усл.ед.

Группы сравнения	Срок наблюдения					
	До ожога	1 сутки	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки
Контрольная группа	$22,22 \pm 0,222^2$	$100,00 \pm 0,000^1$	$100,00 \pm 0,000^2$	$99,50 \pm 0,340^{1,2}$	$82,60 \pm 0,830^{1,2}$	$24,00 \pm 0,390^{1,2}$
Основная группа	$22,11 \pm 0,200^2$	$100,00 \pm 0,000^1$	$83,40 \pm 0,540^{1,2}$	$37,20 \pm 0,700^{1,2}$	$20,10 \pm 0,310^{1,2}$	$20,60 \pm 0,220^{1,2}$

Прим.: различия статистически достоверны при  $p < 0,05$

<sup>1</sup> – различия внутри группы по срокам наблюдения

<sup>2</sup> – различия между группами исследования по срокам наблюдения

Показатели прозрачности роговицы на первые сутки после нанесения ожога в контрольной и основной группах не различались и составляли 100 усл. ед., что соответствовало полной непрозрачности. На 3 сутки в контрольной



группе уровень прозрачности достоверно не изменился, тогда как в основной произошло статистически достоверное уменьшение непрозрачности до  $83,40 \pm 0,540$  усл. ед. ( $p=0,005$ ). На 7 сутки в контрольной группе непрозрачность статистически недостоверно ( $p=0,179$ ) уменьшилась на 0,5%, в основной также продолжилась тенденция к снижению и наблюдалось достоверное уменьшение непрозрачности ( $p=0,005$ ) на 55,4%. На 14 сутки в группе контроля прозрачность достоверно ( $p=0,005$ ) повысилась на 17%, в основной произошло достоверное ( $p=0,005$ ) плавное повышение прозрачности до  $20,10 \pm 0,31$ . К окончанию периода наблюдения показатели прозрачности роговицы в контрольной группе достоверно снизились ( $p=0,005$ ) на 75,3%, в основной группе наблюдалось незначительное недостоверное повышение ( $p=0,067$ ). Таким образом, на 30-е сутки прозрачность роговицы в группах приблизилась к значениям, полученным до нанесения ожога. В контрольной группе роговица была на 7,4% статистически достоверно менее прозрачной ( $p=0,012$ ), чем до ожога, тогда как в основной прозрачность даже статистически достоверно ( $p=0,018$ ) превосходила на 6,8% показатели доожоговых значений.

Сравнительная динамика восстановления прозрачности роговицы, представленная на рисунке 12, демонстрирует, что до нанесения ожога показатели основной и контрольной групп не имели статистически значимых различий ( $p=0,72$ ). Однако уже на третьи сутки после ожогового воздействия в основной группе показатели прозрачности были достоверно ( $p=0,0001$ ) выше, чем в группе контроля, разница составила 16,6%. На 7 сутки тенденция к снижению в основной группе сохранилась, в результате показатели прозрачности в основной группе были на 62,6% ( $p=0,0001$ ) выше, чем в контрольной. На 14 сутки статистически достоверные ( $p=0,0001$ ) различия с контрольной группой составили 75,7%. К окончанию периода наблюдения прозрачность роговицы основной группы достоверно превосходила показатель контрольной, разница между показателями групп составила 14,2% ( $p=0,0002$ ).

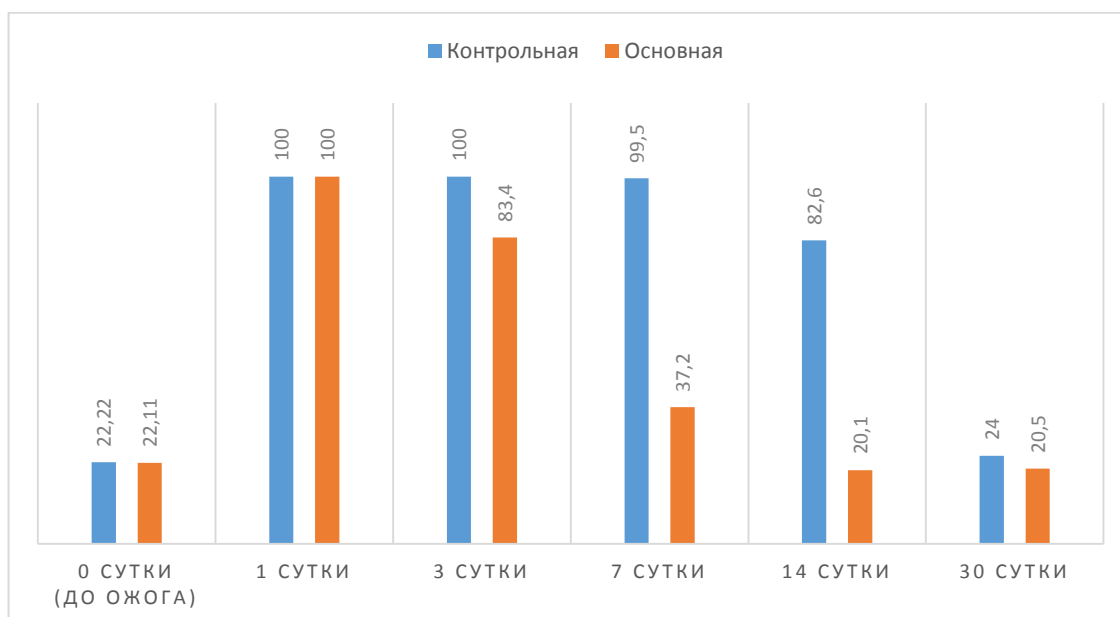


Рисунок 12 – График сравнительной динамики прозрачности роговицы

Показатели максимальной толщины роговицы основной и контрольной групп до нанесения ожога и в различные сроки после представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Средние показатели максимальной толщины роговицы в группах исследования, по данным Pentacam на первом этапе эксперимента, мкм

Группы сравнения	Срок наблюдения					
	0 сутки (до ожога)	1 сутки	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки
Контрольная группа	501,89± 1,369 <sup>2</sup>	1194,80± 1,080 <sup>1</sup>	578,35± 1,106 <sup>1,2</sup>	413,25± 0,640 <sup>1,2</sup>	546,10± 0,830 <sup>1,2</sup>	503,40± 0,450 <sup>1,2</sup>
Основная группа	505,33± 1,067 <sup>2</sup>	810,75± 8,542 <sup>1</sup>	485,05± 1,009 <sup>2</sup>	419,75± 0,778 <sup>1,2</sup>	556,75± 0,680 <sup>1,2</sup>	556,75± 0,555 <sup>1,2</sup>

Прим.: различия статистически достоверны при  $p < 0,05$

<sup>1</sup> – различия внутри группы по срокам наблюдения

<sup>2</sup> – различия между группами исследования по срокам наблюдения

На 3 сутки в контрольной группе произошло резкое достоверное ( $p=0,00008$ ) снижение максимальной толщины роговицы на 51,6%, в основной группе – на 40,1% ( $p=0,00008$ ). На 7 сутки статистически достоверное

снижение ( $p=0,00008$ ) наблюдалось в обеих группах: контрольной на 28,5%, основной на 13,5%. На 14 сутки в контрольной и основной группах произошло достоверное ( $p=0,00008$ ) повышение максимальной толщины роговицы на 32,1% и 32,6% соответственно. К окончанию периода наблюдения была вновь отмечена тенденция к уменьшению данного показателя: так в контрольной группе максимальная толщина роговицы уменьшилась на 7,8%, в основной группе данный показатель не изменился ( $p=0,00008$ ). Таким образом, на 30-е сутки максимальная толщина роговицы в контрольной группе практически сравнялась с показателями до ожога и лишь на 0,3% была статистически недостоверно выше ( $p=0,139$ ), в то время, как в основной группе произошло статистически достоверное ( $p=0,007$ ) увеличение данного показателя на 10,2% в сравнении с исходными показателями.

График сравнительной динамики максимальной толщины роговицы (рис. 13) демонстрирует, что до нанесения ожога показатели групп не имели статистически значимых различий ( $p=0,055$ ). Однако уже на первые сутки после ожога наблюдалось достоверное ( $p=0$ ) снижение данного показателя в основной группе по сравнению с контрольной, с постепенным сравнением показателей групп к 7 суткам. Так, на 3 сутки максимальная толщина роговицы в контрольной группе была на 16,1% статистически значимо выше ( $p=0$ ), чем в основной, тогда как на 7 сутки уже показатели контроля статистически значимо превосходили опытные данные на 1,5% ( $p=0,000004$ ).

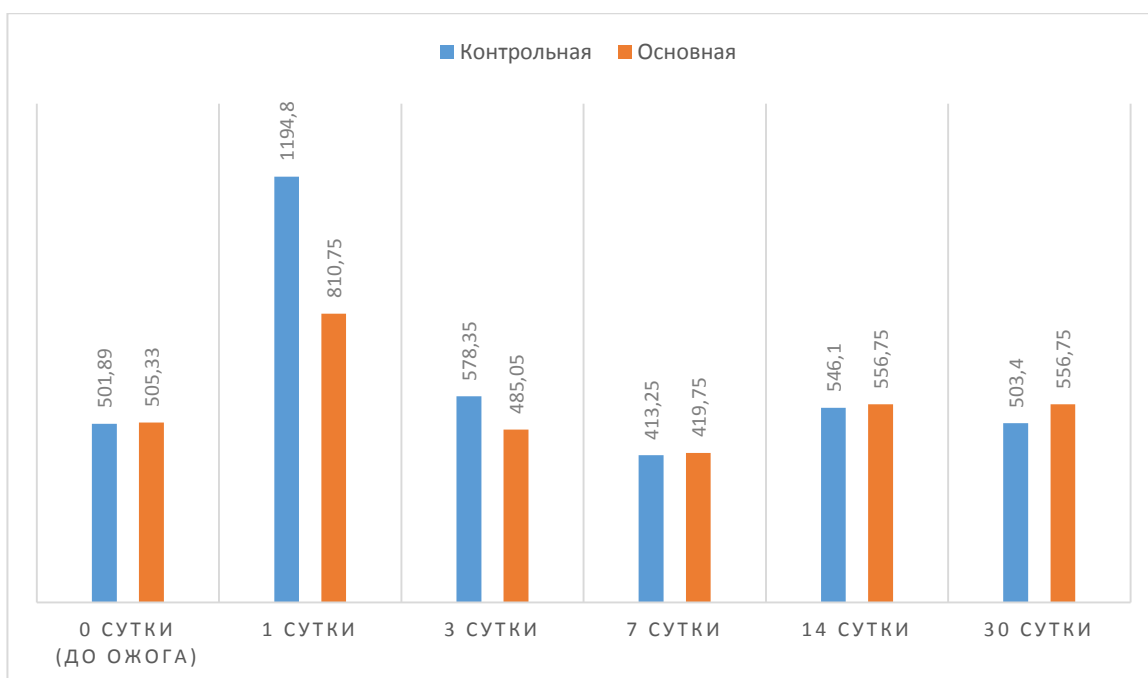


Рисунок 13 – График сравнительной динамики средней максимальной толщины роговицы

На 14 сутки в контрольной и основной группах произошло повышение максимальной толщины роговицы, более резкое в контрольной группе, в результате чего показатель контрольной группы стал статистически значимо превышать значения основной на 13,8% ( $p=0,000$ ). К окончанию периода наблюдения в контрольной группе произошло снижение максимальной толщины роговицы, тогда как в основной показатель остался на прежнем уровне и значения группы исследования вновь стали статистически значимо на 9,6% выше показателей основной ( $p=0,000$ ).

Отмеченный на данном этапе эксперимента факт снижения отека роговицы на ранних сроках после термического повреждения мог быть связан с блокированием воспалительной реакции за счет стабилизации клеточных мембран противовоспалительными цитокинами. Данный эффект, вероятно, связан с возможным восстановлением баланса цитокинов в поврежденных тканях роговицы посредством белковых структур, входящих в состав БПК. За счет этого к 30-м суткам достигалось полное восстановление толщины роговицы в области дефекта.

Показатели минимальной толщины роговицы основной и контрольной групп представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Средние показатели минимальной толщины роговицы основной и контрольной групп, по данным Pentacam на первом этапе эксперимента, мкм

Группы сравнения	Срок наблюдения					
	0 сутки (до ожога)	1 сутки	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки
Контрольная группа	501,89± 1,369 <sup>2</sup>	395,00± 4,650 <sup>1,2</sup>	305,83± 1,660 <sup>1,2</sup>	377,17± 2,120 <sup>1,2</sup>	451,00± 0,360 <sup>1,2</sup>	488,00± 1,520 <sup>1,2</sup>
Основная группа	505,33± 1,067 <sup>2</sup>	117,67± 0,667 <sup>1,2</sup>	421,67± 2,499 <sup>1,2</sup>	380,67± 4,470 <sup>1,2</sup>	511,67± 0,954 <sup>1,2</sup>	526,83± 0,167 <sup>1,2</sup>

Прим.: различия статистически достоверны при  $p < 0,05$

<sup>1</sup> – различия внутри группы по срокам наблюдения

<sup>2</sup> – различия между группами исследования по срокам наблюдения

На 3 сутки в контрольной группе произошло снижение минимальной толщины роговицы на 22,6% ( $p=0,027$ ), тогда как в основной поврежденный участок за счет воспалительного отека достоверно увеличился в толщине на 258,3% ( $p=0,027$ ). Начиная с 7 суток, в группе контроля наблюдалось достоверное ( $p=0,027$ ) повышение минимальной толщины роговицы, сохранявшееся до конца периода наблюдения. В опытной группе на 7 сутки за счет снижения воспалительной реакции и вследствие снижения отека наблюдалось статистически достоверное ( $p=0,027$ ) снижение минимальной толщины роговицы на 9,7%, после чего поступательное восстановление поврежденного участка на 14 и 30 сутки на 34,4% и 8,2% соответственно ( $p=0,027$ ). Таким образом, на 30-е сутки минимальная толщина роговицы в контрольной группе была статистически достоверно ( $p=0,028$ ) ниже на 2,8% показателей нормальных значений роговицы до ожога, в то время как в основной группе произошло статистически достоверное ( $p=0,027$ ) увеличение данного показателя на 4,3% в сравнении с исходными показателями.

График сравнительной динамики минимальной толщины роговицы (рис. 14) демонстрирует, что до нанесения ожога показатели групп не имели статистически значимых различий ( $p=0,055$ ). Однако уже на первые сутки после ожога в основной группе наблюдалось статистически достоверное ( $p=0,004$ ) резкое снижение минимальной толщины в зоне ожогового повреждения по сравнению с контрольной группой. На третьи сутки показатели обеих групп увеличивались, при этом увеличение в основной группе было более выражено, в результате чего максимальная толщина роговицы группы статистически достоверно ( $p=0,004$ ) на 27,5% превышала показатели контроля. Столь значительное увеличение толщины роговицы на 3-и сутки в опытной группе может быть связано с избыточным накоплением межклеточной жидкости, связанной с задержкой гликозамингликанов в толще стромы, обусловленной применением БПК, и ранним завершением эпителизации. На 7 сутки показатели основной группы практически сравнялись с контрольными и были меньше лишь на 0,9%, однако разница была статистически недостоверной ( $p=0,332$ ). Но уже на 14 и 30 сутки показатели опытной группы статистически достоверно превышали показатели контрольной группы на 11,9% ( $p=0,004$ ) и 7,4% соответственно ( $p=0,003$ ).

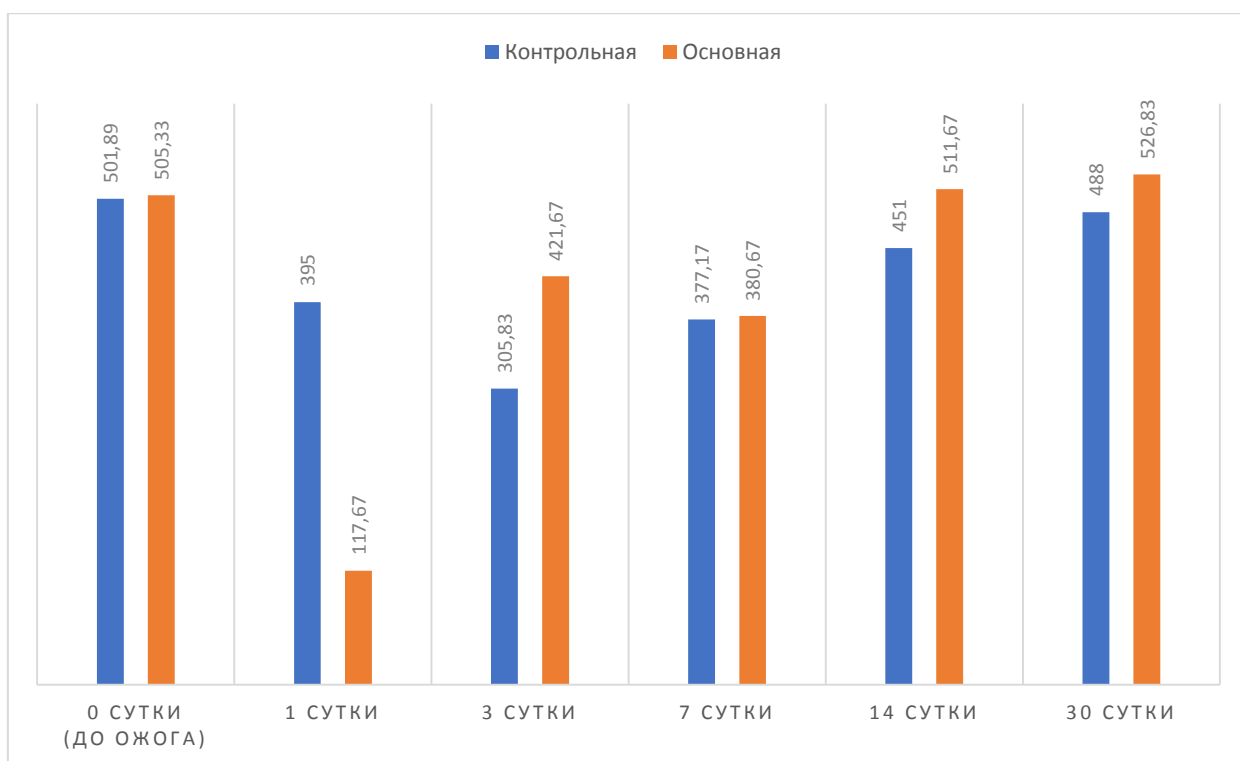


Рисунок 14 – График сравнительной динамики средней минимальной толщины роговицы

### 3.1.2. Результаты гистологического исследования

Результаты гистологического исследования по результатам работы на 1 этапе не демонстрировали выраженных различий в состоянии животных. По итогам этого исследования, заслуживали внимания только факты более активного течения репаративных процессов в опытной группе начиная с 3-х суток наблюдения.

На 1-е сутки в контрольной и опытной группах животных, по данным гистологического исследования, не наблюдалось различий. Гистологическая картина соответствовала поражению роговицы и глубжележащих слоев средней степени тяжести, о чем свидетельствовали множественные отслойки десцеметовой оболочки, слущенность эндотелия и множественные преципитаты.

На 7 сутки в группе контроля эпителий был эрозирован с некрозами и очаговой воспалительной инфильтрацией; задняя эпителиальная мембрана

дифференцировалась без видимых изменений. Строма с выраженным отеком. Десцеметова мембрана утолщена, эндотелий рыхлый. На поверхности эндотелия визуализировались преципитаты. В опытной группе гистологическая картина отличалась только отсутствием преципитатов на поверхности эндотелия.

К 30-м суткам в контрольной группе на гистологических срезах эпителий был без каких-либо выраженных изменений. Задняя мембрана эпителия визуализировалась плохо. Десцеметова мембрана была не изменена. Эндотелий редкий, уплощенный, без выраженных изменений.

На 30-е сутки опытная группа, как видно на представленном снимке, (рисунок 15) характеризовалась сохранением структуры роговицы. Задняя мембрана эпителия без видимых изменений; строма сохранена, однако выявлялась небольшая дезорганизация ее слоев. Состояние десцеметовой мембраны без видимых изменений.

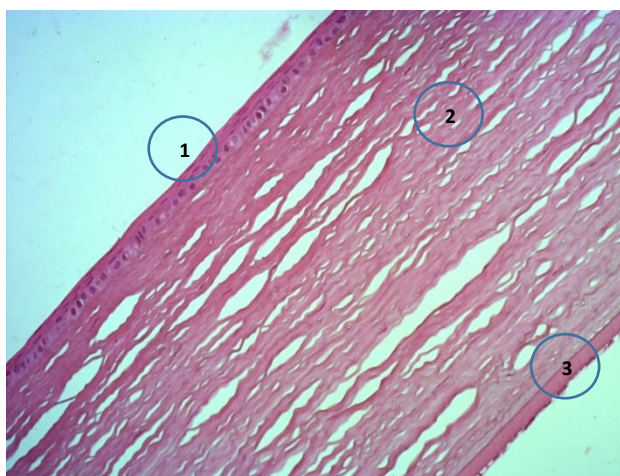


Рисунок 15 – Гистологический препарат роговицы кролика. Центральный ожог роговицы. Окраска гематоксилин-эозин, ув. х 200. Опытная группа. 30 сутки  
1 - эпителий, 2 - десцеметова мембрана с эндотелием, 3 - нарушение упорядоченности хода пучков коллагеновых волокон

Гистологическая картина у животных контрольной группы свидетельствовала о повреждении роговицы средней степени тяжести, о чем, в частности, говорит наличие преципитатов на эндотелии и вовлеченность в воспалительный процесс самого эндотелия. В опытной группе уже на 7 сутки



не наблюдалось преципитатов, а следовательно, и воспалительной реакции в передней камере поврежденных глаз. Это косвенно может говорить о более низкой выраженности воспалительной реакции в опытной группе по сравнению с контрольной.

Данные гистологического обследования соответствовали клинической и инструментальной картине на первом этапе эксперимента.

Таким образом, данные, полученные на основании клинических и гистологических исследований в результате первого этапа экспериментального исследования, говорят о том, что применение БПК при центральных ожогах роговицы способствует быстрому восстановлению поврежденных тканей в более короткие сроки и проявляется восстановлением прозрачности, толщины и гистологической структуры роговицы по сравнению со стандартной противовоспалительной и корнеопротекторной терапией.

### **3.2. Результаты применения белково-пептидного комплекса для профилактики неоваскуляризации роговицы при термическом ожоге периферической зоны роговицы кроликов (этап 2)**

Решение задачи оценки эффективности профилактики постожогового ангиогенеза роговицы посредством применения белково-пептидного комплекса в лечении модели периферической ожоговой травмы роговицы с захватом лимбальной зоны выполнялось посредством проведения клинических методов исследования и изучения данных гистологической картины.

#### **3.2.1 Оценка состояния роговицы и глубжележащих сред по данным инструментальных и лабораторных исследований**

На втором этапе эксперимента была поставлена задача: проанализировать влияние БПК на более тяжелое повреждение роговицы с

затрагиванием лимбальной области и, следовательно, с ответной сосудистой реакцией.

Исследование проводилось по алгоритму первого этапа.

До нанесения ожога в контрольной и опытной группах офтальмоскопически глаза были спокойные, роговица, влага передней камеры и хрусталик прозрачные, радужка структурна.

Сразу после нанесения ожога инструментально оценить состояние роговицы и глублежащих сред так же, как и на первом этапе работы, не представлялось возможным из-за наличия выраженного блефароспазма.

Одновременно с осмотром на 1-е сутки животным обеих групп проводилась скарификация струпа роговицы в зоне термического воздействия. У всех животных наблюдался выраженный блефароспазм.

Данная модель термического ожога, применяемая на втором этапе эксперимента, позволила оценить реакцию на повреждающий агент не только тканей роговицы, но и лимбальной сосудистой сети.

У животных контрольной (рис. 16) и основной (рис. 17) групп на 3-е сутки офтальмоскопически наблюдался выраженный блефароспазм, хемоз конъюнктивы в области верхнего свода и обильное слизистое отделяемое. Отсутствие видимых сосудов в области лимбальной сети. В зоне термического воздействия эрозия эпителия и выраженное стромальное помутнение роговицы. В контрольной группе помутнение роговицы распространялось на окружающие ткани приблизительно на 2-3 мм в различных направлениях, в основной в среднем на 1-2 мм перилимбально и по направлению к центру роговицы. У животных основной группы визуализировались участки эпителия роговицы по краю дефекта. Более активная эпителизация наблюдалась в участках роговицы, приближенных к лимбу.

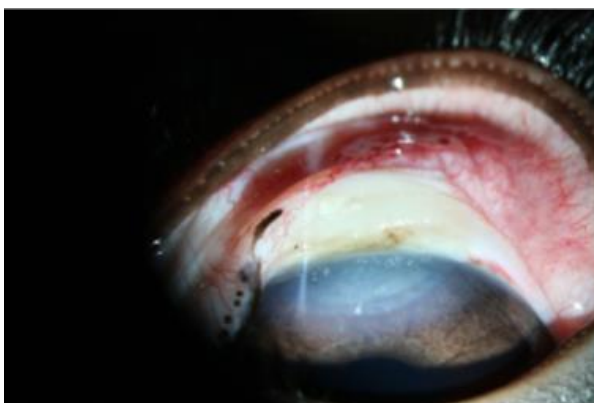


Рисунок 16 – Результаты фоторегистрации переднего отрезка глаза.  
Периферический ожог с захватом лимбальной области. Контрольная группа.  
3 сутки

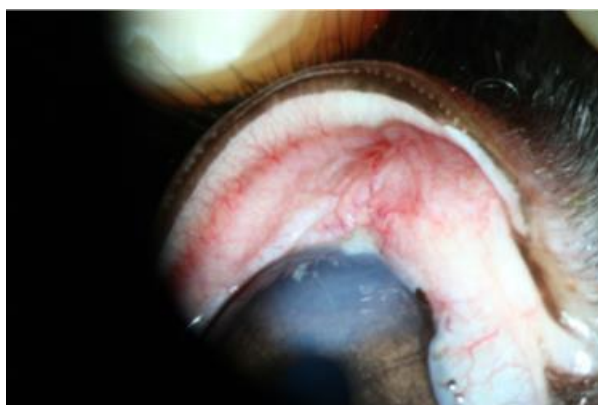


Рисунок 17 – Результаты фоторегистрации переднего отрезка глаза.  
Периферический ожог с захватом лимбальной области. Опытная группа.  
3 сутки

На 7-е сутки в контрольной группе офтальмоскопическая картина не позволяла судить о завершении эпителизации. Участок роговицы, который был подвержен термическому поражению, был еще не прозрачен (среднее значение  $100,00 \pm 0,000$ ), по лимбу наблюдалось разрастание сосудистой сети и выраженная гиперпигментация пораженной области (рис. 18). В толще стромы визуализировались новообразованные сосуды, которые имели рост по направлению к центру и внедрялись в роговицу приблизительно на 2-3 мм.

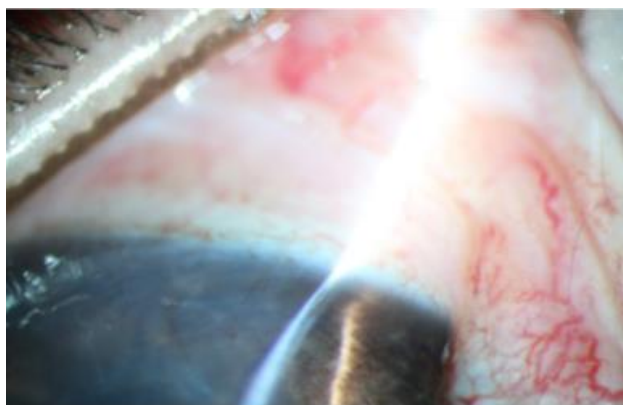


Рисунок 18 – Результаты фоторегистрации переднего отрезка глаза.  
Периферический ожог с захватом лимбальной области. Контрольная группа.  
7 сутки

На 7-е сутки в опытной группе офтальмоскопически состояние глаз было спокойным (рис. 19). Перилимбальная сосудистая сеть была расширена в участках, прилежащих к зоне термического воздействия. Эпителизация роговицы завершилась полностью. В толще стромы сохранялось выраженное помутнение (среднее значение прозрачности  $87,60 \pm 0,400$ ).



Рисунок 19 – Результаты фоторегистрации переднего отрезка глаза.  
Периферический ожог с захватом лимбальной области. Опытная группа.  
7 сутки

К 14-м суткам у животных контрольной группы, по данным офтальмоскопии, интенсивность стромального помутнения незначительно уменьшилась (среднее значение  $98,90 \pm 0,706$ ). Наблюдалось обильное

проращение новообразованных сосудов в толщу роговицы. Сосуды увеличились в диаметре, в них хорошо просматривался ток крови. Таким образом, к 14-м суткам наблюдалось образование неоваскулярного бельма роговицы вследствие термического поражения глаза.

На 14-е сутки состояние глаз в опытной группе, по результатам офтальмоскопических обследований, приблизилось к исходному состоянию (до нанесения ожога). Это подтверждалось отсутствием диффузного помутнения (среднее значение  $35,39 \pm 0,472$ ) в зоне ранее существовавшего повреждения. Перилимбальная сосудистая сеть в зоне термического воздействия была незначительно расширена.

К 30-м суткам в контрольной группе, по данным офтальмоскопии, калибр проросших в роговицу сосудов увеличился, они все еще были полнокровными. Однако незначительно изменилась их направленность (рис. 20). Сосудистое русло стало извитым, сформировались сосудистые анастомозы. Помутнение роговицы стало меньшим по площади, однако интенсивность данного помутнения не снизилась (среднее значение  $97,70 \pm 0,578$ ).



Рисунок 20 – Результаты фоторегистрации переднего отрезка глаза. Периферический ожог с захватом лимбальной области. Контрольная группа. 30 сутки

На 30-е сутки в опытной группе офтальмоскопически последствия термического ожога проявлялись в виде поверхностного стромального

помутнения (среднее значение прозрачности  $31,90 \pm 0,433$ ) в самом центре термического воздействия (рис. 21). Перилимбальная сосудистая сеть полностью не восстановилась.

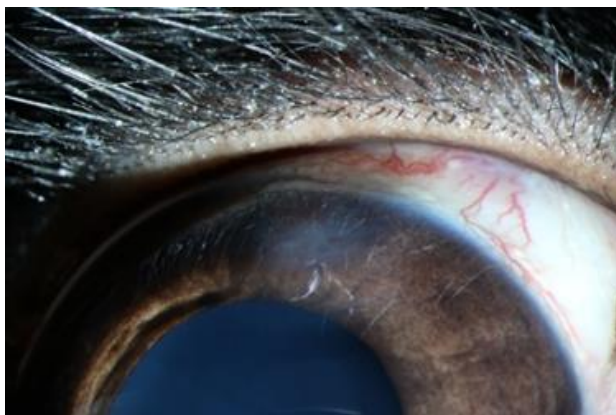


Рисунок 21 – Результаты фоторегистрации переднего отрезка глаза. Периферический ожог роговицы с захватом лимбальной области. Опытная группа. 30 сутки

Показатели прозрачности роговицы основной и контрольной групп на различных сроках наблюдения представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Средние параметры прозрачности роговицы, по данным Pentacam, основной и контрольной групп на втором этапе эксперимента, усл. ед.

Группы сравнения	Срок наблюдения					
	0 сутки (до ожога)	1 сутки	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки
Контрольная группа	22,22± 0,222	100,00± 0,000 <sup>1</sup>	100,00± 0,000 <sup>2</sup>	100,00± 0,000 <sup>2</sup>	98,90± 0,706 <sup>1,2</sup>	97,70± 0,578 <sup>1,2</sup>
Основная группа	22,11± 0,200	100,00± 0,000 <sup>1</sup>	89,65± 0,395 <sup>1,2</sup>	87,60± 0,400 <sup>1,2</sup>	35,39± 0,472 <sup>1,2</sup>	31,90± 0,433 <sup>1,2</sup>

Прим.: различия статистически достоверны при  $p < 0,05$

<sup>1</sup> – различия внутри группы по срокам наблюдения

<sup>2</sup> – различия между группами исследования по срокам наблюдения

Показатели прозрачности роговицы на первые сутки после нанесения ожога в контрольной и основной группах не различались и составляли 100 усл. ед., что соответствовало полной непрозрачности. На 3 сутки в контрольной группе уровень прозрачности достоверно не изменился и соответствовал полной непрозрачности, тогда как в основной произошло статистически достоверное уменьшение непрозрачности ( $p=0,005$ ). На 7 сутки в контрольной группе роговица оставалась полностью непрозрачной, в основной продолжилась тенденция к снижению непрозрачности и наблюдалось достоверное на 2,3% уменьшение непрозрачности ( $p=0,005$ ). На 14 сутки в группе контроля произошло статистически недостоверное ( $p=0,108$ ) повышение прозрачности, в основной продолжилось дальнейшее достоверное ( $p=0,005$ ) повышение на 59,6%. К окончанию периода наблюдения показатели прозрачности роговицы в контрольной группе достоверно повысились ( $p=0,017961$ ) на 1,2%, в основной группе сохранилась положительная динамика и наблюдалось незначительное достоверное повышение прозрачности ( $p=0,006$ ). Таким образом, показатели прозрачности роговицы на 30-е сутки в контрольной группе были достоверно ниже первоначальных доожоговых значений на 339,7% ( $p=0,000015$ ), тогда как в основной снижение составило только 44,3% ( $p=0,007$ ).

Сравнительная динамика восстановления прозрачности роговицы, представленная на рисунке 22, демонстрирует, что до нанесения ожога показатели основной и контрольных групп не имели статистически значимых различий ( $p=0,72$ ). На 3 и 7 сутки после ожога показатели контрольной группы не изменялись, и роговица оставалась абсолютно непрозрачной, тогда как в основной группе наблюдалось плавное повышение прозрачности, статистически достоверно превосходившее показатели контроля на 10,3% ( $p=0,00006$ ) и 12,4% ( $p=0,00006$ ) соответственно. На 14 и 30 сутки за счет более стремительного снижения непрозрачности в основной группе статистически достоверная разница между группами составила 64,2% ( $p=0,0001$ ) и 67,3% ( $p=0,0001$ ) соответственно, таким образом, к концу срока наблюдения

показатели основной группы значительно превосходили показатели контрольной.

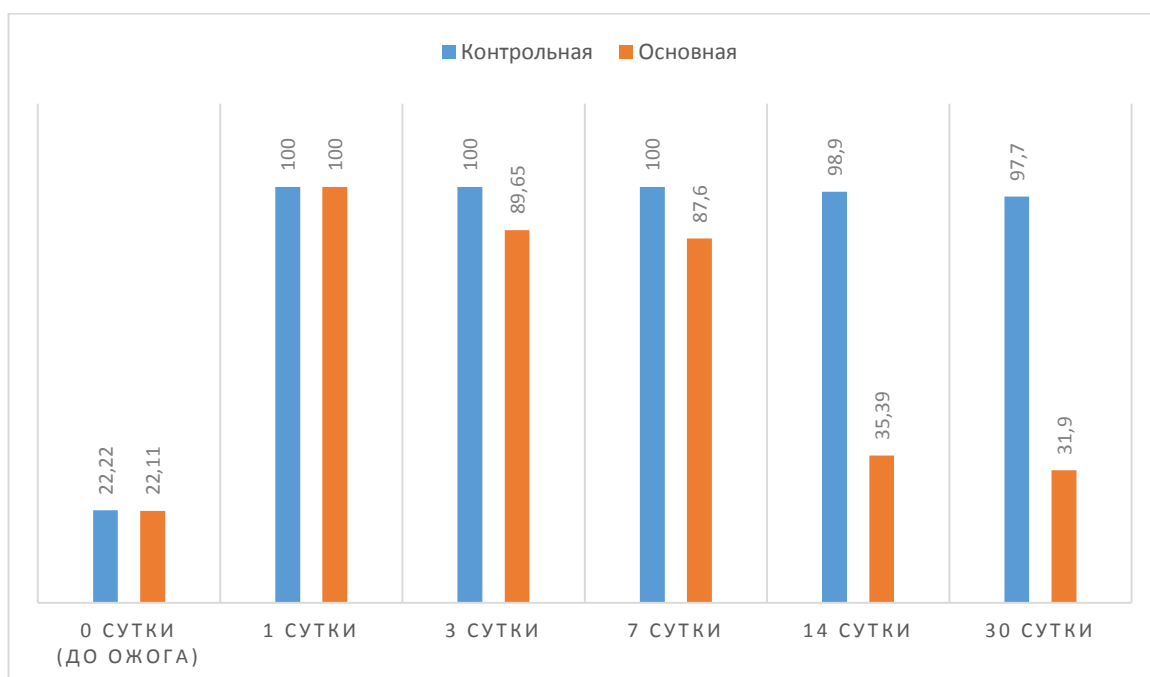


Рисунок 22 – График сравнительной динамики прозрачности роговицы, по данным Pentacam, на 2 этапе работы

### 3.2.2. Результаты гистологического исследования

На 1-е сутки в контрольной и опытной группах животных, по данным гистологического исследования, не наблюдалось различий. Гистологическая картина соответствовала тяжелому термическому поражению роговицы и глубжележащих слоев, о чем свидетельствовали множественные отслойки десцеметовой оболочки, слущенность эндотелия и множественные преципитаты.

На 7 сутки в группе контроля эпителий был эрозирован с некрозами и очаговой воспалительной инфильтрацией, боуменова мембрана дифференцировалась без видимых изменений. Строма с выраженным отеком. Десцеметова мембрана была утолщенной, эндотелий рыхлый. На поверхности эндотелия выявлялись преципитаты (рис. 23).



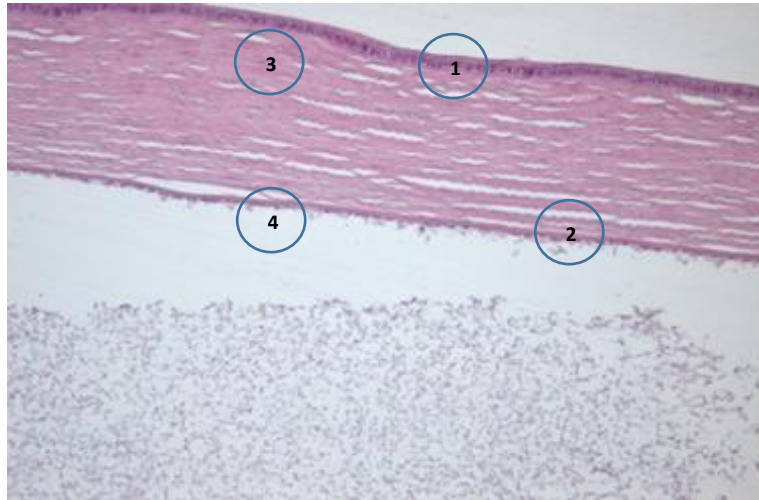


Рисунок 23 – Гистологический препарат роговицы кролика. Периферический ожог роговицы с захватом лимбальной области. Окраска гематоксилин-эозин, ув.х60. Опытная группа. 7 сутки

1 - эпителий, 2 - десцеметова мембрана с эндотелием, 3 - нарушение упорядоченности хода пучков коллагеновых волокон, 4 – преципитаты на эндотелии

На 7-е сутки в опытной группе наблюдался перинуклеарный отек базального эпителия роговицы, эпителий в зоне повреждения роговицы был неупорядочен, боуменова мембрана без видимых изменений; строма так же, как и в группе контроля, сохранена. Десцеметова мембрана присутствовала на всех срезах и плотно прилежала к строме. Однако наблюдался рыхлый эндотелий, а по наличию множественных конгломератов на нем можно было судить о наличии преципитатов (рис. 24).

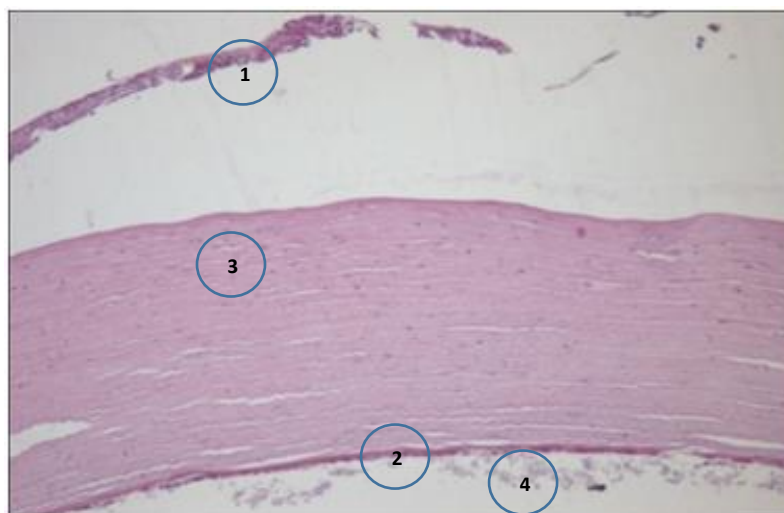


Рисунок 24 – Гистологический препарат роговицы кролика. Периферический ожог роговицы с захватом лимбальной области. Окраска гематоксилин-эозин, ув.х100. Контрольная группа. 7 сутки

1 - эпителий, 2 - десцеметова мембрана с эндотелием, 3 - нарушение упорядоченности хода пучков коллагеновых волокон, 4 – преципитаты на эндотелии

К 30-м суткам в контрольной группе на гистологических срезах наблюдался сохраненный эпителий и значительные изменения в глубжележащих слоях роговицы, а именно, обильное вращание новообразованных сосудов в передние слои роговицы, формирование сосудистого бельма и поддержание отека стромы (рис. 25).

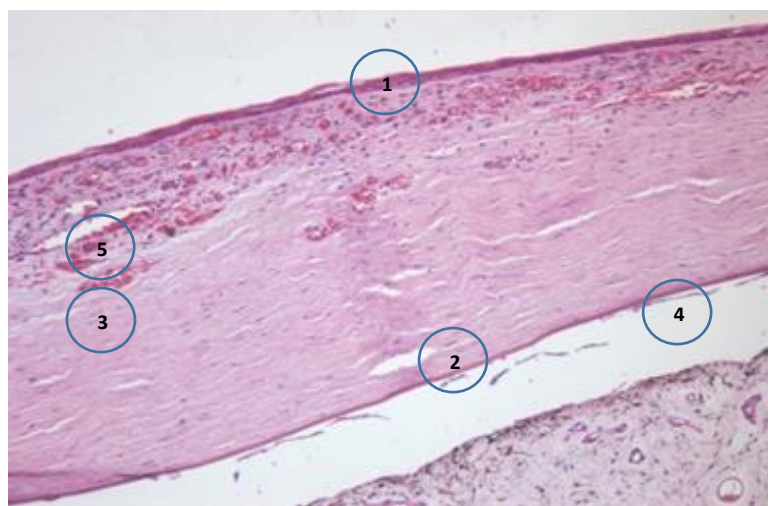


Рисунок 25 – Гистологический препарат роговицы кролика. Периферический ожог роговицы с захватом лимбальной области. Окраска гематоксилин-эозин, ув.х100. Контрольная группа. 30 сутки

1 - эпителий, 2 - десцеметова мембрана с эндотелием, 3 - нарушение упорядоченности хода пучков коллагеновых волокон, 4 – преципитаты на эндотелии, 5 -новообразованные сосуды

На 30-е сутки в опытной группе также наблюдалась сохранная структура роговицы. Базальный эпителий роговицы был сохранен с некоторой дезорганизацией слоев клеток. На участках, прилежащих к зонам термического воздействия, эпителий был полностью структурирован. Боуменова мембрана без видимых изменений, строма сохранная с некоторой дезорганизацией ее слоев. Состояние десцеметовой мембраны без видимых изменений. Эндотелий приобрел структурность, на его поверхности наблюдались единичные преципитаты (рис. 26).

Гистологическая картина у животных контрольной группы на 30-е сутки позволяла говорить о сформированном неоваскулярном помутнении роговицы в зоне ранее перенесенного термического воздействия, о чем свидетельствовало наличие сосудов в передних слоях роговицы, в то время как у животных опытной группы в аналогичные сроки наблюдалась сохранная структура роговицы.

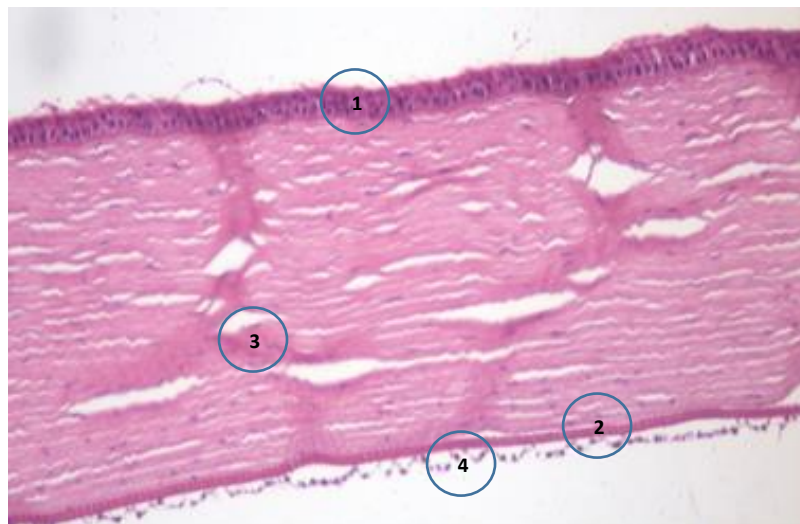


Рисунок 26 – Гистологический препарат роговицы кролика. Периферический ожог роговицы с захватом лимбальной области. Окраска гематоксилин-эозин, ув.х100. Опытная группа. 30 сутки

1 - эпителий, 2 - десцеметова мембрана с эндотелием, 3 - нарушение упорядоченности хода пучков коллагеновых волокон, 4 – преципитаты на эндотелии

Данные гистологического обследования соответствовали клинической и инструментальной картине на втором этапе эксперимента.

Таким образом, данные, полученные на основании клинических и гистологических исследований в результате второго этапа экспериментального исследования, показали, что применение белково-пептидного комплекса является эффективным средством профилактики неоваскулогенеза, что проявляется в восстановлении прозрачности, толщины и гистологической структуры роговицы по сравнению со стандартной терапией, при которой в аналогичные сроки наблюдения формируется неоваскулярное бельмо роговицы.

По результатам 3 главы была последовательно проанализирована эффективность влияния БПК на репаративные свойства роговицы и эффективность влияния БПК на профилактику развития патологического ангиогенеза роговицы кроликов. Полученные сведения позволили приступить ко второму этапу эксперимента.

## **ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ ПОСТОЖОГОВОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ РОГОВИЦЫ**

Целью данной главы экспериментального исследования являлась оценка эффективности применения паракринных факторов МСК в составе БПК общей фракции и фракции до 30 кДа на модель хронической постожоговой неоваскуляризации роговицы крыс и обосновать применение БПК для лечения данной модели с помощью определения оценки активности НАДФ – оксидазы посредством хемилюминисцентного анализа.

Основанием для использования двух фракций БПК явился тот факт, что современные антиVEGF препараты имеют молекулярную массу в диапазоне от 90 до 100 кДа и они обладают недостаточной антиангиогенной эффективностью при лечении неоваскуляризации роговицы, однако молекулярная масса одного из первых препаратов, обладающих антиангиогенной активностью в лечении неоваскуляризации роговицы, - ангиостатина - составила 38 кДа.

### **4.1. Результаты применения белково-пептидного комплекса при лечении постожогового неоваскулярного бельма роговицы (этап 4)**

Решение задачи оценки влияния белково-пептидного комплекса на сформированную в результате химического повреждения модель хронической постожоговой неоваскуляризации роговицы крыс выполнялось посредством проведения клинических методов исследования, изучения данных гистологической картины и математической оценки площади поврежденной роговицы.

Для решения поставленной задачи нужно было добиться формирования модели хронической постожоговой неоваскуляризации роговицы. Оно формировалось на 3 этапе экспериментального исследования.

На данном этапе работы в качестве экспериментальных животных были использованы крысы. Факторы, повлиявшие на этот выбор, описаны во 2 главе диссертации. Кроме того, возможность проведения эксперимента на другом виде животных позволила подтвердить положительное действие БПК независимо от видоспецифичности объекта лечения.

#### **4.1.1. Разработка модели постожогового неоваскулярного бельма роговицы и характеристика этапов его развития (этап 3)**

##### **4.1.1.1. Результаты биомикроскопического исследования**

До нанесения ожога в контрольной и опытной группах офтальмоскопически глаза были спокойные, роговица прозрачная, влага передней камеры также прозрачная, радужка структурна, хрусталик прозрачный.

В первые часы после повреждения у крыс офтальмоскопически наблюдались блефароспазм, выраженная инъекция сосудов конъюнктивы, отек эпителия.

На 1-е сутки было отмечено усиление блефароспазма, светобоязнь и выраженная конъюнктивальная инъекция сосудов. Эпителий роговицы был практически полностью слущен с сохранением отдельных «островков» в парацентральной зоне.

К 3-м суткам, помимо сохраняющихся блефароспазма, конъюнктивальной инъекции и слущенного эпителия, офтальмоскопически визуализировалась расширенная сеть лимбальных сосудов с единичным прорастанием новообразованных сосудов по направлению к центральной зоне роговицы.

На 7-е сутки блефароспазм уменьшился, эпителий закрыл эрозированную поверхность, но у отдельных животных наблюдалось сохранение деэпителизированных участков в центральной области, которые не превышали диаметр 1,5 мм. По всей паралимбальной зоне роговицы наблюдалось вращение паннуса из новообразованных сосудов в толщу стромы на 1-2 мм (рис. 27).

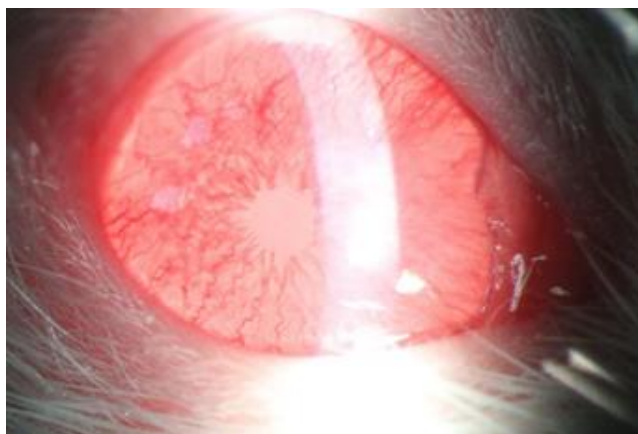


Рисунок 27 – Фоторегистрация переднего отрезка глаза крысы. Модель химического поражения роговицы. 7-е сутки

К 14-м суткам не наблюдалось блефароспазма и конъюнктивальной инъекции сосудов, отмечалась полная эпителизация поверхности роговицы и формирование неоваскуляризированного помутнения роговицы. Сосуды, в свою очередь, имели различный ход. Отдельные стволы были направлены к центральной зоне с формированием между собой анастомозов, другие сосуды оканчивались в парацентральной зоне и имели меньший диаметр.

К 30-м суткам (рис. 28) различий в офтальмологическом статусе животных по сравнению с 14 сутками не было выявлено.



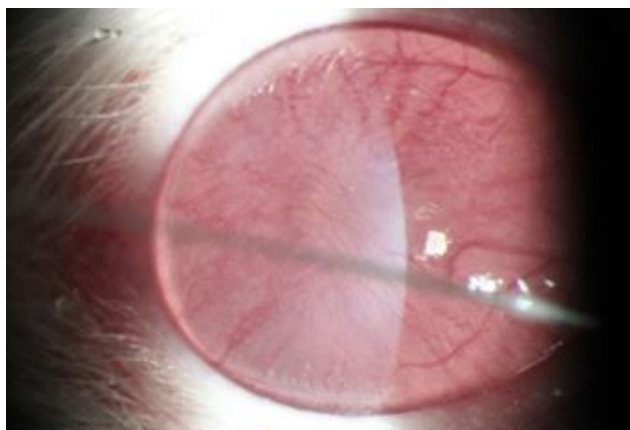


Рисунок 28 – Фоторегистрация переднего отрезка глаза крысы. Модель химического поражения роговицы. 30-е сутки

Таким образом, по данным офтальмоскопических исследований, к 14-м суткам наблюдалось формирование неоваскулярного бельма роговицы, которое не претерпевало динамики до 30-х суток.

#### **4.1.1.2. Результаты оптической когерентной томографии переднего отрезка глаза**

По данным ОСТ переднего отрезка, к 3-м суткам (рис. 29) отмечалось увеличение толщины (среднее значение  $669,90 \pm 4,122$ ) роговицы с формированием отслоек десцеметовой мембраны.



Рисунок 29 – ОСТ переднего отрезка глаза крысы. Модель химического поражения роговицы. 3-е сутки

На 7-е сутки (рис. 30), по данным ОСТ, отмечалось увеличение оптической плотности роговицы с сохранением ее толщины (среднее значение  $581,90 \pm 2,779$ ). Увеличение отслойки десцеметовой мембраны и преципитаты на поверхности эндотелия.

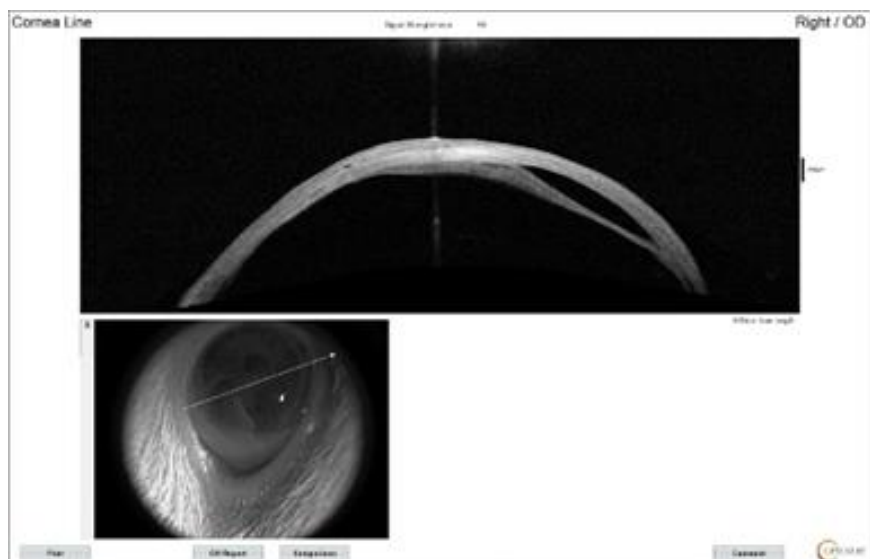


Рисунок 30 – ОСТ переднего отрезка глаза крысы. Модель химического поражения роговицы. 7-е сутки

На 14-е сутки (рис. 31) сохранялось увеличение оптической плотности роговицы, отслойки десцеметовой мембраны, кроме того, отмечено формирование задних синехий.

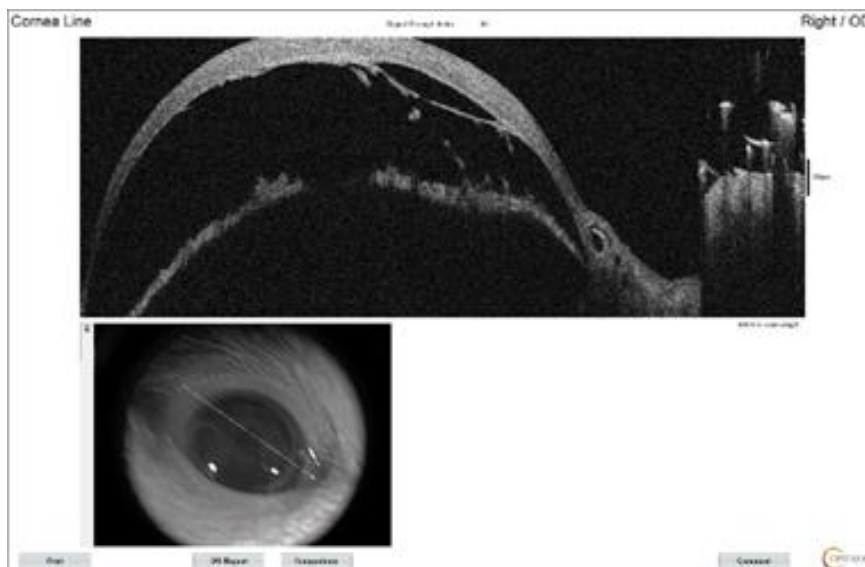


Рисунок 31 – ОСТ переднего отрезка глаза крысы. Модель химического поражения роговицы. 14-е сутки

К 30-м суткам (рис. 32) толщина эпителиального слоя была неравномерной, в назальном сегменте параоптической области в толще стромы определялось гиперрефлективное помутнение, в его проекции, преимущественно в поверхностных слоях стромы, визуализировались множественные гипорефлективные полости (кисты). УПК был тотально закрыт за счет плоскостной иридокорнеальной синехии. Также отмечена неравномерная толщина роговицы (среднее значение  $494,20 \pm 2,274$ ) в центральной зоне (формировалось центральное «плато», где роговица была истонченной).

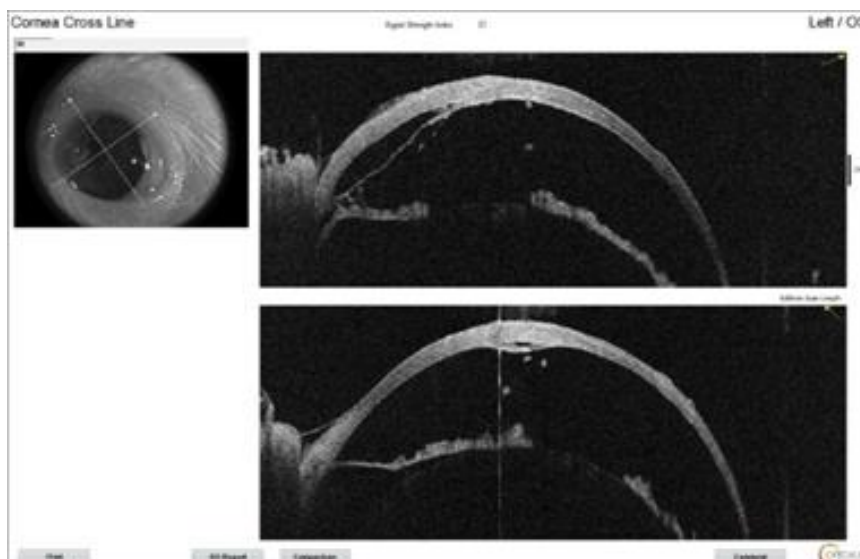


Рисунок 32 – ОСТ переднего отрезка глаза крысы. Модель химического поражения роговицы. 30-е сутки

Показатели средней толщины роговицы, по данным ОСТ, на различных сроках наблюдения представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Средние показатели толщины роговицы, по данным ОСТ, на третьем этапе эксперимента, мкм

Период наблюдения	До воздействия	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки
Средняя толщина роговицы, мкм	404,64± 0,472	669,90± 4,122 <sup>1</sup>	581,90± 2,779 <sup>1</sup>	501,10± 1,410 <sup>1</sup>	494,20± 2,274 <sup>1</sup>

Прим.: различия статистически достоверны при  $p < 0,05$

<sup>1</sup> – различия внутри группы по срокам наблюдения

На 3 сутки после воздействия на роговицы крыс отмечалось статистически достоверное ( $p=0,005$ ) увеличение толщины роговицы, составившее 65,5%. На протяжении всего срока наблюдения, начиная с 7 суток, отмечалось статистически достоверное уменьшение толщины роговицы, составившее 13,1 и 13,9% на 7 и 14 сутки ( $p=0,005$ ) соответственно. На 30 сутки было отмечено незначительное статистически недостоверное снижение данного показателя на 1,4 % ( $p=1,000$ ). Таким образом, значения толщины

роговицы к концу периода наблюдения статистически достоверно ( $p=0,005$ ) на 22,1% превышали показатели нормальных значений до ожога.

Графически динамика толщины роговицы в модели химического ожога представлена на рисунке 33.



Рисунок 33 – Динамика толщины роговицы в модели химического ожога роговицы

Таким образом, отсутствие динамики воспалительного процесса в передней камере с 14-х суток, незначительная динамика данных толщины роговицы в сторону ее большей неравномерности позволило предположить, что уже к 14-м суткам получена стойкая модель неоваскулярного бельма роговицы в результате химического поражения, что подтверждалось данными оптической когерентной томографии.

#### 4.1.1.3. Результаты исследования площади поражения роговицы

С целью оценки динамики сформированного неоваскулярного помутнения было принято решение определять площадь роговицы, поврежденной новообразованными сосудами. Для этого использовалась программа IP Square.

Первым этапом определялась общая площадь роговицы на каждом конкретном снимке. На втором этапе выделялась площадь пораженного

участка. Данный процесс происходил вручную. Оценивалась зона помутнения поврежденной роговицы и очерчивалась ее граница.

На третьем этапе программа высчитывала поврежденный участок роговицы (рис. 34) и с помощью алгоритмов, заложенных в ней, выдавался процент поврежденной зоны.

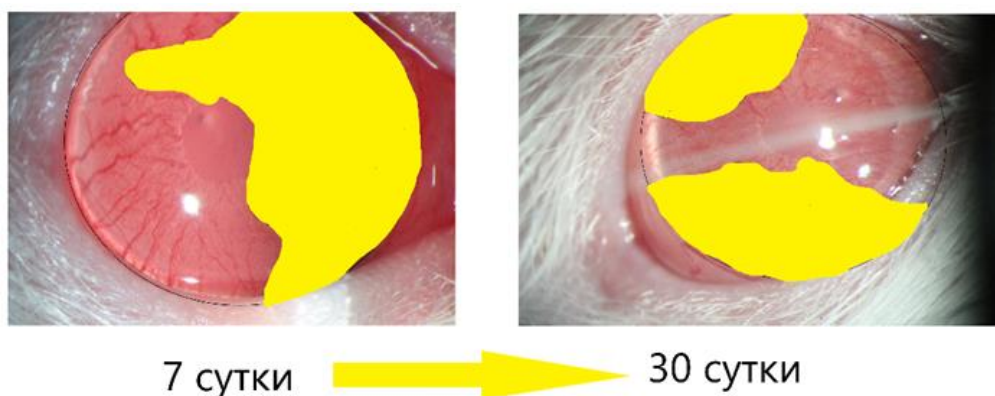


Рисунок 34 – Схема определения площади повреждения роговицы.

Поврежденные зоны обозначены с помощью цветового картирования

Средние показатели площади пораженной роговицы представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Средние показатели площади поражения роговицы на третьем этапе эксперимента, %

Срок наблюдения	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки
Площадь поражения роговицы, %	42,30±1,086	68,20±0,490 <sup>1</sup>	61,40±0,340 <sup>1</sup>	61,40±0,163

Прим.: различия статистически достоверны при  $p < 0,05$

<sup>1</sup> – различия внутри группы по срокам наблюдения

Из таблицы видно, что на 7 сутки наблюдалось статистически достоверное ( $p=0,005$ ) увеличение пораженной площади роговицы на 61,2%. Однако уже на 14 сутки отмечалось статистически достоверное уменьшение данного показателя на 10% ( $p=0,005$ ). Эта динамика, вероятно, связана с

уменьшением воспалительной реакции и снижением отека роговицы. На 30 сутки площадь поражения не изменялась, сохраняя значения предыдущего периода наблюдения ( $p=0,005$ ).

Графически динамика толщины роговицы в модели химического ожога представлена на рисунке 35.



Рисунок 35 – Динамика средних показателей площади поражения роговицы в модели химического ожога роговицы (этап 3)

Полученные данные свидетельствовали об отсутствии динамики площади поражения роговицы уже с 14-х суток.

#### 4.1.1.4. Результаты гистологического исследования

Гистологическая картина на данном этапе эксперимента полностью соответствовала офтальмоскопической и инструментальной картине, сформированной в результате поражающего фактора неоваскулярного помутнения роговицы.

По данным гистологического исследования модели химического ожога на 3 сутки (рис. 36), процесс эпителизации поврежденного участка был уже завершен, однако в центральной зоне новообразованный эпителий отслоен от подлежащей стромы с формированием псевдокисты, заполненной прозрачной экссудативной жидкостью. В строме центральной зоны диффузный

пластинчатый умеренный лимфоцитарно-плазмоцитарный инфильтрат. На периферии клеточный компонент инфильтрата перемещен в передние слои стромы (субэпителиально), в его составе были обнаружены единичные эозинофильные гранулоциты, возможно, эозинофилы (аллергический компонент), а также активный неоваскулогенез с тенденцией прорастания капилляров по направлению к центру. Задний эпителий роговицы (эндотелий) без особенностей.

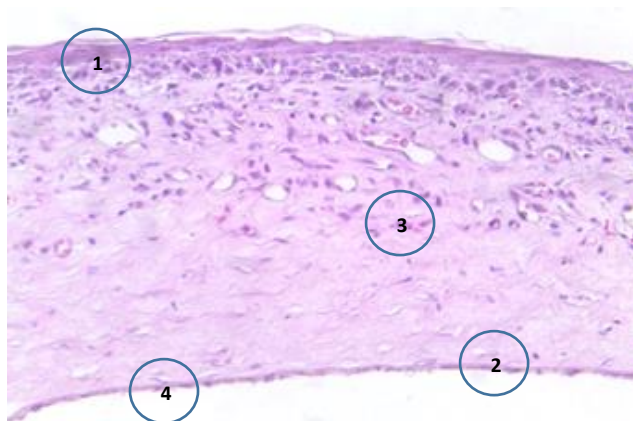


Рисунок 36 – Гистологический препарат роговицы крысы (3 сутки). Окраска гематоксилин – эозин, ув. X200

1 - эпителий, 2 - десцеметова мембрана с эндотелием, 3 - нарушение упорядоченности хода пучков коллагеновых волокон, 4 – преципитаты на эндотелии

К 7 суткам в центральной зоне под эпителием сохранялись псевдокисты, заполненные прозрачной экссудативной жидкостью, на фоне субэпителиальной фиброплазии. В строме наблюдался диффузный пластинчатый умеренный лимфоцитарно-плазмоцитарный инфильтрат на фоне неоваскуляризации с диапедезными кровоизлияниями. Задний эпителий роговицы (эндотелий) без особенностей (рис. 37).



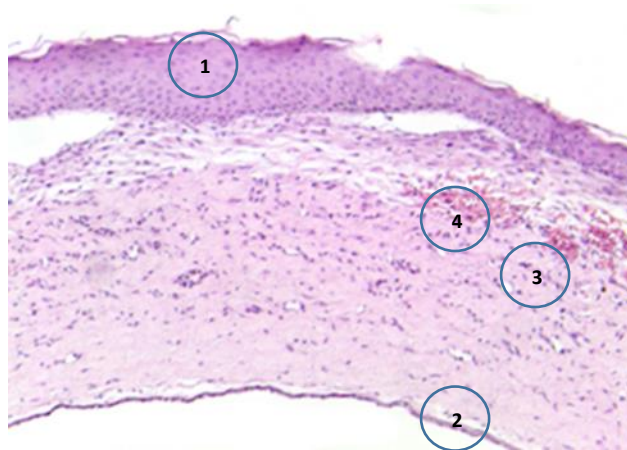


Рисунок 37 – Гистологический препарат роговицы крысы (7 сутки). Окраска гематоксилин – эозин, ув. X200

1 - эпителий, 2 - десцеметова мембрана с эндотелием, 3 - нарушение упорядоченности хода пучков коллагеновых волокон, 4 — новообразованные сосуды

На 14 сутки, по данным гистологического исследования, субэпителиальные кисты отсутствовали, активной фиброплазии не наблюдалось. В строме обнаруживалась слабая клеточная инфильтрация в передних слоях, неоваскуляризация также затрагивала только передние слои роговицы с единичными экстравазальными эритроцитами. Задний эпителий роговицы (эндотелий) также без особенностей (рис. 38).

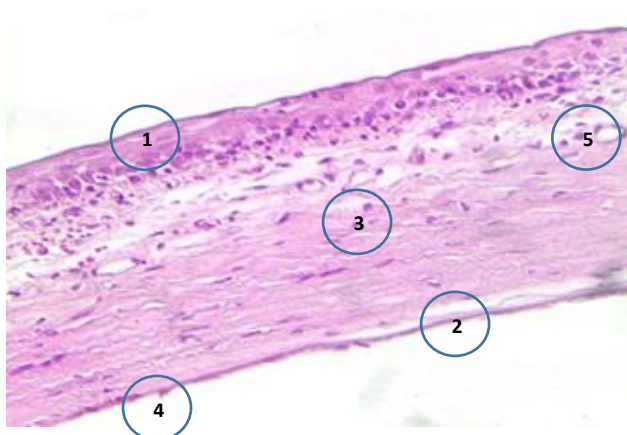


Рисунок 38 – Гистологический препарат роговицы крысы (14 сутки). Окраска гематоксилин – эозин, ув. X200

1 - эпителий, 2 - десцеметова мембрана с эндотелием, 3 - нарушение упорядоченности хода пучков коллагеновых волокон, 4 – преципитаты на эндотелии, 5 - новообразованные сосуды

На 30 сутки, по данным гистологии наблюдалось истончение роговицы с признаками сформированного васкуляризированного бельма. Сосуды эктазированы, полнокровны, строма умеренно отечна. Задний эпителий роговицы без особенностей (рис. 39).



Рисунок 39 – Гистологический препарат роговицы крысы (30 сутки). Окраска гематоксилин – эозин, ув. x100

1 - эпителий, 2 - десцеметова мембрана с эндотелием, 3 - нарушение упорядоченности хода пучков коллагеновых волокон, 4 –новообразованные сосуды

В результате данного этапа эксперимента было установлено, что сформированное в результате химического повреждения неоваскулярное бельмо развивается к 14-м суткам и вплоть до 30-х суток не имеет никакой клинически, инструментально и гистологически значимой динамики.

#### **4.1.2. Оценка состояния роговицы и глубже лежащих сред по данным инструментальных и лабораторных исследований при лечении постожогового неоваскулярного бельма роговицы**

Первые сутки наблюдения на данном этапе эксперимента соответствовали концу периода наблюдения, то есть 30 суткам на третьем этапе работы.

В контрольной группе на 14-е и 30-е (рис. 40) сутки, по данным офтальмоскопии, динамики не наблюдалось. Были выявлены множественные новообразованные сосуды роговицы (преимущественно крупные сосудистые стволы) со стромальными помутнениями в их проекции. Сформированное неоваскулярное бельмо оставалось без изменений.

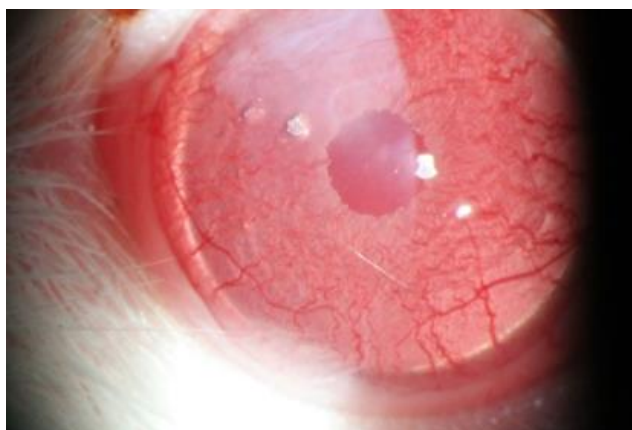


Рисунок 40 – Фоторегистрация переднего отрезка глаза крысы. Химический ожог роговицы. Контрольная группа. 30-е сутки лечения

На 14-е сутки инстилляций в конъюнктивальную полость белково-пептидного препарата различных фракций в опытной группе наблюдалось уменьшение количества новообразованных сосудов, в проекции запустевших сосудов помутнения роговицы исчезали (рис. 41). Сохранившиеся новообразованные комплексы имели меньший диаметр. Эпителий оставался сохранным, в передней камере патологии не было выявлено. Различий в подгруппах, где в качестве лечения применялся белково-пептидный препарат общей фракции и фракции до 30 кДа, не наблюдалось, что также подтверждалось показателями прозрачности роговицы, полученными посредством Pentacam.

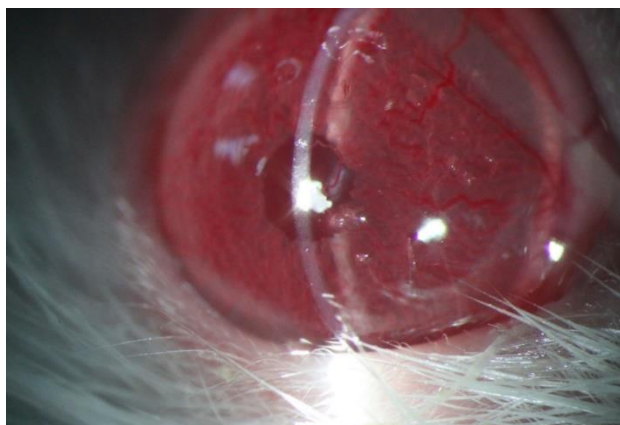


Рисунок 41 – Фоторегистрация переднего отрезка глаза крысы. Химический ожог роговицы. Опытная группа (подгруппа 1). 14-е сутки лечения

На 30-е сутки в опытной группе у подавляющей части животных новообразованных сосудов обнаружено не было, сохранялись лишь отдельные сосудистые стволы, выходящие из лимбальной области, проходящие в толще роговицы и вновь вклинивающиеся в область лимбальной сосудистой сети (рис. 42). Отдельно стоит отметить, что помутнений в зонах сохранившихся новообразованных сосудов не наблюдалось. Офтальмоскопически различий между двумя опытными подгруппами выявлено не было.

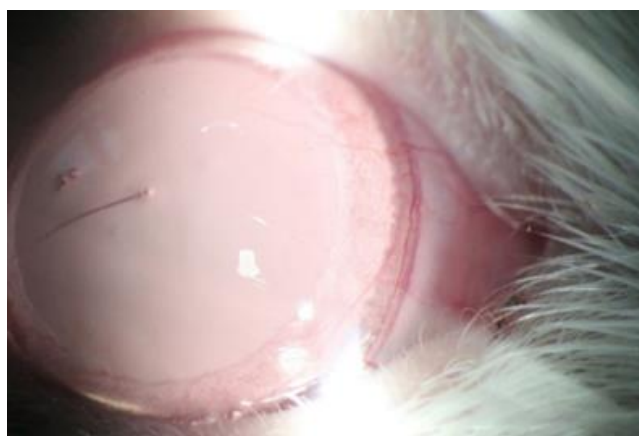


Рисунок 42 – Фоторегистрация переднего отрезка глаза крысы. Химический ожог роговицы. Опытная группа (подгруппа 2). 30-е сутки лечения

Показатели прозрачности роговицы основной и контрольной группы на различных сроках наблюдения представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Средние показатели прозрачности роговицы, по данным Pentacam, на четвертом этапе эксперимента, усл.ед.

Группы сравнения	Срок наблюдения			
	До воздействия	1 сутки	14 сутки	30 сутки
Контрольная группа	32,19±0,101* <sup>1</sup>	100,00±0,000 <sup>1</sup>	100,00±0,000 <sup>2</sup>	98,10±0,277 <sup>1,2</sup>
Опытная подгруппа 1 (общая фракция)	32,18±0,122*	100,00±0,000 <sup>1</sup>	65,10±0,458 <sup>1,2</sup>	33,10±0,277 <sup>1,2</sup>
Опытная подгруппа 2 (пептидный препарат фракцией до 30 кДа)	32,19±0,101*	100,00±0,000 <sup>1</sup>	66,50±0,373 <sup>1,2</sup>	33,60±0,305 <sup>1,2</sup>

Прим.: различия статистически достоверны при  $p < 0,05$

\* средние показатели прозрачности роговицы соответствуют данным, полученным на 3 этапе эксперимента

<sup>1</sup> – различия внутри группы по срокам наблюдения

<sup>2</sup> – различия между группами исследования по срокам наблюдения

Показатели прозрачности роговицы на первые сутки наблюдения были одинаковы во всех группах, имея показатель абсолютной непрозрачности (100 усл. ед.). На 14 сутки показатель контрольной группы не изменялся, тогда как

показатели опытных подгрупп достоверно снижались на 34,9% ( $p=0,005$ ) и 33,5% ( $p=0,005$ ) соответственно в первой и второй подгруппе. На 30 сутки в контрольной группе наблюдалось достоверное незначительное снижение непрозрачности на 1,9% ( $p=0,005$ ), в опытных подгруппах дальнейшее значительное увеличение прозрачности на 49,1% ( $p=0,005$ ) в первой и 49,5% ( $p=0,005062$ ) во второй подгруппе. Таким образом, статистически достоверная разница с нормальными значениями к концу срока наблюдения в контрольной группе составила 204,7% ( $p=0,005$ ), для первой и второй подгрупп 2,8% ( $p=0,017$ ) и 4,4% ( $p=0,011$ ) соответственно.

Сравнительная динамика восстановления прозрачности роговицы, представленная на рисунке 43, демонстрирует, что на 0 и 1-е сутки группы были однородны по данному показателю (статистически значимой разницы между группами не выявлено. На 0 сутки – между опытной подгруппой 1 и 2  $p=1$ ; опытная подгруппа 1 и контрольная  $p=1$ ; опытная подгруппа 2 и контрольная  $p=1$ . На 1 сутки – между опытной подгруппой 1 и 2  $p=1$ ; опытная подгруппа 1 и контрольная  $p=1$ ; опытная подгруппа 2 и контрольная  $p=1$ ). На 14 сутки показатель контроля был ниже, чем в опытной группе, так статистически достоверные различия контрольной группы и опытной подгруппы 1 составили 34,9% ( $p=0,00004$ ), опытной подгруппой 2 – 33,5% ( $p=0,00004$ ). К 30 суткам разница с контрольной группой статистически достоверно увеличилась до 66,3% ( $p=0,0001$ ) и 65,7% ( $p=0,0001$ ) соответственно с первой и второй подгруппами. Между подгруппами на 1-е ( $p=1,000$ ) и 30-е ( $p=0,198$ ) сутки данные не имели статистически значимых различий, на 14-е ( $p=0,0283$ ) значения статистически достоверно различались незначительно (2,1%).

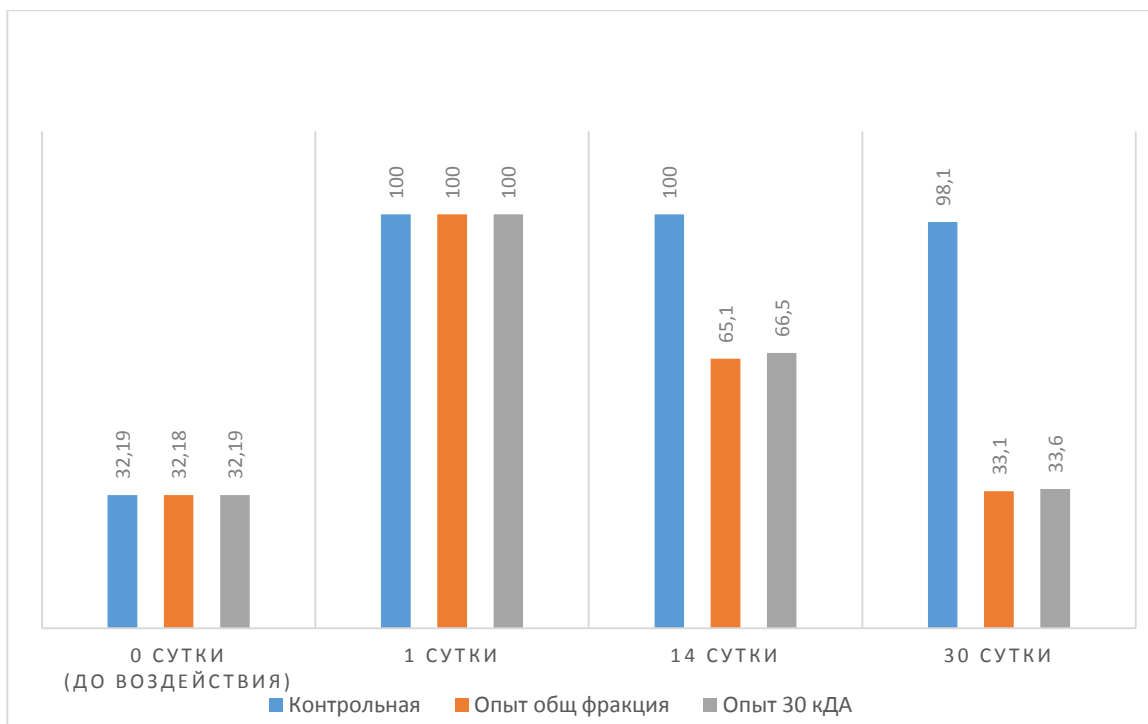


Рисунок 43 – График сравнительной динамики прозрачности роговицы

Данные оценки состояния прозрачности роговицы крыс, приведенные в таблице 8, получены при помощи прибора Pentacam. Однако карты топографии и пахиметрии в связи с маленьким диаметром роговицы прибору достоверно определить не удалось, в связи с этим для определения показателей толщины роговицы использовали оптический когерентный томограф RTVue-100.

#### 4.1.2.1. Результаты оптической когерентной томографии роговицы при лечении постожогового неоваскулярного бельма роговицы (этап 4)

В контрольной группе на протяжении всего срока наблюдения, то есть на 14-е и 30-е сутки, существенных изменений по сравнению с данными, полученными по окончании третьего этапа работы выявлено не было.

В опытной группе, по данным OCT переднего отрезка, к 14-м суткам наблюдался выраженный эпителиально-стромальный отек роговицы с множественными субэпителиальными кистами, а также неравномерным

увеличением рефлексивности стромы на разных уровнях (преимущественно поверхностных ее слоев) (рис. 44).

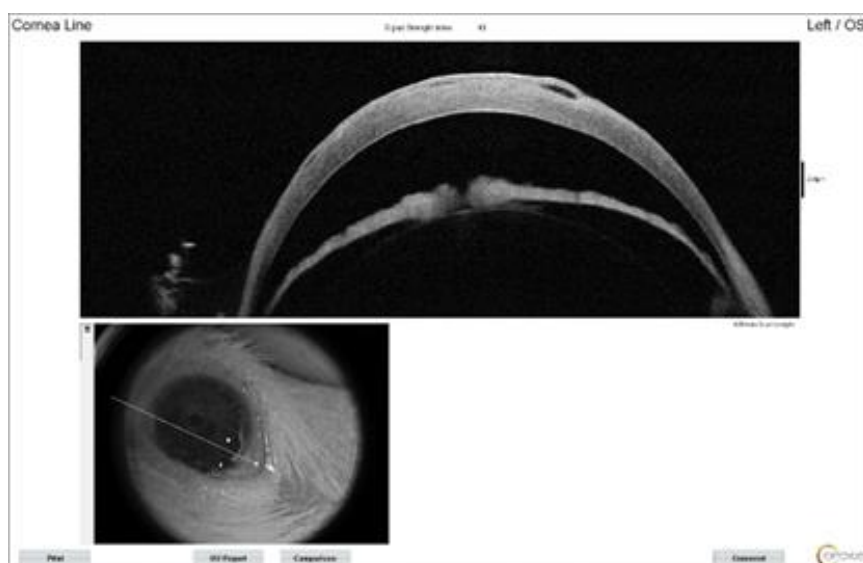


Рисунок 44 – Оптическая когерентная томография переднего отрезка глаза крысы. Химический ожог роговицы. Опытная группа. 14-е сутки лечения

К 30-м суткам динамики относительно 14-х суток не наблюдалось (рис. 45). По данным ОСТ, различий между двумя опытными подгруппами на всех сроках наблюдения выявлено не было.

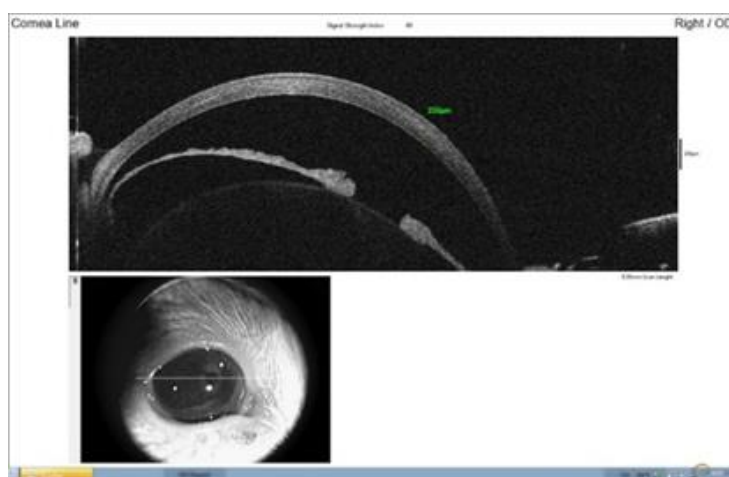


Рисунок 45 – Оптическая когерентная томография переднего отрезка глаза крысы. Химический ожог роговицы. Опытная группа. 30-е сутки лечения



Показатели толщины роговицы основной и контрольной групп представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Средние показатели толщины роговицы основной и контрольной групп, по данным ОСТ, на четвертом этапе эксперимента, мкм

Группы сравнения	Срок наблюдения			
	До воздействия	1 сутки (от начала лечения)	14 сутки	30 сутки
Контрольная группа	404,62±0,386*	603,40±0,163 <sup>1</sup>	592,40±0,371 <sup>1,2</sup>	587,30±0,684 <sup>1,2</sup>
Опытная подгруппа 1 (общая фракция)	404,50±0,399*	603,20±0,133 <sup>1</sup>	473,00±0,258 <sup>1,2</sup>	459,80±0,291 <sup>1,2</sup>
Опытная подгруппа 2 (пептидный препарат фракцией до 30 кДа)	404,75±0,382*	603,10±0,179 <sup>1</sup>	472,60±0,933 <sup>1,2</sup>	464,70±0,803 <sup>1,2</sup>

Прим.: различия статистически достоверны при  $p < 0,05$

\* средние показатели толщины роговицы соответствуют данным, полученным на 3 этапе эксперимента

<sup>1</sup> – различия внутри группы по срокам наблюдения

<sup>2</sup> – различия между группами исследования по срокам наблюдения

На протяжении всего срока наблюдения показатели толщины роговицы контрольной группы незначительно статистически достоверно снижались: к 14 суткам на 1,8% ( $p=0,005$ ), к 30 суткам на 0,9% ( $p=0,005$ ), к концу срока наблюдения показатель толщины роговицы статистически достоверно ( $p=0,005$ ) превосходил нормальные значения на 45,1%. На 14-е сутки в основной группе толщина роговицы достоверно уменьшилась в подгруппе 1 на 21,6% ( $p=0,005$ ), в подгруппе 2 на 21,6% ( $p=0,005$ ). На 30-е сутки значения толщины роговицы в опытных подгруппах продолжили тенденцию к снижению и уменьшились на 2,8% и 1,7% ( $p=0,005$ ) в первой и второй подгруппе соответственно. Таким образом, статистически достоверная разница с нормальными значениями к концу срока наблюдения составила

13,7% ( $p=0,005$ ) и 14,8% ( $p=0,005$ ) для первой и второй подгрупп соответственно.

Сравнительная динамика толщины роговицы, представленная на рисунке 46, демонстрирует, что на 0 и 1-е сутки группы были однородны по данному показателю (статистически значимой разницы между группами не выявлено. На 0 сутки – между опытной подгруппой 1 и 2  $p=0,62$ ; опытная подгруппа 1 и контрольная  $p=0,81$ ; опытная подгруппа 2 и контрольная  $p=0,8$ . На 1 сутки – между опытной подгруппой 1 и 2  $p=0,73$ ; опытная подгруппа 1 и контрольная  $p=0,37$ ; опытная подгруппа 2 и контрольная  $p=0,26$ ). На 14 сутки значения в контрольной группе были выше значений опытной, статистически достоверные различия между контрольной группой и опытной подгруппой 1 составили 20,1% ( $p=0,0001$ ), между опытной подгруппой 2 – 20,2% ( $p=0,0001$ ). К 30 суткам разница с контрольной группой статистически достоверно увеличилась на 21,7% ( $p=0,0001$ ) и 20,9% ( $p=0,0001$ ) соответственно с первой и второй подгруппами. Между подгруппами на 1-е ( $p=0,726$ ) и 14-е ( $p=0,097$ ) сутки данные не имели статистически значимых различий, на 30-е ( $p=0,0008$ ) данные статистически достоверно различались незначительно (1%).

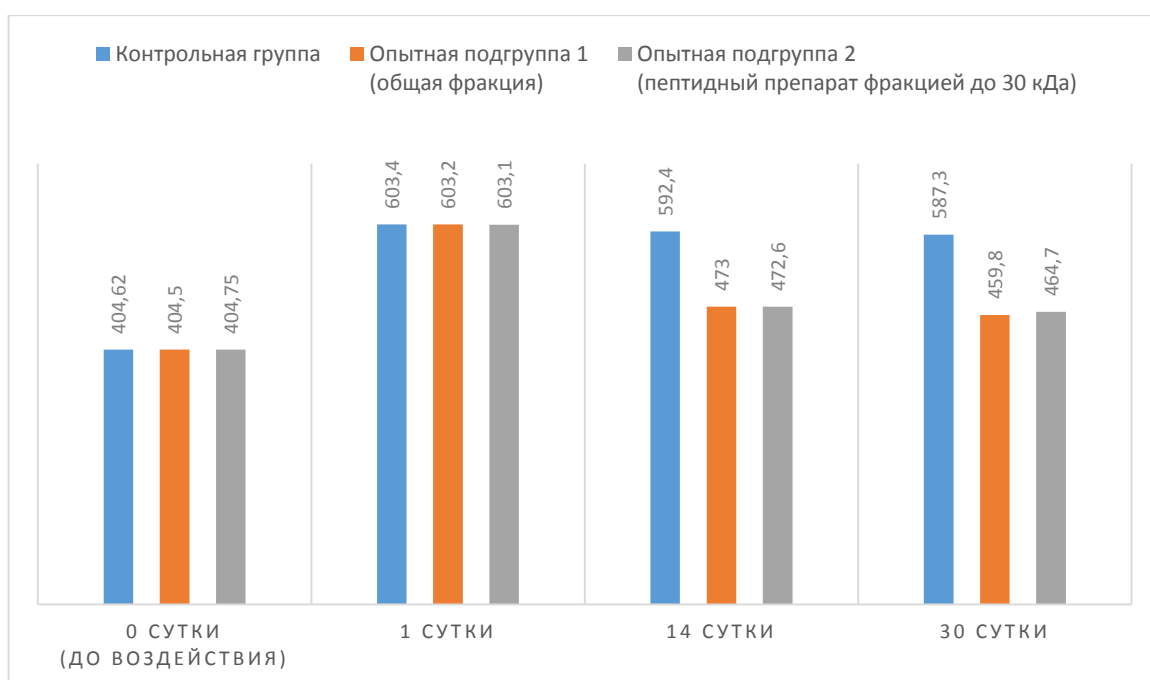


Рисунок 46 – График сравнительной динамики толщины роговицы

Полученные данные косвенно свидетельствуют о процессах восстановления, протекающих в роговице животных, наиболее выраженных в основной группе.

#### 4.1.2.2. Результаты исследования площади поражения роговицы при лечении постожогового неоваскулярного бельма роговицы (этап 4)

Анализ площади поражения роговицы проводился по аналогии с 3 этапом исследования. Данные по проценту поражения роговицы в основной и контрольной группах представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Средние показатели площади поражения роговицы (этап 4), %

Группы	Срок наблюдения		
	До воздействия	14 сутки	30 сутки
Контрольная группа	61,40±0,163 <sup>1*</sup>	59,38±0,160 <sup>1,2</sup>	48,36±0,151 <sup>1,2</sup>
Опытная подгруппа 1 (общая фракция)	61,40±0,163 <sup>*</sup>	6,61±0,031 <sup>1,2</sup>	4,63±0,021 <sup>1,2</sup>
Опытная подгруппа 2 (пептидный препарат фракцией до 30 кДа)	61,40±0,163 <sup>*</sup>	7,14±0,123 <sup>1,2</sup>	5,01±0,031 <sup>1,2</sup>

Прим.: различия статистически достоверны при  $p < 0,05$

<sup>1</sup> – различия внутри группы по срокам наблюдения

<sup>2</sup> – различия между группами исследования по срокам наблюдения

На 14 сутки наблюдалось незначительное статистически достоверное снижение площади пораженной роговицы в контрольной группе ( $p=0,005$ ). На 30 сутки объем поражения роговицы уменьшился еще на 18,6% ( $p=0,005$ ). В опытных подгруппах на протяжении всех сроков наблюдения четко прослеживалась тенденция к уменьшению площади поражения роговицы. На 14 сутки значительное статистически достоверное уменьшение показателя

составило 89,2 % и 88,4% в 1 и 2 подгруппах соответственно ( $p=0,005$ ). На 30 сутки объем поражения незначительно достоверно уменьшился на 29,9% ( $p=0,005$ ) и 29,8% ( $p=0,005$ ) в опытной подгруппе 1 и 2 соответственно.

Сравнительная динамика площади пораженной роговицы животных в группах исследования представлена на рис. 47. Показатели контрольной группы на всех сроках наблюдения выше значений обеих опытных подгрупп. Так, на сроке 14-ти суток показатели контроля в 8,98 ( $p=0,0001$ ) и в 8,31 раза ( $p=0,0001$ ) достоверно превышали показатели 1 и 2 основных групп соответственно. К концу срока наблюдения разница с контролем продолжала достоверно увеличиваться: в 10,44 ( $p=0,00008$ ) и в 9,65 раза ( $p=0,0001$ ) соответственно. Между подгруппами на 1-е сутки статистически значимых различий не выявлено ( $p=1,000$ ), на 14-е ( $p=0,0001$ ) и 30-е ( $p=0,0001$ ) сутки данные статистически достоверно различались незначительно: 8,0% и 8,2% соответственно.

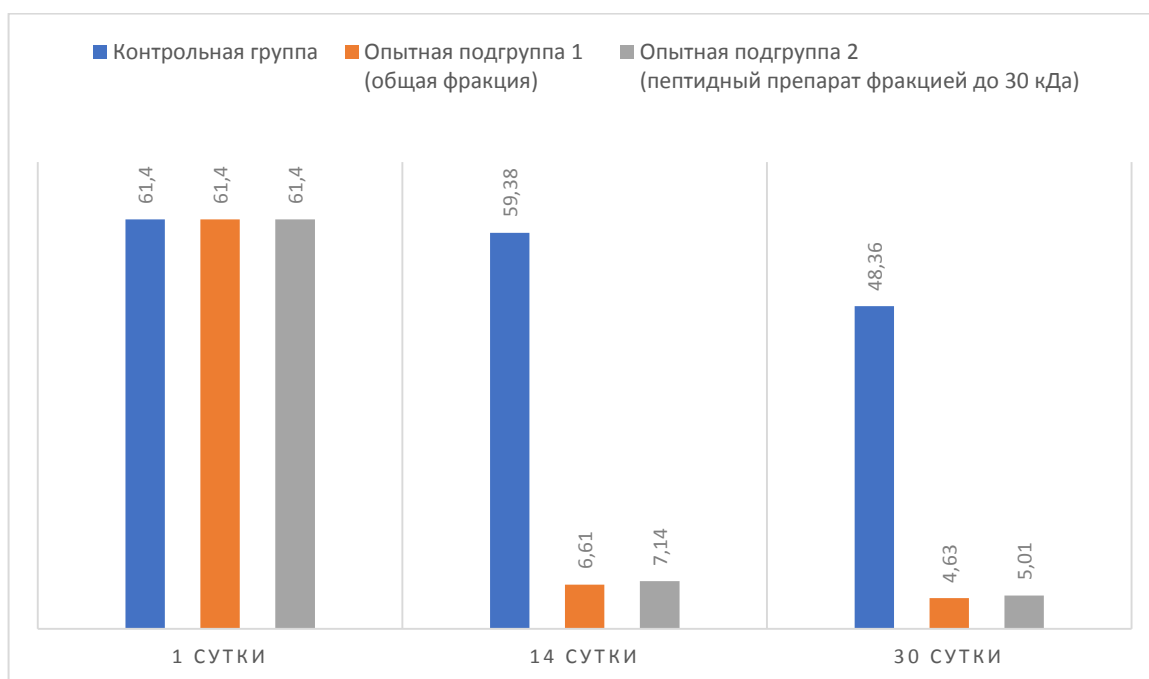


Рисунок 47 – График сравнительной динамики площади поражения роговицы

#### 4.1.2.3. Результаты гистологического исследования при лечении постожогового неоваскулярного бельма роговицы (этап 4)

Данные, полученные в результате гистологического исследования, полностью соответствовали материалам инструментальных исследований на этом этапе эксперимента.

В контрольной группе на 14-е и 30-е (рис. 48) сутки, по результатам гистологии, идентифицировался неизменный эпителий, визуализировалось сформированное неоваскулярное бельмо в виде субэпителиальной фиброплазии и неоваскуляризации.

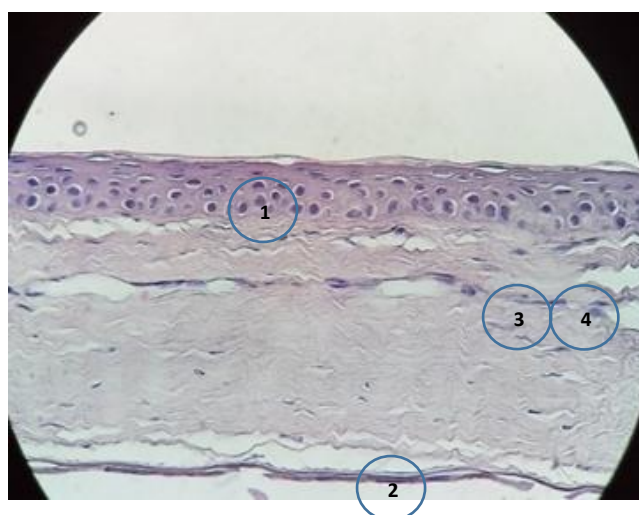


Рисунок 48 – Гистологический препарат роговицы крысы. Окраска гематоксилин – эозин, ув. X200. Контрольная группа, 30 сутки

1 - эпителий, 2 - десцеметова мембрана с эндотелием, 3 - нарушение упорядоченности хода пучков коллагеновых волокон, 4 – новообразованные сосуды

На 14-е сутки в основной группе в роговице обнаруживались функционирующие и запустевшие сосуды с признаками облитерации. Задний эпителий роговицы (эндотелий) без особенностей.

К 30-м суткам в опытной группе (рис. 49) эпителий не был изменен, строма без отека, малоклеточна; субэпителиально выявлялись единичные запустевшие, не содержащие в себе эритроцитов сосуды капиллярного типа. Задний эпителий роговицы (эндотелий) без особенностей.

По данным гистологического исследования, на всех сроках наблюдения между подгруппами опытной группы различий не выявлено.

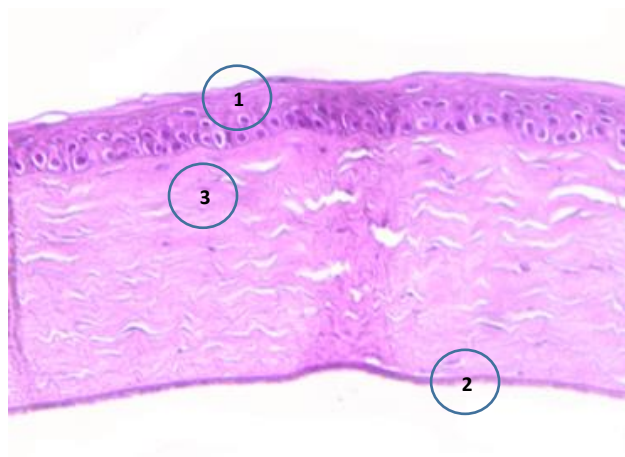


Рисунок 49 – Гистологический препарат роговицы крысы. Окраска гематоксилин – эозин, ув. X200. Опытная группа, 30 сутки

1 - эпителий, 2 - десцеметова мембрана с эндотелием, 3 - нарушение упорядоченности хода пучков коллагеновых волокон

В результате гистологического исследования наблюдались выраженные различия в опытной и контрольной группах. В опытных подгруппах прослеживалась тенденция к обратному развитию сформированного сосудистого русла в тканях роговицы, в то время как в контрольной неоваскулярное бельмо роговицы оставалось неизменным.

Подводя итог экспериментальных исследований, проведенных на модели хронической постожоговой неоваскуляризации роговицы крыс, следует отметить, что впервые была достигнута инволюция сформированного сосудистого русла в тканях роговицы после применения БПК, о чем данных в

имеющихся на настоящий момент источниках литературы обнаружено не было.

Таким образом, данные, полученные на разработанной модели хронической постожоговой неоваскуляризации (разработке модели хронической постожоговой неоваскуляризации роговицы были посвящен раздел диссертации 4.1), на основании клинических и гистологических исследований, а также математического анализа в результате четвертого этапа экспериментального исследования, говорят о том, что применение БПК при хронической постожоговой неоваскуляризации роговицы позволяло достичь обратного ангиогенеза сосудов роговицы, что проявилось в восстановлении прозрачности, толщины и приближением гистологической структуры роговицы к исходным до химического повреждения значениям. Эти данные подтверждены результатами, полученными в контрольной группе животных, где, несмотря на использование культуральной среды, к концу срока наблюдения поврежденная роговица изменений не претерпевала.

Помимо этого, обращало на себя внимание возвращение толщины роговицы крыс к исходным значениям в течение 30-дневного курса лечения, которое не могло быть следствием регресса неоваскуляризации роговицы, а предположительно, происходило в связи со стиханием постожоговой воспалительной реакции. Учитывая этот факт, было принято решение изучить активность НАДФ-оксидазы посредством хемилюминисцентного анализа с оценкой выработки АФК для определения степени воспалительной реакции в поврежденных тканях роговицы крыс.

#### **4.1.3. Результаты влияния белково-пептидного комплекса на активность НАДФ-оксидазы**

Влияние белково-пептидного комплекса на функциональную активность нейтрофилов (активность НАДФ-оксидазы) оценивали, используя хемилюминисцентный анализ перитониальных нейтрофилов.

### *Получение перитонеальных нейтрофилов*

Перитонеальные нейтрофилы получали при моделировании воспаления путем внутрибрюшинной инъекции суспензии зимозана (5 мг / мл, 150 мкл на животное). Через пять часов брюшную полость промывали 3 мл сбалансированного солевого раствора Хэнкса, не содержащего  $Ca^{2+}$  (HBSS, pH 7,4, 4 ° C), промывку центрифугировали в течение 5 мин (600 g при 4 ° C). Чистота популяции полиморфноядерных нейтрофилов (PMN) превышала 95%, по оценке люминесцентной микроскопии (LeicaDM6500,  $\times 40$ ) с окрашиванием акридиновым оранжевым. Выживаемость клеток составляла 97-99%.

Животным опытных подгрупп одновременно с зимозаном подкожно вводили 0,5 мл белково-пептидного комплекса.

Группе контрольных животных одновременно с зимозаном подкожно вводили 0,5 мл культуральной среды.

В свою очередь, продукция АФК является одной из основных функций нейтрофилов, обеспечивающих их противовоспалительный эффект. При этом ключевым ферментом, ответственным за продукцию АФК, является НАДФ-оксидазный комплекс, контролирующий образование  $H_2O_2$  молекул.

Анализ показал, что в крови животных опытных подгрупп наблюдалось достоверное снижение суммарной продукции АФК и амплитуды хемилюминесцентного ответа по сравнению с показателями в контрольной группе. Различий между подгруппами опытной группы не было выявлено.

Продукция АФК в нейтрофилах, изолированных из очага воспаления в перитонеальной полости, также различалась в исследуемых группах животных. Ответ на бактериальный пептид N-формил-Met-Leu-Phe (fMLF), действующий через рецепторы, сопряженные с ГТФ-связывающим белком, в клетках животных опытной группы был значительно ниже по сравнению с ответом в клетках животных контрольной группы (рис. 50). Кинетические параметры ответа, такие как скорость развития ответа (наклон), амплитуда и продукция АФК, были значительно ниже в клетках животных опытных



подгрупп по сравнению с показателями в контрольной группе (таблица 11). Различий между подгруппами опытной группы не было выявлено. Результаты дали основание предполагать, что в клетках животных опытных подгрупп изменилась активность НАДФ-оксидазы оксидазы, катализирующей образование супероксид-анион радикала, предшественника других АФК.

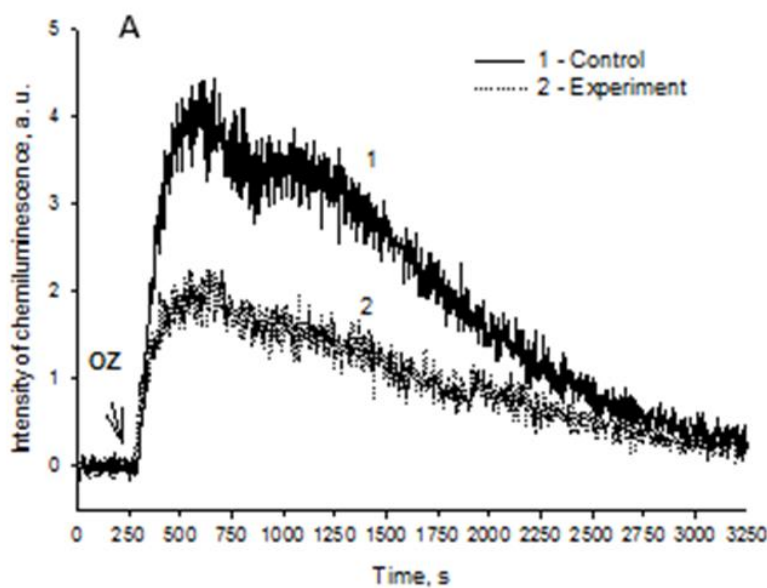


Рисунок 50 – Генерация активных форм кислорода в периферической крови. А – экспериментальные записи ответов на опсонизированный зимозан в цельной крови контрольных животных (1) и животных, получивших п\к общую фракцию и фракцию БПК до 30 кДа за 4 ч до измерения (2)

Таблица 11 – Параметры кинетических кривых в опытной и контрольной группах

	<b>Опыт</b> (% относительно контроля)	<b>p</b> (относительно контроля)
<b>Амплитуда</b>	48,3±24,2	0,0004
<b>Суммарная продукция АФК</b>	51,0±24,0	0,00045
<b>Угол наклона</b>	54,0±18,0	0,01

Анализ кинетических кривых показал достоверное отличие между контролем и опытными подгруппами по продукции: суммарной продукции АФК и амплитуды кривой ХЛ и tg угла наклона кривой, что характеризует ферментативную активность НАДФ-оксидазного комплекса (рис. 51). Различий между подгруппами опытной группы не было выявлено.

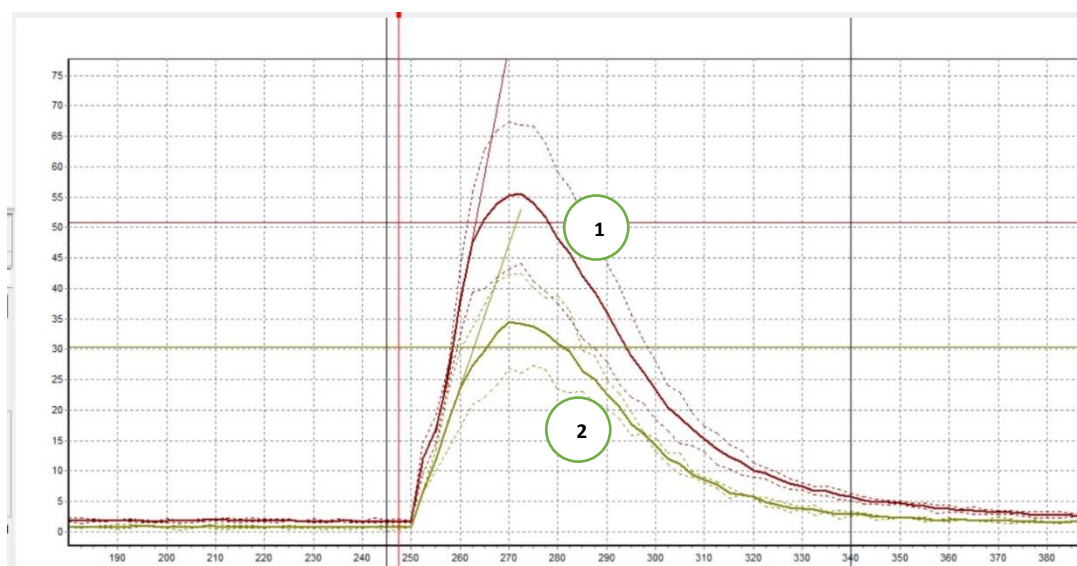


Рисунок 51 – Дыхательный взрыв в нейтрофилах, изолированных из очага воспаления в перитонеальной полости. А – экспериментальные записи ответов на 5 мкМ fMLF клеток контрольных (1) и опытных (2) животных

На основе полученных данных можно заключить, что общая фракция и фракция БПК до 30 кДа изменяет активность внутриклеточных ферментов (снижение tg угла наклона кривой ХЛ), что приводит к достоверному снижению суммарной продукции АФК нейтрофилами как в периферической крови так и в очаге воспаления.

Таким образом, на основании четвертого этапа работы удалось установить факт обратного развития сформированного неоваскулярного русла в роговице опытных животных, что было подтверждено данными инструментальных и лабораторных исследований. БПК общей фракции и фракции до 30кДа показал одинаковую эффективность в процессе лечения постожогового неоваскулярного бельма роговицы. В контрольной группе,

несмотря на применение культуральной среды, содержащей в своем составе биологически активные цитокины, новообразованное бельмо роговицы оставалось без существенной динамики.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Химическое или термическое повреждение роговицы обычно приводит к обширному поражению всего переднего сегмента глаза и остается основной причиной неоваскулогенеза. Патологический ангиогенез может привести к серьезному ухудшению прогноза заболеваний роговицы и обычно не имеет специфического лечения. Именно наличие новообразованных сосудов затрудняет процесс восстановления тканей роговицы и глублежащих тканей глаза, а образование неоваскулярного бельма значительно снижает перспективы восстановления зрительных функций.

Современные варианты лечения неоваскуляризации роговицы включают местную противовоспалительную терапию, главным образом, кортикостероиды, и местное введение ингибиторов VEGF [49, 146, 42]. Хотя оба варианта могут быть эффективными, они также имеют существенные ограничения [70]. Одним из перспективных направлений в лечении неоваскуляризации роговицы является использование стволовых или прогениторных клеток, получаемых из костного мозга и лимбальной области. В настоящее время многие авторы подтверждают эффективность использования МСК как в экспериментальных моделях, так и в клинической практике при лечении ожогов глаз, сопровождающихся признаками воспаления и циклитической реакции [83].

Возможным путем решения постожоговой неоваскуляризации роговицы может быть и использование пептидов, полученных из культивированных стволовых клеток. Пептидный препарат открывает новые возможности в лечении ожогов глаз. Главным преимуществом БПК является отсутствие всех негативных сторон МСК, таких, как длительный период подготовки МСК и тератогенный эффект, при наличии большинства свойств, присущих стволовым клеткам. Однако в литературе отсутствуют данные о применении

пептидов, полученных из культивированных стволовых клеток, в офтальмологической практике при лечении постожоговой неоваскуляризации, что и определило цель настоящей работы – обосновать применение паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса в профилактике и лечении постожоговой неоваскуляризации роговицы и оценить их эффективность в эксперименте.

Для реализации поставленной цели были необходимы следующие задачи:

на модели центральной термической ожоговой травмы роговицы оценить эффективность влияния паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса на репаративные свойства роговицы;

на модели периферической термической ожоговой травмы роговицы оценить эффективность паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса в профилактике периферического постожогового ангиогенеза роговицы;

на модели хронической постожоговой неоваскуляризации роговицы, вызванной химическим повреждением, оценить эффективность применения паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса в достижении обратного ангиогенеза сосудов роговицы;

провести сравнительный анализ эффективности применения разных фракций белково-пептидного комплекса на модели хронической постожоговой неоваскуляризации роговицы в достижении обратного ангиогенеза сосудов роговицы;

обосновать применение паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса для профилактики и лечения постожоговой неоваскуляризации роговицы на основе оценки активности никотинамидадениндинуклеотидфосфат оксидазы.

В работе последовательно выполнена серия экспериментов *in vivo* в соответствии с порядком поставленных задач. Решение каждой задачи позволяло перейти на следующий этап работы, аккумулировав полученные ранее результаты для решения новой.

В экспериментах использовались кролики-самцы породы Шиншилла весом от 2,5 до 3 кг в возрасте 5-6 месяцев, а также крысы-самцы стока Wistar весом от 300 до 350 г в возрасте 6-7 месяцев.

Для достижения поставленной цели работа была разделена на несколько последовательных этапов, соответствующих задачам исследования: *1 этап* – оценка влияния БПК на репаративные свойства роговицы в модели центрального термического ожога; *2 этап* – оценка влияния БПК на репаративные свойства роговицы в модели термического повреждения с захватом лимбальной области; *3 этап* – разработка модели хронической постожоговой неоваскуляризации роговицы и характеристика этапов ее течения; *4 этап* – оценка влияния БПК на состояние сформированного неоваскулярного бельма роговицы.

На *первом этапе* проведено сравнение эффективности лечения термических ожогов роговицы центральной локализации с применением БПК и классических средств на разработанной модели центрального термического ожога роговицы кроликов. Исследование было проведено на 40 животных (40 глаз), которые были разделены на *опытную* (в качестве лечения применяли пептидный белково-пептидный комплекс общей фракции) и *контрольную* (применяли стандартные методы лечения, используемые при термических ожогах глаз) группы, включавшие в себя по 20 животных (20 глаз).

На 7 сутки после применения БПК офтальмоскопически в опытной группе отмечали восстановление структуры роговицы, а к 14-м – увеличение показателей прозрачности роговицы до нормальных значений. При этом в контрольной группе животных наблюдали нарушение структуры и прозрачности роговицы вплоть до конца срока наблюдения 30 суток.

В результате проведенного исследования было установлено, что прозрачность роговицы в зоне повреждения у животных опытной группы к 30-м суткам составляла  $20,60 \pm 0,220$ , у животных группы контроля –  $24,00 \pm 0,390$ . Таким образом, к окончанию периода наблюдения показатели прозрачности роговицы в основной группе достоверно превосходили показатели в контрольной на 14,2% ( $p=0,000212$ ). Кроме того, было отмечено, что максимальная толщина роговицы в основной группе в отличие от контрольной не увеличивается на первые сутки после термического воздействия. Это может быть связано с блокированием воспалительной реакции за счет стабилизации клеточных мембран противовоспалительными цитокинами. Данный вывод, в частности, подтверждается работами Medi Eslani и соавторов [64]. В группе контроля значения толщины роговицы начали снижаться только к 3-м суткам. На 14-е сутки в контрольной и основной группах произошло достоверное повышение показателей толщины роговицы, но уже к 30-м в обеих группах вновь наблюдалось снижение значений. Это, вероятно, было связано с затуханием активной воспалительной реакции [85, 122, 151]. К концу периода наблюдения толщина роговицы в опытной группе статистически достоверно превышала показатели в контрольной на 9,6% ( $p=0,000$ ) и 7,4% ( $p=0,003414$ ) по максимальному и минимальному значениям соответственно. Результаты гистологического обследования соответствовали клинической и инструментальной картине на первом этапе эксперимента.

По данным зарубежных и отечественных авторов, иммунофлуоресцентный анализ демонстрирует повышенную экспрессию НАДФ2 и НАДФ4 оксидазы как в роговице человека, так и в роговице кроликов и крыс, подвергшихся ожоговому повреждению [75]. Эти результаты показывают, что ожоговое повреждение глаза избирательно стимулирует транскрипцию и экспрессию изоформ НАДФ2 оксидазы, которая участвует в окислительном стрессе при повреждении роговицы. Кроме того, исследования Gu X.-J. и соавторов [75] подтверждают, что НАДФ2 оксидаза ассоциирована при воспалительных процессах с нейтрофилами и стромальными клетками

роговицы. За счет этих процессов на ранних этапах запускается инфильтрация роговицы воспалительными клетками лимфоцитарной популяции.

В данной работе уменьшение отека и быстрое восстановление прозрачности роговицы, вероятно, связано со свойствами БПК, большинство из которых присущи мезенхимальным стволовым клеткам, которые напрямую могут влиять на функции нейтрофилов, макрофагальных клеток и активность НАДФ оксидазы [122, 151]. Данные цитокины, содержащиеся в БПК, уже на первых этапах применения препарата, вероятно, позволяли блокировать каскад воспалительных реакций за счет восстановления баланса про- и противовоспалительных факторов в тканях роговицы. Наблюдавшееся восстановление роговицы в основной группе, предположительно, связано с подавлением активности НАДФ оксидазы как одного из вероятных компонентов в развитии каскада воспалительных реакций.

В настоящем исследовании это было продемонстрировано с помощью хемилюминисцентного анализа. Вследствие подавления активности НАДФ оксидазы снижалась выработка активных форм кислорода (АФК) и уменьшалась лимфоцитарная инфильтрация поврежденных тканей, которая, как известно, поддерживается высокими концентрациями НАДФ оксидазы. Также, вероятно, купирование воспаления в основной группе связано с уменьшением выработки нейтрофилов, которые являются доминирующими инфильтрирующими клетками лейкоцитарной популяции и на ранних стадиях воспалительного процесса играют важную роль в ответе на воспалительную реакцию [72]. Отметим, что нейтрофилы являются основным компонентом врожденного иммунитета и участвуют в воспалительном ангиогенезе при повреждении роговицы [44, 72]. Этот факт послужил поводом для проведения дальнейших этапов этой экспериментальной работы с включением в воспалительный процесс лимбальной сосудистой сети.

Кроме того, МСК, а следственно, и БПК, ускоряют процессы регенерации как за счет снижения уровня апоптоза, ингибируя его начальные



стадии, так и за счет ускорения пролиферации эндотелия, что подтверждается многочисленными исследованиями [114, 124, 125].

Таким образом, полученные на первом этапе работы данные позволяют сделать вывод, что БПК способствует восстановлению ожогового повреждения роговицы в более короткие сроки. Это заключение позволило приступить ко второму этапу эксперимента.

На *втором этапе* проводили сравнение эффективности БПК и классических средств в лечении модели периферического термического ожога роговицы кроликов, где за счет ожогового повреждения лимбальной области была спровоцирована ответная сосудистая реакция. Таким образом, одной из целей данного этапа было изучение влияния БПК на патологический ангиогенез в тканях роговицы. В исследовании были задействованы 40 кроликов (40 глаз). *Опытная* (в качестве лечения применяли пептидный препарат общей фракции) и *контрольная* (применяли стандартные методы лечения термических ожогов глаз) группы включали в себя по 20 животных (20 глаз).

Офтальмоскопически в опытной группе животных на всем сроке наблюдения не было отмечено появления новообразованных сосудов роговицы, а последствия термического ожога проявлялись лишь в виде поверхностного стромального помутнения в самом центре термического воздействия. Тогда как в контрольной группе наблюдали прорастание новообразованных сосудов в роговицу в зоне термического воздействия и формирование неоваскулярного бельма роговицы уже на 14-е сутки. Основываясь на данных Medi Eslani и соавторов [64], этот эффект можно связать с происходящими в тканях роговицы патофизиологическими процессами, а именно, снижением миграции макрофагов в очаге повреждения, которые, в свою очередь, влияют на активность нейтрофилов за счет воздействия на них паракринных факторов МСК. Следствием этих патофизиологических механизмов является снижение воспалительной реакции поврежденных тканей роговицы.

Восстановление прозрачности роговицы в основной группе отмечалось уже на 3-е сутки наблюдения, тогда как показатели контрольной не изменялись, и роговица оставалась абсолютно непрозрачной до 7-х и лишь незначительно увеличивала свою прозрачность к 30-м суткам. К концу срока наблюдения показатели основной группы значительно превосходили показатели контрольной – на 67,3% ( $p=0,000143$ ).

По данным гистологических исследований, в основной группе уже с 7-х суток наблюдалось поступательное восстановление структурности слоев роговицы. К исходному, до термического воздействия, состоянию приходили эпителий и эндотелий роговицы, незначительная гиперлефкетивность была отмечена только на уровне стромы. К 30-м суткам в основной группе наблюдалась сохранная структура роговицы, тогда как в контрольной на гистологических срезах было отмечено обильное врастание новообразованных сосудов в передние слои роговицы, формирование сосудистого бельма и сохранение отека стромы.

Быстрое восстановление роговицы в основной группе и отсутствие новообразованных сосудов после термического поражения, вероятно, связано с первоначальным подавлением воспалительного каскада реакций в ранние сроки, что, предположительно, привело к подавлению ангиогенеза, а вследствие этого, и к более быстрому восстановлению оптических свойств роговицы. Это заключение подтверждается работами M. Eslani и соавторов [64], а также E.C. Chan и соавторов [55].

Таким образом, на втором этапе было показано, что 30-дневный курс пептидной терапии эффективен для предотвращения роста новообразованных сосудов, что проявлялось в отсутствии неоваскулярного бельма роговицы у животных опытной группы. Это позволило предположить, что пептидный препарат обладает не только противовоспалительным, но и ингибирующим ангиогенез эффектом, что позволило приступить к следующему этапу работы.

На *третьем этапе* разрабатывали модель хронической постожоговой неоваскуляризации роговицы и осуществляли характеристику этапов ее

течения. В качестве экспериментальных животных были использованы крысы в связи со следующими факторами: доступность вивария с большим количеством подопытных животных, возможность смоделировать ожоговую модель на оба глаза с целью нивелирования индивидуальных различий и относительно простая наркотизация животных. Кроме того, возможность проведения эксперимента на другом виде животных позволила подтвердить положительное действие БПК, независимо от видоспецифичности объекта лечения. В исследовании участвовали 52 крысы (104 глаза).

После предшествующего химического повреждения роговицы и конъюнктивы офтальмоскопически уже к 14-м суткам наблюдали полную эпителизацию поверхности роговицы и формирование неоваскуляризированного помутнения, на 30-е сутки различий в офтальмологическом статусе не наблюдалось. Офтальмоскопическая картина согласовывалась с результатами инструментальных исследований. По данным ОСТ переднего отрезка глаза, к 14-м суткам толщина роговицы была неравномерной – от 526 до 588 мкм, отмечалась ее кистозная дегенерация, наличие фибриновой мембраны на эндотелии и иридокорнеальные синехии. Эти изменения сохранялись без динамики до 30-х суток. Средняя толщина роговицы на 3 сутки наблюдения составила  $669,90 \pm 4,122$  мкм, начиная с 7-х суток отмечалось статистически достоверное уменьшение этого показателя, составившее 13,1%. На 14 сутки – дальнейшее уменьшение на 13,9% ( $p=0,005062$ ), средняя толщина роговицы соответствовала  $501,10 \pm 1,410$  мкм. На 30 сутки наблюдалось незначительное статистически недостоверное снижение на 1,4 % ( $p=1,000$ ).

Результаты оценки площади поражения роговицы показали, что на 7-е сутки наблюдалось ее статистически достоверное увеличение на 38% ( $p=0,005$ ). Однако уже на 14-е сутки отмечалось статистически достоверное уменьшение данного показателя на 10% ( $p=0,005$ ). Эта динамика, предположительно, связана с уменьшением воспалительной реакции и снижением отека роговицы, что согласуется с данными Elsa C. Chan и

соавторов [55]. На 30-е сутки площадь поражения не изменялась, сохраняя значения предыдущего периода наблюдения ( $p=0,005$ ).

Результаты гистологического анализа подтверждали данные, полученные с помощью других методов исследования.

Таким образом, по результатам третьего этапа эксперимента было доказано, что сформированное в результате химического повреждения неоваскулярное бельмо развивается к 14-м суткам и вплоть до 30-х суток не имеет никакой офтальмоскопически и инструментально значимой динамики. Это позволило приступить к следующему этапу экспериментальных исследований.

На *четвёртом этапе* проводили оценку эффективности БПК разных фракций на процессы обратного ангиогенеза в лечении, сформированного на предыдущем этапе постожогового неоваскулярного бельма роговицы крыс. Для исключения влияния белковых комплексов культуральной среды на процессы ангиогенеза выполняли сравнительную оценку влияния БПК и культуральной среды.

Экспериментальное исследование выполнено на 48 крысах (48 глаз), при этом в зависимости от способа лечения один глаз каждого животного был отнесен к контрольной группе, второй парный глаз к опытной. В свою очередь, опытная группа была разделена на 2 подгруппы. В *первую подгруппу* вошли 16 крыс (16 глаз), которым в качестве лечения применялся пептидный препарат общей фракции. Во *вторую подгруппу* вошли также 16 крыс (16 глаз), которым в качестве лечения применялся пептидный препарат фракции до 30 кДа. В *контрольной группе* – 16 крыс (16 глаз) – для лечения ожогов применяли культуральную среду.

Офтальмоскопически на 30-е сутки лечения БПК в опытных подгруппах животных наблюдали обратное развитие новообразованных сосудов роговицы. У большинства крыс новообразованных сосудов обнаружено не было, сохранялись лишь отдельные сосудистые стволы. Тогда как в контрольной группе к окончанию срока наблюдения были выявлены множественные

новообразованные сосуды роговицы со стромальными помутнениями в их проекции.

Полученные офтальмоскопически данные согласовывались с результатами инструментального и гистологического анализа. Так, по данным Pentacam, на протяжении всего срока наблюдения показатель прозрачности роговицы контрольной группы значительно не изменялся на 1-е и 14-е сутки, оставаясь на уровне полной непрозрачности, и лишь к 30-м суткам статистически достоверно снизился на 1,9% ( $p=0,005$ ). В опытных подгруппах этот показатель планомерно снижался, достигнув к концу срока наблюдения  $33,10 \pm 0,277$  и  $33,60 \pm 0,305$  усл. ед. в первой и второй подгруппе соответственно, статистически достоверная разница с контрольной группой составила 66,3% ( $p=0,0001$ ) и 65,7% ( $p=0,0001$ ) соответственно. Между подгруппами на 1-е ( $p=0,726$ ) и 14-е ( $p=0,097$ ) сутки данные не имели статистически значимых различий, на 30-е данные статистически достоверно различались незначительно – 1% ( $p=0,0008$ ). Незначительные различия в данных обеих подгрупп, вероятно, могут быть связаны с молекулярной массой используемых препаратов. Препарат общей фракции содержит, бесспорно, большой спектр биологически активных цитокинов. Однако высокая эффективность препарата с молекулярной массой до 30 кДа указывает на то, что основной спектр необходимых для подавления воспалительной реакции цитокинов содержится именно там, о чем говорится в более ранних работах [29]. Выяснение этого факта будет проводиться в дальнейших исследованиях.

Оценка площади поражения роговицы продемонстрировала, что показатели контрольной группы на всех сроках наблюдения были выше значений в обеих опытных подгруппах. К концу срока наблюдения разница с контролем достигала 90,4% ( $p=0,00008$ ) и 89,6% ( $p=0,0001$ ) соответственно в первой и второй подгруппе. Между подгруппами на 1-е сутки статистически значимых различий не выявлено ( $p=1,000$ ), на 14-е ( $p=0,0001$ ) и 30-е ( $p=0,0001$ ) сутки данные статистически достоверно различались незначительно – 7,4% и 7,6% соответственно. Это также косвенно свидетельствует о подавлении

неоваскуляризации БПК, возможно, за счет подавления миграции нейтрофилов в очаге воспаления и снижения перицитарной активности, описанных А. Mukwaya и соавторами [108].

По данным гистологического исследования, в ткани роговицы опытных животных присутствовали или остатки ранее новообразованных сосудов, или сами сосуды без признаков их кровенаполнения. На всех сроках наблюдения между подгруппами опытной группы различий не было выявлено. В контрольной группе наблюдали сформированное неоваскулярное бельмо роговицы. Таким образом, наблюдались выраженные различия в опытной и контрольной группах. В опытных подгруппах прослеживалась тенденция к обратному развитию сформированного сосудистого русла в тканях роговицы, в то время как в контрольной неоваскулярное бельмо роговицы оставалось неизменным.

На основе анализа результата влияния белково-пептидного комплекса на активность НАДФ оксидазы было сделано заключение, что общая фракция и фракция до 30 кДа изменяет активность внутриклеточных ферментов (снижение tg угла наклона кривой активности АФК), что приводит к достоверному снижению суммарной продукции АФК нейтрофилами, как в периферической крови, так и в очаге воспаления.

Таким образом, на данном этапе эксперимента был подтвержден антиангиогенный эффект БПК. БПК общей фракции и фракции до 30кДа показал одинаковую эффективность в процессе лечения постожогового неоваскулярного бельма роговицы. В контрольной группе, несмотря на применение культуральной среды, содержащей в своем составе биологически активные цитокины, новообразованное бельмо роговицы оставалось без существенной динамики.

Примеры обратимости патологического ангиогенеза были описаны А. Mukwaya и соавторами [108], в их работе изучалась реваскуляризация роговицы крыс после ингибирования ангиогенеза. Авторами сделано заключение, что оставшиеся в толще роговицы функциональные

новообразованные сосуды способствуют появлению новых сосудистых стволов и заполнению ими старого кровеносного русла. Было отмечено, что 30-дневный курс ингибирования ангиогенеза эффективен для значительного регресса новообразованных сосудов, что демонстрировалось восстановлением прозрачности роговицы крыс и запустеванием новообразованных сосудов. Однако по результатам эксперимента в тканях роговицы сохранялись едва заметные сосуды со значительно суженным диаметром русла и содержащие единичные эритроциты. Данные сосуды облегчали реваскуляризацию ткани путем запуска процесса гипердилатации и последующего прорастания сосудов *de novo*. Такие сосуды оставались в ткани, несмотря на устойчивую антиангиогенную среду, сохраняя свои неповрежденные стенки с аномальным эндотелием.

В настоящей работе на 4-м этапе эксперимента были получены несколько другие данные, о чем свидетельствовали результаты гистологических исследований. Отдельно находящиеся в строме роговицы эндотелиальные сосудистые клетки свидетельствовали о полной резорбции сосудистого русла. Безусловно, в тканях животных опытной группы наблюдали и единичные запустевшие сосуды капиллярного типа, не содержащие эритроцитов. Такие сосуды, сохраняющиеся в тканях и после антиVEGF терапии, хорошо известны [117] и описываются гипотезой сосудистой нормализации исходного ангиогенеза после антиангиогенного лечения [53, 101, 147].

Anthony Mukwaya и соавторы [108] описывают нормализацию структуры роговицы крыс после подавления факторов, способствующих васкуляризации. Однако авторы наблюдали аномалии на ультраструктурном уровне. По результатам гистологического исследования, в русле некоторых сосудов имелись перициты, частично отделенные от сосудистой стенки, в то время как эндотелий выпирал и расширялся в просвет. Кровоток в сохраненных сосудах присутствовал, но обнаруженная «жидкость», по сути, не являлась кровью, а состояла из плазмы или плазмopodobного вещества с

единичными эритроцитами. Для того чтобы изучить это явление, необходимо проведение дальнейших экспериментов по изучению роговицы после проведения курса лечения с применением БПК.

Стоит отметить, что сосудистые аномалии на ультраструктурном уровне подтверждены и смежными исследованиями по изучению регрессии сосудов в других тканях [55-58]. Таким образом, данные представленных исследований указывают на неполную дегенерацию регрессировавших сосудов на клеточном уровне. Однако в литературных источниках не было найдено данных, свидетельствующих о резорбции сосудистого русла, что было отмечено в настоящем исследовании.

Примечательно, что обратный ангиогенез после прекращения антиVEGF терапии, описанный в работе А. Mukwaya и соавторов [108], проявляется в быстром (в течение 24 часов) возвращении перicyтов в стенку ранее запустевших сосудов, что позволяет им вернуться к нормальной функционирующей структуре, а это, в свою очередь, увеличивает перфузию и кровоток данных сосудов.

Эта «обратная нормализация» являлась ответом на внезапное увеличение вазодилатации, при которой ангиогенные факторы вновь активировали частично запустевшие сосуды, что приводило к выраженному реваскуляризационному ответу.

Интересно, что ранний эффект вазодилатации наблюдается также и в других тканях. Например, после 7-дневной антиVEGF-терапии у людей и у мышей и ее прекращения наблюдаются дилатации и увеличение сосудов печени [76]. В то же время другие исследования по лечению опухолевых процессов у мышей показывают, что отмена VEGF-терапии, спустя 7 суток, приводит к образованию резистентных к лечению сосудов, которые появляются уже через 2 дня после отмены лечения [141]. Эти сосуды можно в дальнейшем считать собственными сосудами, имеющими полноценную структуру, именно поэтому они не поддаются антиVEGF-терапии.



Именно в связи с эффектом вазодилатации применение БПК может стать перспективным направлением в лечении сформировавшейся неоваскуляризации в тканях глаза. Иллюстрацией данного предположения могут послужить клинические примеры лечения хориоидальной неоваскуляризации при возрастной макулярной дегенерации антиVEGF препаратами. У пациентов, получающих инъекции афлиберцепта, оптическая когерентная томография в режиме ангиографической визуализации показывает, что расширенная персистирующая сосудистая сеть при реваскуляризационном ответе приводит к усугублению данной патологии, требующей более длительного лечения [143]. В настоящей работе, как было сказано выше, наблюдали распад сформированного патологического неоваскулярного русла.

Регрессия сосудов в применяемой для лечения модели хронической неоваскуляризации роговицы проявлялась в виде формирования полного распада сосудов или запустевания сосудов роговицы, которые являлись следствием первичного ангиогенеза. Несмотря на обильную сеть базальных сосудистых мембран и их непосредственный контакт с собственными лимбальными сосудами, не было никаких доказательств повторного заполнения русла запустевших сосудов после проведенного курса БПК-терапии.

Основываясь на полученных данных, можно предположить, что во время сосудистой регрессии базальные мембраны запустевших сосудов оказываются безвозвратно спящими за счет процесса закрытия просвета сосудов на их проксимальных участках с помощью схлопывания базальной мембраны в виде «пробки». Эти «пробки», возможно, состоят из большого количества коллагена IV типа, простирающегося до места соединения базальной мембраны новообразованных сосудов с постоянными сосудами. Подобные плотные пробки из коллагена IV типа также встречаются в RIP-Tag2 модели опухоли [108, 141], при этом эндотелиальные клетки все еще тесно связаны с ними, но не проникают внутрь коллагеновых «пробок», что

продемонстрировано в работе Anthony Mukwaya, Pierfrancesco Mirabelli и соавторов [108].

В данном исследовании представлена экспериментальная модель, позволяющая добиться стойкого запустевания новообразованных сосудов роговицы после ингибирования патологического ангиогенеза с помощью БПК, что, вероятно, связано с воздействием паракринных факторов МСК на нейтрофильную активность и активность НАДФ оксидазы.

В настоящем исследовании внимание было сфокусировано на модулирующих эффектах паракринных факторов МСК на нейтрофилах и НАДФ оксидазы и было показано, что используемый препарат значительно снижает ангиогенные эффекты в поврежденной роговице, специфически индуцирует противовоспалительные маркеры, что в итоге приводит к балансу про- и противовоспалительных цитокинов в тканях роговицы.

Важным выводом проведенных исследований является то, что подавление НАДФ оксидазы белково-пептидным комплексом может служить потенциальным механизмом уменьшения моноцитарной воспалительной реакции.

С помощью хемилюминисцентного анализа в данной работе удалось показать, что используемый препарат влияет на выработку НАДФ2 оксидазы, которая, в свою очередь, влияет на лимфоцитарную инфильтрацию поврежденных тканей роговицы. Кроме того, в своем составе применяемый в работе БПК содержит антиапоптотические, антиангиогенные и противовоспалительные цитокины.

Следует отметить, что используемый в работе препарат, помимо подавляющих ангиогенез белков, содержит достаточно высокие концентрации VEGF и PEGF (до 1200 пг/мл), что было показано в предыдущих работах [92]. Однако при столь высоких концентрациях фактора роста сосудов наблюдалось подавление неоваскулогенеза роговицы. Это может быть связано с инактивацией рецепторов к VEGF высокими концентрациями лиганда

(препарата БПК) или с воздействием других факторов, секретлируемых стволовыми клетками.

Проведенное исследование показало, что паракринные факторы, полученные из стволовых клеток, являются перспективными и могут стать основой для создания новых высокоэффективных препаратов для лечения ожоговой болезни глаза.

Таким образом, в проведенном исследовании была наглядно продемонстрирована эффективность применения паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе БПК в лечении термических ожогов роговицы центральной локализации, а также ожогов роговицы с повреждением лимбальной области, которая выражалась в ускорении процессов восстановления тканей роговицы и предупреждении развития неоваскуляризации, что открывает новые возможности в лечении данной патологии, которая в большинстве случаев не поддается медикаментозной терапии. Это открывает широкие перспективы применения БПК в лечении ожогов глаз различной этиологии и тяжести течения и, возможно, позволит во многих случаях избежать хирургического лечения с сохранением высоких зрительных функций.

## ВЫВОДЫ

1. Оценка эффективности влияния паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса на репаративные свойства роговицы по результатам клинических и гистологических исследований в лечении модели центральной термической ожоговой травмы показала, что применение БПК при центральных ожогах роговицы ускоряло эпителизацию, которая завершалась на 3-и сутки после термического воздействия, восстанавливало пахиметрические показатели и гистологическую структуру роговицы к 7-м суткам, восстанавливало прозрачность к 14-м суткам, в отличие от группы контроля, где эпителизация роговицы завершалась к 7-м суткам, восстановления пахиметрических показателей и гистологической структуры не происходило, а прозрачность роговицы восстановилась к 30-м суткам.
2. Оценка эффективности паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса в профилактике постожогового ангиогенеза роговицы на модели периферической термической ожоговой травмы с повреждением лимбальной зоны показала, что применение белково-пептидного комплекса по результатам офтальмоскопии и гистологического исследования препятствует росту новообразованных сосудов из поврежденной лимбальной области в течение срока наблюдения 30 суток, в отличие от группы контроля, где рост новообразованных сосудов из поврежденной лимбальной области наблюдался на 14-е сутки, а к концу срока наблюдения 30 суток формировалось неоваскулярное бельмо роговицы.
3. Оценка эффективности применения паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса на модели хронической постожоговой неоваскуляризации роговицы показала, что применение БПК позволяет достичь обратного ангиогенеза сосудов

роговицы, что проявляется в восстановлении прозрачности, толщины и приближении гистологической структуры роговицы к исходным до химического повреждения значениям в отличие от группы контроля, где к концу срока наблюдения новообразованные сосуды остаются без динамики.

4. Сравнительный анализ эффективности применения общей фракций белково-пептидного комплекса и фракции до 30 кДа на модели хронической постожоговой неоваскуляризации роговицы в достижении обратного ангиогенеза сосудов роговицы показал, что, по данным офтальмоскопии и гистологического исследования, процесс инволюции новообразованных сосудов роговицы протекает идентично; к 30-м суткам, по данным инструментальных исследований, разница в показателях толщины роговицы составляет 1,1%, прозрачности роговицы – 0,4%, площади остаточного повреждения – 0,1%, что достоверно отличается от показателей в группе контроля ( $p < 0,05$ ) и свидетельствует о сопоставимой эффективности обеих фракций.

5. Оценка активности никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ) оксидазы методом хемилюминисцентного анализа показала, что в опытной группе наблюдались значительное снижение кинетических параметров ответа по сравнению с показателями в контрольной группе (скорость развития ответа – на 54,0% ( $p = 0,01$ ), амплитуда суммарного хемилюминисцентного ответа – на 48,3% ( $p = 0,0004$ ), продукция активных форм кислорода – на 51,0% ( $p = 0,0004$ )), что указывает на снижение активности НАДФ оксидазы и подавление воспалительного процесса при использовании белково-пептидного комплекса и обосновывает его применение для профилактики и лечения постожоговой неоваскуляризации роговицы.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Использование паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса в лечении термических и химических ожогов роговицы центральной и периферической локализации показало свою высокую эффективность в экспериментах на животных по сравнению со стандартными методами медикаментозной терапии, что может быть рекомендовано к проведению дальнейших исследований по изучению отдаленных результатов лечения и возможной комбинации с другими лекарственными препаратами и последующему внедрению в клиническую практику.
2. Использование паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток в составе белково-пептидного комплекса в профилактике и лечении постожоговой неоваскуляризации роговицы показало свою высокую эффективность в экспериментах на животных в сравнении с культуральной средой, необходимой для производства белково-пептидного комплекса, что может быть рекомендовано к проведению дальнейших исследований по изучению механизмов действия и активности паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток.
3. На основе полученных данных о сопоставимой эффективности общей фракции и фракции до 30 кДа белково-пептидного комплекса рекомендованы дальнейшие исследования антиангиогенной активности фракции до 30 кДа.
4. Разработанная модель патологического постожогового ангиогенеза роговицы является легковоспроизводимой, позволяет добиться появления неоваскулярных сосудов в роговице уже к 7-м суткам, а к 14-м суткам сформировать устойчивое неоваскулярное бельмо и может быть рекомендована для изучения других звеньев неоваскулогенеза с целью их

исследования на патофизиологическом уровне, а также эффективности воздействия различных лекарственных средств на процессы ангиогенеза.

5. Измерение активности НАДФ-оксидазы с помощью хемилюминисцентного анализа позволяет определить выраженность воспалительного процесса и может быть рекомендовано к использованию в качестве метода оценки степени воспалительной реакции в поврежденных тканях роговицы.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БПК – белково-пептидный комплекс

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

PlGF – плацентарный фактор роста

ANGPT – ангиопоэтин

PDGF – тромбоцитарный фактор роста

TGF - трансформирующий фактор роста

FGF – фактор роста фибробластов

IGF – инсулинподобный фактор роста

TSP – тромбоспондин

VASH – вазогибин

HIF – транскрипционный фактор

АФК – активная форма кислорода

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

TNF – фактор некроза опухоли

кДа – килодальтон

мм – миллиметр

нМ – нанометр

ОСТ – оптическая когерентная томография

CD14 – мембранный гликозилфосфатидилинозитол-связанный белок

CD16 – клетки-эффекторы, ответственные за противоопухолевый, противовирусный и трансплантационный иммунитет

CD163 – трансмембранный белок-регулятор острой фазы воспаления

CD206 – лектин типа С

УПК – угол передней камеры



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева, Г.Ф. Особенности диагностики и лечения ожоговой контузионной травмы, Науч.-практич. Конференция МНИГБ им. Гельмгольца: материалы / Г.Ф. Алексеева, Г.Г. Бордюгова. – М.: 2001. – С. 36-37 Текст: непосредственный.
2. Ахмедов, А.А. Основные аспекты травмы зрения, труды МНИИГБ им. Гельмгольца. Москва, 1998. С. 171-172. – Текст: непосредственный. 2
3. Багров, С.Н. Применение лечебных коллагеновых покрытий для роговицы при кератопластике / С.Н. Багров, В.К. Зуев, Т.В. Козлова [и др.]. – Текст: непосредственный // Офтальмохирургия. – 1996. – Т.1. – С. 34-35.
4. Березинская, Д.И. Пенициллин при ожогах глазного яблока и кожи век / Д.И. Березинская. – Текст: непосредственный // Вестник офтальмологии. – 1950. – Т.6. – С. 13.
5. Борзенко, С.А. Лимбальные мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки: способ выделения и органного культивирования / С.А. Борзенко, Н.А. Онищенко, Х.Д. Тонаева [и др.]. – Текст: непосредственный // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т.5. – №3. – С. 17.
6. Борзенко, С.А. Сотрансплантация ММСК-подобных клеток лимба способствует местной иммунокоррекции и прозрачному приживлению трансплантата роговицы при кератопластике высокого риска / С.А. Борзенко, Н.А. Онищенко, Х.Д. Тонаева [и др.]. – Текст: непосредственный // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т.16. – №1. – С. 12-20. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2014-1-12-20>

7. Галлиулина, Р.Ш. Кератоамниопластика: дис. ...канд.мед.наук / Р.Ш. Галлиулина. М., 1992. 140 с. Текст: непосредственный.
8. Канцельсон, А.Б. Опыт патогенетической терапии ожогов глаз по нашему комплексному методу / А.Б. Канцельсон, М.К. Саушкина. – Текст: непосредственный // Офтальмологический журнал. – 1959. – Т.3. – С. 115.
9. Каримова, М.Х. Влияние бактериофага на процессы перекисного окисления липидов и активность ферментов антиоксидантной защиты при экспериментальном увеите / М.Х. Каримова, Ф.А. Бахритдинова. – Текст: непосредственный // Вестник офтальмологии. – 2002. – Т.6. – С. 38-40.
10. Кашников, В.В. Современные аспекты реабилитации пострадавших в чрезвычайных ситуациях / В.В. Кашников. – Текст: непосредственный // Офтальмохирургия и тер. – 2001. – Т. 21. – С. 38-41.
11. Керимов, К.Т. Комплексная антиоксидантная терапия при ожогах органа зрения / К.Т. Керимов, М.М. Агаев, Н.К. Керимова и [др.] – Текст: непосредственный // Офтальмология. – 2012. – № Т. – С. 34-42.
12. Керимов, К.Т. Ожоги глаз. Патогенез и лечение / К.Т. Керимов, А.И. Джафаров, Ф.С. Гахраманов. – М.: Изд.-во РАМН, 2005. – 464 с. – Текст: непосредственный.
13. Куликов, А.Н. О совершенствовании классификации ожогов глаз / А.Н. Куликов, В.Ф. Черныш, С.В. Чурашов – Текст: непосредственный / Офтальмохирургия. – 2020. – №2. – С. 100-108.
14. Кованов, В.В. Коллагенопластика в медицине / В.В. Кованов, И.А. Сыченников. Москва, 1978. 375 с. – Текст: непосредственный.
15. Кормош, Н.Г. Физиологическая роль активных форм кислорода (субклеточный уровень) - взгляд клинициста / Н.Г. Кормош – Текст: непосредственный // РБЖ. – 2011. – Т. 4. –29-35.
16. Куртукова, М.О. Факторы, регулирующие ангиогенез / М.О. Куртукова, И.О. Бугаева, А.Н. Иванов. – Текст: непосредственный // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5.

17. Лазаренко, Л.Ф. Выявление сенсibilизированных лимфоцитов при кератопластике в условиях ожоговой травмы глаза / Л.Ф. Лазаренко. – Текст: непосредственный // Офтальмология. Журнал. – 1975. – Т. 6. – С. 305-310.
18. Лебехов, П.И. Об эффективности коллагеновых покрытий при ожогах роговицы, Новое в лечении ожогов глаз, Тез. Доклад / П.И. Лебехов, С.С. Сапоровский, А.А. Круглев [и др.] – М.: 1989. – С. 38-39. Текст: непосредственный.
19. Макаров, П.В. Осложнения тяжелой ожоговой травмы глаза и их хирургическая профилактика / Всероссийский съезд офтальмологов. Тез. Докл. Ч.2 / П.В. Макаров, Р.А. Гундорова, О.С. Слепова. – М.: 2000. 87 с. Текст: непосредственный.
20. Малюгин, Б.Э. Глубокая передняя послойная кератопластика с использованием фемтосекундного лазера IntraLase 60 kHz: первый опыт / Малюгин Б.Э., Паштаев А.Н., Елаков Ю.Н. [и др.] – Текст: непосредственный // Практическая медицина. – 2012. – Т. 4. – С. 100-103.  
19
21. Можаяев, Г.А. Неотложная медицинская помощь пострадавшим при авариях и катастрофах / Г.А. Можаяев, В.Н. Заболотный, В.П. Дьяконов. – Киев: 1995. 286 с. Текст: непосредственный.
22. Непомнящая, В.М. Инфекционные осложнения при химических ожогах роговицы, их лечение и профилактика / В.М. Непомнящая. – Текст: непосредственный // Офтальмология. Журнал. – 1978. – Т. 2. – С. 100-104.  
21
23. Полуниин, Г.С. Протеолитические ферменты и их ингибиторы в офтальмологии / Г.С. Полуниин. – Текст: непосредственный // Вестник офтальмологии. – 1977. – №3. – С. 79-81.
24. Пучковская, Н.А. Гистологические и биомеханические изменения роговой оболочки после химических и термических ожогов / Н.А.

- Пучковская, С.Р. Мучник, Л.С. Шульгина. – Текст: непосредственный // Офтальмология. Журнал. – 1959. – Т. 4. – С. 202-206. 23
25. Пучковская, Н.А. О показаниях к неотложной и ранней лечебной кератопластике при ожогах глаз, 5 научная конференция по проблеме «Ожоги» Ч. 2 / Н.А. Пучковская, С.Р. Мучник, В.М. Непомнящая. – Л.: 1967. – С. 101-104. Текст: непосредственный.
26. Пучковская, Н.А. Патогенез в лечении ожогов глаз и их последствия / Н.А. Пучковская, В.М. Непомнящая, В.М. Шульгина. – М.: 1973. с. 177 Текст: непосредственный.
27. Самойлов А.С. Применение клеточных технологий при термических ожоговых повреждениях кожи / А.С. Самойлов, Т.А. Астрелина, А.В. Аксененко, И.В. Кобзева, Ю.Б. Сучкова – Текст: непосредственный // саратовский научно-медицинский журнал. – 2019. – Т. 15, № 4. – С. 999-1004.
28. Тедрос, А.Г. Первый всемирный доклад о проблемах зрения, Всемирная организация здравоохранения, Пресс-релиз. Женева 8 октября 2019. – Текст: непосредственный.
29. Терещенко, А.В. Влияние препарата пептидов на постожоговые воспалительные процессы повреждённых тканей роговицы в эксперименте / А.В. Терещенко, И.Г. Трифаненкова, А.А. Темнов – Текст: непосредственный // Acta biomedica scintica. –2019. – Т.4, № 4.
30. Хубутя, М.С. Паракринные механизмы противовоспалительного и органопротективного действия при трансплантации мезенхимальных стволовых клеток. Обзор литературы / М.С. Хубутя, А.В. Вагабов, А.А. Темнов [и др.]. – Текст: непосредственный // Трансплантология. – 2014. – Т. 1. – С. 20-32.
31. Ченцова, Е.В. Васкуляризация роговицы / Е.В. Ченцова, А.В. Бойко. – Текст: непосредственный // Вестник офтальмологии. – 1982. – №4. – С.74-77.

32. Черныш, В.Ф. Ожоги глаз. Состояние проблемы и новые подходы / В.Ф. Черныш, Э.В. Бойко. – ГЭОТАР-Медиа: 2017. с. 184. Текст: непосредственный.
33. Aase, K. Angiomotin regulates endothelial cell migration during embryonic angiogenesis / K. Aase, M. Ernkvist, L. Ebarasi [et al.]. – Text: immediate // *Genes Dev.* – 2007. – Vol.21, №16. – P.2055-2068. doi: 10.1101/gad.432007.
34. Abad, M. The Xray crystallographic structure of the angiogenesis inhibitor angiostatin / M. Abad, R. Arni, D. Grella [et al.]. – Text: immediate // *J Mol Biol.* – 2002. – Vol.318, №4. – P.1009-1017. doi: 10.1016/S0022-2836(02)00211-5.
35. Adair, T.H. Angiogenesis / T.H. Adair, J.P. Montani. – San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, 2010. – 82 p. – Text: immediate.
36. Albini, A. Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention / A. Albini, F. Tosetti, R. Benelli [et al.]. – Text: immediate // *Cancer Res.* – 2005. – Vol.65, №23. – P.10637-10641. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3473.
37. Ambati, B.K. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1/ B.K. Ambati, M. Nozaki, N. Singh [et al.]. – Text: immediate // *Nature.* – 2006. – Vol.443, №7114. – P.993-997. doi: 10.1038/nature05249.
38. Avisar, I. Effect of subconjunctival and intraocular bevacizumab injections on corneal neovascularization in a mouse model / I. Avisar, D. Weinberger, I. Kremer. – Text: immediate // *Curr. Eye Res.* – 2010. – Vol.35. – P.108–115.
39. Avunduk, A.M. Therapeutic use of limbal stem cells / A.M. Avunduk, Y. Tekelioglu. – Text: immediate // *Curr Stem Cell Res Ther.* – 2006. – Vol.1, №2. – P.231-238. doi: 10.2174/157488806776956922.
40. Azar, D.T. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing (an American Ophthalmological Society thesis) / D.T. Azar. – Text: immediate // *Trans Am Ophthalmol Soc.* – 2006. – Vol.104. – P.264-302.
41. Azar, D.T. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing (an American

- Ophthalmological Society thesis) / D.T. Azar. – Text: immediate // Transactions of the American Ophthalmological Society. – 2006. – Vol.104. – P.264–302.
42. Bahar, I. Subconjunctival bevacizumab injection for corneal neovascularization / I. Bahar, I. Kaiserman, P. McAllum [et al.]. – Text: immediate // Cornea. – 2008. – Vol.27
  43. Bartosh, T.J. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties / T.J. Bartosh, J.H. Ylöstalo, A. Mohammadipoor [et al.]. – Text: immediate // Proc Natl Acad Sci USA. – 2010. – Vol.107, №31. – P.13724-13729. doi: 10.1073/pnas.1008117107.
  44. Benelli, R. Neutrophils as a key cellular target for angiostatin: implications for regulation of angiogenesis and inflammation / R. Benelli, M. Morini, F. Carrozzino [et al.]. – Text: immediate // FASEB J. – 2002. – Vol.16, №2. – P.267-269. doi: 10.1096/fj.01-0651fje.
  45. Berg, K. Comparison of ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration according to LUCAS treat-and-extend protocol / K. Berg, T.R. Pedersen, L. Sandvik [et al.]. – Text: immediate // Ophthalmology. – 2015. – Vol.122, №1. – P.146-152. doi: 10.1016/j.ophtha.2014.07.041.
  46. Bergers, G. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy / G. Bergers, D. Hanahan. – Text: immediate // Nat Rev Cancer. – 2008. – Vol.8, №8. – P.592-603. doi: 10.1038/nrc2442.
  47. Bi, B. Stromal Cells Protect against Acute Tubular Injury via an Endocrine Effect / B. Bi [et al.] // J. Am. Soc. Nephrol. – 2007. – Vol. 18, №9. – P. 2486–2496.
  48. Bouchlaka, M.N. Human Mesenchymal Stem Cell-Educated Macrophages are a Distinct High IL-6 Producing Subset That Confer Protection in Graft-Versus-Host-Disease and Radiation Injury Models / M.N. Bouchlaka, A.B. Moffitt, J.

- Kim [et al.]. – Text: immediate // Biol Blood Marrow Transplant. – 2017. – Vol.23, №6. – P.897-905. doi: 10.1016/j.bbmt.2017.02.018.
49. Brodovsky, S.C. Management of alkali burns: an 11-year retrospective review / S.C. Brodovsky, C.A. McCarty, G. Snibson [et al.]. – Text: immediate // Ophthalmology. – 2000. – Vol.107. – P.1829–1835.
50. Brown, S.I. Collagenase inhibitors in prevention of ul-cers of alkali-burned cornea, / S.I. Brown, C.A. Weller. – Text: immediate // Arch Ophthalmol. – 1970. – Vol.83, №3. – P.352-353. doi: 10.1001/archopht.1970.00990030352013.
51. Buchanan, C.F. Flow shear stress regulates endothelial barrier function and expression of angiogenic factors in a 3D microfluidic tumor vascular model / C.F. Buchanan, S.S. Verbridge, P.P. Vlachos [et al.]. – Text: immediate // Cell Adh Migr. – 2014. – Vol. 8, №5. – P.517-524. doi: 10.4161/19336918.2014.970001.
52. Cantelmo, A.R. Endothelial metabolism driving angiogenesis: emerging concepts and principles /A.R. Cantelmo, A. Brajic, P. Carmeliet. – Text: immediate // Cancer J. – 2015. – Vol.21, №4. – P.244-249. doi: 10.1097/PPO.0000000000000133.
53. Cao, Y. Elevated levels of urine angiostatin and plasminogen/plasmin in cancer patients / Y. Cao, N. Veitonmaki, K. Keough [et al.]. – Text: immediate // Int J Mol Med. – 2000. – Vol.5, №5. – P.547-551. doi: 10.3892/ijmm.5.5.547.
54. Chan, E. NADPH oxidase in tissue repair and regeneration. In Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants (Laher, I., ed.) / E. Chan, G.S. Liu, C. Roulston [et al.]. Berlin Heidelberg, Springer, 2014. P. 2517–2537. – Text: immediate
55. Chan, E.C. NADPH oxidase 2 plays a role in experimental corneal neovascularization / E.C. Chan, P. van Wijngaarden, E. Chan [et al.]. – Text: immediate // Clin Sci (Lond). – 2016. – Vol.130, №9. – P.683-696. doi: 10.1042/CS20150103.

56. Chang, D.K. Antiangiogenic targeting liposomes increase therapeutic efficacy for solid tumors / D.K. Chang, C.Y. Chiu, S.Y. Kuo [et al.]. – Text: immediate // *J Biol Chem.* – 2009. – Vol.284, №19. – P.12905-12916. doi: 10.1074/jbc.M900280200.
57. Chang, J.H. Corneal neovascularization: an anti-VEGF therapy review / J.H. Chang, N.K. Garg, E. Lunde [et al.]. – Text: immediate // *Surv Ophthalmol.* – 2012. – Vol.57, №5. – P.415-29. doi: 10.1016/j.survophthal.2012.01.007.
58. Chouinard-Pelletier, G. Increased shear stress inhibits angiogenesis in veins and not arteries during vascular development /G. Chouinard-Pelletier, E.D. Jahnsen, E.A. Jones. – Text: immediate // *Angiogenesis.* – 2013. – Vol.16, №1. – P.71-83. doi: 10.1007/s10456-012-9300-2.
59. de Visser, K.E. Paradoxical roles of the immune system during cancer development / K.E. de Visser, A. Eichten, L.M. Coussens. – Text: immediate // *Nat Rev Cancer.* – 2006. – Vol.6, №1. – P.24-37. doi: 10.1038/nrc1782.
60. Dobrowolski, D. Application of autologous cultivated corneal epithelium for corneal limbal stem cell insufficiency-short-term results / D. Dobrowolski, E. Wylegala, B. Orzechowska-Wylegala [et al.]. – Text: immediate // *Oczna.* – 2011. – Vol.113, №10-12. – P.346-351.
61. Egginton, S. Physiological factors influencing capillary growth / S. Egginton. – Text: immediate // *Acta Physiol (Oxf).* – 2011. – Vol.202, №3. – P.225-39. doi: 10.1111/j.1748-1716.2010.02194.x.
62. Eliopoulos, N. Human marrow-derived mesenchymal stromal cells decrease cisplatin renotoxicity in vitro and in vivo and enhance survival of mice post-intraperitoneal injection / N. Eliopoulos [et al.] // *AJP – Renal Physiol.* – 2010. – Vol. 299, №6. – P. 1288–1298.
63. Erdurmus, M. Inhibitory effects of topical thymoquinone on corneal neovascularization / M. Erdurmus, R. Yagci, B. Yilmaz, [et al.]. – Text: immediate // *Cornea.* – 2007. – Vol. 26. – P. 715–719.
64. Eslani, M. Cornea-Derived Mesenchymal Stromal Cells Therapeutically Modulate Macrophage Immunophenotype and Angiogenic Function / M.



- Eslani, I. Putra, X. Shen [et al.]. – Text: immediate // Stem Cells. – 2018. – Vol.36, №5. – P.775-784. doi: 10.1002/stem.2781.
65. Ferrari, G. Topical ranibizumab as a treatment of corneal neovascularization / G. Ferrari, M.H. Dastjerdi, A. Okanobo [et al.]. – Text: immediate // Cornea. – 2013. – Vol.32, №7. – P.992-997. doi: 10.1097/ICO.0b013e3182775f8d.
66. Fitzgerald, K. The Cytokine Factsbook and Webfacts. 2nd Edition / K. Fitzgerald, L. O'Neill, A. Gearing, R. Callard. 2001. – Text: immediate
67. Friedenwald, J.S. Acid burns of the eye / J.S. Friedenwald, W.F. Hughes J.H. Herrmann. – Text: immediate // Arch Ophthal. – 1946. – Vol.35. – P.98-108. doi: 10.1001/archopht.1946.00890200103003.
68. Fu, Y. Unraveling the mysteries of endostatin / Y. Fu, H. Tang, Y. Huang [et al.]. – Text: immediate // IUBMB Life. – 2009. – Vol.61, №6. – P.613-626. doi: 10.1002/iub.215.
69. Gacche, R.N. Angiogenic factors as potential drug target: efficacy and limitations of anti-angiogenic therapy / R.N. Gacche, R.J. Meshram. – Text: immediate // Biochim Biophys Acta. – 2014. – Vol.1846, №1. – P.161-79. doi: 10.1016/j.bbcan.2014.05.002.
70. Galie, P.A. Fluid shear stress threshold regulates angiogenic sprouting / P.A. Galie, D.H. Nguyen, C.K. Choi [et al.]. – Text: immediate // Proc Natl Acad Sci USA. – 2014. – Vol.111, №22. – P.7968-7973. doi: 10.1073/pnas.1310842111.
71. Garcia-Fernandez, M. Low doses of insulinlike growth factor I improve insulin resistance, lipid metabolism, and oxidative damage in aging rats / M. Garcia-Fernandez [et al.] // Endocrinology. – 2009. – Vol. 149, №5. – P. 2433–2442
72. Gong, Y. Neutrophils promote inflammatory angiogenesis via release of preformed VEGF in an in vivo corneal model / Y. Gong, D.R. Koh. – Text: immediate // Cell Tissue Res. – 2010. – Vol.339, №2. – P. 437-448. doi: 10.1007/s00441-009-0908-5.
73. González-Rubio, M. Oxidative stress induces tyrosine phosphorylation of PDGF alpha-and beta-receptors and pp60c-src in mesangial cells / M.

- González-Rubio, S. Voit, D. Rodríguez-Puyol [et al.]. – Text: immediate // *Kidney Int.* – 1996. – Vol.50, №1. – P.164-173. doi: 10.1038/ki.1996.299.
74. Group, C.R. Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration / C.R. Group. – Text: immediate // *N Engl J Med.* – 2011. – Vol.364, №20. – P.1897-1908. doi: 10.1056/NEJMoa1102673.
75. Gu, X.J. Involvement of NADPH oxidases in alkali burn-induced corneal injury / X.J. Gu, X. Liu, Y.Y. Chen [et al.]. – Text: immediate // *Int J Mol Med.* – 2016. – Vol.38, №1. – P.75-82. doi: 10.3892/ijmm.2016.2594.
76. Gupta, D. Treatments for corneal neovascularization: a review/ D. Gupta, C. Illingworth. – Text: immediate // *Cornea.* – 2011. – Vol.30, №8. – P.927-938. doi: 10.1097/ICO.0b013e318201405a.
77. Haas, C.S. Inhibition of angiogenesis by interleukin-4 gene therapy in rat adjuvant-induced arthritis / C.S. Haas, M.A. Amin, B.B. Allen [et al.]. – Text: immediate // *Arthritis Rheum.* – 2006. – Vol.54, №8. – P.2402-2414. doi: 10.1002/art.22034.
78. Haep, L. Interferon gamma counteracts the angiogenic switch and induces vascular permeability in dextran sulfate sodium colitis in mice / L. Haep, N. Britzen-Laurent, T.G. Weber [et al.]. – Text: immediate // *Inflamm Bowel Dis.* – 2015. – Vol.21, №10. – P.2360-2371. doi: 10.1097/MIB.0000000000000490.
79. Hakami, N.Y. Wound healing after alkali burn injury of the cornea involves Nox4-type NADPH oxidase. / N.Y. Hakami, G.J. Dusting, E.C. Chan [et al.]. – Text: immediate // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2020. – Vol.61, №12. – P.20. <https://doi.org/10.1167/iovs.61.12.20>
80. Han, Y. Nuclear envelope proteins Nesprin2 and LaminA regulate proliferation and apoptosis of vascular endothelial cells in response to shear stress / Y. Han, L. Wang, Q.P. Yao [et al.]. – Text: immediate // *Biochim Biophys Acta.* – 2015. – Vol.1853, №5. – P.1165-1173. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.02.013.
81. Haring, R.S. Epidemiologic Trends of Chemical Ocular Burns in the United States / R.S. Haring, I.D. Sheffield, R. Channa [et al.]. – Text: immediate //

- JAMA Ophthalmol. – 2016. – Vol.134, №10. – P. 1119-1124. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2016.2645.
82. Hashimoto, T. Hypoxia-inducible factor as an angiogenic master switch / T. Hashimoto, F. Shibasaki. – Text: immediate // Front Pediatr. – 2015. – Vol.3. – P.33. doi: 10.3389/fped.2015.00033.
83. Hayashi, T. Immunologic mechanisms of corneal allografts reconstituted from cultured allogeneic endothelial cells in an immune-privileged site / T. Hayashi, S. Yamagami, K. Tanaka [et al.]. – Text: immediate // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2009. – Vol.50, №7. – P.3151-3158. doi: 10.1167/iovs.08-2530.
84. Hollingworth, W. A longitudinal study to assess the frequency and cost of antivasular endothelial therapy, and inequalities in access, in England between 2005 and 2015 / W. Hollingworth, T. Jones, B. C. Reeves [et al.]. – Text: immediate // BMJ Open. – 2017. – Vol. 7, №10. – P.e018289. doi: 10.1136/bmjopen-2017-018289.
85. Horwitz, E.M. Advancing regenerative medicine the translational way / E.M. Horwitz. – Text: immediate // Sci Transl Med. – 2013. – Vol.5, №177. – P.177-179. doi: 10.1126/scitranslmed.3005873.
86. Huegel, R. Novel Anti- Inflammatory Properties of the Angiogenesis Inhibitor Vasostatin / R. Huegel, P. Velasco, M. De La Luz Sierra [et al.]. – Text: immediate // J Invest Dermatol. – 2007. – Vol.127, №1. – P.65-74. doi: 10.1038/sj.jid.5700484.
87. Ito, H. Endothelial progenitor cells as putative targets for angiostatin / H. Ito, I.I. Rovira, M.L. Bloom [et al.]. – Text: immediate // Cancer Res. – 1999. – Vol.59, №23. – P.5875-5877.
88. Jacobo, S.M. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) stabilizes nascent blood vessels / S.M. Jacobo, A. Kazlauskas. – Text: immediate // J Biol Chem. – 2015. – Vol.290, №10. – P.6349-6360. doi: 10.1074/jbc.M114.634154.
89. Johnson, K.E. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the regulation of cutaneous wound repair / K.E. Johnson, T.A. Wilgus. – Text:

- immediate // *Adv Wound Care (New Rochelle)*. – 2014. – Vol.3, №10. – P.647-661. doi: 10.1089/wound.2013.0517.
90. Jurowski, P. Corneal endothelial cells' protection against thermal injury: influence of ophthalmic viscoelastic substances in experimental study on rabbits / P. Jurowski, R. Goś, G. Owczarek [et al.]. – Text: immediate // *Eur J Ophthalmol*. –2005. – Vol.15, №6. – P.674-679.
91. Kappou, D. Role of the angiopoietin/Tie system in pregnancy / D. Kappou, S. Sifakis, A. Konstantinidou [et al.]. – Text: immediate // *Exp Ther Med*. – 2015. – Vol.9, №4. – P.1091-1096. doi: 10.3892/etm.2015.2280.
92. Khubutiya, M.S. Paracrine mechanisms of proliferative, anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of mesenchymal stromal cells in models of acute organ injury / M.S. Khubutiya, A.V. Vagabov, A.A. Temnov [et al.]. – Text: immediate // *Cytotherapy*. – 2014. – Vol.16, №5. – P.579-585. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.07.017.
93. Kim, S.W. The effect of topical bevacizumab on corneal neovascularization / S.W. Kim, B.J. Ha, E.K. Kim [et al.]. – Text: immediate // *Ophthalmology*. – 2008. – Vol.115, №6. – P.33–38.
94. Krock, B.L. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil / B.L. Krock, N. Skuli, M.C. Simon. – Text: immediate // *Genes Cancer*. – 2011. – Vol.2, №12. – P.1117-1133. doi: 10.1177/1947601911423654.
95. Kumar, P. MAPK mediates gamma-irradiation-induced endothelial cell apoptosis, and vascular endothelial growth factor protects endothelial cells through the phosphoinositide 3-kinase-Akt-Bcl-2 pathway / P. Kumar, A. Miller, P.J. Polverini. – Text: immediate // *J Biol Chem*. – 2004. – Vol.279, №41. – P. 43352-43360. doi: 10.1074/jbc.M405777200.
96. Lawler, P.R. Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin- 1 and -2 / P.R. Lawler, J. Lawler. – Text: immediate // *Cold Spring Harb Perspect Med*. – 2012. – Vol.2, №5. – P. a006627. doi: 10.1101/cshperspect.a006627.

97. Lee, R.H. Therapeutic factors secreted by mesenchymal stromal cells and tissue repair / R.H. Lee, J.Y. Oh, H. Choi [et al.]. – Text: immediate // J Cell Biochem. – 2011. – Vol.112, №11. – P.3073-3078. doi: 10.1002/jcb.23250.
98. Li, S.M. Rac1-dependent intracellular superoxide formation mediates vascular endothelial growth factor-induced placental angiogenesis in vitro / S.M. Li, L.W. Zeng, L. Feng, D.B. Chen. – Text: immediate // Endocrinology. – 2010. – Vol.151. – P.5315–5325.
99. Lieberthal, W. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis / W. Lieberthal, V. Triaca, J. Levine. – Text: immediate // Am J Physiol. – 1996. – Vol.270, №4 Pt 2. – P. F700-708. doi: 10.1152/ajprenal.1996.270.4. F700.
100. Lin, C.M. Ferulic acid augments angiogenesis via VEGF, PDGF and HIF-1 alpha / C.M. Lin, J.H. Chiu, I.H. Wu [et al.]. – Text: immediate // J Nutr Biochem. – 2010. – Vol.21, №7. – P. 627-633. doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.04.001.
101. Matsunaga, T. Angiostatin is negatively associated with coronary collateral growth in patients with coronary artery disease / T. Matsunaga, W.M. Chilian, K. March. – Text: immediate // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2005. – Vol.288, №5. – P.2042-2046. doi: 10.1152/ajpheart.00669.2004.
102. Mayweg, S. Stellenwert der systemischen Steroidtherapie nach Normalrisikokeratoplastik / S. Mayweg, T. Reinhard, H. Spelsberg [et al.]. – Text: immediate // Ophthalmologe. – 2005. – Vol. 102, №5. – P. 497–501.
103. Mirshahi, A. Bevacizumab-augmented retinal laser photocoagulation in proliferative diabetic retinopathy: a randomized double-masked clinical trial / A. Mirshahi, R. Roohipoor, A. Lashay [et al.]. – Text: immediate // Eur J Ophthalmol. – 2008. – Vol.18, №2. – P.263-269. doi: 10.1177/112067210801800215.
104. Mohammad, H. Topical Bevacizumab in the Treatment of Corneal Neovascularization: Results of a Prospective, Open-label, Non-comparative

- Study / H. Mohammad, M.D. Dastjerdi, M. Khalid [et al.]. – Text: immediate // Arch Ophthalmol. – 2009. – Vol. 127, №4. – P. 381–389.
105. Montzka, K. Growth factor and cytokine expression of human mesenchymal stromal cells is not altered in an in vitro model of tissue damage / K. Montzka, T. Führmann, J. Müller-Ehmsen [et al.]. – Text: immediate // Cytotherapy. – 2010. – Vol.12, №7. – P.870-880. doi: 10.3109/14653249.2010.501789.
106. Morigi, M. Life-Sparing Effect of Human Cord Blood-Mesenchymal Stem Cells in Experimental Acute Kidney / M. Morigi [et al.] // Stem Cells. – 2010. – Vol. 28, №3. – P. 513–522.
107. Moser, T. Endothelial cell surface F1-F0 ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin / T. Moser, D. Kenan, T. Ashley [et al.]. – Text: immediate // Proc Natl Acad Sci USA. – 2001. – Vol.98, №12. – P.6656-6661. doi: 10.1073/pnas.131067798.
108. Mukwaya, A. Revascularization after angiogenesis inhibition favors new sprouting over abandoned vessel reuse / A. Mukwaya, P. Mirabelli, A. Lennikov [et al.]. – Text: immediate // Angiogenesis. – 2019. – Vol.22, №4. – P.683-696. 553-567. doi: 10.1007/s10456-019-09679-9.
109. Murdoch, C. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis / C. Murdoch, M. Muthana, S.B. Coffelt [et al.]. – Text: immediate // Nat Rev Cancer. – 2008. – Vol.8, №8. – P.618-631. doi: 10.1038/nrc2444.
110. Nasu, K. Hypoxia simultaneously inhibits endostatin production and stimulates vascular endothelial growth factor production by cultured human endometrial stromal cells / K. Nasu, M. Nishida, J. Fukuda [et al.]. – Text: immediate // Fertil Steril. – 2004. – Vol.82, №3. – P.756-759. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.03.032.
111. Niederkorn, J.Y. The immune privilege of corneal allografts / J.Y. Niederkorn. – Text: immediate // Transplantation. – 1999. – Vol.67, №12. – P.1503-1508. doi: 10.1097/00007890-199906270-00001.
112. Nasu, K. Hypoxia simultaneously inhibits endostatin production and stimulates vascular endothelial growth factor production by cultured human endometrial

- stromal cells / K. Nasu, M. Nishida, J. Fukuda [et al.]. – Text: immediate // *Fertil Steril.* – 2004. – Vol.82, №3. – P.756-759. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.03.032.
113. Nikuei, P. The imbalance in expression of angiogenic and anti-angiogenic factors as candidate predictive biomarker in preeclampsia / P. Nikuei, K. Malekzadeh, M. Rajaei [et al.]. – Text: immediate // *Iran J Reprod Med.* – 2015. – Vol.13, №5. – P.251-262.
114. Oh, J.Y. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury / J.Y. Oh, M.K. Kim, M.S. Shin [et al.]. – Text: immediate // *Stem Cells.* – 2008. – Vol.26, №4. – P.1047-1055. doi: 10.1634/stemcells.2007-0737.
115. Okada, M. Hepatocyte growth factor protects small airway epithelial cells from apoptosis induced by tumor necrosis factoralpha or oxidative stress / M. Okada, K. Sugita, T. Inukai [et al.]. – Text: immediate // *Pediatr Res.* – 2004. – Vol.56, №3. – P. 336-44. doi: 10.1203/01.PDR.0000134255.58638.59.
116. Okamura, Y. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. / Y. Okamura, M. Watari, E.S. Jerud [et al.]. – Text: immediate // *J Biol Chem.* – 2001. – Vol.276, №13. – P.10229-10233. doi: 10.1074/jbc.M100099200.
117. O'Reilly, M.S. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice / M.S. O'Reilly, L. Holmgren, C. Chen [et al.]. – Text: immediate // *Nat Med.* – 1996. – Vol.2, №6. – P.689-692. doi: 10.1038/nm0696-689.
118. O'Reilly, M.S. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma / M.S. O'Reilly, L. Holmgren, Y. Shing [et al.]. – Text: immediate // *Cell.* – 1994. – Vol.79, №2. – P.315-328. doi: 10.1016/0092-8674(94)90200-3.
119. O'Reilly, M.S. Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance / M.S. O'Reilly, D. Wiederschain, W. G. Stetler-Stevenson [et al.]. – Text: immediate // *J Biol Chem.* – 1999. – Vol.274, №41. – P.29568-29571. doi: 10.1074/jbc.274.41.29568.

120. Paleari, L. Antiangiogenesis in Search of Mechanisms: Angiostatin as a Prototype. In *Cancer Therapy: Molecular Targets in Tumor-Host Interactions* / L. Paleari, C. Brigati, L. Anfosso [et al.]. – Edited by: Weber GF. Norfolk: Horizon Scientific Press, 2005. –143-168 p. – Text: immediate.
121. Pawelczyk, E. In vivo transfer of intracellular labels from locally implanted bone marrow stromal cells to resident tissue macrophages / E. Pawelczyk, E.K. Jordan, A. Balakumaran [et al.]. – Text: immediate // *PLoS One*. – 2009. – Vol.4, №8. – P.e6712. doi: 10.1371/journal.pone.0006712.
122. Phinney, D.G. Concise review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: The state of transdifferentiation and modes of tissue repair - Current views / D.G. Phinney, D.J. Prockop. – Text: immediate // *Stem Cells*. – 2007. – Vol.25, №11. – P.2896-2902. doi: 10.1634/stemcells.2007-0637.
123. Prandini, M.H. No evidence for vasculogenesis regulation by angiostatin during mouse embryonic stem cell differentiation / M.H. Prandini, A. Desroches-Castan, O. Feraud [et al.]. – Text: immediate // *J Cell Physiol*. – 2007. – Vol.213, №1. – P.27-35. doi: 10.1002/jcp.21084.
124. Prockop, D.J. Medical therapies with adult stem/progenitor cells (MSCs): a backward journey from dramatic results in vivo to the cellular and molecular explanations / D.J. Prockop, J.Y. Oh– Text: immediate // *J Cell Biochem*. – 2012. – Vol.113, №5. – P.1460-1469. doi: 10.1002/jcb.24046.
125. Prockop, D.J. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation / D.J. Prockop, J.Y. Oh. – Text: immediate // *Mol Ther*. – 2012. – Vol.20, №1. – P.14-20. doi: 10.1038/mt.2011.211.
126. Prockop, D.J. The exciting prospects of new therapies with mesenchymal stromal cells / D.J. Prockop. – Text: immediate // *Cytherapy*. – 2017. – Vol.19, №1. – P.1-8. doi: 10.1016/j.jcyt.2016.09.008.
127. Rabiolo, A. VesselJ: A New Tool for Semiautomatic Measurement of Corneal Neovascularization /A. Rabiolo, F. Bignami, P. Rama [et al.]. – Text: immediate // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2015. – Vol.56, №13. – P.8199-8206. doi: 10.1167/iovs.15-17098.



128. Rogers, M.S. Common polymorphisms in angiogenesis / M.S. Rogers, R.J. D'Amato. – Text: immediate // Cold Spring Harb Perspect Med. – 2012. – Vol.2, №11. – P.a006510. doi: 10.1101/cshperspect.a006510.
129. Rojas, M. Requirement of NOX2 expression in both retina and bone marrow for diabetes-induced retinal vascular injury / M. Rojas, W. Zhang, Z. Xu [et al.]. – Text: immediate // PLoS One. – 2013. – Vol. 8. – P. 843-857
130. Ruan, G.X. Lactate engages receptor tyrosine kinases Axl, Tie2, and vascular endothelial growth factor receptor 2 to activate phosphoinositide 3-kinase/Akt and promote angiogenesis / G.X. Ruan, A. Kazlauskas. – Text: immediate // J Biol Chem. – 2013. – Vol.288, №29. – P.21161-21172. doi: 10.1074/jbc.M113.474619.
131. Sato, Y. The vasohibin family: a novel family for angiogenesis regulation / Y. Sato. – Text: immediate // J Biochem. – 2013. – Vol.153, №1. – P.5-11. doi: 10.1093/jb/mvs128.
132. Sener, E. The impact of subconjunctivally injected EGF and VEGF inhibitors on experimental corneal neovascularization in rat model / E. Sener, N. Yuksel, D.K. Yildiz, [et al.]. – Text: immediate // Curr. Eye Res. – 2011. – Vol.36. – P. 1005–1013
133. Shimazaki, J. Ocular surface reconstruction for thermal burns caused by fireworks / J. Shimazaki, K. Konomi, S. Shimmura [et al.]. – Text: immediate // Cornea. – 2006. – Vol.25, №2. – P.139-145. doi: 10.1097/01.ico.0000180083.59244.8f.
134. Shojaei, F. Bv8 regulates myeloid-celldependent tumour angiogenesis / F. Shojaei, X. Wu, C. Zhong [et al.]. – Text: immediate // Nature. – 2007. – Vol.450, №7171. – P.825-831. doi: 10.1038/nature06348.
135. Shojaei, F. Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells / F. Shojaei, X. Wu, A.K. Malik [et al.]. – Text: immediate // Nat Biotechnol. – 2007. – Vol.25, №8. – P.911-920. doi: 10.1038/nbt1323.

136. Singh, P. Ocular chemical injuries and their management / P. Singh, M. Tyagi, Y. Kumar [et al.]. – Text: immediate // *Oman J Ophthalmol.* – 2013. – Vol.6, №2. – P.83-86. doi: 10.4103/0974-620X.116624.
137. Spyridopoulos, I. Divergence of angiogenic and vascular permeability signaling by VEGF: inhibition of protein kinase C suppresses VEGF-induced angiogenesis, but promotes VEGF-induced, NO-dependent vascular permeability / I. Spyridopoulos, C. Luedemann, D. Chen, [et al.]. – Text: immediate // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2002. – Vol.22, №6. – P. 901-906. doi: 10.1161/01.atv.0000020006.89055.11.
138. Stoiber, J. Amniotic membrane transplantation with limbal stem cell transplantation as a combined procedure for corneal surface reconstruction after severe thermal or chemical burns / J. Stoiber, J. Ruckhofer, W. Muss [et al.]. – Text: immediate // *Ophthalmologe.* – 2002. – Vol.99, №11. – P.839-848. doi: 10.1007/s00347-002-0668-z.
139. Stratman, A.N. Endothelial cell-pericyte interactions stimulate basement membrane matrix assembly: influence on vascular tube remodeling, maturation, and stabilization / A.N. Stratman, G.E. Davis. – Text: immediate // *Microsc Microanal.* – 2012. – Vol.18, №1. – P.68-80. doi: 10.1017/S1431927611012402.
140. Tammela, T. VEGFR-3 controls tip to stalk conversion at vessel fusion sites by reinforcing Notch signaling / T. Tammela, G. Zarkada, H. Nurmi [et al.]. – Text: immediate // *Nat Cell Biol.* – 2011. – Vol.13, №10. – P.1202-1213. doi: 10.1038/ncb2331.
141. Taraboletti, G. Targeting tumor angiogenesis with TSP-1-based compounds: rational design of antiangiogenic mimetics of endogenous inhibitors / G. Taraboletti, M. Rusnati, L. Ragona [et al.]. – Text: immediate // *Oncotarget.* – 2010. – V.1, № 7. – P. 662-673. *Oncotarget.* – 2010. – Vol.1, №7. – P.662-673. doi: 10.18632/oncotarget.101108.
142. Teichmann, J. The control of endothelial cell adhesion and migration by shear stress and matrix-substrate anchorage / J. Teichmann, A. Morgenstern, J.

- Seebachet [et al.]. – Text: immediate // *Biomaterials*. – 2012. – Vol.33, №7. – P.1959-1969. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.11.017.
143. Tudisco, L. Epigenetic control of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ -dependent expression of placental growth factor in hypoxic conditions / L. Tudisco, F. Della Ragione et [al.]. – Text: immediate // *Epigenetics*. – 2014. – Vol.9, №4. – P. 600-610. doi: 10.4161/epi.27835.
144. Tykhomyrov, A.A. Role of angiostatins in diabetic complications / A.A. Tykhomyrov, S.I. Shram, T.V. Grinenko. – Text: immediate // *Biomed. Khim.* – 2015, № 61, № 1. – P. 41-56. *Biomed Khim.* – 2015. – Vol.61, №1. – P.41-56. doi: 10.18097/pbmc20156101041.
145. Ushio-Fukai, M. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy / M. Ushio-Fukai, Y. Nakamura. – Text: immediate // *Cancer Lett.* – 2008. – Vol.266, №1. – P.37-52. doi: 10.1016/j.canlet.2008.02.044.
146. Uy, H.S. Topical bevacizumab and ocular surface neovascularization in patients with stevens-johnson syndrome / H.S. Uy, P.S. Chan, R.E. Ang. – Text: immediate // *Cornea*. – 2008. – Vol.27, №1. – P.70–73.
147. Wahl, M.L. Angiostatin and anti-angiogenic therapy in human disease / M.L. Wahl, T.L. Moser, S.V. Pizzo. – Text: immediate // *Recent Prog Horm Res.* – 2004. – Vol.59. – P.73-104. doi: 10.1210/rp.59.1.73.
148. Wahl, M.L. Angiostatin's molecular mechanism: aspects of specificity and regulation elucidated / M.L. Wahl, D.J. Kenan, M. Gonzalez-Gronow [et al.]. – Text: immediate // *J Cell Biochem.* – 2005. – Vol.96, №2. – P.242-261. doi: 10.1002/jcb.20480.
149. Walter, J.J. Angiostatin binds to smooth muscle cells in the coronary artery and inhibits smooth muscle cell proliferation and migration In vitro / J.J. Walter, D.C. Sane. – Text: immediate // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 1999. – Vol.19, №9. – P.2041-2048. doi: 10.1161/01.atv.19.9.2041.
150. Wang, H. Endothelial NADPH oxidase 4 mediates vascular endothelial growth factor receptor 2-induced intravitreal neovascularization in a rat model of

- retinopathy of prematurity / H. Wang, Z. Yang, Y. Jiang [et al.]. – Text: immediate // *Mol Vis.* – 2014. – Vol.3, №20. – P.231-241.
151. Wang, M. Mesenchymal stem cell-based immunomodulation: Properties and clinical application. / M. Wang, Q. Yuan, L. Xie. – Text: immediate // *Stem Cells Int.* – 2018. – Vol.6. – P.3057624. doi: 10.1155/2018/3057624.
152. Wang, Z. Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy / Z. Wang, C. Dabrosin, X. Yin [et al.]. – Text: immediate // *Semin Cancer Biol.* – 2015. – Vol. 35 Suppl(Suppl). – P.S224-S243. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.01.001.
153. Whitcher, J.P. Corneal blindness: a global perspective / J.P. Whitcher, M. Srinivasan, M.P. Upadhyay. – Text: immediate // *Bull World Health Organ.* – 2001. – Vol.79, №3. – P.214-21.
154. Wragg, J.W. Shear stress regulated gene expression and angiogenesis in vascular endothelium / J.W.Wragg, S. Durant, H.M. McGettricket [et al.]. – Text: immediate // *Microcirculation.* – 2014. – Vol.21, №4. – P.290-300. doi: 10.1111/micc.12119.
155. Xiang, H. Work-related eye injuries treated in hospital emergency departments in the US / H. Xiang, L. Stallones, G. Chen [et al.]. – Text: immediate // *Am J Ind Med.* – 2005. – Vol.48, №1. – P.57-62. doi: 10.1002/ajim.20179.
156. Xu, L. COX-2 inhibition potentiates antiangiogenic cancer therapy and prevents metastasis in preclinical models. *Sci Transl Med* 6(242):242ra84-242ra84 / L. Xu, J. Stevens, M.B. Hilton [et al.]. – Text: immediate // *Sci Transl Med.* – 2014. – Vol. 6, №242. – P.242ra84. doi: 10.1126/scitranslmed.3008455.
157. Yadav, L. Tumour angiogenesis and angiogenic inhibitors / L. Yadav, N. Puri, V. Rastogi [et al.]. – Text: immediate // *J Clin Diagn Res.* – 2015. – Vol.9, №6. – P. XE01-XE05. doi: 10.7860/JCDR/2015/12016.6135.
158. Zhao, G. Numerical simulation of the inhibitory effect of angiostatin on metastatic tumor angiogenesis and microenvironment / G. Zhao, W. Yan, E. Chen [et al.]. – Text: immediate // *Bull Math Biol.* – 2013. – Vol.75, №2. – P.274-287. doi: 10.1007/s11538-012-9805-2.

159. Zimna, A. Hypoxia-inducible factor-1 in physiological and pathophysiological angiogenesis / A. Zimna, M. Kurpisz. – Text: immediate // *Biomed. Res. Int.* – 2015. – Vol.2015. – P. 549412. doi: 10.1155/2015/549412.