

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ
БИОЛОГИИ имени А.Н. БЕЛОЗЕРСКОГО

На правах рукописи

Тюлина Вероника Валерьевна

**Окислительный стресс при синдроме сухого глаза, вызванный
нарушением мигательного рефлекса**

1.5.5. Физиология человека и животных

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук
Сенин Иван Иванович

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
1. Обзор литературы.....	9
1.1. Синдром сухого глаза	10
1.2. Глазная поверхность	11
1.3. Физико-химические свойства слёзной жидкости.....	15
1.1.2. Осмолярность	15
1.1.3. Испарение	16
1.1.4. Липидный состав	17
1.1.5. Муцины.....	18
1.1.6. Протеомный состав	20
1.4. Окислительный стресс на глазной поверхности при ССГ (клинические исследования).....	23
1.5. Экспериментальные модели ССГ на лабораторных животных.....	24
1.6. Развитие окислительного стресса при моделировании ССГ in vitro и in vivo	31
1.7. Компоненты антиоксидантной защиты слёзной жидкости.....	35
1.8. Маркеры и мишени окислительного стресса при ССГ.....	37
1.9. Нарушение мигательного рефлекса как новый этиологический фактор развития ССГ.....	41
2. Материалы и методы.....	45
2.1. Материалы и Реактивы	45
2.2. Содержание и уход за животными	46
2.3. Моделирование синдрома сухого глаза	46
2.4. Клиническое исследование.....	47
2.5. Гистологическое исследование.....	47
2.6. Окрашивание роговицы метиленовым синим	48

2.7. Получение образцов слёзной жидкости	48
2.8. Определение осмолярности.....	48
2.9. Определение антиоксидантной активности.....	48
2.10. Измерение активности антиоксидантных ферментов	50
2.11. Количественное определение электрохимически активных антиоксидантов в слёзной жидкости.....	50
2.12. Зимография супероксиддисмутазной активности	50
2.13. Определение малонового диальдегида	51
2.14. Желатиновая зимография.....	51
2.15. Иммуноферментный анализ.....	51
2.16. Анализ ВЭЖХ – МС/МС	52
2.17. Участники исследования для сравнительного анализа ВЭЖХ – МС/МС .	53
2.18. Электрофорез и иммуноблотинг	53
2.19. Определение общей концентрации белка.....	54
2.20. Статистический анализ.....	54
3. Результаты исследования	55
4. Обсуждение	85
5. Заключение.....	96
6. Выводы	99
7. Список сокращений.....	100
8. Список литературы.....	102

ВВЕДЕНИЕ

1. Актуальность и степень разработанности темы

В XXI веке население все больше зависит от различных технологий в личной и профессиональной сферах, много времени проводит за цифровыми экранами такими как компьютеры, смартфоны и планшеты, что привело к росту распространенности офтальмологических заболеваний, которые могут затронуть до 90% людей по всему миру, что заставляет обратить внимание на эту проблему.

Последствия длительного использования устройств визуального отображения информации еще предстоит выяснить. Однако уже имеющиеся клинические данные однозначно указывают на связь целого ряда патофизиологических эффектов с продолжительностью использования цифровых устройств. Одним из ключевых признаков является изменение физиологии моргания, которое выражается в изменении динамики паттернов мигательного рефлекса, что приводит к развитию синдрома сухого глаза (ССГ). Все это может привести к изменению биохимического состава и гиперосмолярности слёзной жидкости (СЖ) с последующим воспалением эпителия роговицы и конъюнктивы.

Имеющиеся данные в основном носят фрагментарный характер, и требуются дальнейшие исследования для выявления изменений биохимического состава и компонентов слёзной жидкости при развитии ССГ, вызванного нарушением мигательного рефлекса. Интересно, что уже первые клинические исследования показали, что у пользователей цифровых экранов глазная поверхность подвержена окислительному стрессу (ОС), который может вызывать повреждение роговицы. У пациентов с ССГ в СЖ обнаружено провоспалительное состояние, а также повышенные концентрации маркеров перекисного окисления липидов. Первичный ответ, вероятно, включает замкнутый круг между прооксидантными и провоспалительными механизмами, которые способствуют дисфункции глазной поверхности. Поэтому дальнейшее изучение механизмов и динамики развития окислительного повреждения структур глаза при ССГ, вызванного нарушением мигательного рефлекса, представляет большой интерес для фундаментальной науки и прикладного применения при разработке терапевтических подходов для профилактики и лечения последствий длительного использования электронных устройств визуального отображения.

2. Целью настоящей работы является изучение механизмов развития окислительного стресса и его патогенетической роли при синдроме сухого глаза, связанного с нарушением мигательного рефлекса, а также поиск обоснованного подхода для его коррекции. В соответствии с этой целью решались следующие задачи:

1. Разработать экспериментальную модель синдрома сухого глаза, вызванного нарушением мигательного рефлекса и изучить динамику изменения компонентов антиоксидантной защиты в слёзной жидкости при развитии этой патологии;

2. Провести качественный и количественный анализ перекисного окисления липидов и изменений сигнального липида слёзной жидкости с целью определения путей, опосредующих ответ тканей поверхности глаза в условиях окислительного стресса;

3. Исследовать эффективность местного применения водорастворимых антиоксидантов на клинико-морфологические изменения роговицы, показатели антиоксидантной активности и продуктов перекисного окисления липидов слёзной жидкости;

4. Оценить влияние применения ингибитора липоксигеназы на накопление продуктов перекисного окисления липидов и изменение липидного состава слёзной жидкости;

5. Изучить клинические, морфологические и биохимические эффекты применения митохондриально-адресованного антиоксиданта с оценкой терапевтической эффективности при синдроме сухого глаза.

3. Научная новизна работы

В работе была разработана новая экспериментальная модель ССГ, вызванного нарушением физиологии моргания. Предложенный подход позволил создать условия, имитирующие нарушение паттернов мигательного рефлекса и развитие ССГ у людей во время использования цифровых экранов. Охарактеризованы клинико-морфологические повреждения роговицы, а также изменение окислительно-восстановительного баланса слёзной жидкости при нарушении мигательного рефлекса, что ранее не было продемонстрировано ни в одном исследовании. В частности, показано снижение антиоксидантной активности (АОА) и концентрации низкомолекулярных антиоксидантов, а также накопление продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в слёзной жидкости.

Впервые разработан воспроизводимый метод количественного совместного определения полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и их оксилипинов в СЖ. Продемонстрирована ключевая роль липидных продуктов липоксигеназного пути метаболизма арахидоновой и линолевой кислот при развитии воспаления глазной поверхности при ССГ, вызванного нарушением мигательного рефлекса.

Впервые показано, что при местном применении глазных капель, содержащих диметилсульфоксид (ДМСО) и ингибитор 5-липоксигеназы N-[1-(1-бензотиен-2-ил)этил]-N-гидроксимочевина (Зилеутон), оказывает положительное действие на клинико-морфологические изменения роговицы при ССГ. В основе молекулярных механизмов терапевтического действия этих препаратов лежит их способность подавлять накопление продуктов перекисного окисления липидов и продуктов метаболизма арахидоновой и линолевой кислот липоксигеназного пути, что приводит к подавлению окислительного стресса и снижению индекса воспаления глазной поверхности.

Впервые показана эффективность митохондриально-адресованной антиоксидантной терапии при ССГ, вызванном нарушением мигательного рефлекса. Местное применение глазных капель, содержащих митохондриально-адресованный антиоксидант Пластохинонилдецилтрифенилфосфония бромид (SkQ1) подавляет нарушение окислительно-восстановительного баланса СЖ, снижает провоспалительный ответ на глазной поверхности и подавляет разрушение внеклеточного матрикса роговицы.

4. Теоретическая и практическая значимость работы

На основании клинических, гистологических и биохимических данных можно говорить о возможном использовании разработанной нами модели для фундаментальных исследований механизмов развития ССГ и поиска новых терапевтических подходов лечения этого заболевания. В частности, с использованием нашей модели мы подтвердили роль окислительного стресса и воспаления в развитии ССГ, вызванного нарушением мигательного рефлекса. Нами впервые было показано, что использование ингибитора 5-липоксигеназы может оказать положительное воздействие на ССГ. Кроме того, с использованием митохондриально-адресованного антиоксиданта SkQ1 мы продемонстрировали потенциальную эффективность антиоксидантной терапии при ССГ. Таким образом были впервые предложены и успешно применены подходы для профилактики и лечения ССГ, вызванного нарушением физиологии моргания.

5. Методология и методы исследования

Работа выполнена с использованием современных биохимических, физико - химических, гистологических, клинических методов. Для исследований *in vivo* использовали модель на лабораторных кроликах.

6. Основные положения, выносимые на защиту

1. В условиях нарушения мигательного рефлекса у кроликов происходит развитие клинко-морфологических изменений глазной поверхности, характерных для ССГ;
2. Нарушение мигательного рефлекса приводит к развитию в СЖ окислительного стресса и сопровождается снижением в ней содержания низкомолекулярных антиоксидантов и накоплением продуктов перекисного окисления липидов и провоспалительных оксилипинов;
3. Липоксигеназы играют ключевую роль в биосинтезе провоспалительных оксилипинов на глазной поверхности при ССГ;
4. Местное применение ДМСО подавляет перекисное окисление липидов в СЖ;
5. Терапия ингибитором липоксигеназы - Зилеутоном - подавляет накопление провоспалительных оксилипинов и приводит к выраженному снижению индекса воспаления в СЖ на фоне нарушения мигательного рефлекса;
6. Митохондриально - адресованный антиоксидант SkQ1 препятствует развитию окислительного стресса и накоплению провоспалительных медиаторов в СЖ, а также сохраняет барьерную функцию эпителия роговицы.

7. Степень достоверности результатов

Все результаты были получены в трех и более независимых экспериментах. Для достижения межгрупповой статистической достоверности все экспериментальные группы включали шесть и более экспериментальных животных. Методы исследования и статистическая обработка данных соответствует современным стандартам.

8. Публикации

По материалам диссертации опубликовано 11 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и RSCI

9. Апробация результатов

Результаты работы были представлены на следующих научных мероприятиях: «Достижения и перспективы супрамолекулярной и биологической химии в биомедицине и сельском хозяйстве» (Москва, 4-8 декабря 2017); Sechenov International Biomedical

Summit 2018 (Москва, 21-23 мая 2018); II Объединенный научный форум (Дагомыс, 1-6 октября 2019); «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны» (Санкт-Петербург, 19-20 ноября 2020); 6-ая Российская конференция по медицинской химии с международным участием (MedChem-Russia, Нижний Новгород, 1-4 июля 2024); Всероссийская конференция с международным участием (Биохимия человека, Москва, 17–19 октября 2024); Международная научная конференция, посвященная 120-летию со дня рождения академика А.Н. Белозерского и 90-летию со дня рождения академика В.П. Скулачёва (Москва, 20-22 февраля 2025); Третья Всероссийская школа-конференция по медицинской химии для молодых ученых с международным участием (Уфа, 23-27 июня 2025).

По материалам работы опубликованы 8 тезисов докладов в сборниках российских и международных конференций. Диссертационная работа апробирована на заседании отдела сигнальных систем клетки НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова.

10. Личный вклад автора в исследование

Основные результаты диссертационной работы получены автором самостоятельно в отделе сигнальных систем клетки НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова с 2016 по 2026 год. Личный вклад включает: анализ научной литературы по теме исследования, разработку дизайна экспериментов и их выполнение, осуществление моделирования ССГ на животных, клинические осмотры кроликов, получение образцов для гистологических и биохимических исследований, статистическую обработку, анализ результатов. Соискателем осуществлялась подготовка рукописей статей к публикации и представление результатов работы на научных конференциях. Непосредственное измерение концентрации оксилипинов методом тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) проводились при участии к.ф.н. Горяинова С.В. Подготовка гистологических срезов роговицы проводилась при участии к.б.н. Ганчаровой О.С.

11. Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 120 страницах и содержит 25 рисунков и 5 таблиц. В текст работы вошли следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение результатов, выводы, список сокращений и список литературы (232 источника).

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глаз представляет собой узкоспециализированный орган, ответственный за первичное восприятие зрительной информации (рис. 1а). С функциональной точки зрения в структуре глаза можно выделить основные части: ответственная за восприятие света (сетчатка и ее пигментный эпителий), светопреломляющие ткани (хрусталик, радужная оболочка и цилиарное тело) и среды (водянистая влага и стекловидное тело), которые фокусируют и регулируют уровень светового потока на сетчатку, наружная оболочка (склера и роговица) [1].

Прозрачность роговицы и ее преломляющие свойства являются ключевыми для нормального восприятия зрительным анализатором света. Морфологически в роговице выделяют пять слоев (рис. 1б): эпителий роговицы (многослойный, плоский, неороговевающий эпителий); передняя ограничивающая мембрана или слой Боумена - модифицированная бесклеточная область стромы; строма роговицы - соединительная ткань, состоящая из коллагеновых пластинок, кератоцитов и модифицированных фибробластов; задняя ограничивающая пластинка или десцеметова мембрана; и однослойный эндотелий роговицы [1].

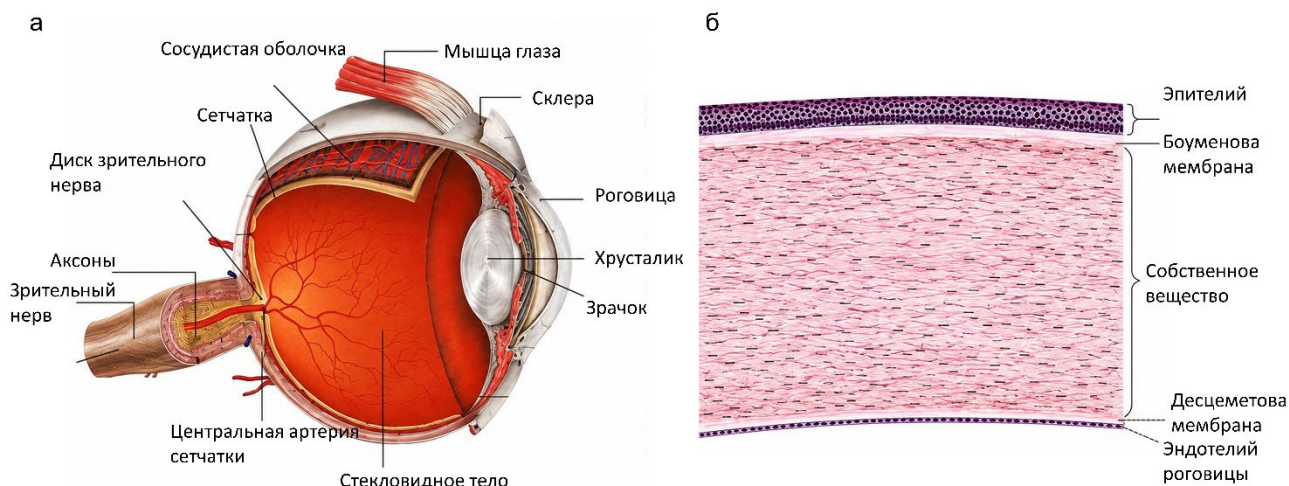


Рисунок 1 – Строение: а – глазного яблока; б – роговицы

Заболевания роговицы являются одной из важных проблем здравоохранения ввиду прогрессирующего роста числа пациентов. Наиболее распространенным является синдром сухого глаза, который может приводить к снижению качества жизни,

работоспособности, частичной и даже полной потери зрения. Частота встречаемости увеличивается с возрастом и затрагивает от 5% до 34% населения в зависимости от страны, в которой проводились исследования [2].

1.1. Синдром сухого глаза

Согласно отчету «Международной рабочей группы по проблемам ССГ (TFOS)» за 2017 год, ССГ — это «многофакторное заболевание глазной поверхности, характеризующееся потерей гомеостаза слёзной пленки и сопровождающееся глазными симптомами, нестабильностью слёзной пленки и гиперосмолярностью, воспалением и повреждением глазной поверхности, а также нейросенсорными аномалиями, которые определяют этиологию заболевания». В большинстве случаев ССГ сопровождается такими симптомами, как ограничение повседневной деятельности, болью и ухудшением общего состояния здоровья [3].

Глазная поверхность включает слёзную пленку, слёзные железы, мейбомиевы железы, роговицу, конъюнктиву и веки (рис. 2). Нарушение гомеостаза связано с изменением физико-химических свойств слёзной пленки, которое сопровождает многие симптомы при ССГ. Нестабильность слёзной пленки, гиперосмолярность, воспаление и повреждение глазной поверхности лежат в основе патогенеза ССГ. Также в последние годы все чаще подчеркивается, что вовлечение нейронов и нейросенсорные аномалии играют важную роль в патофизиологии ССГ [3].

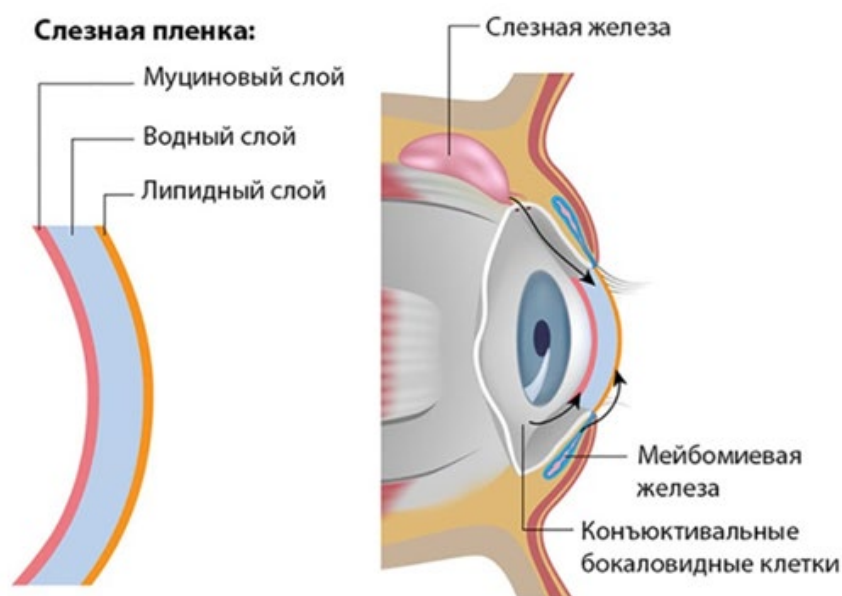


Рисунок 2 – Схема строения слёзной пленки и структур, отвечающие за ее формирование

В следующих разделах «Обзора литературы» будет представлена информация о ключевых компонентах глазной поверхности, обсуждена их взаимосвязь, а также будет уделено особое внимание современным представлениям об изменениях при ССГ.

1.2. Глазная поверхность

Физиологию глазной поверхности обеспечивают анатомические структуры, участвующие в формировании и обновлении слёзной пленки, а также нервная, иммунная, эндокринная и сосудистая системы.

1) Роговица

Роговица играет важную роль в поддержании баланса микроокружения глазной поверхности (рис. 1 Б). Эпителий роговицы постоянно подвергается воздействию внешней среды и защищает ее внутренние слои от проникновения токсичных веществ и вредных патогенов, благодаря наличию плотных межклеточных контактов [4]. Микроворсинки поверхностного эпителия способствуют «прикреплению и удержанию» слёзной пленки. Высокоорганизованный эпителий также производит олигомеризированные трансмембранные муцины, формирующие области гликокаликса. Эпителиальные клетки обладают различными сигнальными механизмами, участвующими в заживлении ран и секретируют ключевые для этого процесса белковые компоненты, такие как факторы роста, цитокины и т. д. Кератоциты в строме роговицы способны синтезировать коллаген, а гликозаминогликаны, поддерживают внеклеточный матрикс. Кератоциты также взаимодействуют с эпителиальными клетками через секреторные сигнальные молекулы. Лимбальные стромальные клетки образуют микроокружение для лимбальных эпителиальных стволовых клеток, осуществляя контроль за их пролиферацией и дифференцировку последних [5]. Также роговица пронизана большим количеством нервных окончаний, которые генерируют афферентные нервные импульсы для глазной поверхности. Эндотелий роговицы действует как барьер между стромой роговицы и водянистой влагой в передней камере [6].

При ССГ наблюдается нарушение состояния слёзной пленки, влекущее за собой изменение рельефа поверхности роговицы и появление сухих пятен, что влияет на качество зрения [7]. Иссущение поверхности роговицы приводит к развитию признаков воспалительных реакций и активации протеиназ, приводящих к повреждению внеклеточного матрикса коллагеновой стромы, что приводит к истончению роговицы [8]. ССГ также сопровождается уменьшением поверхностных эпителиальных клеток

роговицы, что приводит к дальнейшему ее повреждению. Частыми осложнениями ССГ является рубцевание, помутнение и дегенерация роговицы, что может привести к слепоте [9].

2) Конъюнктива

Эпителий конъюнктивы является продолжением эпителиального слоя роговицы и также выполняет защитную и барьерную функции. Кроме того, бокаловидные клетки конъюнктивы секретируют муцин, входящий в состав слёзной пленки, и играют важную роль в иммунной защите глазной поверхности. За продукцию муцина в конъюнктивальном эпителии отвечают бокаловидные клетки и клетки Лангерганса. Бокаловидные клетки конъюнктивы синтезируют и секретируют большое семейство муцинов, включая MUC1, MUC4, MUC5AC и MUC16 [10]. Бокаловидные клетки конъюнктивы находятся в непосредственной близости от лимфоцитов и дендритных клеток. При воспалительных состояниях поверхности глаза их количество сокращается, что связывают с возможным прямым воздействием на них цитокинов и хемокинов [11].

Есть основания считать, что в строме конъюнктивы присутствуют мезенхимальные стволовые/стромальные клетки, которые принимают участие в репарации и регуляции иммунных ответов [12].

Хроническое воспаление конъюнктивы является признаком ССГ. Основным патологическим изменением конъюнктивы в ответ на дефицит слёзной пленки и хроническую воспалительную реакцию является плоскоклеточная метаплазия и снижение плотности бокаловидных клеток [13, 14].

3) Слёзная железа

Слёзная железа способствует поддержанию гомеостаза глазной поверхности, секретируя водную составляющую слёзной пленки, которая включает воду, электролиты и белки. В норме объем секретируемой СЖ обеспечивает достаточное содержание влаги на глазной поверхности для удержания белков в растворимом состоянии и преломления света на границе воздух-вода на поверхности роговицы. Секрет слёзной железы также содержит различные антибактериальные белки: лизоцим, лакритин, иммуноглобулины и цитокины. Кроме этого, в слёзной железе присутствуют IgA-секретирующие клетки, которые защищают глазную поверхность от патогенов [15].

Дисфункция слёзной железы может быть вызвана различными причинами, такими как старение, длительное воздействие цифровых экранов, сухая среда, лучевая терапия,

контактные линзы, рефракционная хирургия, гормональный дисбаланс, синдром Шегрена и системные нарушения. Возрастным изменением функций слёзной железы является прогрессирующая ацинарная атрофия, неконтролируемый фиброз и инфильтрация лимфоцитов. Аутоиммунные расстройства, такие как синдром Шегрена, нацелены на слёзную железу, при этом аутоантигены экспрессируются на поверхности эпителиальных клеток, что приводит к потере слёзных ацинарных и протоковых клеток [15]. В результате в протоке слёзной железы происходит накопление продуктов фиброза и фрагментов апоптотических клеток, что затрудняет приток и отток жидкости [16]. Таким образом, необратимые изменения в слёзной железе оказывают влияние на количество и качество СЖ.

4) Мейбомиевы железы

За обеспечение глазной поверхности липидным секретом отвечают мейбомиевы железы, которые расположены в толще хряща верхнего и нижнего век. Эти специализированные железы состоят из мейбоцитов, которые участвуют в процессах, связанных с производством мейбума (богатого липидами секрета, формирующего наружный липидный слой слёзной пленки). Мейбум выходит в выводные протоки мейбомиевой железы во время мягкой компрессии век при моргании [17, 18]. Липиды, секретируемые мейбомиевой железой, включают холестерин, сложные эфиры холестерина, сложные эфиры воска, триглицериды, фосфолипиды, свободный холестерин и свободные жирные кислоты. Секрет со смесью липидов и белков поддерживает осмолярность, стабильность и предотвращает испарение слёзной пленки. Изменение качества и количества липидов отражают изменения в компонентах СЖ, тем самым приводя к увеличению испарения водянистой составляющей слёзной пленки [18]. При ССГ наблюдается недостаточная секреция и изменение профиля в сторону короткоцепочечных липидов, а также снижение уровня олеиновой кислоты, что отражается на вязкости секрета и приводит к обструкции железы. Показано, что триглицериды, содержание которых повышается в СЖ пациентов с ССГ, являются мишенями активных форм кислорода (АФК), способствующих конформационным изменениям липидных фрагментов. Маркеры перекисного окисления липидов, 4-гидрокси-2-ноненал (4-HNE) и малоновый диальдегид (МДА) повышены при ССГ [19].

5) Веки

Традиционно к первой линии защиты глазного яблока от внешних воздействий относят веки. Помимо физической защиты веки участвуют в равномерном распределении и формировании правильной структуры слёзной пленки на глазной поверхности [1]. Уменьшение частоты моргания может приводить к изменению толщины липидного слоя, что влечет за собой увеличение испарения водного слоя слёзной пленки. Возрастные дегенеративные изменения, травмы, паралич лицевого нерва, лагофтальм, проптоз или синдром гибкого века могут влиять на состояние век, что приводит к неполному смыканию век и редкому морганию. Измененная структура век неспособна оказывать нужное мышечное давление на мейбомиевы железы для высвобождения мейбума, что приводит к развитию ССГ. Редкое моргание также приводит к накоплению токсинов, патогенов и инородных тел, поскольку клиренс СЖ зависит исключительно от частоты моргания с равномерными интервалами. Неполное смыкание век влияет на равномерное распределение СЖ на глазной поверхности, что приводит к сокращению времени разрыва слёзной пленки [20, 21].

6) Слёзная пленка

Слёзная пленка представляет собой упорядоченную структуру. Эта структура не однородна и в ней выделяют три относительно различимых слоя (рис. 2). Внутренний слой – муциновый, толщиной от 2,5 до 5 мкм, находится непосредственно на поверхности роговицы. Он состоит преимущественно из гликозилированных белков, продуцируемых бокаловидными клетками конъюнктивы. Муцины формируют гелеобразную структуру, обеспечивают равномерное распределение слёзной пленки и ее контакт с глазной поверхностью [22]. Следующий слой — водный, толщиной около 4 мкм, непрерывно секретируется слёзными железами со скоростью ~1,2 мкл/мин. Этот слой богат питательными и защитными компонентами, такими как электролиты, белки, пептиды и низкомолекулярные метаболиты. Протеомные исследования СЖ показывают, что наиболее распространенными белками являются липокалин (~ 2 мг/мл) и лизоцим (~ 2.5 мг/л) [23]. Липокалин является амфифильным и поверхностно активным белком, обеспечивающим равномерное распределение СЖ по поверхности роговицы. Обилие лизоцима связывают с его высокой антимикробной активностью [24]. Водный слой также содержит растворимые муцины, которые помогают во время распределения слёзной пленки при моргании. Основными функциями этого слоя являются поддержание

оптически гладкой поверхности для преломления света, предотвращение обезвоживания глазной поверхности, защита от патогенов и мелких частиц из воздуха, а также питание клеток роговицы [22, 23]. Внешний слой слёзной пленки — липидный, толщиной от 0,015 до 0,160 мкм [25]. Липидный слой секретируется мейбомиевыми железами, предотвращает быстрое испарение водного слоя. В его состав входят различные липиды, в том числе триглицериды и свободные жирные кислоты [22].

Слёзная пленка не является статической системой из-за трех ключевых процессов: потока СЖ, испарения и моргания. В то время как динамика, связанная с потоком СЖ и испарением, может привести к балансу, моргание является источником импульсного действия, которое может быть нерегулярным и приводить к нарушению слёзной плёнки. Время движения века вниз и вверх при спонтанном моргании составляет приблизительно 100 мсек. и 250 мсек., соответственно [26]. После каждого моргания СЖ обновляется и распределяется на поверхности роговицы примерно через 1 сек. Через некоторое время, так называемое время разрыва слёзной пленки, ее слой истончается и разрушается. Это время у людей обычно находится в диапазоне нескольких секунд, хотя при ССГ этот показатель ускорен или разрыв может произойти мгновенно после моргания. Распад может наблюдаться макроскопически в виде точек или полос, возникающих на поверхности роговицы. Однако нужно понимать, что макроскопическому разрушению слёзной пленки предшествуют структурные изменения на молекулярном уровне, в частности, осмолярности [25, 27].

Не смотря на постоянное внесение изменений и дополнений в определение ССГ остается понимание, что именно изменение физико-химических свойств и гомеостаза СЖ являются ключевыми иницирующими механизмами, приводящими к развитию патофизиологических процессов на глазной поверхности. В следующем разделе мы рассмотрим более детально физико-химические свойства СЖ.

1.3. Физико-химические свойства слёзной жидкости

1.1.2. Осмолярность

Осмолярность СЖ определяется количеством осмотически активных частиц [28]. Средние значения осмолярности СЖ в норме варьируются от 270 до 315 мОсм/л. Рост осмолярности СЖ наблюдался у людей при бессоннице и в высокогорных районах [29, 30]. Существует корреляция между осмолярностью плазмы и СЖ, в обоих случаях эти значения повышаются у пациентов с обезвоживанием организма или с ССГ [31, 32].

Слёзная пленка истончается за время интервала между морганиями, главным образом из-за испарения, что приводит к гиперосмотическому сдвигу [25]. Согласно математическому моделированию, уровень гиперосмотического сдвига зависит от скорости истончения, которая обусловлена скоростью испарения. При скорости истончения в 1 мкм/мин, осмолярность СЖ увеличится с 302 мОсм/л до 332 мОсм/л. А при скорости истончения 4 мкм/мин наблюдается увеличение осмолярности почти на 51% со средним значением 457 мОсм/л. Наиболее высокие значения осмолярности были выявлены при истончении слёзной пленки со скоростью 10-20 мкм/мин и уровни 951 и 1828 мОсм/л соответственно. При гиперосмолярности возникает болевой синдром на глазной поверхности у пациентов во время разрыва слёзной пленки или перед морганием [33]. Эта взаимосвязь была косвенно подтверждена при использовании инстилляций солевых растворов с повышенным уровнем осмолярности. Первичный дискомфорт пациенты начинали ощущать, когда осмолярность глазных капель с хлоридом натрия составляла 454 ± 14 мОсм/л, при этом выраженная боль, сопоставимая с ощущениями при разрыве слёзной пленки, проявлялась при увеличении осмолярности в среднем до 809 мОсм/л [34]. Можно сделать вывод, что существует чёткая зависимость между осмолярностью глазных капель и ощущаемым дискомфортом.

Выявленные значения осмолярности СЖ у пациентов с ССГ колеблются от 311 до 360 мОсм/л [28, 35]. В последующих исследованиях была выявлена статистически значимая корреляция между степенью тяжести заболевания и уровнем осмолярности слёзной пленки [36, 37].

1.1.3. Испарение

Скорость испарения считается показателем стабильности липидного слоя. Быстрое испарение слёзной пленки между морганиями связано с ее истончением, дискомфортом и болью на поверхности глаза и может приводить к развитию СГГ [38]. Данные о предрасположенности у определенного возраста и пола к скорости испарения СЖ неоднозначны. Некоторые исследования показали, что у возрастных групп пациентов скорость испарения в 1,5 раза выше, чем у молодых [39]. У женщин скорость испарения примерно в 1,4 раза выше, чем у мужчин [40]. Выявлено, что снижение относительной влажности воздуха всего на 10 % увеличивает скорость испарения СЖ здоровых людей более чем на 40% [41].

Исследования показывают, что скорость испарения СЖ у пациентов с ССГ, связанным с дисфункцией мейбомиевых желез, заметно выше, чем у здоровых людей [42]. В настоящее время нет единой точки зрения на природу регуляции скорости испарения и выдвигаются три предположения: существует определенная организация липидного слоя и его состава; липидный слой не является единственной структурой, ответственной за замедление испарения, но и специфические белки и/или муцин также необходимы; испарение воды с поверхности глаза вообще не контролируется липидами и липидный слой выполняет другие функции. В последних двух случаях предполагается, что при испарении водного слоя концентрация секреторных муцинов и белков в липидном слое будет увеличиваться. Плотная полимерная сеть муцина обладает высокой гидратационной способностью и может подавлять дальнейшее испарение СЖ. Также возможно, что муцины вместе с белками и липидами СЖ поддерживают структуру липидного слоя слезной пленки [43]. Таким образом, все ключевые компоненты слезной пленки могут влиять на устойчивость ее к испарению.

1.1.4. Липидный состав

В физиологических условиях основная липидная масса поступает в СЖ из протоков мейбомиевых желез, расположенных на слизисто-кожном соединении обода век [43]. Сравнение липидного состава из мейбомиевых желез и цельных СЖ показало, что классы и соотношения липидов в них очень похожи. Единственным исключением были фосфолипиды, большинство из которых могут поступать из других источников [44, 45].

Липидный состав мейбомиевых желез был исследован для выявления корреляций состава со степенью выраженности ССГ. Липидный состав секрета мейбомиевых желез представлен примерно 84% неполярными и 16% полярными (амфифильными) липидами [44]. У людей неполярные липиды представлены на 30-50% из восковых эфиров, 30-45% холестериновых эфиров и примерно 2% триглицеридов [46]. Восковые эфиры обычно имеют компонент олеиновой кислоты (C18:1), а длина спиртовой цепи варьируется от C18 до C30. Особенностью сложных эфиров холестерина является то, что они имеют очень длинные ацильные цепи, преимущественно C22:1–C34:1. Другие липиды, обнаруженные в секрете мейбомиевых желез, включают свободный холестерин, который составляет <0,5%, и фосфолипиды, которые составляют <0,01% [47]. Представителями полярных липидов, обнаруженных в секрете мейбомиевых желез, являются (О-ацил)- ω -гидроксигирные кислоты, которые составляют около 4%. Амфифильные полярные

липиды действуют как поверхностно-активные вещества и обеспечивают взаимодействие гидрофильной водной фазы с неполярными липидами или являются барьером для испарения. [48]. Исследователи указывают, что соотношение липидов в СЖ не изменяется с возрастом, а также не было выявлено разницы между мужчинами и женщинами [49]. Недавно в секрете мейбомиевых желез был выявлен сквален, липид, обладающий противовоспалительными, антибактериальными и антиоксидантными свойствами, за счет чего помогает поддерживать стабильность слёзной пленки [50].

За последнее время были представлены результаты исследований, направленных на изучение липидного состава СЖ у пациентов с ССГ [51, 52]. У пациентов с ССГ была обнаружена тенденция к снижению низко- и сренемолекулярных восковых эфиров. Также было показано, что некоторые амфифильные липиды, холестерилсульфаты, глюкозилцерамиды, ганглиозидманнозиды и лизофосфатидилхолины положительно коррелировали с повышенной слёзопродукцией. Были обнаружены небольшие количества сульфата холестерина в мейбуме и СЖ пациентов, страдающих ССГ [53]. Однако его роль в СЖ нуждается в дальнейшем исследовании, поскольку он обычно связан с эпителием, где может выполнять сигнальную функцию [54].

1.1.5. Муцины

Муцины представляют собой крупные высокомолекулярные гликопротеины, содержащие один или несколько белковых доменов, богатых О-гликозилированными серинами и треонинами. Эти важные гликановые цепи составляют значительную часть (50-80%) от общей массы муцинов [55]. В совокупности муцины образуют слизь, которая покрывает апикальные поверхности эпителия в дыхательных, желудочно-кишечных и репродуктивных путях, а также на поверхности глаза. Муцины выполняют различные функции, включая смазку, образование барьера и гидратацию [56].

У человека идентифицировано более 20 генов муцина (MUC), продукты которых классифицируются на два типа: секреторные муцины и трансмембранные муцины. Секреторные муцины далее подразделяются на крупные гелеобразующие муцины и мелкие растворимые муцины [57]. Гелеобразующими муцинами являются MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 и MUC19, малорастворимыми муцинами являются MUC7, MUC8 и MUC9, а другие были охарактеризованы как трансмембранные. Муцины глазной поверхности синтезируются эпителием роговицы и конъюнктивы, а также слёзными железами, где они выполняют барьерную функцию, предотвращают связывание

патогенов с поверхностью глаза, поддерживают увлажнение роговицы, а также помогают плавно скользить векам и распределяться СЖ по поверхности [58, 59]. На протяжении многих лет роль муцинов в физиологии глазной поверхности и их участие в развитии ССГ является объектом пристального внимания.

Источником гелеобразующих муцинов глазной поверхности являются бокаловидные клетки конъюнктивы, причем наиболее выражено экспрессируется MUC5AC. Гелеобразующие муцины важны для гидратации глазной поверхности, а также играют важную роль не только в поддержании структуры слезной пленки, но и в предотвращении связывания инородных частиц и патогенов с глазной поверхностью и повреждения клеток в процессе моргания [60].

Несколько исследований продемонстрировали снижение уровня MUC5AC при ССГ. У пациентов с ССГ наблюдалось снижение общего количества бокаловидных клеток [58, 61]. Недавние исследования выявили дефицит бокаловидных клеток и, как следствие, снижение экспрессии MUC5AC у офисных работников, использующих экраны визуального отображения [62]. У пациентов с атопическим кератоконъюнктивитом количество бокаловидных клеток и уровень мРНК MUC5AC были значительно снижены, в то же время наблюдалось увеличение MUC16, и авторы предположили, что MUC16 компенсирует недостаток MUC5AC [63]. У пациентов с синдромом Шегрена также сообщалось о снижении мРНК и белка MUC5AC в СЖ и снижении мРНК и белка MUC19 [64]. Таким образом, существует множество данных, демонстрирующих, что ССГ сопровождается снижением уровня MUC5AC на глазной поверхности.

Трансмембранные муцины, экспрессируемые эпителием конъюнктивы и роговицы, включают MUC1, MUC4 и MUC16, были обнаружены в СЖ [65]. Иммунореактивный MUC20 был обнаружен по всей поверхности эпителия глаза, но преимущественно в области плазматической мембраны промежуточных слоев клеток. MUC20 также наблюдался в цитоплазме апикальных клеток многослойного плоского эпителия конъюнктивы, но не в бокаловидных клетках. В СЖ он не был обнаружен [66]. Трансмембранные муцины имеют большие внеклеточные домены, гидрофобный мембранный домен и короткий цитоплазматический домен. Внеклеточный домен содержит tandemные повторы, богатые серином и треонином, которые подвергаются гликозилированию, и может простирается до 200-500 нм над поверхностью глаза [67]. Трансмембранные муцины способствуют высокоорганизованному защитному

эпителиальному барьеру на апикальном гликокаликсе клеток эпителия глазной поверхности, они также связываются с галектином-3 - мультивалентным β -галактозидсвязывающим лектином [45]. Галектин-3 локализуется с MUC1 и MUC16 на апикальной поверхности эпителиальных клеток и играет ключевую роль в поддержании барьерной функции слизистой оболочки. Было обнаружено, что концентрация белка галектина-3 в СЖ значительно выше у пациентов с ССГ и связана с эпителиальной дисфункцией, которая может способствовать нарушению барьерной функции глазной поверхности. У женщин в постменопаузе с ССГ выявлено повышение уровней мРНК и белка MUC1 и MUC16 по сравнению с контролем [68]. Такие изменения могут быть результатом связанных с ССГ медиаторов воспаления (например, ИЛ-1, ИЛ-6, IFN- γ , ФНО- α), регулирующих экспрессию трансмембранного муцина [69].

Таким образом, муцины играют ключевую роль в здоровье глазной поверхности и нарушение их синтеза и секреции является важным фактором при развитии ССГ.

1.1.6. Протеомный состав

За последние два десятилетия был достигнут значительный прогресс в понимании белкового состава СЖ в норме и при ССГ. В настоящее время известно, что почти 1800 белков составляют протеом СЖ человека, некоторые из которых уже стали биомаркерами ССГ [70]. Такие биомаркеры в СЖ человека могут предсказывать, диагностировать и даже, в некоторых случаях, быть терапевтическими средствами для лечения заболеваний глазной поверхности.

Считается, что в здоровом глазу белковый состав слёзной пленки определяется секретом слёзной железы, мейбомиевых желёз, бокаловидных клеток и вспомогательных слёзных желёз. Современные методологические подходы позволяют идентифицировать до 1543 белков в СЖ. Большинство идентифицированных белков вовлечены в иммунную систему и могут принимать участие в иммунных и воспалительных ответах. Среди идентифицированных белков 64 были протеазами или ингибиторами протеаз, а 18-антиоксидантными ферментами [71]. Эти результаты могут объяснить важность СЖ в защите глазной поверхности от патогенных внешних факторов, раздражителей и окислительного стресса.

Белковый состав СЖ здоровых людей является фундаментальным объектом исследования для сравнения с клиническим протеомом СЖ пациентов с офтальмологическими заболеваниями. Первое на что было обращено внимание – это

различия в содержании ряда белков у мужчин и женщин. Было обнаружено, что содержание лактоферрина, гаптоглобина, α -1-антитрипсина, цистатин-4, липокалина 1 и лакритина значительно выше в СЖ у представительниц женского пола по сравнению с представителями мужского пола. Большинство белков, повышенный уровень которых выявлен в СЖ у пациентов женского пола, ассоциированы с местными иммунными защитными реакциями. Информация о белках была проанализирована с использованием системы классификации Omicsbean. Оказалось, что вовлечены гены, которые связаны с "везикулярно-опосредованным транспортом", "иммунным эффекторным процессом" и "экзоцитозом" [72].

Воспаление глазной поверхности является одним из ключевых процессов у пациентов с ССГ, поэтому не удивительно выявление воспалительных белков как потенциальных маркеров ССГ [73]. Среди них выделяют белки с повышенным содержанием в СЖ α -1-гликопротеина, S100A8, S100A9, S100A4, а также со сниженным содержанием лактоферрина, липокалина 1 и лизоцима [74]. Белок α -1-гликопротеин способствует противовоспалительным реакциям, тогда как белки S100A8 и S100A9 являются провоспалительными белками и обычно обнаруживаются в области воспаления [75]. Лактоферрин, липокалин 1 и лизоцим являются мажорными белками СЖ, которые защищают от патогенов. Снижение экспрессии этих белков может объяснить, почему пациенты с ССГ склонны к инфекционным заболеваниям глазной поверхности. Примечательно, что липокалин способствует формированию и поддержанию компактного и однородного липидного слоя слёзной пленки [76]. Следовательно, снижение уровня липокалинов может привести к нестабильности липидного слоя, а также к увеличению скорости испарения СЖ. Уровни S100A8 и S100A9 связаны со степенью дисфункции мейбомиевой железы и с симптомами покраснения глаз, нечеткого зрения у пациентов с ССГ [77]. Сдвиг окислительно-восстановительного баланса и воспалительная реакция могут запускать увеличение синтеза белков S100A8 и S100A9 [78]. Сообщалось о значительном повышении уровня альбумина и снижении уровней липокалина-1 и липофилина А при ССГ, вызванным укоренным испарением слёзной пленки [79].

В другом исследовании сообщалось о выраженной экспрессии богатого пролином белка 4, лакритина, альдегиддегидрогеназы 3A1, фосфатидилэтаноламинсвязывающего белка 1 и серотрансферрина [80]. Повышенная экспрессия богатого пролином белка 4 при ССГ может указывать на нарушение неврологического процесса слёзной железы.

Снижение экспрессии лакритина может объяснять снижение секреции СЖ у пациентов с ССГ [81]. Белок альдегиддегидрогеназа 3A1 защищает эпителиальные клетки роговицы от окислительного стресса, вызванного ультрафиолетом и 4-HNE на поверхности роговицы [82]. Повышенная экспрессия белка серотрансферрина была выявлена только при ССГ с дефицитом СЖ [80]. Используя протеомный анализ, было обнаружено возрастание содержания в СЖ у пациентов с ССГ убиквитин-протеиновой лигазы E3, копина-1, а также фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α) и интерлейкина-6 (ИЛ-6) [83].

У пациентов с ССГ также было обнаружено в СЖ высокие показатели тиоредоксина, иммуноглобулина γ -1, мембраносвязанной фосфолипазы A2, альфа-1-антитрипсина. Помимо этого, был снижен уровень лактопероксидазы, которая катализирует окисление различных соединений перекисью водорода, при ССГ [84]. Следовательно, эти белки могут служить биомаркерами этого заболевания в дополнение к принятой матриксной металлопротеиназе-9 (ММП-9), которая уже используется в диагностике [85].

ММП-9 — это цинк- и кальций-зависимый фермент, который играет важную роль в ремоделировании тканей в физиологических условиях, таких как заживление ран и развитие костей. Также известно, что ММП-9 играет патогенную роль при воспалительных заболеваниях, таких как сердечно-сосудистые патологии, артрит, некоторые онкологические заболевания, ССГ [86].

Активность ММП-9 регулируется эпигенетическими процессами, межклеточными взаимодействиями и путями, опосредованными цитокинами. Было доказано, что гиперосмолярность СЖ на поверхности роговицы, наблюдаемая при ССГ, запускает сигнальный каскад стресс-активированной протеинкиназы. Сигнальный каскад протеинкиназы приводит к высвобождению ММП-9 из клеток эпителия роговицы, тем самым запуская цикл воспалительного процесса [87, 88]. Белки межклеточных контактов окклюдин и белок плотных контактов-1 расщепляются под действием ММП-9, что приводит к нарушению барьерной функции эпителия роговицы и, как следствие, к разрушению ее эпителиальных слоев [89].

Таким образом, протеомные исследования показали, что ССГ сопровождается изменением содержания в СЖ белков, принимающих участие в регуляции воспаления и окислительно-восстановительного баланса, что указывает на возможное участие окислительного стресса в развитии патологических изменений на глазной поверхности.

1.4. Окислительный стресс на глазной поверхности при ССГ (клинические исследования)

В офтальмологии установленным фактором предрасположенности женщин к заболеванию ССГ в менопаузе является ОС, и во многом изучение гендерной предрасположенности послужило отправной точкой в понимании его роли в патогенезе ССГ [90]. Было показано, что пероксидазная активность в СЖ может регулироваться эстрогеном из сыворотки крови и снижается на фоне приема оральных контрацептивов, что может привести к ослаблению антиоксидантной защиты глаза [91]. Еще одно исследование показало, что активность пероксидазы в СЖ молодых мужчин и женщин не отличается. При этом как у мужчин, так и у женщин наблюдалось возрастное снижение активности пероксидазы, но у мужчин это изменение происходит медленнее. Поэтому уже в среднем возрасте пероксидазная активность в СЖ у мужчин выше, чем у женщин [92].

Синдром Шегрена является системным аутоиммунным заболеванием, которое вызывает развитие ССГ из-за воспаления экзокринных желез, особенно слёзных и слюнных желез. Выявление в сыворотке крови аутоантител к антигенам Ro (SS-A) и La (SS-B) являются ключевыми диагностическими маркерами синдрома Шегрена [93]. Было показано, что белок SS-A/Ro52 может выполнять функции сигнальной молекулы. Этот белок транслоцируется из цитоплазмы в ядро в ответ на избыточную внутриклеточную концентрацию перекиси водорода и активирует MAP-киназный каскад [94]. В биологических жидкостях у пациентов с синдромом Шегрена обнаруживается повышенное содержание маркеров ОС, таких как 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин и гексаноил-лизин [95]. Эти наблюдения были позднее подтверждены и дополнены информацией, что в то же время происходит повышение уровня антиоксиданта тиоредоксина по сравнению с контрольной группой [96]. Содержание маркеров окислительного стресса у пациентов с ССГ коррелировало с различными клиническими параметрами, такими как время разрыва слёзной пленки, слёзопродукция, чувствительность роговицы, плотность бокаловидных клеток конъюнктивы [97].

С помощью иммуногистохимического анализа было показано, что эпителиальные клетки конъюнктивы у пациентов с ССГ экспрессируют меньшее количество супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы и каталазы по сравнению с образцами эпителия здоровых пациентов [98]. Повышенный уровень маркера ПОЛ

липидов 4-HNE были идентифицированы в эпителии конъюнктивы. Он коррелировал с тяжестью клинических проявлений на глазной поверхности и с количеством воспалительных клеток [99].

Таким образом, описанные результаты указывают на то, что маркеры окислительного стресса присутствуют в СЖ и на глазной поверхности у пациентов с ССГ. А также ОС может вносить существенный вклад в механизмы развития клинических симптомов изучаемого заболевания у людей.

В следующем разделе будут рассмотрены современные представления о потенциальной роли окислительного стресса при ССГ, которые были получены в экспериментах на лабораторных животных. Такого рода исследования позволили получить важную информацию не только для понимания молекулярных механизмов развития ССГ у людей, но с помощью них удалось сделать целый ряд важных шагов для разработки терапевтических подходов лечения ССГ.

1.5. Экспериментальные модели ССГ на лабораторных животных

Экспериментальные модели заболеваний на животных помогают приблизиться к более глубокому пониманию их патогенеза и являются первичной основой для поиска и разработки методов лечения патологий. Не является исключением и ССГ, который как упомянуто выше, является многофакторным заболеванием и до сих пор в научных и медицинских кругах нет однозначного определения этого заболевания. Но при всех разногласиях достигнуто общее убеждение, что причиной ССГ является нарушение гомеостаза глазной поверхности, целостность которой обеспечивает оптическую прозрачность роговицы, оптимальный состав СЖ для защиты глазной поверхности от травматических повреждений, высыхания, инфекций и воспаления.

Общая оценка анатомических и функциональных структур глазной поверхности способствует нашему пониманию патогенеза ССГ. Накопленные знания о глазной поверхности заложили основы для классификации патофизиологии ССГ на водно-дефицитный, испарительный и смешанный типы. Эта классификация позволяет создать систему для оценки экспериментальных моделей ССГ на животных, которые уже были ранее разработаны (табл. 1). Как видно из таблицы, в настоящее время ни одна модель на животных не может заключить в себе все особенности ССГ человека.

Сразу следует признать, что ожидать разработки модели ССГ, включающей все факторы заболевания, неосуществимо. Основываясь на полученных к настоящему

времени фундаментальных представлениях о многофакторности ССГ и попытках моделирования этого заболевания при планировании дальнейших исследований необходимо опираться на три признанных факта: во-первых, не существует идеальной экспериментальной модели; во-вторых, каждая из доступных моделей отражает конкретные аспекты ССГ, отражая заметную гетерогенность этого заболевания; в-третьих, существующие модели, какими бы ограниченными они ни были, уже внесли большой вклад в понимание и позволили начать поиск подходов для лечения ССГ. Действительно, шаг за шагом удастся воспроизвести отдельные «элементы» заболевания, что может в перспективе позволить объединять различные подходы в одной модели, которая будет наиболее близка к патофизиологии ССГ у человека.

Таблица 1 – Экспериментальные модели ССГ на животных

Тип модели	Дефицит слезы	Повышенное испарение слезы	Смешанный
А, на мышах			
MRL/lpr мышь	Да	НЕТ	НЕТ
NOD – мыши	ДА	НЕТ	НЕТ
Иссечение слёзной железы	ДА	НЕТ	НЕТ
Изменение условий окружающей среды	НЕТ	ДА	НЕТ
Б, на крысах			
Применение скополамина	ДА	НЕТ	НЕТ
В, на кроликах			
Применение атропина	ДА	НЕТ	НЕТ
Использование бензалкония хлорида	ДА	НЕТ	НЕТ
Дакриоаденэктомия	ДА	НЕТ	НЕТ
Конканавалин А	ДА	НЕТ	НЕТ
Закрытие протоков мейбомиевой железы	НЕТ	ДА	НЕТ

Выбор экспериментальных животных является ключевым для моделирования ССГ, поскольку существуют заметные различия в анатомических, биохимических,

физиологических и морфологических характеристиках глазной поверхности между обезьяной, собакой, кроликом, крысой, кошкой, мышью и людьми. Два основных фактора определяют выбор животных – это размер глаза и биохимический состав СЖ. При этом именно размер глаза является основным фактором и чем ближе по размеру глаз экспериментального животного к человеческому глазу, тем полезнее будет эта модель. Это во многом связано с тем, что глаза мышей, крыс и морских свинок (наиболее распространенных лабораторных животных) достаточно сложно препарировать и получение тканей глаза и СЖ в достаточных количествах для исследований затруднительно. В некоторых случаях размер тканей глаза настолько мал, что может потребоваться аналитические методы высокой чувствительности и для проведения биохимических исследований приходится объединять биоматериал от нескольких экспериментальных животных одной группы. Поэтому в этой части обзора будет уделено основное внимание и предпринята попытка дать оценку существующим экспериментальным моделям ССГ у кроликов, глаза которых близки по размерам к человеческим. Кролик является основным объектом исследований при изучении механизмов развития ССГ и отработки перспективных подходов для профилактики и лечения этого заболевания не смотря на ряд анатомических и биохимических отличий глаза человека [100].

В настоящее время в литературе представлена информация о нескольких экспериментальных моделях ССГ у кроликов. При разработке большинства из них ставилась задача инициировать развитие признаков ССГ путем снижения слёзопродукции у экспериментальных животных. Один из подходов, который был использован для решения этой задачи заключался в частичном или полном хирургическом иссечении слёзной железы с одновременным удалением мембранной перепонки (третьего века) и гардировой железы или без нее [101]. Другой подход заключается в закрытии выводных протоков слёзной железы с помощью термического повреждения [102]. Для моделирования ССГ также нашли широкое применение фармакологические вещества, такие как бензалкония хлорид и 1% атропин, которые вызывают снижение слёзопродукции у кроликов [103, 104]. В последующем были предприняты попытки создания моделей разными способами, приводящими к нарушению слёзопродукции слёзной железы: радиационное облучение слёзной железы, инъекции аутологичных лимфоцитов, введение митогена конканавалина А, инъекции ботулинического токсина

типа А или денервация слезной железы [105-109]. Развитие признаков ССГ при повышенном испарении слезы происходит при дефиците или дисфункции мейбомиевых желез, в результате чего снижается доля липидов в слёзной пленке. Моделирование быстрого испарения СЖ достигается с помощью закрытия выводных протоков мейбомиевых желез путем прижигания [110]. Далее рассмотрим подробнее условия моделирования ССГ у лабораторных животных.

1.5.1. Модели с дефицитом слёзопродукции

1) Модель абляции слёзной железы

Для создания модели ССГ проводилось хирургическое иссечение слёзных и гардеровой желез, а также удаление третьего века. Так как водная составляющая слёзной пленки млекопитающих образуется в результате активности основной и вспомогательной слёзных желез, их удаление уменьшает скорость слёзопродукции. Однако, эффект оказался кратковременным и вызванные операционным вмешательством симптомы ССГ постепенно исчезали без каких-либо терапевтических воздействий [101, 111]. Для получения устойчивой клинической картины ССГ другими авторами в дополнение к вышеописанным хирургическим процедурам осуществлялось прижигание бульбарной конъюнктивы 50%-ым раствором трихлоруксусной кислоты [112]. Также была предпринята попытка создания модели ССГ с помощью закрытия выводного протока слёзной железы при удаленных гардеровой железы и третьего века [102]. Определение стабильности слёзной пленки и скорости слёзопродукции, окрашивание роговицы флуоресцеином и бенгальским розовым у кроликов после вышеперечисленных процедур показали, что у животных развивается хронический слёзодефицитный ССГ, близкий по клиническим и гистологическим характеристикам к заболеванию у людей.

2) Применение бензалкония хлорида

Инстилляции бензалкония хлорида в конъюнктивальный мешок в течении нескольких недель приводит к развитию симптомов ССГ у кроликов [103, 113]. В частности, у экспериментальных кроликов наблюдается повреждение роговицы и конъюнктивы, снижение базальной секреции СЖ, потеря бокаловидных клеток и дефицит муцина (MUC5AC) [113]. Данная модель хорошо воспроизводится и используется для изучения биохимических аспектов развития ССГ.

3) Атропин-индуцированная модель

Раствор атропина в виде глазных капель широко используется в офтальмологической практике для расширения зрачка и достижения паралича аккомодации с целью определения истинной рефракции глаза и исследования глазного дна, а также при воспалительных заболеваниях глаз создание функционального покоя. Однако оказалось, что продолжительное применение этого препарата может приводить к снижению слёзопродукции. Так, инстилляцией 1% раствора сульфата атропина три раза в день в течение пяти дней вызывает характерные для ССГ клинические признаки, включая снижение слёзопродукции и повреждение эпителия роговицы. Модель ССГ с использованием атропина сульфата оказалась полезной для оценки фармакологической эффективности заменителей СЖ или глазных препаратов [104]. Однако основным недостатком данной модели является непостоянная воспроизводимость.

4) Модель аутоиммунного дакриoadенита при инъекции лимфоцитов

Эта модель ССГ у кролика напоминает синдром Шегрена, была разработана путем совместного культивирования аутологичных лимфоцитов периферической крови с очищенными эпителиальными клетками слёзной железы кролика и введения активированных лимфоцитов в слёзную железу. Развивающийся после этого дакриoadенит приводит к снижению слёзопродукции и стабильности слёзной пленки, а также к повреждению поверхности роговицы [106].

5) Конканавалин А – индуцированная модель

Было показано, что однократная инъекция Т-клеточного митогена конканавалина А в слёзную железу приводит к образованию инфильтрата, который вызывает тяжелое и широко распространенное разрушение ткани. Последующее нарушение выработки СЖ приводит к местному воспалению глазной поверхности и проявлению клинических признаков характерных для ССГ с дефицитом влаги. Однако данная модель недостаточно воспроизводимая и требует усовершенствования [107]

1.5.2. Модели с повышенным испарением слезы

Мейбомиевые железы обеспечивают поступление на глазную поверхность основной части липидов, которые образуют липидный слой слёзной пленки. Таким образом, нарушение липидного слоя слезы способствует ускоренному испарению водной компоненты слёзной пленки, что и является ключевым событием для развития иссушающего стресса при ССГ. На основании этого предположения была разработана экспериментальная модель ССГ у кроликов путем нарушения протоков мейбомиевых

желез. С этой целью авторы работы осуществили прижигание протоков мейбомиевых желез. Результатом стало незначительное повышение осмолярности СЖ, снижение бокаловидных клеток конъюнктивы, а также уменьшение увлажненности роговицы [110].

Недавно была разработана альтернативная экспериментальная модель, позволяющая снизить секреторную активность мейбомиевых желез путем введения в края верхнего века инактивированные микобактерии туберкулеза штамма H37Ra в суспензии с полным адъювантом Фрейда. Суспензии микобактерий вводились в носовую, центральную и височную части верхнего века, что приводило к воспалению век и дисфункции мейбомиевых желез через две недели. [114]

В литературе также имеется информация и о других попытках создания экспериментальных моделей ССГ у кроликов с дисфункцией мейбомиевой железы. Например, системное введение 13-цис-ретиноевой кислоты или местное применение адреналина приводило гиперкератинизации эпителия протоков мейбомиевых желез [115, 116].

Подводя итог этой части «Обзора литературы», можно заключить, что кролик, по-видимому, является одним из наиболее привлекательных лабораторных животных для изучения ССГ. Это дает возможность изучить множественные патофизиологические механизмы дефицита слёзопродукции при ССГ разными способами: фармакологическое вмешательство, иммунное повреждение или полное иссечение слёзных желез. Кроме того, повышенное испарение слезы может быть изучено, вероятно, лучше, чем у любого другого животного.

Однако, имеются и свои недостатки. Основным недостатком кроликов является ограничения для обнаружения белков на поверхности глаза ввиду отсутствия специфических антител на многие белки кроликов. Кроме того, применимость транскриптомных методов также ограничена, поскольку около трети генома кролика еще не исследовано. В этом контексте мышинные и крысиные модели могут компенсировать эти недостатки, особенно когда требуется использование генетически модифицированных моделей, которые могут помочь оценить роль конкретных белков в патогенезе ССГ.

Среди этиологического многообразия ССГ выделяют экспозиционную кератопатию (повреждение роговицы), которая развивается при неполном смыкании век и/или нарушении частоты моргания и проявляется в основном при длительном

воздействии внешней среды на глазную поверхность [117]. Мигательный рефлекс способствует образованию и равномерному распределению слёзной пленки по поверхности роговицы, а также умеренному испарению водной части СЖ с глазной поверхности. Экспозиционную кератопатию можно разделить на нейротрофическую, нейропаралитическую и ятрогенную. Нейротрофический тип встречается при параличе черепного нерва, аневризме, нарушении мозгового кровообращения, рассеянном склерозе и некоторых вирусных заболеваниях [118, 119]. Нейропаралитический тип наблюдается при лагофтальме в результате паралича лицевого нерва и опосредованно при экзофтальме [120]. Ятрогенная экспозиционная кератопатия часто проявляется у пациентов в условиях общей анестезии и при местной анестезии во время хирургических операций на глазах [121, 122]. Так, осложнениями после эксимерлазерной рефракционной хирургии роговицы могут быть хемоз конъюнктивы, эрозии роговицы, плавление роговицы, инфекционный кератит и даже перфорация роговицы [123]. Но наиболее распространенное осложнение после лазерной рефракционной хирургии роговицы и одна из основных причин недовольства пациентов является ССГ. Так как даже легкая форма ССГ может существенно повлиять на качество жизни пациента, приводя к снижению трудоспособности [124, 125].

Как уже было сказано в разделе 1, в последние десятилетия был выявлен еще один фактор развития ССГ – это использование цифровых экранов (мобильные телефоны, гаджеты, компьютеры и т.д.), что в настоящее время является частью повседневной жизни большинства населения и особенно людей молодого возраста. Вероятным объяснением взаимосвязи между использованием цифровых экранов с развитием заболевания является снижение частоты и увеличение неполных морганий у пользователей этих устройств [126, 127]. При этом происходит избыточное испарение водной составляющей СЖ, а неполное моргание не обеспечивает правильного формирования и равномерного распределения слёзной пленки [128]. Таким образом, редкое и неполное моргание приводит к сухости глазной поверхности, поскольку происходит быстрое испарение СЖ, которое как предполагается со временем может инициировать ССГ [129].

В настоящее время в распоряжении исследователей имеется достаточно широкий набор экспериментальных моделей, позволяющих получить у животных клинические признаки ССГ. В основе разработанных экспериментальных моделей лежали попытки достигнуть иссушающего стресса посредством снижения слёзопродукции или в условиях

длительного (несколько недель) содержания с контролем влажности и температуры окружающей среды без блокирования мигательного рефлекса экспериментальных животных. Признано, что ни одна из разработанных экспериментальных моделей по своей сути не эмитирует условия, с которыми приходится иметь дело пациентам с нарушением мигательного рефлекса. По этой причине создание новой экспериментальной модели, при которой нарушаются паттерны мигательного рефлекса, и глазная поверхность в течение короткого времени подвергается воздействию кислорода воздуха, признано особо актуальным как для проведения фундаментальных исследований, так и для поиска подходов к терапии этой разновидности ССГ.

1.6. Развитие окислительного стресса при моделировании ССГ *in vitro* и *in vivo*

Окислительный стресс возникает в результате неконтролируемого образования АФК под воздействием многочисленных экзогенных и эндогенных факторов. В случае органа зрения к таким экзогенным факторам относят влияние света (особенно его УФ-спектра), бактериальные и вирусные инфекции, химические и физические повреждения; среди прочего выделяют эндогенные факторы, ключевым из которых является электрон-транспортная цепь митохондрий [130].

К основным АФК относят супероксид анион ($O_2^{\bullet-}$), перекись водорода (H_2O_2) и гидроксильные радикалы (например, $HO^{\bullet}$). Эти кислородсодержащие химические соединения образуются как естественные продукты метаболизма кислорода в физиологических условиях и играют важную роль в клеточной сигнализации и гомеостазе организма [131]. Дисбаланс образования АФК и антиоксидантов глаза вызывает ОС, который может в свою очередь приобретать хронический процесс вследствие нарушения метаболизма клеток тканей глаза, что приводит к повреждению и гибели клеток органа зрения, способствуя развитию ряда офтальмологических заболеваний [132].

В аэробных клетках живых организмов АФК образуются в ходе естественных биологических процессов, причем большая их часть имеет эндогенное происхождение. В настоящее время можно выделить девять основных путей образования АФК: 1) электрон-транспортная цепь митохондрий; 2) метаболизм цитохрома P-450; 3) аутоокисление катехоламинов; 4) окисление восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФН) оксидазой НАДФН; 5) метаболизм арахидоновой кислоты при участии циклооксигеназ и липоксигеназ; 6) окисление ксантина или гипоксантина

ксантиноксидазой; 7) восстановление молекулярного кислорода изоформами NO-синтазы (NOS) (nNOS или eNOS) при дефиците аргинина или тетрагидробиоптерина; 8) метаболизм пероксисом и 9) окисление переходных тяжелых металлов (Cu^+ и Fe^{2+}) [132].

Экзогенные источники АФК включают физические факторы (солнечный свет, ионизирующее излучение и гамма-облучение), постоянное воздействие химических веществ окружающей среды (сигаретный дым, ксенобиотики, ароматические амины, озон и хлорорганические соединения) и патогены [133]. Основным же экзогенным источником образования АФК в глазу является ультрафиолетовое излучение. Одной из возможных причин образования АФК является активация молекул хромофоров, таких как флавины, порфирин, триптофан и меланин, в процессе фотохимических реакций. Химически эти реакции включают электронное возбуждение хромофора до синглетного состояния с последующим преобразованием в долгосрочное триплетное состояние. Затем молекула взаимодействует с молекулой кислорода с образованием супероксид аниона, возвращаясь затем в свое основное состояние. Ультрафиолетовое воздействие также может генерировать супероксид анион через реакцию переноса электронов [134].

В ходе эволюции в тканях глаза была сформирована сложная и многоуровневая система антиоксидантной защиты, которая позволяет осуществлять контроль над образованием АФК и поддерживать их физиологический уровень для поддержания гомеостаза [135]. При этом системы антиоксидантной защиты отличаются в разных отделах глаза, что в определенной мере отражает структурно-функциональные особенности и учитывает природу источников образования АФК в различных тканях зрительного анализатора. Среди компонентов антиоксидантной защиты выделяют группы низкомолекулярных антиоксидантов и белков антиоксидантной защиты. Наличие первых во многом определяется поступлением этих антиоксидантов и их предшественников извне в организм. Присутствие же белков, принимающих участие в антиоксидантной защите органов и тканей организма находится под контролем внутриклеточной регуляции.

Указания на возможное участие окислительного стресса в развитии ССГ были получены *in vitro* и на экспериментальных моделях ССГ на животных. Гиперосмолярность слёзной пленки вызывает повреждение поверхностного эпителия путем активации каскада воспалительных событий на глазной поверхности и высвобождения медиаторов воспаления в СЖ. В гиперосмолярной культуральной среде

наблюдается индуцирование окислительного стресса в культивируемых первичных эпителиальных клетках роговицы человека. В этих экспериментах наблюдалось увеличение продукции АФК и изменение уровней оксигеназы и антиоксидантных ферментов, что приводило к повреждению митохондриальной ДНК, а также окислительному повреждению мембран с образованием продуктов перекисного окисления липидов [136]. Хлорид бензалкония (катионное поверхностно-активное вещество) обычно используемый в качестве консерванта в глазных каплях, способен вызывать окислительное повреждение липидного слоя слёзной пленки. Было обнаружено, что гиперосмолярность потенцирует токсические эффекты хлорида бензалкония в культивируемых эпителиальных клетках конъюнктивы [137].

Несколько исследований на мышах и крысах также указывают на связь между окислительным стрессом и ССГ. У мышей с нокаутом супероксиддисмутазы-1 нарушается антиоксидантная защита, которая проявляется в фиброзе, инфильтрации CD4⁺ Т-клетками, моноцитами и нейтрофилами в слёзной железе. У этих мышей также снижалась слёзопродукция, повышался уровень общего белка в СЖ и наблюдалась дисфункция мейбомиевых желёз [138, 139]. В другой трансгенной модели у мыши *tet-mev-1* было обнаружено, что окислительное повреждение митохондрий в слёзной железе приводит к ее дисфункции, уменьшая выработку слез и увеличивая образование АФК, что приводит к ССГ. Ген *mev-1* кодирует Cyt-1, большую субъединицу цитохрома сукцинат-убихиноноксидоредуктазы в комплексе II электрон-транспортной цепи митохондрий. Ген *mev-1* индуцировал окислительный стресс, связанный с повреждением эпителия глазной поверхности и снижением секреции водных компонентов СЖ [140]. Также в исследованиях на мышах с экспериментальным диабетом наблюдается связь между окислительным стрессом и ССГ. По мере прогрессирования ССГ при экспериментальном диабете экспрессия SIRT1 сначала повышается, а затем снижается. Эти интересные изменения указывают на роль SIRT1 в борьбе с окислительным стрессом. SIRT1 - это ген, который кодирует белок сиртуин 1. Этот белок относится к семейству NAD⁺-зависимых деацетилаз класса III. Он играет ключевую роль в регуляции множества биологических процессов: от старения и метаболизма до воспаления и нейропротекции [141]. Когда ССГ индуцировался инъекцией гидробромида скополамина мышам линии C57BL/6 это приводило к снижению производства СЖ, нарушению ее окислительно-восстановительного статуса, на фоне этого увеличивалась площадь повреждения

роговицы, что позволяет предположить, что выявленные признаки ССГ действительно связаны с ОС [142].

Исследования показали, что некоторые вещества способны снижать уровень АФК и предотвращать развитие или уменьшать признаки ССГ. В культивируемых клетках эпителия роговицы в условиях окислительного стресса, индуцированного перекисью водорода, инкубация с лактоферрином и ксантановой камедью позволила защитить клетки от воздействия АФК [143, 144]. Также на эпителиальных клетках было показано, что в условиях окислительного стресса, вызванного хлоридом бензалкония, гиалуроновая кислота оказывала цитопротекторное действие [145]. L-карнитин способен снижать окислительный стресс, вызванный гиперосмолярностью в культивируемых клетках. Этот эффект выражался в снижении уровня маркеров окислительного стресса, медиаторов воспаления и восстановлении содержания антиоксидантных ферментов [146].

Таким образом, различные факторы могут инициировать увеличение продукции АФК в СЖ и на глазной поверхности. В настоящее время формируется концепция замкнутого круга развития ССГ, которая учитывает факторы и механизмы развития этого заболевания. Рост уровня АФК и последующее развитие окислительного стресса могут играть важную роль в этом процессе. Мы предполагаем, что именно снижение уровня АФК в будущем может стать новым важным принципом в терапии ССГ (рис. 3).

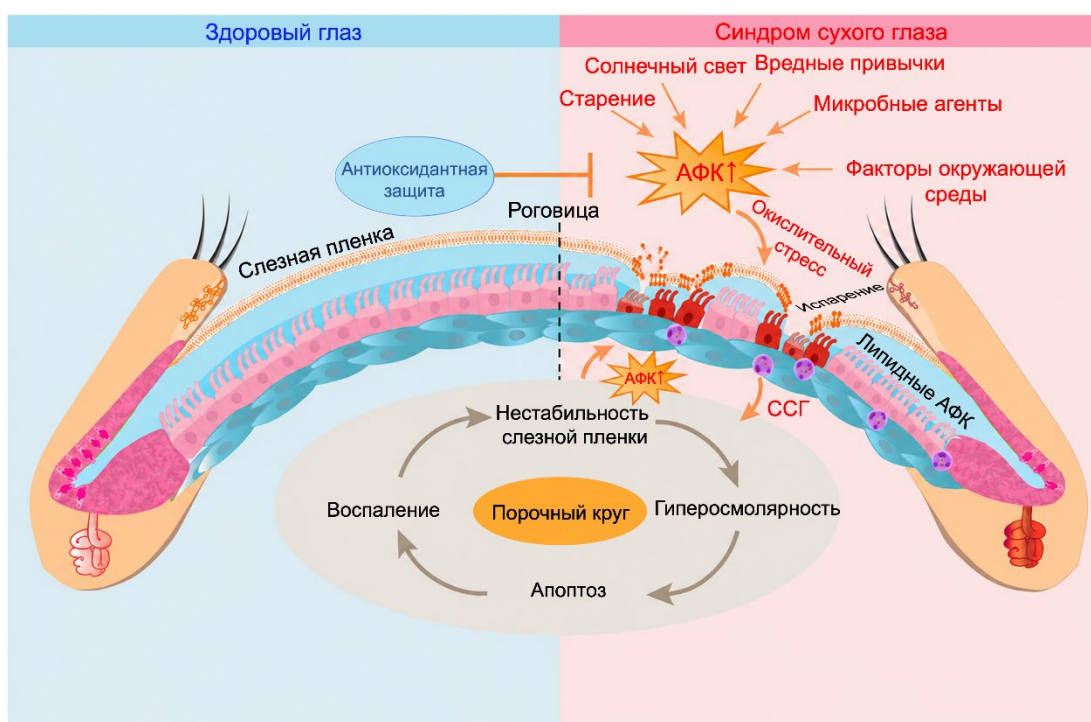


Рисунок 3 – Роль АФК в развитии замкнутого круга при ССГ (адаптирован [147])

Важно отметить, что роль окислительного стресса как патогенетического фактора ССГ и механизмы, обуславливающие повреждение роговицы, остаются малоизученными. Также остается неясным, насколько развитие заболевания ассоциировано с дефицитом антиоксидантной защиты роговицы, а также каковы мишени и медиаторы окислительного стресса. Предполагается, что такими мишенями может быть целый ряд белков, включая компоненты электрон-транспортной цепи митохондрий, металлопротеиназы, а также ферменты, регулирующие гомеостаз сигнальных липидов слезы. Ответы на эти вопросы необходимы для разработки терапии ССГ, вызванного нарушением мигательного рефлекса.

1.7. Компоненты антиоксидантной защиты слёзной жидкости

В физиологических условиях происходит постоянное производство активных форм кислорода в различных реакциях, позволяющих поддерживать гомеостаз анатомических структур глаза. За нейтрализацию активных форм кислорода отвечают антиоксиданты ферментативного и неферментативного происхождения. Механизм действия антиоксидантов разнообразен. Они могут перехватывать промежуточные продукты активных форм кислорода или уменьшать их локальную концентрацию, удаляя прооксидантные ионы металлов, захватывая реактивные виды кислорода, такие как супероксидный анион-радикал или перекись водорода, нейтрализуя иницирующие цепь радикалы, такие как гидроксильные $\text{OH}\cdot$, алкоксильные $\text{RO}\cdot$ или пероксильные $\text{ROO}\cdot$, разрывая цепь радикальной последовательности, а также могут восстанавливать окисленную форму другого антиоксиданта. Некоторые из антиоксидантов, такие как глутатион, N-ацетилцистеин, α -липоевая кислота, коэнзим Q10 и ферментные антиоксиданты, вырабатываются организмом эндогенно. Другие вещества, такие как полифенолы и каротиноиды растительного происхождения, витамины группы В, С и Е, цинк и селен, а также омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, должны поступать в организм с пищей и считаются незаменимыми питательными веществами [148]. Когда нарушается равновесие между выработкой активных форм кислорода и их нейтрализацией, образование радикалов превышает возможности эндогенного антиоксидантного запаса, что приводит к нарушениям структур глаза и снижению зрительной функции, связанным с окислительным стрессом.

За поддержание окислительно-восстановительного баланса в СЖ на глазной поверхности отвечает ряд компонентов антиоксидантной защиты. В СЖ человека были обнаружены различные низкомолекулярные антиоксиданты, среди которых наиболее распространенными являются аскорбиновая кислота (665 мкМ) и мочева кислота (328 мкМ). Аскорбиновая кислота (АК) нейтрализует гидроксильные, алкоксильные и супероксидные радикалы-анионы в биологических средах, также оказывает синергетический эффект с токоферолом при удалении перекисных радикалов липидов. Мочевая кислота (МК) является эффективным нейтрализатором синглетного кислорода, пероксильных и гидроксильных радикалов и защищает мембрану от перекисного окисления липидов. На эти два соединения в СЖ человека приходится около 50% АОА; остальные ~50% приходятся на другие молекулы, в том числе глутатион (107 мкМ), L-цистеин (48 мкМ) и L-тирозин (45 мкМ). Глутатион, признанный антиоксидант и цитопротектор, может нейтрализовать перекись водорода, гидроксильный анион и хлор-окислители, участвует в восстановлении других антиоксидантов. L-цистеин способен связывать тяжелые металлы благодаря наличию в его структуре тиольной группы, может захватывать АФК, такие как супероксид и гидроксильные радикалы. L-тирозин благодаря фенольной группы в его структуре способен нейтрализовать АФК, участвует в синтезе коэнзима Q10 [148, 149]. В СЖ также были обнаружены цинк и селен [150]. На момент начала нашей работы не было информации о низкомолекулярном антиоксидантном составе слёзной жидкости кроликов в физиологических условиях, были только данные по АОА в исследуемой жидкости [151].

Кроме низкомолекулярных компонентов, антиоксидантная защита глазной поверхности обеспечивается такими белками, как лактоферрин и белки семейства S100A [77]. К ферментативным антиоксидантам первой линии защиты относятся СОД, каталаза и глутатионпероксидаза. СОД превращает супероксидный радикал в перекись водорода, каталаза и глутатионпероксидаза нейтрализуют перекись водорода. Ко второй линии защиты относят альдегид дегидрогеназу, глутатионредуктазу и глутатионсинтетазу, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, пероксиредоксин, тиоредоксинредуктаза и другие [148]. Информация, касающаяся содержания ферментативных антиоксидантов в СЖ человека, неоднозначна. Однако единственным доказанным ферментом, обладающим антиоксидантной активностью в слёзной жидкости, является супероксиддисмутаза [152]. Активность каталазы и семейства глутатионпероксидазы в СЖ зависит от методических

подходов отбора, поэтому их роль в СЖ остается дискуссионным вопросом. На момент начала настоящей работы состав ферментативных антиоксидантов в СЖ кроликов также не был описан в литературе.

Исследование показало, что у пациентов с ССГ уровень лактоферрина в СЖ ниже, а уровень альбумина выше по сравнению со здоровыми людьми. Также было выявлено снижение количества белков, обладающих липидсвязывающими свойствами, и увеличение количества белков, связанных с воспалительными процессами [153]. Дефицит антиоксидантных ферментов может привести к значительному повреждению глаз, связанному с окислительным стрессом [154]. У мышей с нокаутированным геном СОД1 наблюдается дисфункция мейбомиевых желез, повышенный уровень 4-HNE и 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина, повреждение эпителия роговицы, а также биохимические и структурные изменения, характерные для митохондриальной дисфункции [139]. Недостаточная антиоксидантная способность может вызвать воспаление, приводящее к структурным нарушениям как мейбомиевых, так и слёзных желез [139]. Таким образом, при нарушении гомеостаза слёзной пленки и снижении антиоксидантов слёзной жидкости глазная поверхность перестает быть защищенной.

1.8. Маркеры и мишени окислительного стресса при ССГ

Маркеры окислительного стресса — это биологические молекулы или показатели, используемые для оценки степени ОС. Данные, полученные от лабораторных исследований и пациентов с ССГ, указывают на то, что нарушение окислительно-восстановительного баланса является важнейшим патологическим фактором при ССГ. Динамика изменений маркеров ОС может служить ориентиром для оценки прогрессирования заболевания [155].

АФК могут инициировать ПОЛ в клеточных мембранах и вызывать накопление продуктов этого процесса - гидропероксидов, что приводит к разрушению мембран и гибели клеток. Повышенный уровень липидных гидропероксидов определяется двумя основными биомаркерами: МДА и 4-HNE. Эти биомаркеры были обнаружены в СЖ и на глазной поверхности у пациентов с ССГ. Повышенная концентрация продуктов ПОЛ, вероятно, может коррелировать с другими параметрами, выявляемыми при диагностике ССГ, такими как время разрыва слёзной пленки и объем СЖ. Кроме того, было обнаружено, что некоторые ферменты класса оксидоредуктаз чрезмерно

экспрессируются при ССГ, такие как миелопероксидаза, синтаза оксида азота и ксантиноксидаза [97].

После ПОЛ, вызванного АФК, происходит ответ на клеточный стресс, который выражается в активации митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) и ядерного фактора «каппа-би» (NF- κ B), которые опосредуют высвобождение воспалительных цитокинов интерлейкинов (ИЛ) 1 α и 1 β , фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α) и ММП-9 [88]. Кроме того, воспалительная реакция в клетках роговицы и конъюнктивы усиливается за счет повышения экспрессии CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками, а также за счет высвобождения провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-6 и ИЛ-8, приводя к повреждению эпителиальных клеток [156].

Избыточное образование АФК нарушает окислительно-восстановительный баланс, приводит к экспрессии различных иммунных и воспалительных молекул, тем самым инициируя воспалительные процессы и влияя на повреждение глазной поверхности. Отдельные классы молекул, которые способствуют воспалительным реакциям и их разрешению при ССГ, могут стать мишенью для перспективной терапии: это ПНЖК омега-3 и омега-6 и их производные оксилипины, представляющие собой липидные медиаторы воспаления. Оксилипины синтезируются из ПНЖК в результате множества окислительных реакций, катализируемых специфическими ферментами (циклооксигеназой (COX), липоксигеназой (LOX) и монооксигеназой цитохрома P450 (CYP)) или протекающих независимо от ферментов в присутствии АФК [157]. Предполагается, что хроническое воспаление при ССГ связано с дисбалансом между омега-3 (докозагексаеновой кислотой (DHA) и эйкозапентаеновой кислотой (EPA)) и омега-6 (арахидоновой кислотой (AA)) полиненасыщенными жирными кислотами, что приводит к гиперпродукции провоспалительных липидных медиаторов (оксилипинов, производных омега-6, таких как простагландины) и недостаточной выработке противовоспалительных молекул (оксилипинов, производных омега-3) [158]. У пациентов с ССГ наблюдалась повышенная экспрессия простагландина (PG) E₂ в СЖ, уровень которого коррелировал с выраженностью симптомов [158, 159]. Хотя подавление COX представляется многообещающим путем в терапии ССГ, хорошо известные ингибиторы циклооксигеназ, нестероидные противовоспалительные препараты, не рекомендуются пациентам с ССГ из-за ряда серьезных побочных эффектов [160]. Таким образом, важно разработать альтернативный подход к селективному ингибированию

ферментативных путей образования оксилипинов, основанный на понимании динамических изменений всего спектра этих липидных медиаторов при ССГ.

Механизмы передачи сигналов, лежащие в основе возникновения и разрешения воспаления на глазной поверхности изучены недостаточно. Тем не менее их можно прояснить с помощью анализа провоспалительных и противовоспалительных сигнальных молекул, присутствующих в СЖ. В отсутствие кровоснабжения СЖ выполняет питательную и защитную функции по отношению к роговице, а также поддерживает иммунный ответ на глазной поверхности. В целом ЕРА и DHA омега-3 ПНЖК, а также их производные оксилипины, гидроксййкозапентаеновые кислоты и гидроксидокозагексаеновые кислоты, считаются противовоспалительными медиаторами. Они подавляют выработку PG, лейкотриенов (LT) и гидроксййкозатетраеновых кислот (HETE) — провоспалительных оксилипинов, образующихся из омега-6 ПНЖК и АА. Кроме того, оксилипины, называемые ййкозаноидами (метаболитами полиненасыщенных жирных кислот с 20 атомами углерода), которые являются воспалительными липидными медиаторами, представляют собой производные линолевой (LA) и α -линоленовой (ALA) кислот. К оксилипинам LA относятся гидропероксиоктадекадиеновые (HpODE) и гидроксййкозатетрадиеновые (HODE) кислоты, а также эпоксиоктадекамоноеновые (EpOME) и дигидроксиоктадекамоноеновые (DiHOME) кислоты. ALA может превращаться в гидропероксиоктадекатриеновые (HpOTrE) и гидроксййкозатетрадиеновые (HOTrE) кислоты, а также в эпоксиоктадекадиеновые (EpODE) и дигидроксиоктадекадиеновые (DiHODE) кислоты (рис. 4) [157].

Было предпринято несколько попыток измерить физиологический и патологический уровни ПНЖК и оксилипинов в СЖ человека [158, 160]. Было установлено, что концентрация АА и ййкозаноидов PGE₂, PGD₂ и 12-HETrE значительно повышается при воспалении глазной поверхности коррелирующие с клинической оценкой [158]. Соответственно, выявление состава оксилипинов в СЖ может позволить диагностировать и контролировать течение заболеваний. До сих пор исследования ограничивались обнаружением в слёзной жидкости ПНЖК или отдельных липидов. Насколько нам известно, масштабный количественный и качественный анализ липидов в СЖ, включая производные АА, LA и ALA, ранее не проводилась.

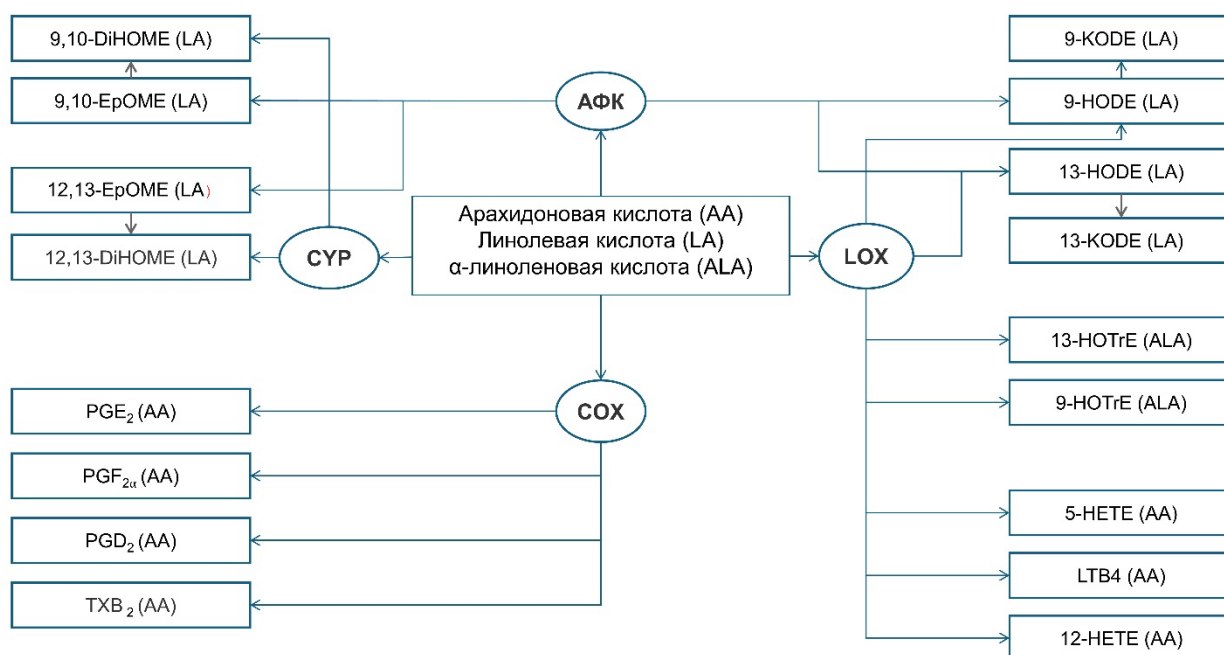


Рисунок 4 – Механизмы биосинтеза липидных медиаторов. Метаболиты AA, LA и ALA делятся на группы, синтезируемые путем действия липоксигеназ, циклооксигеназ, монооксигеназ цитохрома P450 или АФК

В разделе 1.6 обзора литературы были представлены литературные данные, указывающие на возможную роль ОС в митохондриях на развитие ССГ. Митохондрии, являясь основными аэробными метаболическими центрами клеток, обеспечивают энергию и подвержены окислительному стрессу. Известно, что повреждение митохондрий связано с многочисленными патологическими процессами, приводящими к гибели клеток, такими как апоптоз, некроз, некроптоз и ферроптоз [161-164]. Для оценки окислительного повреждения ядерной и митохондриальной ДНК широко используется маркер 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина. Митохондриальные АФК вызывают окисление гуанина в ДНК с образованием 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина [165]. Аконитаза-2 участвует в цикле трикарбоновых кислот, который активируется при повышении митохондриальной активности в условиях окислительного стресса. Этот фермент может являться мишенью окислительного стресса, для защиты митохондриальной ДНК от повреждения [166]. Индукция повышенного уровня экспрессии как аконитазы-2, так и 8-ОНдГ наблюдалась в эпителиальных клетках роговицы в ответ на гиперосмолярность [136].

1.9. Нарушение мигательного рефлекса как новый этиологический фактор развития ССГ

В 2025 г. на международном конгрессе офтальмологов TFOS DEWS III было принято решение о внесении нарушения физиологии и паттернов мигательного рефлекса в перечень этиологических факторов развития ССГ [167]. В заключение обзора литературы нам хотелось бы еще раз остановиться на новизне и актуальности настоящей работы.

Долгое время ССГ рассматривался как сугубо возрастное заболевание с частотой встречаемости от 5 до 30% у людей старше 60 лет. Поэтому моделирование ССГ на животных было направлено на вызывание дефицита выработки слёзной жидкости или ее компонентов, а также их сочетания. Однако современная статистика демонстрирует значительный рост заболеваемости среди лиц в возрасте от 20 до 45 лет с нормальной секрецией слёзной жидкости. Причиной омоложения ССГ является увеличение зрительной нагрузки, связанное с активным использованием электронных устройств визуального отображения. Установлено, что при работе за цифровыми экранами происходит нарушение паттернов мигательного рефлекса, то есть сокращение частоты моргания и неполное смыкание век, что может увеличивать площадь испарения слёзной жидкости с глазной поверхности и препятствовать распределению физиологического уровня липидов из мейбомиевых желез [168]. На момент начала настоящей работы не была разработана экспериментальная модель ССГ, связанная с нарушением мигательного рефлекса, а изучение этого патогенетического фактора критически важно для понимания механизма развития этого типа заболевания.

Распределение слёзной пленки по глазной поверхности происходит благодаря мигательному рефлексу. Моргание обеспечивает отток слёзной жидкости, секрецию и распределение липидов из мейбомиевых желез, формирование и обновление слёзной пленки [169]. Спонтанное моргание играет значимую роль в поддержании стабильности слёзной пленки, что является залогом четкого зрения. Спонтанное моргание — это непроизвольное кратковременное смыкание век, которое происходит при отсутствии явного раздражителя. На частоту моргания влияют такие факторы как активность дофамина, зрительные и/или когнитивные задачи, рефлекторный стимул. Например, пороговые значения, при которых гиперосмолярность СЖ вызывает рефлекторное

моргание, могут варьироваться в зависимости от чувствительности глазной поверхности и площади разрыва слёзной пленки [170].

Среди пользователей электронных устройств визуального отображения преобладают люди, у которых время разрыва слёзной пленки короче интервала между морганиями. У людей старше 40 лет повышен риск нестабильности слёзной пленки. Высокие когнитивные нагрузки, связанные с выполнением задания на чтение, привели к снижению частоты мигательного рефлекса независимо от типа платформы для чтения. Однако только при чтении с цифрового экрана увеличивалось количество неполных морганий, что может быть причиной развития ССГ [171]. Чем сложнее задача, требующая концентрации внимания за цифровым экраном, тем больше человек «забывает» моргать и тем более выраженными становятся симптомы ССГ. Длительная зрительная нагрузка, часто сопровождающееся головными болями, которые могут быть вызваны мышечными спазмами вокруг глазницы, нарушением аккомодации и конвергенции. Это подчеркивает сложную взаимосвязь физиологических факторов, способствующих проявлению симптомов заболевания. При сокращении частоты моргания, слёзная пленка остается стабильной до тех пор, пока почти все моргания являются полноценными. Неполное смыкание век приводит к нестабильности слёзной пленки, особенно при длительном воздействии цифрового экрана [172]. Разрыв слёзной пленки обычно вызывает рефлекторное моргание [173]. Но при использовании электронных устройств визуального отображения подавляется рефлекторное моргание, тем самым увеличивается время, в течение которого поверхность глаза остается незащищенной, подвергаясь воздействию кислорода и испарению [174]. Например, исследователи наблюдали, что средняя частота моргания до начала работы за компьютером составляла 22 моргания в минуту, а во время работы — 7 морганий в минуту [175]. Кроме того, чем больше интервал между морганиями, тем сильнее испаряется слёзная пленка и тем выше гиперосмолярный стресс [129]. Произвольное прищуривание, позволяющее снизить частоту моргания, и более высокие углы обзора еще больше усугубляют ситуацию у тех, кто работает за цифровыми экранами. Стоит отметить, что при работе за электронными устройствами визуального отображения в условиях кондиционирования воздуха и во время отопительного сезона снижается влажность воздуха в помещении, что может являться фактором окружающей среды для развития ССГ, так как приводит к ускоренному испарению СЖ [176]. Однако

точные механизмы, вызывающие развитие ССГ при использовании электронных устройств визуального отображения, до сих пор не изучены.

Исследования показывают, что длительное воздействие синих светодиодов на мышей приводит к апоптозу и окислительному повреждению роговицы [177]. Аналогичные эффекты, такие как снижение жизнеспособности клеток и повышение уровня АФК, наблюдаются в клетках роговицы и конъюнктивы человека в условиях гиперосмолярного стресса [178]. Это может привести к воспалению глазной поверхности, а также выраженному проявлению симптомов ССГ. Кроме того, исследования показывают, что синий свет может негативно влиять на учебную деятельность и когнитивные функции из-за его связи с бессонницей. Синий свет от цифровых устройств, особенно в диапазоне 440–550 нм, подавляет выработку мелатонина, нарушая циркадные ритмы и приводит к трудностям с засыпанием и поддержанием спокойного сна. Однако исследование энергосберегающих ламп, компьютеров и планшетов показало, что в этих устройствах не превышаются допустимые уровни воздействия синего света даже при длительном просмотре [179]. В результате научное сообщество продолжает спорить о влиянии синего света на синдром компьютерного зрения, призывая к дальнейшим исследованиям, чтобы выявить его роль и эффективность в облегчении симптомов.

Мейбомиевы железы, являющиеся основным источником липидного слоя слёзной пленки, выделяют сложную смесь липидов различных классов, которые придают этому слою уникальные свойства, такие как вязкость и поверхностное натяжение. Роговица, часть глазной поверхности, является основной преломляющей поверхностью зрительной системы. Эта прозрачная бессосудистая ткань получает необходимый запас кислорода разными путями [46]. Когда глаза открыты, основным источником кислорода является атмосферный воздух, который переходит из газовой фазы в жидкую через липидный слой слёзной пленки. Этот процесс зависит от диффузии и растворимости липидного слоя, на который влияют физическое состояние и состав. После растворения в водном слое слёзной пленки кислород диффундирует в клетки эпителия и стромы роговицы. Этот способ насыщения кислородом обеспечивает до 70% производства АТФ в эпителии роговицы. В то время как остальная потребность в кислороде удовлетворяется за счёт кровеносных сосудов в веках и конъюнктиве при закрытых глазах [180]. Кислород, поступающий в роговицу из водянистой влаги, в основном потребляется эндотелиальными и стромальными клетками. Скорость потребления кислорода

различается в разных слоях роговицы: самая низкая — у эндотелия (21%), самая высокая — у эпителия (40%) и стромы (39%) от общего количества используемого кислорода [181]. Повышенный уровень кислорода может приводить к избыточному образованию АФК, что вызывает ОС на глазной поверхности [182].

Настоящая работа основывается на предположении, что при нарушении мигательного рефлекса происходит недостаточная секреция липидных компонентов слёзной пленки. В результате происходит ускоренное испарение водного слоя и увеличение времени экспонирования глазной поверхности кислороду воздуха, что может приводить к развитию окислительного стресса. На основании этого мы предполагаем, что ОС может стать новой терапевтической мишенью для лечения ССГ, вызванного нарушением мигательного рефлекса.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы и Реактивы

В работе были использованы следующие реактивы и материалы. Анестезирующий препарат, содержащий 50 мг/мл тилетамина и 50 мг/мл золазепам гидрохлоридов, был изготовлен в Virbac (Карро, Франция). Ксилазина гидрохлорид был от компании «Нита-Фарм» (Саратовская область, Россия). Солевой раствор с фосфатным буфером (PBS) был от Thermo Fisher Scientific (Уолтем, Массачусетс, США), 0,9% изотонический раствор натрия хлорида от ООО "Мосфарм" (Московская область, Россия). Гемоглобин, люминол, раствор пероксида водорода и Trolox (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота), Зилеутон, ДМСО были из Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США). Глазные капли, содержащие SkQ1 (Пластохинонилдецилтрифенилфосфония бромид) от компаний ЗАО "Фрамон" / ООО "НИИ Митоинженерии МГУ" (Россия). Реагенты для гистологического исследования и импрессионной цитометрии были от Бивитрум (Москва, Россия), нитроцеллюлозная бумага от Amersham Biosciences (Великобритания). Набор для анализа бицинхониновой кислоты был от Sigma-Aldrich (США). Наборы для анализа активности глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы были от компании Randox (Крамлин, Великобритания); для определения активности каталазы аммоний молибденовокислый 4-водный от компании Ленреактив (Санкт - Петербург, Россия); набор для определения малонового диальдегида Sigma-Aldrich (США). ИФА наборы для определения СОД1, СОД2, СОД3, ГП1, ГП2, ГП3, ГП4, каталазы от AssayGenie (Дублин, Ирландия). Тестовые полоски Ширмера и флуоресцеиновые полоски были от компании Contacare Ophthalmics and Diagnostics (Вадодара, Гуджарат, США). Набор Стандарты дейтерированных оксилипинов 6-кето PGF1 -d4, TXB2-d4, PGF2 -d4, PGE2-d4, PGD2-d4, LTC4-d5, LTB4-d4, 5 (S)-HETE-d8, 12 (S)-HETE-d8, 15 (S)-HETE-d8, олеоилэтаноламид-d4, EPA-d5, DHA-d5 и AA-d8 были от Cayman Chemical (Анн-Арбор, Мичиган, США). Твердофазная экстракция липидов картридж Oasis® PRIME HLB был получен от Waters (Eschborn, Германия). Реактивы и расходные материалы для электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) и иммуноблоттинга: N,N,N',N'-тетраметил-этилендиамин (ТЕМЕД), додецилсульфат натрия (ДСН), акриламид, N',N'-метилен-бис-акриламид, бромфеноловый синий, Кумасси синий R250, β-меркаптоэтанол Sigma-Aldrich (США), моноклональные антитела

против СОД3 от Thermo Fisher Scientific (США). Наборы для определения концентраций матриксной металлопротеиназы-9 и тканевого ингибитора-1 от AssayGenie (Дублин, Ирландия). Реагенты для зимографии металлопротеиназы-9: желатин, хлорид кальция, хлорид цинка Ленреактив (Санкт - Петербург, Россия), Triton x - 100, Трис от helicon (Москва, Россия). Реагенты для зимографии супероксиддисутазы: Нитросиний-п тетразолий (хлорид), рибофлаин от Диаэм (Москва, Россия). Прочие реагенты и поставщики, использованные в этом исследовании, были из Sigma-Aldrich, Amresco или Serva (Гейдельберг, Германия). Все буферы и другие растворы готовили на бидистиллированной воде.

2.2. Содержание и уход за животными

Эксперименты проводились на кроликах породы «Новозеландская белая» самцах возрастом 4-6 месяцев и массой тела 2,3 – 3,5 кг (Кролинфо, Московская область, Россия). Кролики содержались в индивидуальных клетках (795 × 745 × 1776 мм³) в условиях вивария с 12-часовым световым циклом при температуре 22-25°C и влажностью 45-60% со свободным доступом к пище и воде. Ежедневный мониторинг состояния здоровья всех животных включал осмотр габитуса, кожи, слизистых оболочек, офтальмологическое обследование. С животными обращались в соответствии с 8-м изданием «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» of the National Research Council и «Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research» of The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). Исследования были одобрены комитетом по уходу и использованию животных в НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ (протоколы №1/2016 от 12 января 2016 года, № 001-1/05/2023 от 22 июня 2023 года, № 007-2/03/2024 от 11 марта 2024 года).

2.3. Моделирование синдрома сухого глаза

ССГ индуцировали у животных в течение 6 часов, находящихся в условиях общей анестезии при 30% влажности воздуха и блокировании возможности осуществлять мигательный рефлекс за счет векорасширителей. Общая анестезия достигалась внутримышечным введением анестезирующего препарата, содержащего смесь тилетамина и золепема гидрохлоридов с ксилазином гидрохлорида (в дозе 1,4 мг/кг и 2,1 мг/кг соответственно). В этих условиях происходило увеличение осмолярности слезы, через 6 часов после начала экспозиции глазной поверхности значения изменялись от 296,8±5,0 до 338,5±5,1 мОсм/л. Инстилляций в конъюнктивальный мешок выбранных

препаратов и плацебо проводились по схеме 3 раза в день за день до начала моделирования ССГ и в течение 7 дней после.

Гуманная эвтаназия животных, предназначенных для гистологических исследований и теста с метиленовым синим, проводилась с помощью передозировки анестетика (в условиях общей анестезии). Глазные яблоки животных были энуклеированы посмертно.

2.4. Клиническое исследование

Клиническое обследование животных включало в себя проведение визуального осмотра кроликов и офтальмоскопии. Клиническая картина оценивалась по шкале Дрейза [183]. В частности, исследовались следующие параметры: реакция зрачка на свет, гиперемия и отек конъюнктивы, наличие отделяемого, прозрачность роговицы, гиперемия радужной оболочки, опалесценцию. Кроме этого проводили тесты: Ширмера и флуоресцеиновый. Тест Ширмера используется для определения слёзопродукции и заключается в следующем: целлюлозная полоска помещается в конъюнктивальный мешок нижнего века на 5 минут, затем полоска извлекается, регистрируется длина увлажненной полоски (мм), животное находится при этом в фиксирующей сумке. Процедура повторяется 3 раза, затем высчитывается среднее значение слёзопродукции. Флуоресцеиновый тест - для определения площади повреждения роговицы. На кончик флуоресцеиновой полоски капается 1-2 капля 0,9 % изотонического раствора натрия хлорида, намоченным концом прикасаются к конъюнктиве кролика, совершают мигательный рефлекс, далее с помощью щелевой лампы и синего фильтра отмечают площадь повреждения роговицы в участках свечения флуоресцеина.

2.5. Гистологическое исследование

Гистологический анализ тканей глаза выполняли следующим образом: энуклеация глазного яблока кролика выполнялась посмертно, затем глазное яблоко фиксировали в 10% нейтральном буферном растворе формалина (pH = 7,4) в течение 24 ч при комнатной температуре. Роговица и радужка были обрезаны, обезвожены и залиты в среду Гистомикс (Биовитрум). Было получено восемь серийных поперечных срезов роговицы толщиной 3 микрона, которые зафиксировали на предметные стекла. Затем срезы депарафинизировали, гидратировали и окрашивали с гематоксилином и 0,5% эозином Y. Окрашенные срезы обезвоживали 96% этанолом и ксилолом, очищали в средстве очистке тканей BioClear, помещали в синтетическую среду BioMount и исследовали с помощью

микроскопа Leica DM4000 с камерой Leica DFC или микроскопа Zeiss AxioVert.A1 с камерой Axioscam IC C5 (Германия).

Результаты количественной оценки выявленных патоморфологических изменений оценивали по четырех балльной шкале (где 0 - изменений нет, 0,5 - минимальные изменения, 1 - слабые изменения, 2 – умеренные изменения, 3 - выраженные изменения, 4 - резко выраженные изменения)

2.6. Окрашивание роговицы метиленовым синим

После энуклеации глаз роговицы окрашивали 1% метиленовым синим и промывали физиологическим раствором. Окрашенные роговицы помещали в 1,5 мл раствора ацетона с сульфатом натрия на 15 ч при 20–22°C. Поглощение раствора измеряли при 660 нм.

2.7. Получение образцов слёзной жидкости

Образцы слезы получали с помощью полосок - теста Ширмера, полоска помещалась в конъюнктивальный мешок под нижнее веко на 5 минут и извлекалась, когда СЖ была около 15-20 мм. По окончании сбора СЖ полоску извлекали и помещали в эппендорф объемом 1,5 мл. Полученные образцы хранили при -70°C не более 30 суток. Для дальнейших исследований проводилась экстракция полоски теста Ширмера в PBS на льду. Для ВЭЖХ – МС/МС отбирались 3 последовательные полоски. Фрагменты 15 мм от каждой полоски были отрезаны, перенесены в эппендорф с 1 мл метанола, содержащего 0,1 % ВНТ и хранящийся при -70 °C.

2.8. Определение осмолярности

Осмолярность в образцах СЖ определяли с помощью полумикроосмометра Кнауер К-7400, прибор позволяет измерить физиологические жидкости по температуре замерзания образца. Полумикроосмометр измеряет понижение температуры замерзания раствора по сравнению с чистым растворителем. После введения образца измерение осуществляется автоматически. Система полностью контролируется программным обеспечением. Осмоляльность показывает концентрацию осмотически активных частиц в растворах независимо от их типа, состава и заряда.

2.9. Определение антиоксидантной активности

АОА СЖ и антиоксидантов была проанализирована с использованием системы "гемоглобин - перекись водорода - люминол" [184]. В этой системе образование радикалов - инициаторов (фиррил-радикалов гемоглобина и гидроксильных радикалов)

происходит при взаимодействии гемоглобина и перекиси водорода, а люминол играет роль хемилюминогенного субстрата окисления. Указанные радикалы вызывают одноэлектронное окисление люминола, в процессе которого образуются O_2^- , L^- - радикалы, эндопероксид люминола, 3-аминофтадианион в возбужденном состоянии, при переходе которого в основное состояние высвечивается квант света хемилюминесценции с длиной волны 425 нм. Измеряемым параметром является латентный период – время от момента инициирования свободнорадикального окисления люминола перекисью водорода до начала возгорания хемилюминесценции. Введение в тест систему антиоксидантов приводит к торможению свободнорадикального окисления люминола. Это выражается в увеличении латентного периода хемилюминесценции. Стандартным антиоксидантом является водорастворимый аналог витамин Е - тролокс. Реакционная смесь содержит в себе PBS, 0,01мМ люминола, 0,5мМ гемоглобина и 30 мкл образца СЖ (или стандарта тролокса). Реакцию инициировали добавлением перекиси водорода в конечной концентрации 6 мкМ, хемилюминесценцию образцов контролировали каждую секунду в течение 10 мин с помощью люминометра Glomax – Multi (США). Результаты были рассчитаны в единице тролокса ориентируясь на стандартные растворы.

АОА растворов аскорбиновой кислоты и ДМСО также определяли методом оценки способности поглощения кислородных радикалов (ORAC) с использованием флуоресцеина [185]. Выявляется способность антиоксидантов защищать флуоресцеин от деградации свободными радикалами. В этом анализе в качестве источника пероксильного радикала используется дигидрохлорид 2,2'-азобис(2-амидинопропана) (AAPH). Потеря флуоресценции является показателем степени деградации флуоресцеина пероксильным радикалом. Защитный эффект антиоксидантов измеряется путем оценки времени флуоресценции и площади под кривой образца по сравнению с контролем, в котором отсутствуют антиоксидантные соединения. В качестве калибровочного стандарта используется тролокс. Метод ORAC обеспечивает оценку как времени, так и степени ингибирования реакции. Реакцию оценивали с помощью планшет-ридера Synergy H4 Hybrid (Biotek, США), длина волны возбуждения 485 ± 20 нм и длина волны излучения 530 ± 25 нм при температуре 37°C, длительность измерения 30 мин. Расчеты проводили путем построения кривой.

2.10. Измерение активности антиоксидантных ферментов

Активность СОД, глутатионпероксидазы определяли в СЖ согласно инструкции коммерческих наборов фирмы Randox (Великобритания). Определение активности каталазы проводили в реакционной системе перекись водорода - молибдат аммония, в которой происходит образование окрашенного комплекса с максимумом поглощения при 410 нм [186]. Колориметрические реакции контролировали с помощью планшет – ридера Synergy H4 Hybrid (Biotek, США).

2.11. Количественное определение электрохимически активных антиоксидантов в слёзной жидкости

Полученные образцы СЖ анализировали с помощью обратнофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием спектрофотометрической (254 нм) и амперометрической (0,4 В) детекции. Раствор А: 0,2 М $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ (рН 3). Раствор Б: ацетонитрил. Градиент 0–100% ацетонитрил за 20 мин. Предварительно система была откалибрована по стандартным растворам соответствующих антиоксидантов.

2.12. Зимография супероксиддисмутазной активности

Активность СОД на электрофореграмме выявлялась с помощью нитросинего тетразолия (НСТ) [187]. ПААГ приобретает сиреневый окрас, который объясняется образованием голубого формазана в реакции НСТ с супероксидными радикалами. Радикалы O_2^- образуются на свету при реакции рибофлавина с кислородом воздуха. В местах локализации СОД окрашивание отсутствует, так как СОД, снижая количество супероксидных анион-радикалов, препятствует образованию голубого формазана.

Образцы СЖ смешивались с буфером для образцов без 2-бета меркаптоэтанола и ДСН и наносились на 12% полиакриламидный гель без ДСН. Электрофорез проводили при +4°C, в электронном буфере без ДСН. Затем гель окрашивали по следующей схеме: промывали гель 3 раза по 10 мин в ледяной дистиллированной воде, инкубировали в 2,45 мМ НСТ растворе (приготовленного на 75% N,N-диметилформамиде) в течение 30 мин в темноте. Затем добавляли к раствору в 28 мкМ рибофлавина и 28 мМ TEMED в 36 мМ буфере фосфата калия (рН 7,8) и инкубировали ещё 30 мин в темноте. Далее инкубационный раствор заменяли на дистиллированную воду. Гель оставляли под действием освещения люминесцентной лампы до появления ахроматических полос, указывающих на зону активности СОД. Для выявления активности СОД₂ гель

обрабатывали 5 мМ перекисью водорода в течение 30 мин, после стадии ингибирования все гели были окрашены, как упоминалось ранее.

2.13. Определение малонового диальдегида

ПОЛ представляет собой расщепление липидов, которое происходит в результате окислительного повреждения и является полезным маркером окислительного стресса. Полиненасыщенные липиды восприимчивы к окислительной атаке, обычно реактивной формой кислорода, это приводит к четко определенной цепи реакции с образованием конечных продуктов, таких как МДА. Перекисное окисление липидов определяли реакцией малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой с образованием колориметрических продуктов (532 нм) – триметинового комплекса согласно инструкции коммерческого набора от производителя Sigma-Aldrich (США). Реакцию оценивали с помощью планшет – ридера Synergy H4 Hybrid (Biotek, США). Расчеты проводили с помощью построения стандартной кривой.

2.14. Желатиновая зимография

Электрофоретическое разделение белков СЖ проводилось в 7,5% полиакриламидном геле, в состав которого входит 4 мг/мл желатина, который является белковым субстратом для ММП-9 [188]. После электрофоретического разделения, гель отмывался промывочным буфером, в состав которого входят 2,5 % Triton X-100, 50 мМ Tris/HCl, pH 7,5, 5 мМ CaCl₂, 1 мкМ ZnCl₂, 2 раза по 30 минут при постоянном помешивании для удаления ДСН из геля. Затем гель инкубировался при 37 °С в реакционном буфере 24 часа: 1 % Triton X-100, 50 мМ Tris/HCl, pH 7,5, 5 мМ CaCl₂, 1 мкМ ZnCl₂. Далее, гель окрашивался с помощью Кумасси, при этом, в том месте, где желатин был расщеплён ММП-9 проявляются области расщепления в виде отчётливых полосок на тёмноокрашенном фоне.

2.15. Иммуноферментный анализ

Присутствие изоформ СОД и глутатионпероксидазы, каталазы в СЖ определяли методом ИФА с помощью наборов от AssayGenie (Дублин, Ирландия) согласно инструкции. Исследования проводились на образцах слезы с разбавлением в 50 раз для супероксиддисмутазы, при определении каталазы и глутатионпероксидазы СЖ не разбавлялась.

Концентрацию ММП-9 и тканевого ингибитора 1 типа (ТИМП-1) определяли методом ИФА согласно инструкции наборов от фирмы AssayGenie (Дублин, Ирландия).

Концентрацию оксипинов: LTB₄, PGE₂, PGF₂ α в образцах слезы определяли с помощью коммерческих наборов.

2.16. Анализ ВЭЖХ – МС/МС

Для оценки влияния методов экстракции на определение липидов в слезной жидкости (используемой в качестве матрицы) собирали с использованием капилляров. 15 мкл образца слезы разбавляли безводным метанолом или водно–метанольными растворами с получением 4%, 25% или 95% об./об. MeOH. Полученные зонды смешивали с 2 нг дейтерированных внутренних стандартных растворов, центрифугировали (12000×g, 3 мин), смешанный с 6 мл 0,1% уксусной кислоты и загруженный на твердофазный картридж для экстракции липидов Oasis® PRIME HLB. Картридж промывали 2 мл 15% метанола, содержащего 0,1% муравьиной кислоты, и липиды последовательно элюировали 500 мкл безводного метанола и 500 мкл ацетонитрила. Предварительный анализ ВЭЖХ - МС/МС показали, что эффективность экстракции различных оксипинов из СЖ была максимальной при использовании 95% об./об. водно–метанольного раствора, который был использован в дальнейшем для экстракции липидов с полосок теста Ширмера. Полученные экстракты СЖ концентрировали выпариванием растворителя под слабым потоком азота, восстанавливали в 50 мкл 90% метанола и хранили при -80°C до ВЭЖХ - МС/МС анализа.

Липидные экстракты СЖ анализировали с помощью масс-спектрометра ВЭЖХ - МС/МС серии 8040 (Shimadzu, Япония) в режиме многореакционного мониторинга с разрешением единицы массы как для ионов предшественника, так и для ионов продукта [189]. Липидные соединения разделяли обратнофазным ВЭЖХ (объем образца 20 мкл) с использованием колонки Phenomenex C8 (2,1 мм×150 мм×2,6 мкм) со скоростью потока 0,4 мл/мин и при температуре колонки 40°C. Элюирование проводили с использованием ацетонитрильного градиента в 0,1% (об./об.) муравьиной кислоте. Концентрации ацетонитрила, использованных для элюирования были следующими: 10% (0 мин) - 25% (5 мин) - 35% (10 мин) - 75% (20 мин) - 95% (20 мин) - 95% (25 мин) - 10% (25 мин) - 10% (30 мин). Отделенные липиды подвергали МС-анализу с использованием источника ионизации электроспрея, работающего как в режиме положительных, так и отрицательных ионов. Выделенные молекулярные ионы фрагментировали в газовой фазе методом коллизионно-индуцированной диссоциации и анализировали методом tandemной масс-спектрометрии. Калибровочные данные показали линейность с $r > 0,91$

для всех анализируемых липидов. Целевые ПНЖК и оксилипины идентифицировали и количественно оценивали путем сравнения их данных МС, МС/МС и ВЭЖХ (время удерживания, площади пиков) с данными, полученными для дейтерированных внутренних стандартных соединений тех же классов (6-кето PGF1A-d4, TXB2-d4, PGF2 α -d4, PGE2-d4, PGD2-d4, лейкотриен (LT) C4-d5, LTB4-d4, 5 (S)-HETE-d8, 12 (S)-HETE-d8, 15 (S)-HETE-d8, олеилэтаноламид-d4, EPA-d5, DHA-d5, AA-d8) с использованием коммерческого программного пакета методов Lipid Mediator версии 2 (Shimadzu, Япония) согласно инструкции производителя. Этот анализ охватывает 158 соединений липидных медиаторов, полученных из ПНЖК (список см. <https://www.shimadzu.nl/lcmsms-method-package-lipid-mediators-ver-2>).

2.17. Участники исследования для сравнительного анализа ВЭЖХ – МС/МС

Для сравнительного анализа состава ПНЖК и оксилипинов СЖ человека и кроликов была сформирована группа участников. В исследовании приняло участие 23 человека без патологий глаз (кроме катаракты) по результатам полного офтальмологического обследования, проведенного офтальмологом на базе ФГБУ «Национального медицинского исследовательского центра глазных болезней имени Гельмгольца» Минздрава России. Дополнительными критериями исключения для участников исследования были предшествующее лечение кортикостероидами или нестероидными противовоспалительными препаратами, системные заболевания (например, диабет, заболевания щитовидной железы), беременность или кормление грудью.

2.18. Электрофорез и иммуноблоттинг

1) Электрофорез в ПААГ

Электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии и отсутствии ДСН проводили по методу Лэммли при различных концентрациях разделяющего и концентрирующего гелей. Электрофорез проводили с использованием прибора «Amersham Biosciences» (Великобритания) при напряжении 150 В в течение 1,5 - 2 часов. В качестве стандартов молекулярной массы белков использовался набор белков с молекулярными массами от 10 до 170 кДа PageRuler (Thermo Scientific, США).

2) Иммуноблоттинг

Иммуноблоттинг или вестерн - блоттинг проводили в соответствии со стандартной методикой с некоторыми модификациями. Пробы подвергали ДСН-электрофорезу по

методу Лэммли при концентрациях разделяющего и концентрирующего гелей, равных соответственно 12 и 5%. По завершении электрофореза белки переносили на поливинилидендифторидную мембрану Hybond-C Extra (Amersham) в буфере для переноса (20 mM Tris, 192 mM глицин, 20% метанол) при 300 мА в течение 45 мин. Альтернативно использовали автоматизированную блот-систему Trans Blot Turbo (Bio-Rad). После этого мембрану последовательно инкубировали в 1% растворе сухого обезжиренного молока (Amersham) в буфере TBST (20 mM Tris-HCl (pH=7,5), 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20), в растворе с моноклональными антителами против СОД-3 (Thermo Fisher Scientific, США), разведенными в 1000 раз буфером TBST. В каждом случае инкубацию проводили в течение 1 часа при комнатной температуре и слабом перемешивании; между инкубациями мембрану 4 раза промывали 5-10 мл TBST. Визуализацию белка проводили в системе гель - документации ChemiDoc MP, используя набор для хемилюминисцентной реакции Enhanced Chemiluminescence Kit (Bio-Rad).

2.19. Определение общей концентрации белка

Концентрацию общего белка в образцах СЖ определяли с помощью анализа бицинониновой кислоты: ионы двухвалентной меди в щелочной среде взаимодействуют с белковыми пептидными связями, в результате чего образуется окрашенный комплекс, который сильно поглощает свет на длине волны 562 нм. Колориметрическую реакцию оценивали с помощью планшет – ридера Synergy H4 Hybrid (Biotek, США). Калибровочную кривую строили с использованием стандартных растворов бычьего сывороточного альбумина в PBS.

2.20. Статистический анализ

Статистическую обработку и визуализацию данных проводили в программном обеспечении SigmaPlot 11. (Systat Software, США). Данные, полученные по результатам не менее чем 6 независимых повторности, представлены в виде средних значений с планками погрешностей, обозначающими стандартную ошибку. Для определения статистической значимости между значениями использовали t-тест, дисперсионный анализ с повторными измерениями (для анализа внутри групп) и однофакторного дисперсионного анализа (для анализа между группами) с тестом Тьюки. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Были рассчитаны средние значения, стандартное отклонение с использованием программного обеспечения Excel (Microsoft, США).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования [190-193]

3.1. Разработка новой экспериментальной модели синдрома сухого глаза

3.1.1 *Подбор экспериментального дизайна модели синдрома сухого глаза, вызванного нарушением мигательного рефлекса*

В первой части нашего исследования мы сконцентрировались на подборе условий для разработки новой модели синдрома сухого глаза, вызванного нарушением мигательного рефлекса. Для решения этой задачи мы выбрали кроликов в качестве объекта исследования. Этот вид животных имеет много общих с человеком анатомических и физиологических особенностей строения глаза, включая размер глазного яблока и его внутреннюю структуру, близкие параметры глазной поверхности, а также биохимический состав СЖ и потенциал для отбора слезы для запланированных экспериментов. Моделирование ССГ у кроликов осуществлялось в условиях общей анестезии. Это стандартная практика, которая обеспечивает фиксацию животного, глубокий седативный эффект и позволяет проводить манипуляции с животным, а также дает возможность контролировать внешние факторы, которые могут исказить результаты. Выбор экспериментальных условий, которые позволяют достигнуть проявления клинических признаков ССГ, включал: комбинации анестетиков для проведения общего наркоза экспериментальных животных, оптимальную продолжительность общей анестезии, внешних факторов (температура и влажность воздуха). Это позволило нам создать условия, исключаяющие летальный исход у экспериментальных животных и возможных осложнений на орган зрения (полное восстановление физиологических свойств роговицы происходило не более чем за 7 дней после окончания моделирования заболевания). По результатам этой работы нами были выбраны следующие параметры экспериментальной модели:

1. Для проведения общей анестезии использовалась комбинация тилетамина (1,4 мг/кг) и золепема (1,4 мг/кг) гидрохлоридов с ксилазином гидрохлорида (2,1

мг/кг). Введение анестетика осуществлялось каждые 50-65 минут внутримышечно;

2. Общая анестезия осуществлялась в течение 6 часов;
3. Температура и влажность воздуха составляла $25 \pm 2^\circ\text{C}$ и 30%, соответственно;
4. Блокирование мигательного рефлекса достигалось с помощью векорасширителя

Патологические изменения поверхности роговицы у экспериментальных животных были охарактеризованы с использованием флуоресцеинового теста, теста с метиленовым синим и гистологического исследования. Также нами были проведены исследования по выявлению изменения биохимических свойств СЖ в динамике, которые включали определение осмолярности, содержания компонентов системы антиоксидантной защиты, маркеров окислительного стресса и провоспалительного ответа, регуляторов метаболизма внеклеточного матрикса, а также полиненасыщенных жирных кислот и продуктов их метаболизма.

3.1.2 Клиническое и гистологическое описание экспериментальной модели

Для первичного моделирования клинической картины повреждений роговицы, ассоциированных с нарушением мигательного рефлекса, животные трех экспериментальных групп (по 6 особей в группе) были подвергнуты общей анестезии путем внутримышечных инъекций коммерческого анестетика, содержащего смесь тилетамина и золепема гидрохлоридов с ксилазина гидрохлоридом (в дозе 1,4 мг/кг и 2,1 мг/кг соответственно). Выбранная дозировка обеспечивала условия общей анестезии экспериментальных животных в течение 50–65 мин. Количество инъекций варьировалось с целью достижения длительности анестезии, равной 1 часу (группа 1), 3 часам (группа 2) или 6 часам (группа 3). Для всех животных перед (рис. 5а) и непосредственно после моделирования были определены клинические признаки эрозий роговицы методом окрашивания ее поверхности низкомолекулярным флуоресцеином и последующей оценки площади окрашенных участков при помощи офтальмоскопии (рис. 5б-г). Площадь повреждения поверхности роговицы (клинический показатель) оценивали по шкале от 0 до 4 баллов в зависимости от размера окрашенной флуоресцеином поверхности: нет окрашивания (0 баллов), окрашивание 0–12,5% поверхности (1 балл), 12,5–25% поверхности (2 балла), 25–50% поверхности (3 балла), окрашивание более 50% поверхности (4 балла). Статистический анализ данных, полученных для всех экспериментальных групп, показал, что в целом частота встречаемости клинических

признаков ССГ растёт с увеличением продолжительности экспозиции (табл. 2). Так, если в результате 1-часового моделирования экспериментального ССГ этот параметр составлял менее 10%, после 3 часов патологические изменения наблюдались уже у 80%, а после 6 часов – у 100% животных. Для исключения возможного воздействия анестетика на проявление симптомов ССГ была создана дополнительная группа 4, животные в которой в условиях общей анестезии находились 6 часов с закрытыми веками. В последней группе не было выявлено клинических признаков ССГ. Таким образом, выбранный вид животных (кролики породы «Новозеландская белая») обладает выраженной предрасположенностью к развитию ССГ при нарушении мигательного рефлекса.

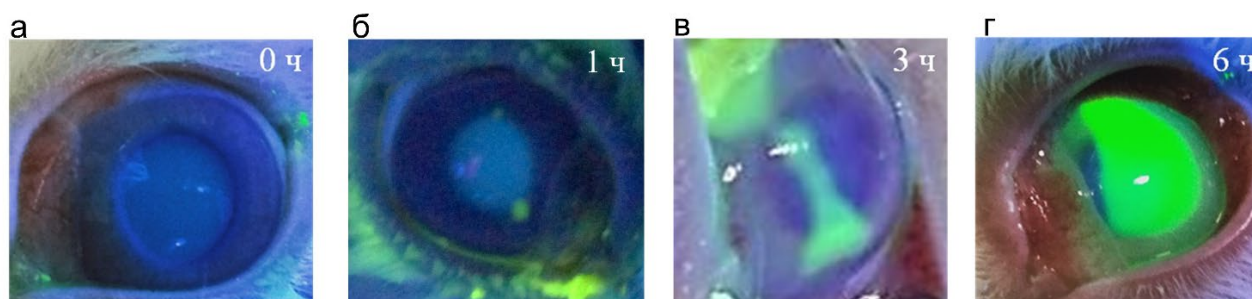


Рисунок 5 – Динамика повреждения роговицы по данным флуоресцеинового теста: а – до начала индукции экспериментальной модели ССГ; б – 1 час, в – 3 часа, г – 6 часов после начала моделирования ССГ

Таблица 2 – Площадь повреждения роговицы у экспериментальных животных в баллах

Время, ч	Площадь повреждения роговицы, балл
0	0*
1	$0,4 \pm 0,2$
3	$1,1 \pm 0,4$
6	$2,3 \pm 0,6$

*Площадь повреждения роговицы оценивалась в баллах, где 0 – отсутствует повреждение, 1 – до 25% повреждение, 2 – до 50%, 3 – до 75%, 4 – до 100% соответственно (для точки 0 часов n=18, для всех остальных n=6).

Полученные нами клинические результаты были подтверждены гистологическими исследованиями роговицы (рис. 6, табл. 3). Для патоморфологической характеристики были получены образцы роговицы от интактных особей и кроликов через 1, 3 и 6 часов

после начала моделирования экспериментальной модели ССГ. Первые морфологические изменения у экспериментальных животных наблюдались спустя час после начала моделирования, а именно были выявлены участки десквамации поверхностных клеток эпителия роговицы (рис. 6б, е). Через 3 часа экспозиции глазной поверхности обнаруживались обширные очаги повреждения роговицы (рис. 6в), включающие дегенеративные и некробиотические изменения в шиповатых клетках, обнажившихся после потери поверхностных клеток (рис. 6з). Такие дефекты эпителия включали изменения в цитоплазме (набухание и просветление) и ядрах клеток (увеличение и просветление) (рис. 6ж). В некоторых случаях поврежденные шиповатые клетки слущивались, и очаги повреждения содержали только один слой дегенерирующих базальных клеток (рис. 6з, звездочка). Через 6 часов повреждения роговицы приобретали значительно более серьезный характер, а именно дегенерация наблюдалась в поверхностных, шиповатых и базальных клетках эпителия роговицы (рис. 6г). Кроме того, прогрессирующая гибель клеток сопровождалась признаками апоптоза, такими как уменьшение размера клеток, ядерные изменения (пикноз или кариорексис), образование апоптотических телец, а также были обнаружены отдельные клетки на разных морфологических стадиях некротической (рис. 6м, звездочка) или апоптотической (рис. 6н, стрелки) гибели. Повреждение всех слоев эпителия привело к нарушению адгезии базальных клеток к базальной мембране, полной утрате эпителиального слоя и обнажению стромы роговицы.

Наиболее выраженные участки обнажения стромы у животных превышали 1 мм в диаметре (рис. 6г, о). В целом через 3-6 часов у большинства животных сформировывается патоморфологическая картина десквамации эпителия роговицы. Наконец, никаких морфологических признаков инициации заживления эпителия (реэпителизации), таких как миграция эпителиальных клеток или их дополнительная пролиферация, обнаружить не удалось. В таблице (табл.3) приведены частота встречаемости эрозий роговицы, а также оценки степени тяжести (средний балл) для перечисленных патологических наблюдений, которые описывают развитие повреждения эпителия роговицы.

Состояние, развившееся через 6 часов после начала нарушения мигательного рефлекса, было признано моделью выраженной формы ССГ, что позволяет провести

дальнейшее изучение регенерации ткани, а также характеристику биохимических изменений в СЖ и оценить действие предложенной терапии.

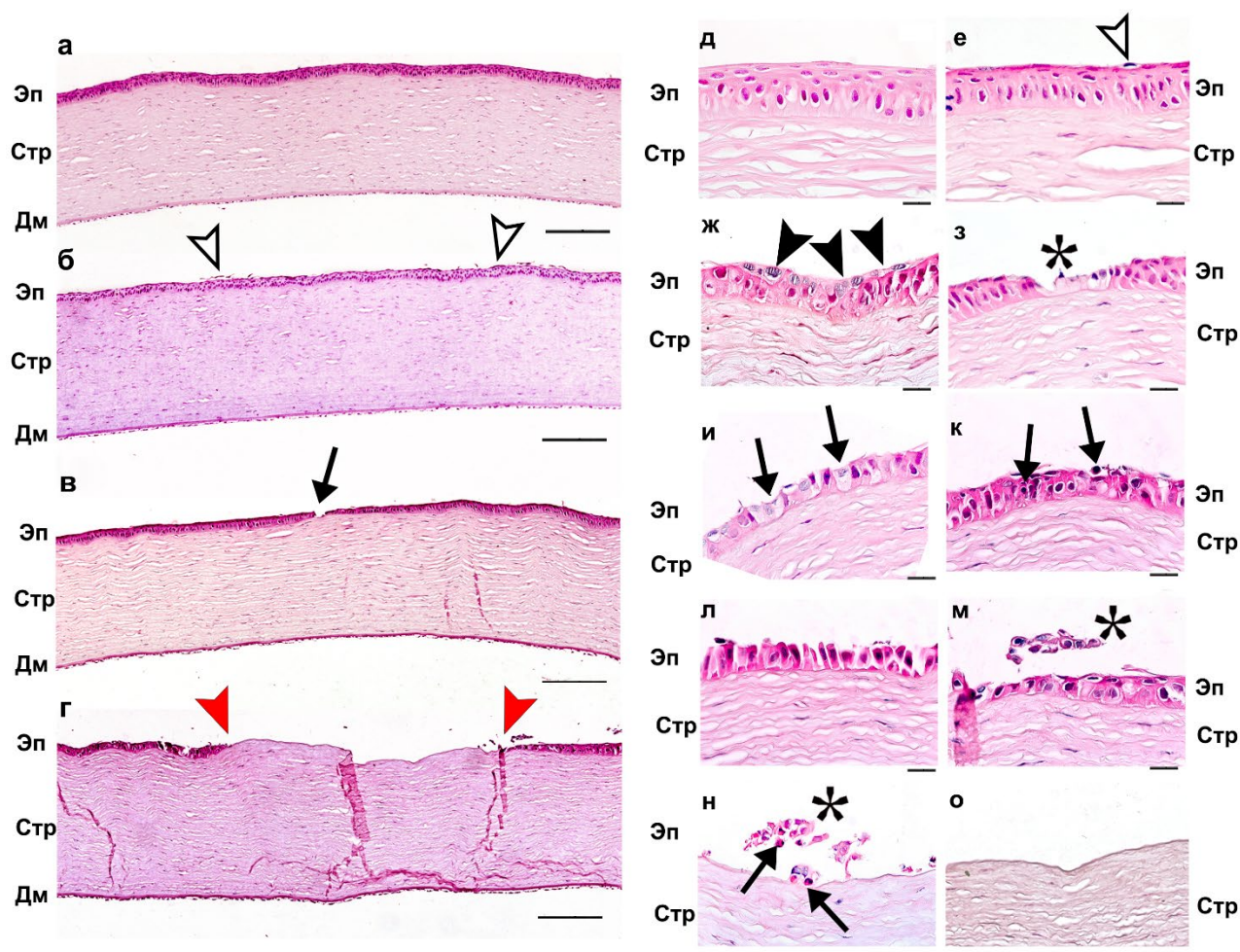


Рисунок 6 – Репрезентативные микрофотографии срезов центральной области роговицы, окрашенных гематоксилином и эозином: а, д – роговица в норме; б, е – роговица после 1-часа экспозиции, белой стрелкой отмечены участки десквамации поверхностных клеток эпителия; в, ж, з – роговица после 3-часовой экспозиции, черными стрелками показаны очаги дегенерации клеток эпителия (ж), черным указателем отмечен участок с нарушенной структурой эпителиального слоя (в), тот же при большем увеличении (з, звездочка); г, и-о – роговица после 6-часовой экспозиции, некротические и апоптотические изменения отмечены черными стрелками на и, к, звездочками на м, н обозначены фрагменты слущенного эпителия, стрелками на н показаны клетки, вошедшие в апоптоз. Сокращения: Эп – эпителий роговицы, Стр – строма роговицы, ДМ – Десцеметова мембрана и эндотелий роговицы. Увеличение: $\times 100$ (а-г) и $\times 1000$ (д-о); масштабные линейки: 200 мкм (А-Г) и 20 мкм (Д-О).

Таблица 3 – Патоморфологические характеристики роговицы через 1, 3, 6 часов экспозиции

Слой роговицы	Диагноз	Параметр	Продолжительность экспозиции, часы			
			И	1	3	6
Эпителий	Десквамация плоских клеток	Частота встречаемости, %	0	100	100	100
		Средний балл	0*	2,3±0,5	3,6±0,6	4,3±0,5
	Эрозия (потеря клеток шиповатого и базального слоев)	Частота встречаемости, %	0	0	100	100
		Средний балл	0	0	2,0±0,9	4,3±0,6
	Полная потеря клеток, обнажение стромы	Частота встречаемости, %	0	0	66	100
		Средний балл	0	0	2,0±1,5	4,0±0,9
	Клеточная дистрофия	Частота встречаемости, %	0	0	100	100
		Средний балл	0	0	3,3±0,6	3,7±0,5
	Морфологические признаки апоптоза	Частота встречаемости, %	0	0	33	100
		Средний балл	0	0	0,6±0,9	3,6±0,5
	Признаки реэпителизации	Частота встречаемости, %	0	0	0	0
		Средний балл	0	0	0	0
Строма	Отек	Средний балл	0	0	0	0
	Воспалительная инфильтрация	Средний балл	0	0	0	0
	Неоваскуляризация	Средний балл	0	0	0	0
Эндотелий	Вакуолизация	Средний балл	0	0	0	0
	Гибель клеток	Средний балл	0	0	0	0

* Результаты количественной оценки выявленных патоморфологических изменений определяли в баллах (где 0 - изменений нет, 0,5 - минимальные изменения, 1 - слабые изменения, 2 – умеренные изменения, 3 - выраженные изменения, 4 - резко выраженные изменения), для интактных животных n=3, на всех временных интервалах моделирования ССГ n=6

Поэтому для последующих экспериментов была выбрана следующая схема: моделирование заболевания длилось в течение 6 часов в описанных условиях, затем

отмечали регенерацию тканей и динамику изменения показателей в СЖ через 24, 48, 72 и 168 часов (рис. 7).



Рисунок 7 – Схема эксперимента

3.1.3 Связь осмолярности слёзной жидкости с барьерной функцией глазной поверхности

Повышение осмолярности слёзной жидкости является ключевым патогенетическим фактором развития ССГ. Мы выявили изменения осмолярности СЖ в условиях экспериментальной модели ССГ, вызванного нарушением мигательного рефлекса. Как видно из представленного графика, после начала экспозиции глазной поверхности наблюдается повышение осмолярности СЖ, значение которой достигает своего максимума через 6 часов и продолжает оставаться повышенным в течение первых суток эксперимента (рис. 8а). Через 48 часов после индукции модели наблюдается снижение этого показателя до уровня нормы. Следует отметить, что в первые 24 часа эксперимента показатель гиперосмолярности СЖ у экспериментальных животных находится на уровне, близком к таковому у пациентов с ССГ (более 316 мОсм/л) [194].

Барьерная функция роговицы поддерживается гликокаликсом и плотными контактами в поверхностных слоях эпителия, которые минимизируют проникновение медиаторов воспаления, клеток и патогенов в роговицу. На фоне роста осмолярности СЖ мы определили, что в нашей модели уже в первые часы происходит нарушение плотных межклеточных контактов, о чем свидетельствует повышение сорбции красителя

метиленового синего роговицей, что является следствием снижения барьерной функции эпителия роговицы и первым признаком повреждения (рис. 8б). На основании этого наблюдения мы предположили, что при развитии патологического процесса происходит увеличение активности ферментов, разрушающие внеклеточный матрикс, основными из которых являются матриксные металлопротеиназы. Одним из таких ферментов является ММП-9.

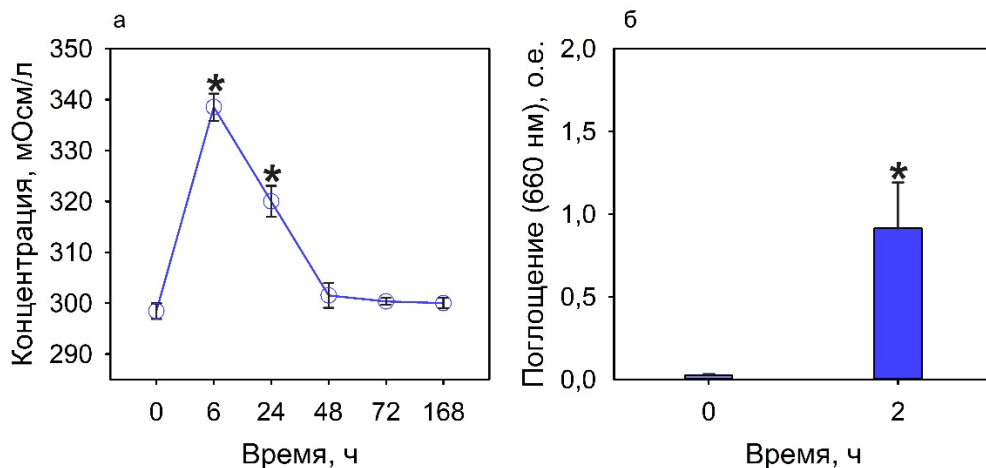


Рисунок 8 – Признаки нарушения барьерной функции эпителия роговицы: а – динамика изменения осмолярности СЖ кроликов во время развития экспериментального ССГ; б – обнаружение нарушения межклеточных контактов эпителия роговицы с помощью метиленового синего. Данные на графиках а-б представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$). Различия достоверны: * - между временными точками $p < 0,05$ (а – парный t-тест, б – непарный t-тест) по сравнению с животными без ССГ

С использованием желатиновой зимографии мы показали, что в норме активность ММП-9 чрезвычайно низка, а при моделировании заболевания действительно происходит увеличение активности фермента в СЖ. Как видно на представленной зимограмме, в условиях экспозиции глазной поверхности активность ММП-9 имеет тенденцию к возрастанию и достигает своего пика через 6 часов (рис. 9а). Данные зимограммы были подтверждены с помощью иммуноферментного анализа. Мы выявили, что концентрация ММП-9 в СЖ также растет: через 6 часов в среднем содержание фермента возрастает более чем в 15 раз (рис. 9б).

Активность металлопротеиназ регулируется эндогенными тканевыми ингибиторами, благодаря чему достигается равновесие, определяющее целостность внеклеточного матрикса. На сегодняшний день описано 4 члена семейства ТИМП. ТИМП-1 секретируются эпителиальными клетками роговицы и является ингибитором

ММП-9 [195]. Нами было обнаружено многократное снижение в СЖ концентрации ТИМП-1 в СЖ, который является ключевым ингибитором исследуемой металлопротеиназы (рис. 9в). Так, в норме согласно данным иммуноферментного анализа содержание ТИМП-1 составляет $57,7 \pm 30,4$ нг/мл. Но как видно из представленных данных содержание ТИМП-1 снижается при развитии экспериментального ССГ и достигает своего минимума во временной точке 4 часа ($15,8 \pm 9,1$ нг/мл).

Важным параметром, который часто используется в клинической практике является определение стехиометрии между ферментом и его ингибитором. Как видно из графика, в норме соотношение фермента и его ингибитора близко к единице, однако уже через 2 часа эта стехиометрия достигает значения более 10 в сторону ММП-9 (рис. 9г). Полученные данные являются дополнительным подтверждением нарушения межклеточных контактов в эпителии роговицы при ССГ. Считается, что такая стехиометрия ММП-9/ТИМП-1 указывает на протекание серьезных деструктивных процессов во внеклеточном матриксе.

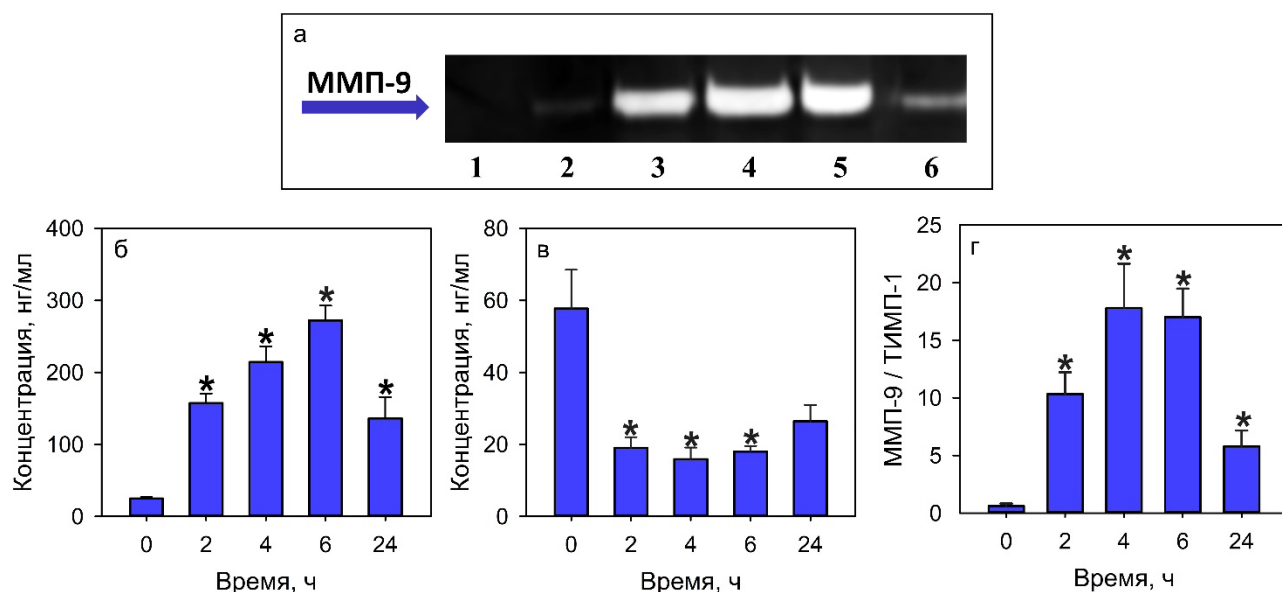


Рисунок 9 – Динамика содержания ММП-9 и ТИМП-1 в СЖ кроликов при развитии экспериментального ССГ: а – репрезентативная желатиновая зимограмма СЖ кроликов (1 – 0, 2 – 2, 3 – 4, 4 – 6, 5 – 8, 6 – 24 часа от начала моделирования); количественное содержание в СЖ: б – ММП-9, в – ТИМП-1; г – стехиометрия ММП-9 к ТИМП-1 в СЖ. Данные на графиках б-г представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$). Различия достоверны: * – между временными точками $p < 0,05$ (парный t-тест) по сравнению с животными без ССГ

3.1.4 Изменение уровня антиоксидантной защиты и развитие окислительного стресса при ССГ, вызванном нарушением мигательного рефлекса

На следующем этапе работы мы решили выявить возможную связь ССГ, вызванного нарушением мигательного рефлекса, с локальными изменениями уровня антиоксидантов. Перед проведением этого анализа было необходимо определить состав и концентрации низкомолекулярных антиоксидантов в СЖ здоровых животных. С помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимическим детектированием установлено, что основными антиоксидантами СЖ являются аскорбиновая кислота, мочева кислота, глутатион и цистеин (рис. 10а). Далее был охарактеризован вклад выявленных соединений в АОА слезы. На графике (рис. 10б) представлены кинетические кривые возгорания люминола в окислительной системе, включающую гемоглобин и перекись водорода. В отсутствие антиоксидантов происходит возгорание люминола (Кривая 1, рис. 10б). Проявление антиоксидантной активности выявляется в наличии продолжительной лаг-фазы. Используя эту систему, мы провели обработку слезы аскорбатоксидазой, которая катализирует окисление аскорбиновой кислоты, и уратоксидазой, которая катализирует окисление мочево́й кислоты, а также их сочетанием. Кривая 5 (рис. 10б) отображает активность антиоксидантов в СЖ здоровых кроликов, образцы СЖ после инкубации с аскорбатоксидазой (кривая 3, рис. 10б), уратоксидазой (Кривая 4, рис. 10б) и их сочетание (Кривая 2, рис. 10б) представлены следующими кривыми. Разница латентного периода соответствует вкладу активности антиоксидантов. С помощью определения активности выявленных антиоксидантов в СЖ, мы обнаружили, что более 60% в АОА вносит аскорбиновая кислота.

Кроме низкомолекулярных антиоксидантов в защите от окислительного стресса ключевую роль играют ферменты антиоксидантной защиты – СОД, каталаза и глутатионпероксидаза. Для определения содержания перечисленных антиоксидантных ферментов нами были использованы три независимых метода: определение активности ферментов, иммуноферментный анализ и вестерн-блотинг. При изучении ферментативной активности в образцах СЖ здоровых животных были обнаружены СОД и глутатионпероксидазная активности, а активность каталазы в исследуемых нами образцах отсутствовала или была ниже уровня детекции (табл. 4).

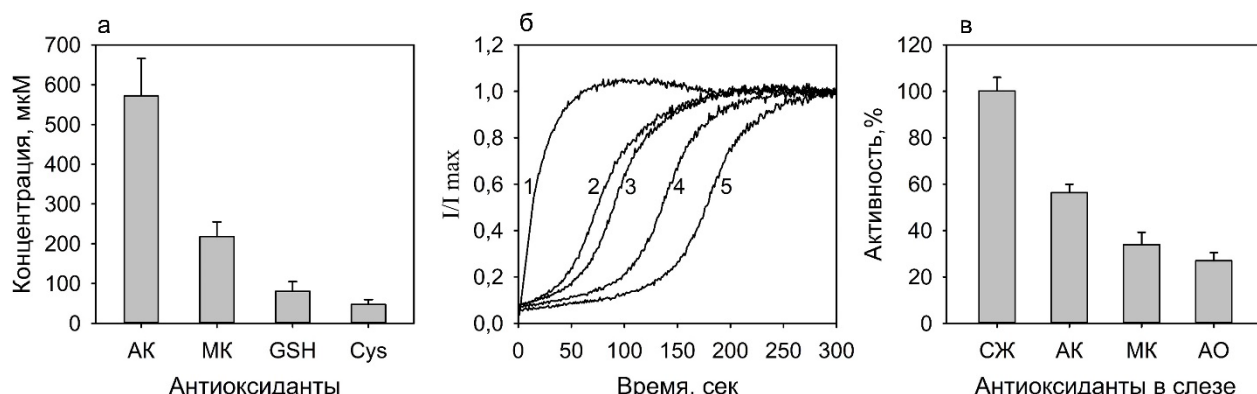


Рисунок 10 – Низкомолекулярные антиоксиданты в СЖ здоровых животных: а – концентрация низкомолекулярных антиоксидантов в СЖ (АК-аскорбиновая кислота, МК- мочевая кислота, GSH-глутатион, Cys-цистеин); б – вклад антиоксидантов в АОА в системе гемоглобин-перекись водорода-люминол (1 – реакционная смесь без АО, 2 – СЖ без АК и МК, 3 – СЖ без АК, 4 – СЖ без МК, 5 – СЖ; в – роль антиоксидантов в СЖ (СЖ-слёзная жидкость, АО-другие электрохимические антиоксиданты в том числе GSH и Cys). Данные на графиках а, в представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$)

Таблица 4 – Компоненты антиоксидантной защиты СЖ кроликов в норме

Показатель	Значение
Антиоксидантная активность	$122,5 \pm 33,7^*$ мкМ Тролокса
Активность супероксиддисмутазы	$119,1 \pm 34,1$ Е/мл
Активность глутатионпероксидазы	$309,6 \pm 128,9$ Е/мл
Активность каталазы	0 Е/мл

*Результаты представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$)

Присутствие СОД-активности в СЖ животных также было подтверждено с помощью зимографии (рис. 11). Этот метод позволяет выявить активность трех изоформ СОД. СОД1 и СОД3 — схожие по строению вещества; отличие между ними в том, что СОД1 действует в цитоплазме клеток, а СОД3 защищает клетку от действия АФК во внеклеточном пространстве. СОД2 является митохондриальной. Мы использовали следующие образцы: стандарт СОД1, экстракт митохондрий, супернатант почки и СЖ животных. На зимограмме изоформы СОД1 и СОД3 отображаются на одном уровне. СОД2 — на другом; она устойчива к инкубации в 5 мМ перекиси водорода в течение 30 минут, поэтому мы смогли исключить ее содержание в СЖ животных. В связи с этим мы провели иммуноферментный анализ и выявили в СЖ наличие изоформы СОД3, которая локализуется во внеклеточном пространстве. Результаты иммуноферментного анализа

были подтверждены иммуноблотингом (результаты не представлены). Несмотря на выявленную глутатионпероксидазную активность в СЖ, определить присутствие глутатионпероксидазы и ее изоформ методом ИФА не удалось. Возможно, что выявленная нами пероксидазная активность связана с присутствием в СЖ других ферментов, обладающих похожей активностью.



Рисунок 11 – Репрезентативная зимограмма активности изоформ СОД. Дорожки: 1 – стандарт СОД1, 2 – растворимая фракция митохондрий (СОД2), 3 – растворимая фракция почки (СОД1-3), 4 и 5 – СЖ от здоровых кроликов. На дорожках 6-10 представлены образцы 1-5 после преинкубации в 5 мМ растворе перекиси водорода в течение 30 минут

Дальнейшие исследования показали, что при моделировании ССГ происходит снижение уровня низкомолекулярных антиоксидантов СЖ в следующей последовательности: тиоловые антиоксиданты (цистеин и глутатион) => аскорбиновая кислота => мочевая кислота (рис. 12а). При определении АОА в образцах СЖ животных было выявлено достоверное снижение активности антиоксидантов (рис. 12б) через 6 часов после начала моделирования ССГ, а полное восстановление антиоксидантной защиты происходило по истечении 168 часов. Аналогичный эффект был зафиксирован при измерении активности СОД (рис. 12в). Снижение содержания низкомолекулярных антиоксидантов и активности СОД коррелирует с увеличением накопления МДА в СЖ, который является маркером ПОЛ (рис. 12г). Можно сделать вывод, что в нашей модели происходит изменения окислительно – восстановительного баланса, которые приводят к развитию окислительного стресса в СЖ и липидном слое слёзной пленки.

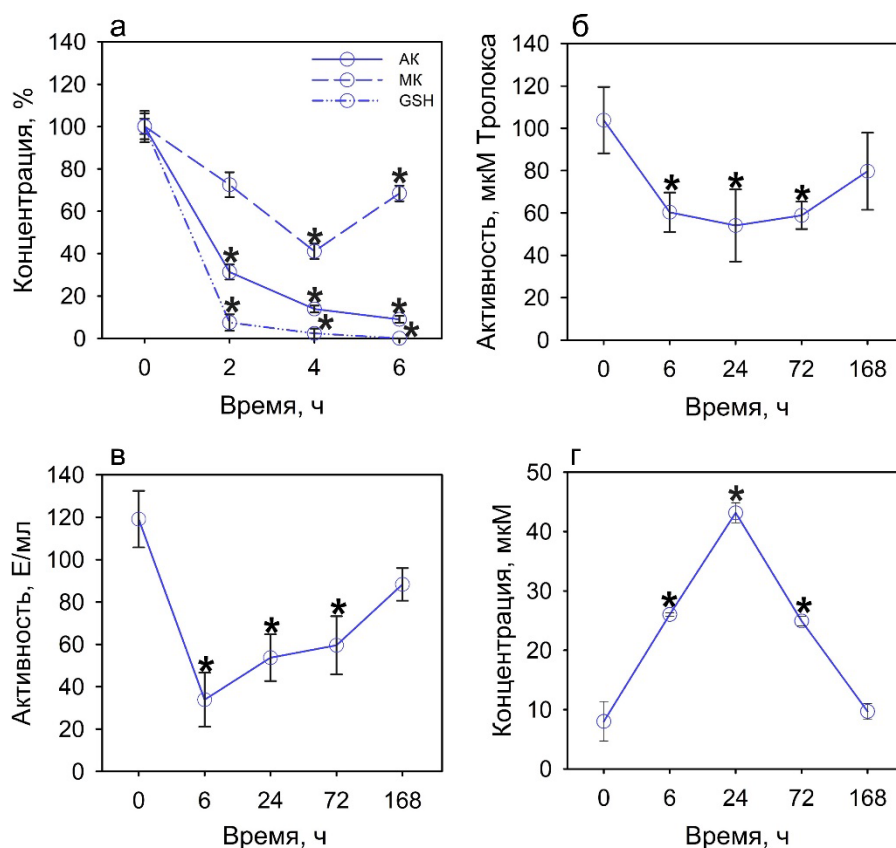


Рисунок 12 – Изменение окислительно – восстановительного баланса в СЖ при ССГ: а – динамика изменения концентрации низкомолекулярных антиоксидантов в СЖ при развитии ССГ (МК – мочевая кислота, GSH – глутатион); б – определение АОА и в – определение активности СОД в СЖ после индукции ССГ; г – изменение уровня МДА в СЖ после индукции ССГ. Данные на графиках а-г представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$). Различия достоверны: * - между временными точками $p < 0,05$ (парный t-тест) по сравнению с животными без ССГ

3.1.5 Разработка методики количественного определения ПНЖК и оксипинонов в СЖ. Сравнительный липидомный анализ состава слезы человека и кролика

Накопление продуктов ПОЛ может указывать на возможную активацию метаболизма ПНЖК и их окисленных метаболитов – оксипинонов, являющихся ключевыми сигнальными липидами, они специфически регулируют процессы воспаления и его разрешения. Поэтому на следующем этапе работы был разработан метод количественного определения этих соединений в СЖ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) (рис. 13а).

На первом этапе образцы СЖ кролика отбирали с помощью капилляров (15 мкл). Затем образцы водно-метанольными растворами с концентрацией метанола 4%, 25% или 95%. Это было необходимо для определения концентрации раствора метанола, при

которой можно наиболее полно детектировать липиды из образца. Полученные образцы смешивали с 2 нг дейтерированных растворов внутренних стандартов, центрифугировали ($12\,000\times g$, 3 мин), смешивали с 6 мл 0,1% уксусной кислоты и наносили на твердофазный картридж для экстракции липидов Oasis PRIME HLB. Предварительный анализ ВЭЖХ-МС/МС продемонстрировал, что эффективность извлечения различных оксипинов из СЖ была максимальной при использовании 95% водно-метанольного раствора. Затем мы сравнили методы отбора СЖ и экстракции на обнаружение липидов. В первом случае 15 мкл СЖ отобранной с помощью капилляров смешивали с 0,1% ВНТ, замораживали при -80°C , размораживали и смешивали с 1 мл 95% метанольного раствора. Во втором случае СЖ собирали с помощью полосок теста Ширмера, увлажненных до 15 мм, которые отрезали по 5 мм и переносили в эппендорф с 1 мл 95% метанольного раствора, содержащего 0,1% ВНТ, замораживали при -80°C и размораживали перед экспериментом. Полученные образцы затем идентично извлекали, как указано выше, и подвергали анализу ВЭЖХ-МС/МС. Только 2 из 14 проанализированных стандартов, а именно ДНА-d5 и АА-d8, показали снижение концентрации при экстракции с помощью полосок теста Ширмера. Поэтому мы решили для дальнейших исследований использовать экстракцию липидов из полосок Ширмера в 95% метанольного раствора с 0,1 % ВНТ.

Использование ВЭЖХ-МС/МС с применением дейтерированных стандартов позволило впервые количественно детектировать более 20 липидных соединений в СЖ кролика. Интересно то, что в СЖ были обнаружены ПНЖК, а также оксипины, которые являются продуктами были получены из АА, LA и ALA.

Подобный подход имеет не только исследовательское значение, но и перспективы для диагностического применения в медицинской практике: например, мониторинг состава СЖ у офтальмологических пациентов при разных заболеваниях, в том числе ССТ. В этой связи нами было решено провести эксперименты, задачей которых являлся сравнительный анализ количественного состава (номенклатуры и концентрации) липидных медиаторов воспаления СЖ людей и кроликов в норме. В исследовании приняло участие 23 человека без патологий глаз (кроме катаракты) по результатам полного офтальмологического обследования, проведенного офтальмологом на базе ФГБУ «Национального медицинского исследовательского центра глазных болезней имени Гельмгольца» Минздрава России. Также в исследовании приняло участие 16 здоровых кроликов без патологий глаз.

В СЖ человека было обнаружено 3 ПНЖК (АА, DHA и EPA) и оксипирины из АА (PGA2-PGJ2, PGE2, LTB4, 20-carboxy-LTB4, TXB3, 12-HETE), LA (13-HpODE/13-NODE/13-KODE, 9-HpODE/9-NODE/9-KODE, 9,10-DiHOME/9,10-EpOME, 12,13-DiHOME/12,13-EpOME) и ALA (9-HOTrE, 13-HOTrE). Кроме того, мы обнаружили два производных фосфолипидов из олеиновой кислоты и этаноламина (олеоилэтаноламид, OEA) и биологически активный фактор (Lyso-PAF) (рис. 13б). В слёзной жидкости кролика были обнаружены 3 ПНЖК (АА, DHA и EPA) и оксипирины из АА (PGA2 + PGJ2, PGD2, PGE2, LTB4, TXB2, 5-HETE, 11-HETE, 12-HETE), LA (9-NODE/9-KODE, 13-NODE/13-KODE, 9,10-DiHOME/9,10-EpOME, 12,13-DiHOME/12,13-EpOME), ALA (9-HOTrE, 13-HOTrE), а также производные фосфолипидов (N-арахидоноилэтаноламид (AEA), OEA и Lyso-PAF); производные DHA и EPA, так же, как и в СЖ человека, не были обнаружены (рис. 13в).

На основе полученных данных липидного анализа мы провели поиск различий и сходств в липидном составе СЖ человека и кролика, что позволило сделать несколько важных наблюдений. Мы обнаружили 19 общих соединений для СЖ человека и кроликов (рис. 14). Вместе с тем, в СЖ кролика не было продуктов метаболизма LA 9-HpODE и 13-HpODE, обнаруженных в СЖ человека, однако в ней присутствовали 9-NODE/9-KODE и 13-NODE/13-KODE, представляющие собой другие производные этой кислоты. Тем не менее некоторые соединения, производные АА, такие как TXB3 в СЖ человека и 5-HETE, 11-HETE и TXB2 в СЖ кролика, были характерны для соответствующих видов. В обоих случаях отсутствовали производные DHA и EPA, в основном состав слёзной жидкости был представлен продуктами LA и АА. Таким образом проведённый нами сравнительный анализ показал сходство липидного состава слезы кроликов с таковым у человека, что является дополнительным подтверждением релевантности нашей модели, а также возможность использования кроликов для изучения патогенеза и терапевтической эффективности лекарственных средств для других офтальмологических заболеваний.

этой работе мы впервые провели липидомный анализ СЖ на наличие метаболитов ПНЖК у людей и кроликов без воспаления глаз, а также сравнили их состав.

3.1.6 Динамика изменения содержания ПНЖК и оксилипинов в слёзной жидкости при развитии ССГ

AA, LA и ALA являются предшественниками окисленных продуктов липидов, таких как простагландины, тромбоксаны, лейкотриены, липоксины и изопростаны.. Эти липидные метаболиты образуются в результате ферментативных реакций с участием COX, LOX и CYP450 и неферментативных реакций (АФК). Образовавшиеся продукты могут инициировать внутриклеточные сигнальные пути во время физиологических и патологических состояний, некоторые из которых являются маркерами ОС.

Разработанная методика позволила нам определить динамику изменения содержания ПНЖК и оксилипинов в СЖ при ССГ. Наблюдаемые паттерны указывают на инициацию воспалительного процесса глазной поверхности, что, в частности отражается в соотношении AA и DHA: преобладание арахидоновой кислоты достигает максимальных значений через 24 часа (рис. 15б). Важно отметить, что наиболее выраженные изменения были выявлены для оксилипинов, являющихся продуктами LOX (рис. 15а)

Масс-спектрометрический анализ оксилипинов проводили в образцах СЖ, полученных сразу после окончания экспериментальной модели ССГ, а также на 1, 3 и 7 сутки после начала моделирования ССГ. Всего в препаратах слёзной жидкости кроликов было идентифицировано 24 метаболита AA, LA, ALA (рис.14в и табл. 5). Наиболее выраженные изменения включали преимущественно повышение концентрации метаболитов LA. В частности, существенный рост демонстрировали 13-HODE и 9-HODE, синтезирующиеся под действием LOX, а также 9-KODE, образующийся за счет неферментативного окисления производных LA. Последнее свидетельствует о развитии ОС клеток вовлеченных тканей глаза. Указанные соединения являются продуктами реакций, катализируемых соответственно 5-LOX и 15- LOX. Кроме того, через 24 часа наблюдался рост PGE₂, PGD₂, PGF₂ α , однако через 6 часов после начала моделирования ССГ был зафиксирован выраженный рост 5-НЕТЕ и LTB₄.

Таким образом, с использованием экспериментальной модели ССГ у кроликов впервые показано, что развитие клинических признаков заболевания сопровождается

выраженными изменениями содержания производных ПНЖК в СЖ. Наиболее существенный рост демонстрируют метаболиты AA и LA. Сделанные наблюдения указывают на важную роль каскадов AA и LA в развитии воспалительного ответа при ССГ. Необходимо отметить, что в СЖ экспериментальных животных происходит накопление метаболитов LA, образующихся в результате неферментативного окисления или процессинга под действием цитохромов в условиях ОС. Полученные данные согласуются с зафиксированным ранее увеличением уровня ПОЛ, а также снижением АОА СЖ при ССГ и свидетельствуют о важной роли ОС в механизме развития этого заболевания. Установлено, что подавляющее большинство воспалительных метаболитов LA, ALA и AA, содержание которых меняется в СЖ животных с ССГ, образуется в результате действия ферментов семейства LOX. Полученные данные позволяют предположить низкий терапевтический потенциал нестероидных противовоспалительных препаратов (мишенями которых являются COX) в отношении воспалительного компонента ССГ. В то же время можно ожидать высокую эффективность антиоксидантов и селективных ингибиторов LOX.

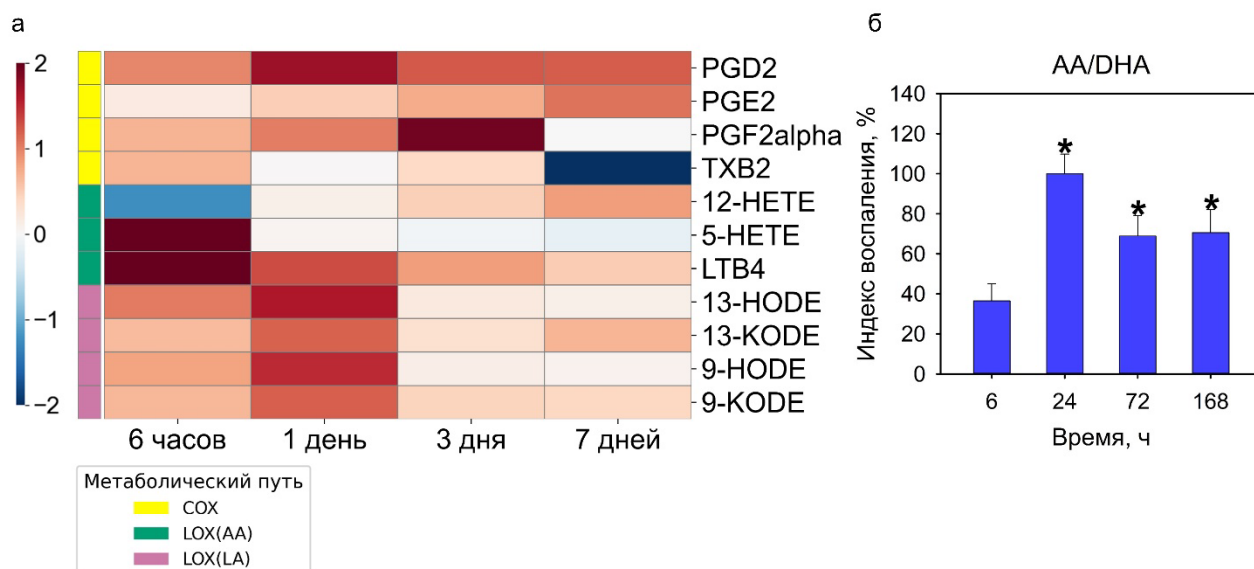


Рисунок 15 – Динамика профиля ПНЖК и оксипинов в СЖ животных после индукции ССГ: А – тепловая карта изменения содержания оксипинов; б – индекс воспаления (n=6). Различия достоверны: * - между временными точками $p < 0,05$ (дисперсионный анализ с повторными измерениями с тестом Тьюки) по сравнению с животными без ССГ

Таблица 5 – Концентрация ПНЖК и оксилипинов в СЖ здоровых кроликов

Показатель в слезе	Концентрация, нг/мл
AA	344,3±171,5*
DHA	10,3±11,7
EPA	28,1±26,5
PGA2+PGJ2	1±0,3
PGE2	28,8±14,3
PGD2	1,7±0,6
TXB3	0±0
TXB2	0,1±0,1
LTB4	2,7±2,2
12-HETE	30,5±23,6
11-HETE	3,5±2,5
5-HETE	0,3±0,3
12,13-DiHome	14,3±6,9
12,13-EpOME	1,9±1,6
9,10-DiHome	41,5±5
9,10-EpOME	3,1±2,3
13-HODE	141,5±53,8
13-KODE	21,5±22,1
9-HODE	153,1±66,7
9-KODE	53,1±7,4
9-HOTrE	3,7±1,9
13-HOTrE	3,6±2,4
Lyso-PAF	610,9±159,7
OEA	12,5±3,3
AEA	0,04±0,04

*Результаты представлены как средние значения ± стандартное отклонение (n = 6)

3.2. Выбор экспериментальной терапии ССГ, вызванного нарушением мигательного рефлекса и дизайн экспериментов

На основании полученных результатов мы можем предложить возможный патофизиологический механизм развития ССГ, вызванный нарушением мигательного рефлекса. Так блокирование мигательного рефлекса приводит к экспонированию роговицы к кислороду воздуха и в тоже время происходит увеличение гиперосмолярности СЖ и нестабильность слёзной пленки, что запускает каскад событий: изменение редокс-статуса СЖ, окислительное повреждение липидного слоя слёзной пленки, а также повреждение клеток и межклеточных контактов эпителия роговицы. Поэтому для проведения дальнейших испытаний было предложено несколько вариантов экспериментальной терапии заболевания. Поскольку аскорбиновая кислота вносит основной вклад в АОА СЖ и при ССГ наблюдается ее существенное снижение, в качестве первого варианта был выбран подход, заключающийся в восполнении уровня этого ключевого антиоксиданта. Также, с учетом наличия признаков окислительного повреждения клеточных мембран было признано целесообразным использование водорастворимого антиоксиданта ДМСО, который способен связываться с клеточной поверхностью и подавлять ПОЛ. На основании литературных данных о возможной патогенетической роли митохондриального ОС при ССГ нами было принято решение о проведении исследований с применением митохондриально-адресованного антиоксиданта SkQ1. По результатам анализа сигнального липидома в исследование был включен селективный ингибитор липоксигеназы N-[1-(1-бензотиен-2-ил)этил]-N-гидроксимочевина (Зилеутон).

Экспериментальную терапию проводили по следующей схеме (рис. 16). Сразу после индукции ССГ осуществляли инстилляции растворов, выбранных соединений в конъюнктивальный мешок по схеме 3 раза в день в течение семи дней. В случае антиоксидантов дополнительно проводили премедикацию соответствующими растворами за сутки до моделирования заболевания. Контроль развития патологического процесса осуществляли на клиническом и гистологическом уровнях. Одновременно проводили сбор образцов и биохимический анализ СЖ.

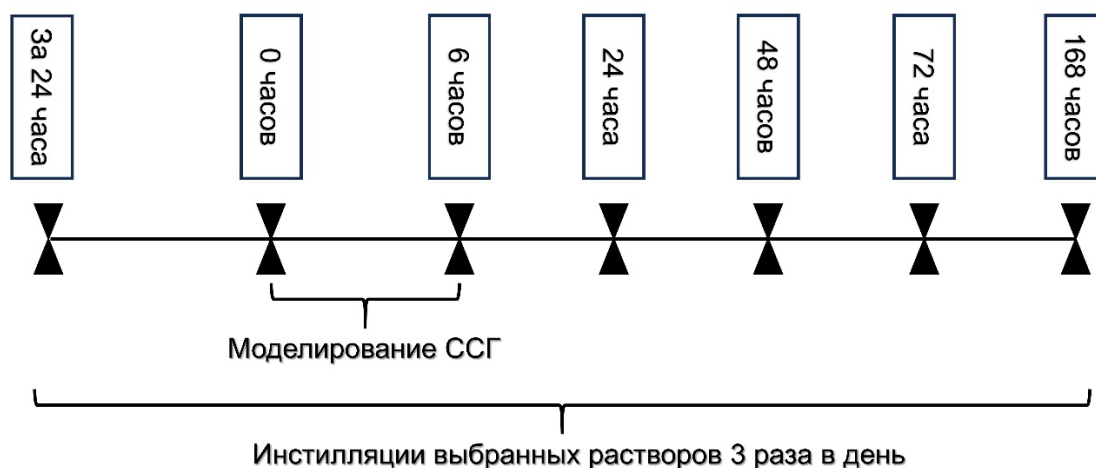


Рисунок 16 – Схема инстилляций выбранных растворов

3.3. Использование водорастворимых антиоксидантов при ССГ, вызванного нарушением мигательного рефлекса

Перед проведением терапии водорастворимыми антиоксидантами при ССГ, вызванном нарушением мигательного рефлекса, мы провели изучение антиоксидантной активности АК и ДМСО на двух распространенных тест-системах, чтобы подтвердить возможный механизм их действия на глазную поверхность. Как видно из представленных рисунков, красные и зеленые графики отображают накопление АФК в отсутствие и присутствии действующего вещества соответственно. Эксперимент показал, что добавление АК приводит к замедлению АФК в водной фазе. При этом ДМСО такой способностью не обладает. В то же время в модельной системе, имитирующей образование ПОЛ, ДМСО проявлял выраженный антиоксидантный эффект; АК оказалась недостаточно эффективной для подавления ПОЛ (синий и фиолетовый графики отображают накопление АФК в отсутствие и присутствии действующего вещества, соответственно) (рис. 17).

Отсюда можно сделать вывод, что АК и ДМСО имеют различный механизм действия. Используя хемилюминесцентный и флуориметрический методы, позволяющие определить антиоксидантную активность вещества, мы определили, что АК предположительно будет обладать способностью подавлять АФК в водном слое слезной пленки, тогда как ДМСО будет эффективно в подавлении образования продуктов ПОЛ.

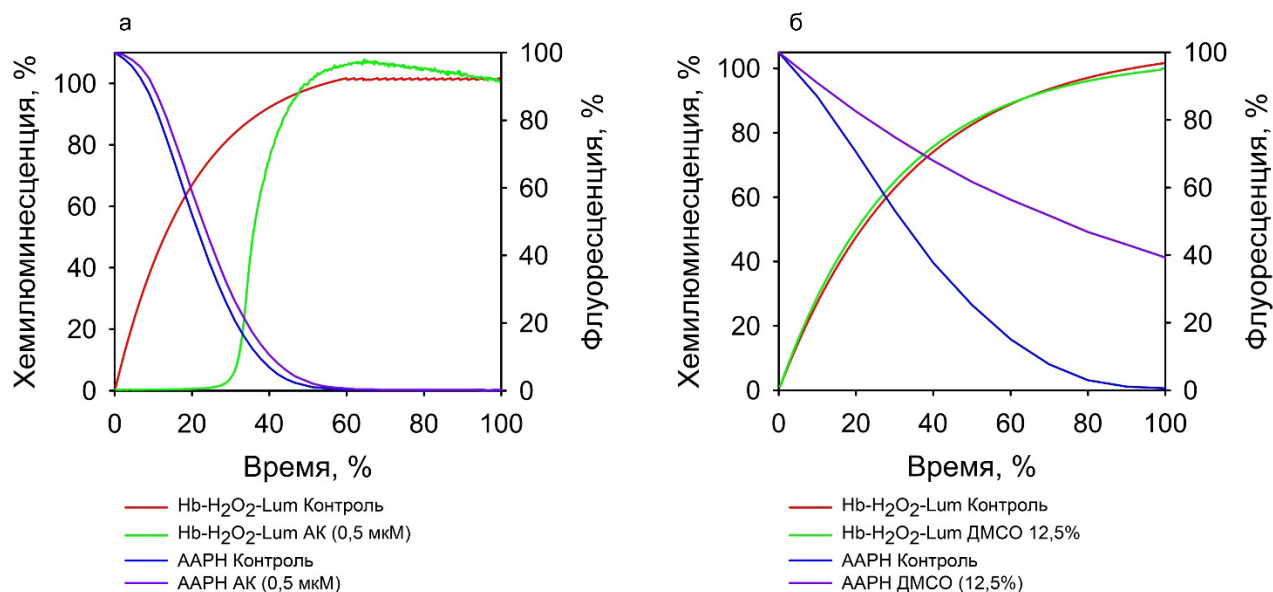


Рисунок 17 – Сравнение антиоксидантного действия АК и ДМСО: а – антиоксидантная активность АК; б – антиоксидантная активность ДМСО. Красные графики – кривые без антиоксиданта в системе гемоглобин-перекись водорода-люминол, зеленые – кривые с добавлением антиоксиданта в систему гемоглобин-перекись водорода-люминол, синие графики – кривые без антиоксиданта в системе ORAC, фиолетовые – кривые с добавлением антиоксиданта в систему ORAC

Не смотря на наше предположения о возможном терапевтическом действии аскорбиновой кислоты при ССГ. Нами не было обнаружено клинически значимых положительных эффектов при применении аскорбиновой кислоты перорально и в виде глазных капель на нашей модели. Эти наблюдения были подтверждены с помощью гистологического исследования. Через 24 часа после индукции ССГ не было достоверных различий между срезами роговицы без (рис. 18б) и при применении растворов 10 % аскорбинкой кислоты в виде глазных капель (рис. 18в) и перорально (рис. 18г). Однако методом хемилюминисценции мы выявили увеличение АОА в плазме крови через 2 часа после введения и не обнаружили ее повышения в слезе.

Местное и системное введение 10% раствора аскорбиновой кислоты не привело к значимому улучшению состояния роговицы в нашей модели, в связи с чем это соединение было исключено из дальнейшего рассмотрения. Возможным объяснением отсутствия местных эффектов может быть быстрая элиминация высоко растворимой аскорбиновой кислоты с глазной поверхности. При этом в случае перорального введения ее активность по нашим данным растет в плазме крови, однако не меняется в слезной жидкости животных, что не дает защитить глазную поверхность от повреждения.

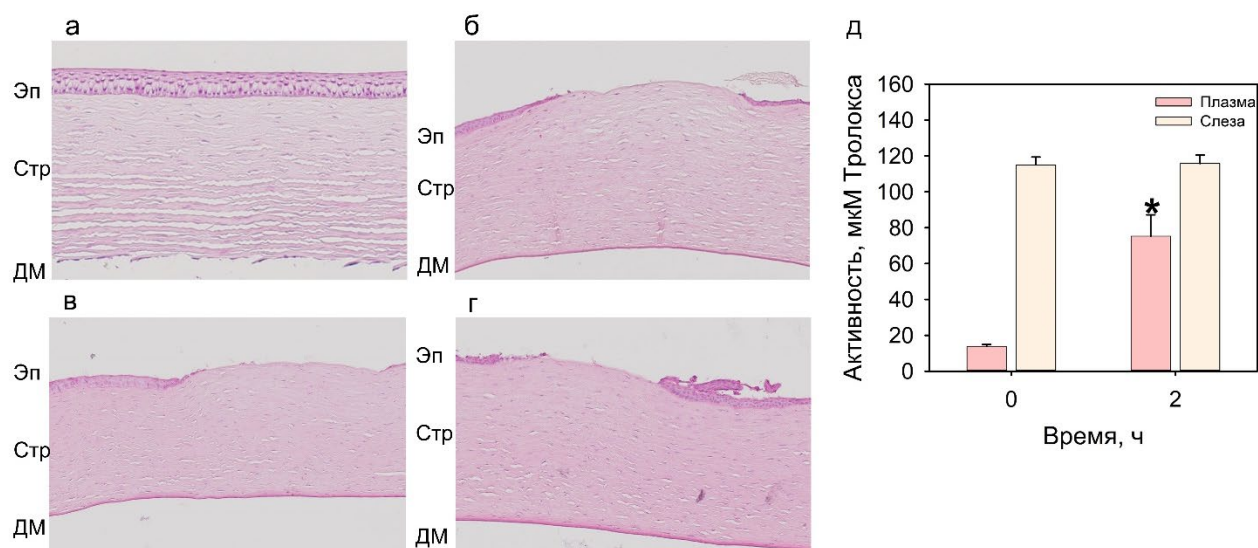


Рисунок 18 – Эффективность применения 10% раствора аскорбиновой кислоты при ССГ. Репрезентативные микроскопические изображения срезов роговицы, окрашенных гематоксилином и эозином: а – норма; роговица через 24 ч после начала инициации модели ССГ б – без терапии, в – местное применение АК, г – пероральное применение АК. Сокращения: Эп – эпителий роговицы, Стр – строма роговицы, ДМ – Десцеметова оболочка и эндотелий роговицы. Увеличение x200; д – антиоксидантная активность в плазме и СЖ после перорального введения АК у intactных животных. Данные на графике д представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$). Различия достоверны: * - $p < 0,05$ (парный t-тест)

В отличие от аскорбиновой кислоты, инстилляций 50% ДМСО давали выраженный терапевтический эффект, заметный как на клиническом, так и на гистологическом уровнях (рис. 19в). Через 24 часа после моделирования ССГ в срезах роговицы животных группы ДМСО содержали гораздо меньше зон денудации и признаков эпителиальной инфильтрации нейтрофилами по сравнению с животными группы ССГ (рис. 19в (Д1)). Также в группе ДМСО у кроликов регенерация роговицы начиналась раньше по сравнению с контрольной группой. Интересно, что его введение не оказывало влияния на антиоксидантную активность СЖ (рис. 19а), однако приводило к снижению концентрации малонового диальдегида (рис. 19б), что говорит об эффективном подавлении перекисного окисления липидов.

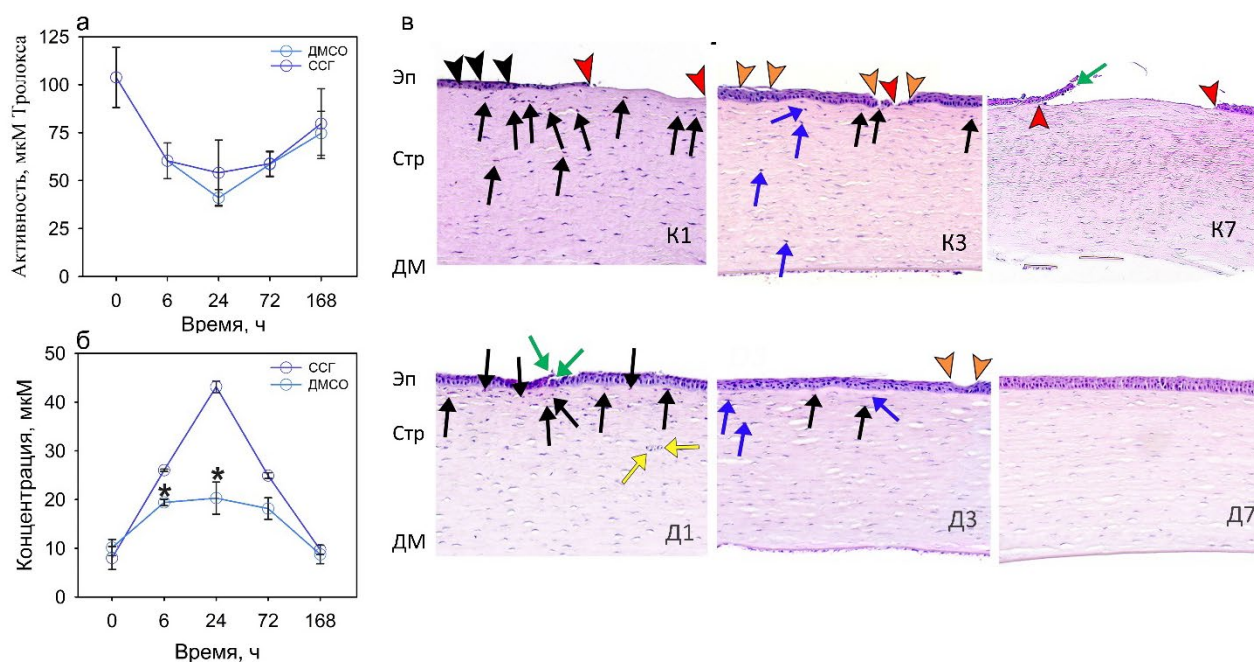


Рисунок 19 – Эффективность применения ДМСО при ССГ: динамика изменения в СЖ животных а – АОА, б – концентрации МДА. Данные на графиках а-б представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$). Различия достоверны: * - между временными точками $p < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ с тестом Тьюки) по сравнению с животными с ССГ без терапии; в - репрезентативные микроскопические изображения поперечных срезов роговицы, окрашенных гематоксилином и эозином: группа ССГ (К1, К3, К7), группа ДМСО (Д1, Д3, Д7) на 1,3 и 7 день после индукции. Красные стрелки - участки отсутствия эпителия роговицы, оранжевые – очаги разрушения эпителия роговицы, зеленые – участки реэпителизации, черные – гранулоцитарная инфильтрация в эпителии и строме роговицы, желтые – неоваскуляризация, синие – активация стромальных кератоцитов. Сокращения: Эп – эпителий, Стр – строма, ДМ – десцеметова оболочка и эндотелий роговицы. Увеличение $\times 200$

3.4. Зилеутон предотвращает накопление провоспалительных оксипинов в слёзной жидкости и ускоряет заживление глазной поверхности

Полученные данные анализа липидома слёзной жидкости свидетельствуют о том, что вызванная ОС провоспалительная реакция при ССГ инициируется в основном продуктами АА и LA. Эти оксипины синтезируются ферментативными путями, включая LOX и COX. Таким образом, для воздействия на воспаление можно использовать соединения, подавляющие активность этих ферментов. Используемые в настоящий момент ингибиторы COX, нестероидные противовоспалительные препараты, эффективны при различных формах воспаления глаз, но они могут осложнять течение ССГ, вызывая серьезные побочные эффекты [160, 196]. Поэтому мы сосредоточились на ингибировании LOX пути метаболизма ПНЖК. Для решения этой задачи мы выбрали Зилеутон – противоастматический препарат, который избирательно ингибирует 5-LOX и

тем самым подавляет выработку лейкотриенов, в том числе LTB₄. Также это вещество снижает уровень простагландинов, что является преимуществом препарата выбора [197].

Поскольку Зилеутон никогда ранее не применялся в офтальмологии и является плохо растворимым в водных растворах веществом, мы предприняли попытку создать растворимую форму для инстилляций с использованием ДМСО, который, по нашим данным, эффективен в подавлении образования продуктов ПОЛ, что может создать комбинированное терапевтическое средство. Преимуществом использования ДМСО также является его способность хорошо проникать в ткани и обеспечивать проникновение других соединений через биологические мембраны. Нами было установлено, что использование раствора, содержащего до 50% ДМСО, не вызывает побочных реакций при местном применении в офтальмологии (см. раздел 3.3.). Таким образом нам впервые удалось создать растворимую форму Зилеутона, которая может быть использована для местного применения в виде глазных капель: 0,5 мг/мл (0,05%) Зилеутона в физиологическом растворе, содержащем 50% ДМСО. Предварительно проведенные токсикологические исследования полученной инстилляционной формы Зилеутона показали хорошую переносимость и отсутствие токсических реакций на глазную поверхность.

Описанные свойства ДМСО давали синергические эффекты при его совместном применении с Зилеутоном в концентрации 0,05%, где ДМСО также использовался в качестве вспомогательного компонента, повышающего растворимость. По данным гистологических исследований инстилляций этого комбинированного препарата помимо выраженной заживляющей способности приводило к снижению количества нейтрофилов в роговице, что отражает противовоспалительное действие Зилеутона. Эти наблюдения согласуются с результатами биохимического и липидного анализа СЖ: оба соединения не влияют на АОА (рис. 20в), однако снижают соотношение АА/ДНА (рис. 20г), что говорит о подавлении воспалительного процесса. Более того, анализ липида СЖ показал, что ДМСО ингибирует образование липидных медиаторов – продуктов СОХ, в то время как Зилеутон снижает уровень метаболитов LOX (рис. 20а), в частности лейкотриена В₄, который отвечает за миграцию нейтрофилов в очаг поражения (рис. 20б).

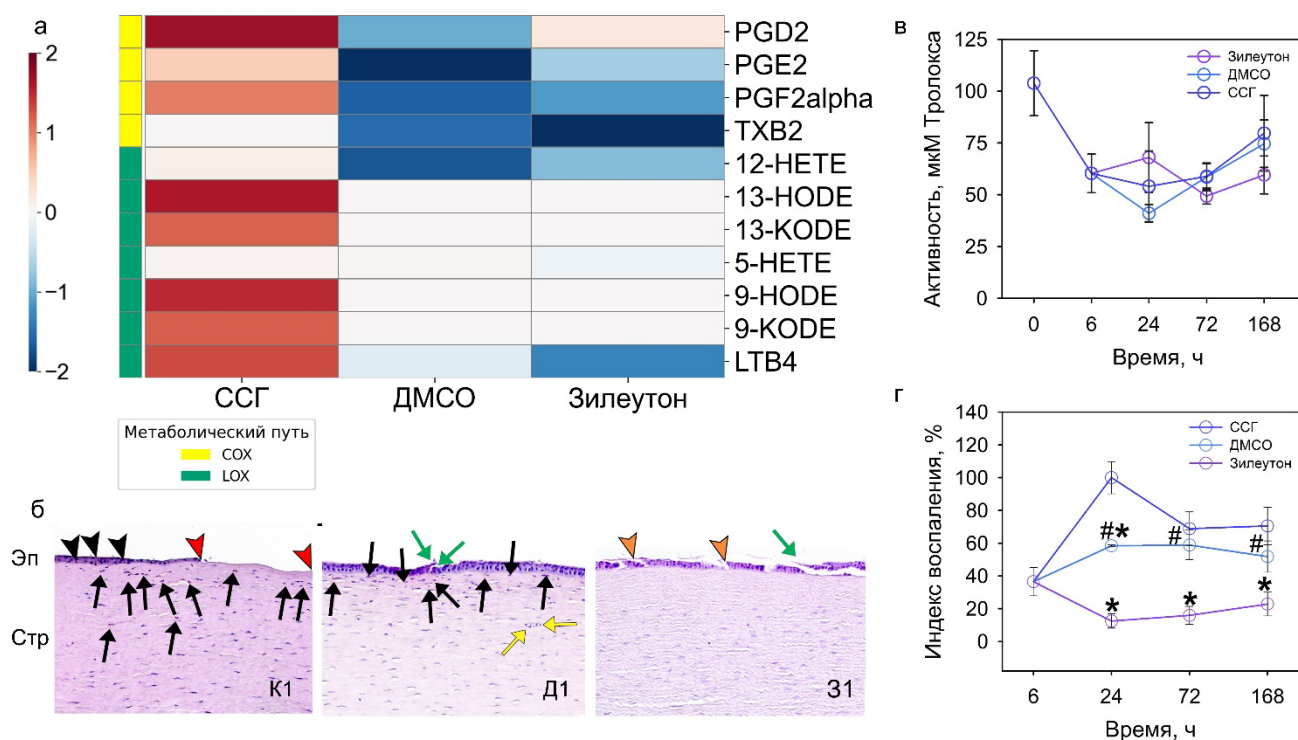


Рисунок 20 – использование ингибитора липоксигеназы-Зилеутон при ССГ: А – тепловая карта СЖ животных через 24 часа после индукции ССГ по сравнению с интактными животными; б - Репрезентативные микроскопические изображения поперечных срезов роговицы, окрашенных гематоксилином и эозином. ССГ (К1), ДМСО (Д1), Зилеутон (31) через 24 часа после индукции модели. Красные стрелки - участки отсутствия эпителия роговицы, зеленые – участки реэпителизации, черные – гранулоцитарная инфильтрация в эпителии и строме роговицы. Сокращения: Эп – эпителий, Стр – строма. Увеличение $\times 200$; в – динамика изменения АОА в СЖ; г – индекс воспаления в СЖ. Данные на графиках в-г представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$). Различия достоверны: * - между временными точками $p < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ с тестом Тьюки) по сравнению с животными с ССГ без терапии, # - между временными точками $p < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ с тестом Тьюки) по сравнению с животными с Зилеутоном

В целом, можно заключить, что описанный двухкомпонентный препарат обладает эффективным действием при ССГ, подавляя воспалительный процесс, вызванный окислительным стрессом.

3.5. Применение SkQ1 при ССГ, вызванном нарушением мигательного рефлекса, оказывает выраженное терапевтическое действие

Для оценки эффективности глазных капель с SkQ1 мы использовали несколько концентраций. Предварительные исследования показали, что инстилляций растворов SkQ1 в концентрациях 0,25, 2,5 и 7,5 мкМ хорошо переносились животными; признаков токсического действия на ткани глаза в использованных условиях не выявлено.

Клинический осмотр проводили с помощью флуоресцентного теста. Можно заметить, что премедикация SkQ1 оказывала выраженное защитное действие на роговицу,

которое усиливалось с увеличением концентрации препарата (рис. 21). Эти наблюдения согласуются с результатами гистологического исследования роговицы. На срезах роговицы видно, что у животных в группах SkQ1 не наблюдалось очагов полного разрушения эпителия, тогда как у животных в группе контроля уже через 6 часов после индукции очаги были (рис. 21). Незначительные изменения включали наличие единичных апоптотических клеток и, как следствие, уменьшение толщины эпителия роговицы. Наименьшее уменьшение толщины эпителия наблюдалось при использовании 7,5 мкМ SkQ1, таким образом премедикация и последующее лечение соответствующим препаратом в этой концентрации позволяет практически полностью сохранить эпителий роговицы при ССГ (рис. 22). Поэтому для дальнейших исследований мы выбрали концентрацию SkQ1 7,5 мкМ.

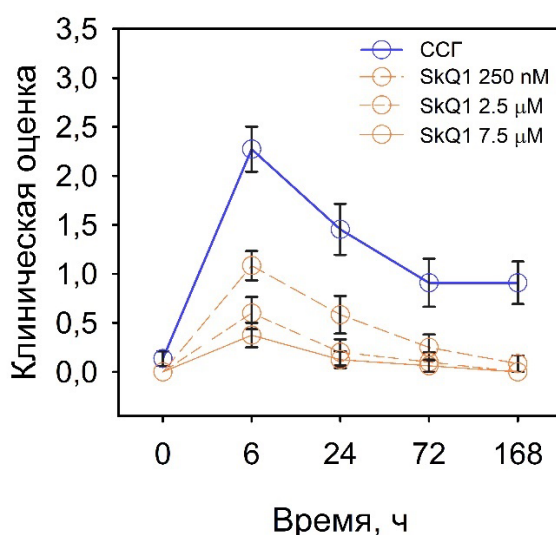


Рисунок 21 – Оценка клинической картины при применении 0,25, 2,5 и 7,5 мкМ SkQ1 в баллах

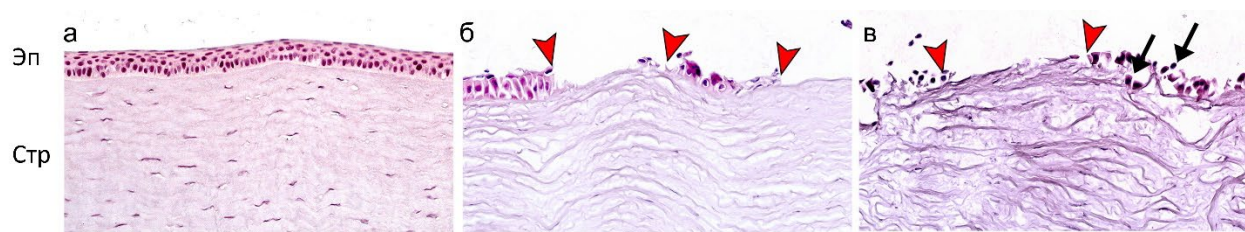
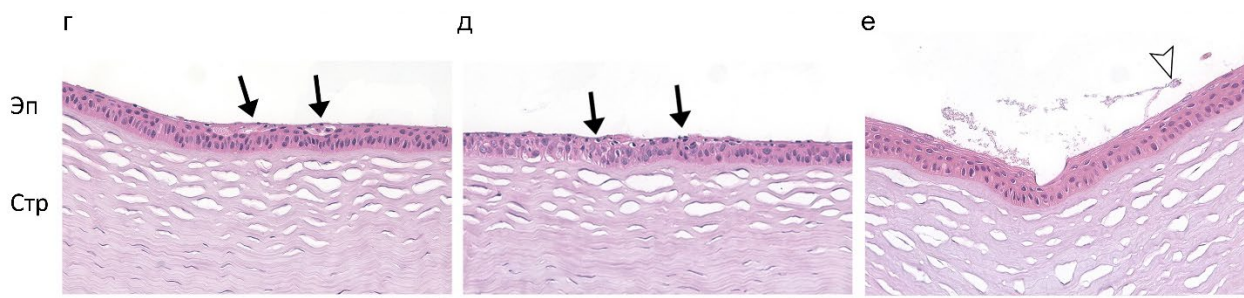


Рисунок 22 – Выбор концентрации SkQ1 для профилактики ССГ. Репрезентативные микроскопические изображения поперечных срезов роговицы, окрашенных гематоксилином и эозином: а – норма; б и в – ССГ;



Продолж. рисунка 22 – Выбор концентрации SkQ1 для профилактики ССГ. Репрезентативные микроскопические изображения поперечных срезов роговицы, окрашенных гематоксилином и эозином: г – 0,25 мкМ SkQ1; д – 2,5 мкМ SkQ1, е – 7,5 мкМ SkQ1. Красные стрелки – участки отсутствия эпителия роговицы, черные стрелки – преднекротические и апоптотические изменения, белые стрелки – десквамация поверхностных клеток эпителия. Сокращения: Эп – эпителий, Стр – строма роговицы. Увеличение: $\times 400$; масштабная линейка 50 мкм

В основе эффекта SkQ1 лежит его выраженное антиоксидантное действие, которое отражается в повышении антиоксидантной активности (рис. 23а) и активности супероксиддисмутазы (рис. 23б) в слёзной жидкости, а также в многократном снижении уровня малонового диальдегида (рис. 23в).

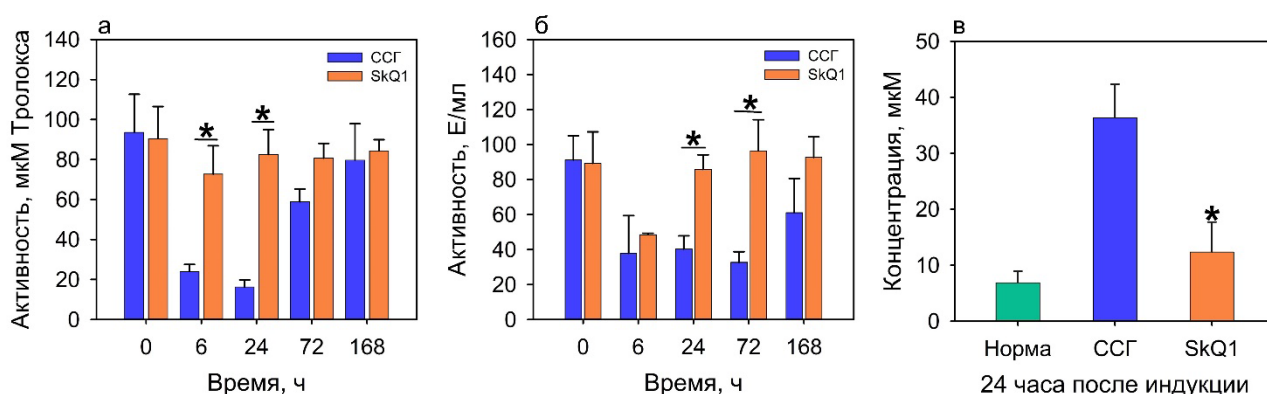


Рисунок 23 – SkQ1 подавляет нарушение окислительно – восстановительного баланса при ССГ, динамика изменения в СЖ животных: а – АОО; б – активности СОД; в – накопления МДА. Данные на графиках а-в представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$). Различия достоверны: * - между временными точками $p < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ с тестом Тьюки) по сравнению с животными с ССГ без терапии

Примечательно, что по данным теста с метиленовым синим применение SkQ1 уменьшало нарушение барьерной функции эпителия роговицы (рис. 24а). Поскольку ММП-9 может участвовать в повреждении эпителиального барьера, далее была исследована система ММП-9/ТИМП-1. В присутствии SkQ1 снижалась желатинолитическая активность, соответствующая ММП-9 (рис. 24б), и ограничивалось повышение концентрации ММП-9 в слёзной жидкости (рис. 24в). Одновременно

применение SkQ1 ослабляло снижение концентрации ТИМП-1 и способствовало её последующему восстановлению (рис. 24г). В результате в ряде временных точек снижалось отношение ММП-9/ТИМП-1 (рис. 24д). Эти изменения могут вносить вклад в сохранение барьерной функции эпителия роговицы при применении SkQ1

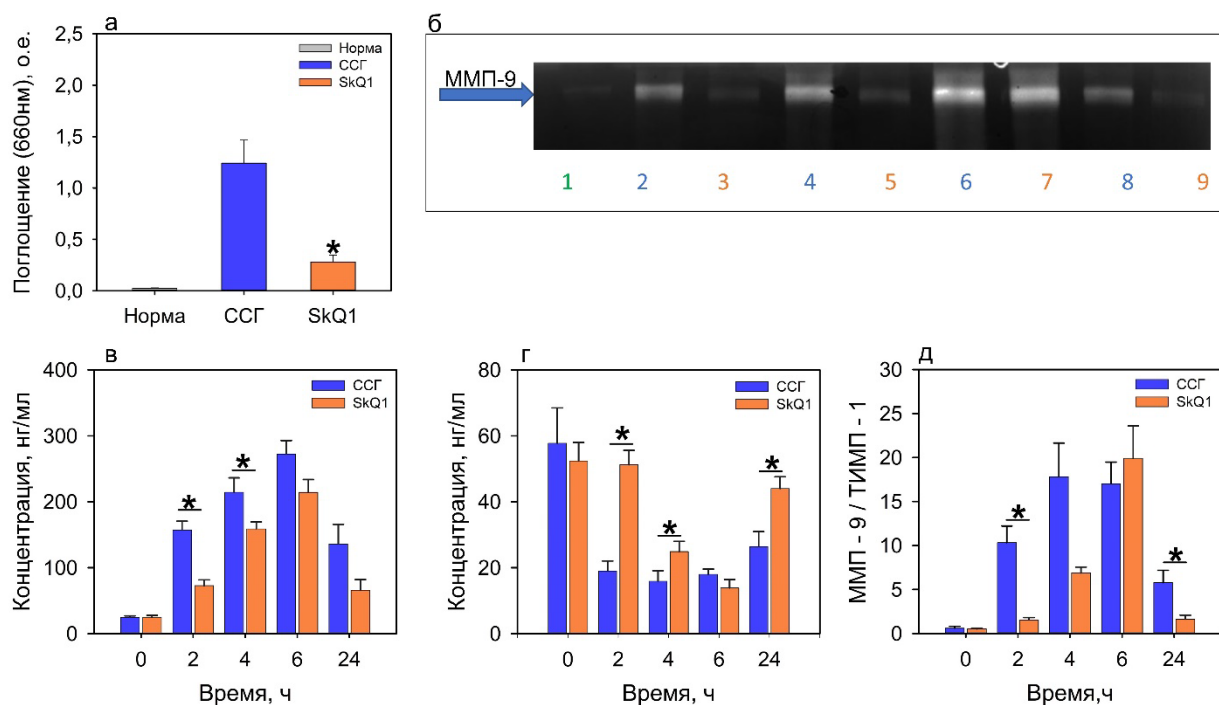


Рисунок 24 – SkQ1 предотвращает разрушение межклеточных контактов в роговице: а – сорбция роговицы к метиленовому синему; б – желатиновая зимограмма СЖ (1 – норма, 2 и 3 – ССГ и SkQ1 через 2 часа, 4 и 5 – ССГ и SkQ1 через 4 часа, 6 и 7 – ССГ и SkQ1 через 6 часов, 8 и 9 – ССГ и SkQ1 через 24 часа после индукции модели; в – ММП-9, г – ТИМП-1; д – стехиометрия ММП-9 к ТИМП-1 в СЖ. Данные на графиках в-д представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$). Различия достоверны: * - между временными точками $p < 0,05$ (непарный t-тест) по сравнению с животными с ССГ без терапии

Наконец, SkQ1 демонстрирует выраженное противовоспалительное действие при ССГ. Применение SkQ1 сопровождалось выраженным снижением провоспалительного ответа. По данным липидного и иммуноферментного анализа снижалось содержание ряда провоспалительных оксилипинов в СЖ. В частности, уменьшались концентрации PGE2, PGF2 α и LTB4, а также снижался индекс воспаления, рассчитанный на основании соотношения арахидоновой и докозагексаеновой кислот (рис. 25а–д). Таким образом, можно заключить, что SkQ1 обладает широким действием и является наиболее эффективным средством для профилактики и лечения ССГ, в том числе вызванного нарушением мигательного рефлексa.

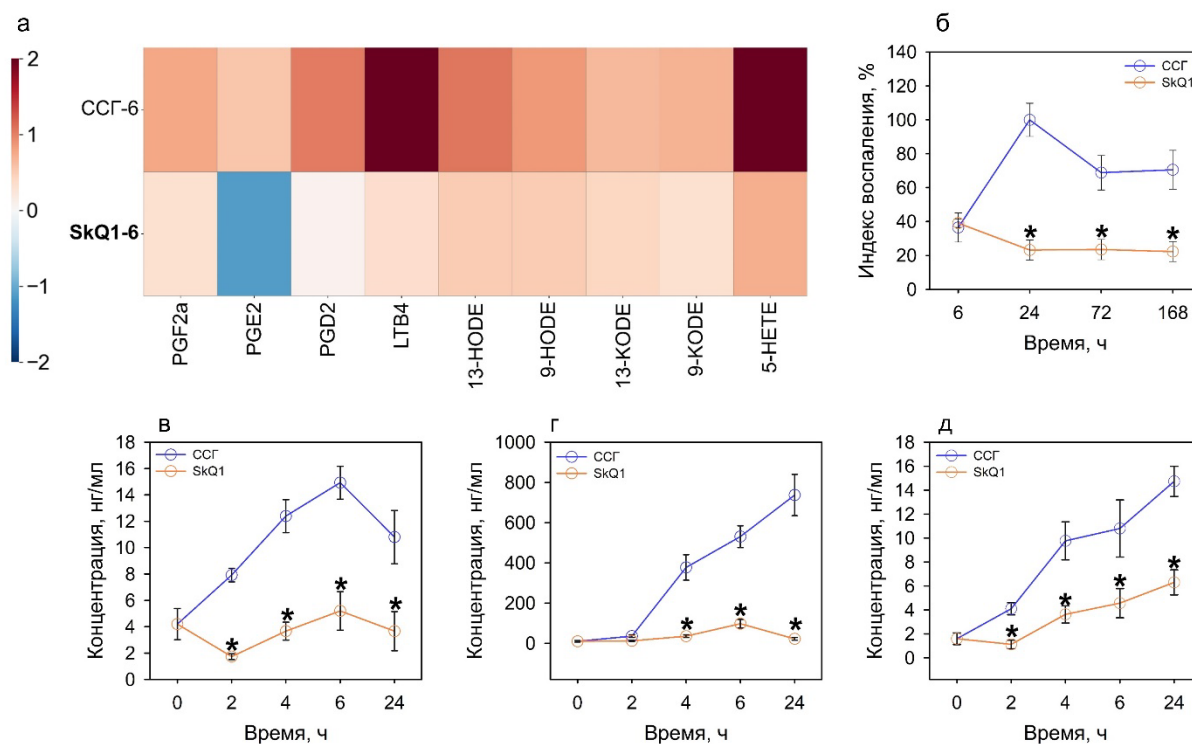


Рисунок 25 – динамика содержания липидных медиаторов в СЖ при применении SkQ1: а - тепловая карта изменения содержания оксилипинов в СЖ через 6 часов после начала индукции ССГ по результатам ВЭЖХ-МС/МС; б – соотношение арахидоновой к докозагексаеновой кислоте в СЖ; результаты ИФА в – динамика изменения LTB4 в СЖ; г – динамика изменения PGE2 в СЖ; д - динамика изменения PGF2α в СЖ. Данные на графиках б-д представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$). Различия достоверны: * - между временными точками $p < 0,05$ (непарный t-тест) по сравнению с животными с ССГ без терапии

4. ОБСУЖДЕНИЕ

ССГ является одной из разновидностей заболеваний глазной поверхности, сопровождающейся изменением биохимического состава слёзной пленки, повреждением, обезвоживанием и воспалением, в том числе роговицы [129]. В последнее время среди этиологий ССГ у людей всех возрастов наблюдается существенный рост, связанный с нарушением мигательного рефлекса. Нарушение мигательного рефлекса вызвано прежде всего не смыканием век при неполном моргании. Нормальная частота мигательных движений и полное смыкание век при этом способствуют формированию, распределению и обновлению слёзной пленки, а также предотвращению ее быстрого испарения с глазной поверхности. При нарушении мигательного рефлекса происходит экспозиционная кератопатия. Экспозиционная кератопатия может возникать как нейротрофическая (при параличе V черепного нерва, аневризме, нарушении мозгового кровообращения, рассеянном склерозе, опухоли, простом герпесе, опоясывающем лишае), так и нейропаралитическая (при параличе VII черепного нерва), ятрогенная (при общей или местной анестезии, офтальмохирургии), при неправильном положении век (характерно для лагофтальма, проптоза) или во время использования цифровых экранов [121, 198-200]. Патологическими осложнениями при ССГ, вызванном нарушением мигательного рефлекса, являются хемоз конъюнктивы, эрозии роговицы, инфекционный кератит и даже перфорация роговицы [126, 200].

Несмотря на то, что были проведены многочисленные исследования ССГ, в большинстве работ внимание было сосредоточено на дефиците водной части слезы или моделях с дефицитом слёзопродукции [111, 201]. В течение последних нескольких лет внимание исследователей уделялось роли воспаления в патогенезе дефицита водного слоя слёзной пленки, поэтому для лечения ССГ были предложены противовоспалительные препараты в сочетании с использованием искусственных слез [202]. Что касается испарительного типа заболевания, большинство исследований было сосредоточено на дисфункции мейбомиевых желез и иссушающем стрессе с воздействием на секрецию слёзной жидкости. Однако в этих моделях экспериментальные животные могли свободно моргать [114]. Были разработаны и другие экспериментальные модели ССГ у животных, но ни одна из них не имитировала состояние, при котором нарушается мигательный рефлекс. По этой причине разработка новой модели ССГ на

лабораторных животных, при которой нарушается мигательный рефлекс, а именно частота моргания и закрытие век, при этом глазная поверхность экспонируется воздействию кислорода воздуха в течение определенного периода времени, оставалась актуальной.

Человек способен подавить безусловный мигательный рефлекс и делает это каждый день: читая книгу, находясь за рулем автомобиля или работая за экранами визуального отображения. Физиологической функцией мигательного рефлекса является формирование, распределение и обновление слёзной пленки. В диссертационной работе нами впервые разработана экспериментальная модель ССГ, вызванного нарушением мигательного рефлекса. В работе показано, что при нарушении мигательного рефлекса происходит рост осмолярности СЖ, ведущий к развитию окислительного стресса на глазной поверхности и каскаду других событий, характерных для ССГ.

Согласно данным сорбции флуоресцеина натрия в разработанной нами экспериментальной модели ССГ, первичные дефекты эпителия роговицы наблюдались уже через 1 час после начала экспозиции глазной поверхности. Наиболее выраженные клинические признаки патологического процесса наблюдались через 6 часов после начала моделирования заболевания. Патологические изменения нарастали в течение первых суток, после чего начинался процесс регенерации ткани. Полное восстановление роговицы (глазная поверхность не окрашивалась красителем) через 7 дней. Согласно гистологическому исследованию, патологический процесс, как правило, проявлялся в десквамации или дегенерации клеток, гибели клеток и отделении умирающих клеток от базальной мембраны. Повреждения выражались в истончении слоев эпителия роговицы или его полном отсутствии. Признаки апоптотической и некротической гибели клеток чаще всего обнаруживались в слоях крыловидных клеток и базальном слое эпителия роговицы. Однако повреждение не распространялось на строму, тем самым представляя собой эрозию роговицы, а не язву. При нарушении мигательного рефлекса повреждения эпителия роговицы, описанные в экспериментальной модели, наблюдаются у пациентов с ССГ или лагофталмом и могут быть осложнениями после блефаропластики [203-205]. Поэтому следующие эксперименты проводили по схеме: моделирование заболевания длилось в течение 6 часов, затем мы наблюдали за регенерацией тканей и динамикой изменения показателей в слёзной жидкости через 24, 72 и 168 часов.

Разработанная нами модель ССГ характеризуется ускоренным испарением слезы и увеличением ее осмолярности ($338,5 \pm 5,1$ мОсм/л). Осмолярность СЖ у кроликов возвращается к исходным значениям через 48 часов после начала моделирования заболевания. Для пациентов с ССГ значения осмолярности слезы могут достигать 316-350 мОсм/л [194, 206]. Этот показатель подтверждает степень соответствия нашей модели изучаемому заболеванию. Интактный эпителий роговицы имеет межклеточные плотные соединения и обеспечивает барьерную функцию для предотвращения дегидратации клеток эпителия или инфицирование. Уже в первые часы после начала экспозиции на фоне гиперосмолярности слезы наблюдалось нарушение плотных межклеточных контактов. Это было установлено с помощью сорбции метиленового синего роговицей спустя 2 часа после начала моделирования. На основании этого наблюдения мы предположили, что при развитии патологического процесса происходит увеличение активности ферментов, разрушающие внеклеточный матрикс, основными из которых являются матриксные металлопротеиназы.

ММП являются ферментами, участвующими в разрушении компонентов внеклеточного матрикса при воспалении. Было показано, что концентрация ММП-9 в слезной жидкости значительно повышена у пациентов с заболеваниями эпителия роговицы, в том числе при ССГ [207]. Мы продемонстрировали, что в нашей экспериментальной модели ССГ происходит резкое увеличение активности и концентрации ММП-9; на фоне этого происходит снижение его ингибитора ТИМП-1. Кроме того, соотношение фермента и его ингибитора подтверждает то, что баланс смещается в сторону преобладания активности ММП-9. Полученные данные указывают на то, что ММП-9 может играть роль в патогенезе ССГ, вызванного нарушением мигательного рефлекса, приводя к снижению барьерной функции эпителия роговицы. Вероятно, это происходит из-за ускоренной потери поверхностных клеток эпителия роговицы, связанных плотными контактами, в результате протеолитического расщепления окклюдина. Показано, что АФК, особенно перекисное окисление липидов, могут стимулировать секрецию ММП-9, а использование антиоксидантной терапии позволяет подавить этот процесс [208, 209]. Также избыточная секреция ММП-9 на глазной поверхности связана с повышением уровня провоспалительного цитокина фактора некроза опухоли- α и активацией сигнального пути митоген-активируемой протеинкиназы p38 [210]. Одним из возможных подходов терапии ССГ может быть

использование ингибиторов ММП-9, включая инстилляций ТИМП-1. Это направление представляет интерес для будущих исследований.

В настоящем исследовании нами было проведено исследование, направленное на количественное определение содержания в СЖ здоровых кроликов низкомолекулярных антиоксидантов и активности ключевых ферментов антиоксидантной защиты. С помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимическим детектированием установлено, что основными антиоксидантами СЖ являются аскорбиновая кислота (572 ± 62 мкМ), мочева кислота (218 ± 24 мкМ), глутатион (81 ± 16 мкМ) и цистеин (48 ± 8 мкМ). Полученные концентрации низкомолекулярных антиоксидантов при сравнении с содержанием этих веществ в слёзной жидкости человека, известными ранее по литературным данным, сопоставимы, а именно: аскорбиновая кислота (665 мкМ), мочева кислота (328 мкМ), глутатион (107 мкМ) и цистеин (48 мкМ) [211]. Далее был охарактеризован вклад выявленных соединений в АОА СЖ. Мы показали, что основной вклад в АОА СЖ вносит аскорбиновая кислота: ее вклад составляет более 60%. В нашем исследовании мы показали, что в СЖ здоровых животных среди ключевых ферментов антиоксидантной защиты высокой активностью обладает только СОД3. Присутствие каталазы и глутатионпероксидазы в СЖ кроликов выявлено не было. Полученные результаты согласуются с литературными данными об антиоксидантных ферментах в СЖ человека; единственным обнаруженным антиоксидантным ферментом первой линии защиты является СОД. Также авторы указывают, что в слёзной пленке отсутствуют ферментные системы, которые могли бы обеспечить существенную защиту роговицы и самой слёзной пленки от окислительного действия перекиси водорода [152].

Последующие исследования показали, что при моделировании ССГ происходит снижение уровня низкомолекулярных антиоксидантов СЖ в следующей последовательности: цистеин и глутатион, аскорбиновая кислота и мочева кислота. Тем самым мы впервые показали последовательное истощение низкомолекулярных антиоксидантов в СЖ у животных с экспериментальным ССГ, вызванным нарушением мигательного рефлекса. На основании этого мы можем предположить, что выявленное нами накопление ключевого маркера ОС МДА в СЖ при моделировании ССГ может быть связано со снижением содержания низкомолекулярных антиоксидантов. Ранее было определено, что в слёзной жидкости пациентов с кератоконусом — невоспалительным

заболеванием роговицы, которое сопровождается структурными изменениями в ткани и связано с окислительным стрессом, — выявлено значительное снижение уровня глутатиона и повышение уровня мочевой кислоты по сравнению с контрольной группой [212].

Накопление продуктов ПОЛ может указывать на возможную активацию метаболизма ПНЖК и их окисленных метаболитов – оксилипинов. Этот важный класс липидных медиаторов вместе с другими сигнальными молекулами, такими как цитокины и хемокины, регулирует воспалительный процесс, в том числе на глазной поверхности. Сообщалось, что воспаление глазной поверхности может быть связано с изменениями содержания оксилипинов в СЖ, но их обнаружение в течение многих лет методологически ограничивалось отдельными молекулами [213]. С помощью разработанного нами метода количественного определения ПНЖК и их оксилипинов в СЖ с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией мы впервые провели комплексный липидный анализ в образцах слезы пациентов и кроликов без воспаления глаз и сравнили их профили. Это позволило впервые количественно детектировать более 20 таких соединений. В последнее время было предпринято несколько попыток охарактеризовать липидом слезы человека с помощью жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрии [214, 215], и наши данные в целом совпадают и дополняют результаты этих исследований. В одной из работ, посвященной оксилипинам СЖ, сообщалось об обнаружении четырех ПНЖК и тридцати их производных, включая все оксилипины АА, идентифицированные в нашем исследовании [214]. По всей вероятности, это связано с иной методикой экстракции СЖ и другим объемом образца. Зато мы дополнительно идентифицировали производные LA и ALA, тем самым значительно расширив понимание состава липидных медиаторов в СЖ человека. Кроме того, наше исследование является первым, в котором всесторонне охарактеризованы метаболиты ПНЖК и их оксилипинов в СЖ кролика. Проведённый нами сравнительный анализ показал сходство липидного состава СЖ кроликов с таковым у человека, что является дополнительным подтверждением релевантности нашей модели.

Оксилипины являются продуктами ферментативной активности COX, LOX, монооксигеназ цитохрома P450 и АФК. АА является предшественником медиаторов воспалительного ответа. Активность COX генерирует простагландины, тогда как ферменты LOX катализируют образование лейкотриенов и гидроксид-эйкозатетраеновых

кислот [216]. Ранее у пациентов с ССГ было выявлено достоверное увеличение в СЖ шести продуктов метаболизма АА, включая 5-НЕТЕ и LTB₄ [214], которые также были обнаружены у экспериментальных животных. Кроме того, наши результаты дополняют эти данные, поскольку мы обнаружили значительное увеличение еще двух простагландинов, PGD₂ и PGF_{2α}, а также 12-НЕТЕ. В целом, принимая во внимание наши результаты и существующие литературные данные, мы можем сделать вывод, что воспалительный ответ при ССГ регулируется оксипиринами 5-НЕТЕ и LTB₄ (продукты 5-LOX), 12-НЕТЕ (продукт 12-LOX), а также PGD₂, PGE₂ и PGF_{2α} (продукты COX). Важно отметить, что наиболее выраженные изменения были выявлены для оксипиринов, являющихся продуктами LOX. В СЖ животных с экспериментальным ССГ наблюдается также рост уровня продуктов 13-HODE, 13-KODE, 9-HODE, 9-KODE, что может указывать на действие LOX и/или АФК, подтверждая, что неразрывно протекают процессы: развитие окислительного стресса и воспаление. Считается, что соотношение АА (провоспалительный ответ) к DHA (противовоспалительный ответ) может указывать на развитие или разрешение воспалительного процесса [217]. В СЖ животных с экспериментальным ССГ соотношение АА/DHA увеличивается в СЖ на фоне развития патологического процесса и достигает максимального значения через 24 часа.

Таким образом, согласно результатам, мы можем предложить возможный патофизиологический механизм развития ССГ, вызванного нарушением мигательного рефлекса. А именно, блокирование мигательного рефлекса приводит к нарушению распределения и обновления слёзной пленки, увеличению испарения и уровня осмолярности, что запускает каскад событий: изменение редокс-статуса СЖ, окислительное повреждение липидного слоя слёзной пленки, воспаление, а также повреждение клеток и межклеточных контактов эпителия роговицы. Вместе с тем нам удалось создать новую модель ССГ, которая отражает этиологические особенности развития заболевания у пациентов. Также данная модель может представлять потенциальный интерес для поиска новых терапевтических подходов для лечения пациентов с нарушением физиологии мигательного рефлекса.

В совокупности окислительный стресс опосредует повреждение роговицы, регулирующую гибель клеток и воспалительные каскады посредством различных путей воздействия, выступая в качестве ключевого механизма в патогенезе и прогрессировании

ССГ. Поэтому антиоксидантная терапия может стать многообещающей стратегией в профилактике и лечении ССГ этой этиологии.

Нами было предложено несколько вариантов экспериментальной терапии заболевания:

1. Поскольку аскорбиновая кислота является доминирующим низкомолекулярным антиоксидантом и вносит основной вклад в АОА СЖ, а в условиях нарушения физиологии мигательного рефлекса и при ССГ наблюдается ее существенное снижение ее содержания, в качестве первого варианта был выбран подход, заключающийся в восполнении уровня этого ключевого соединения. Аскорбиновая кислота является природным водорастворимым веществом, которое играет важную роль в ряде физиологических и метаболических функций организма. Поскольку аскорбиновая кислота служит основной антиоксидантной молекулой, она защищает ткани от свободных радикалов, которые образуются в процессе метаболизма или при развитии различных заболеваний и травм [218]. Аскорбиновая кислота играет важную роль в биосинтезе коллагена: она выступает в качестве кофактора для ферментов в процессе гидроксилирования. Ее присутствие может стимулировать биосинтез компонентов внеклеточного матрикса и пролиферацию фибробластов [219]. Как пероральное, так и местное применение этого антиоксиданта может уменьшить послеоперационное помутнение стромы роговицы после фотоабляции эксимерным лазером [220, 221]. Все это указывало на перспективность выбранного подхода.
2. ДМСО мы решили испытать на нашей модели, так как было выявлено наличие признаков окислительного повреждения клеточных мембран, в частности, накопление МДА в СЖ. Поэтому было признано целесообразным использование водорастворимого антиоксиданта ДМСО, который способен связываться с клеточной поверхностью. Также по литературным данным известно, что это вещество позволяет клеткам легче переносить дегидратацию, взаимодействует с липидными мембранами и предотвращает ПОЛ [222].
3. По результатам анализа сигнального липидома СЖ в исследование был включен селективный ингибитор LOX – Зилеутон

4. Митохондриально-адресованный антиоксидант SkQ1 обладает повышенной проницаемостью в клетки и способен накапливаться в митохондриях

Аскорбиновая кислота

Местное и системное введение 10% раствора аскорбиновой кислоты не привело к значимому улучшению состояния роговицы в нашей модели ССГ. Поэтому это соединение было исключено из дальнейшего рассмотрения. Возможным объяснением отсутствия местных эффектов может быть быстрая элиминация высоко растворимой аскорбиновой кислоты с глазной поверхности. А при пероральном применении раствора аскорбиновой кислоты ее содержание в слёзной жидкости не изменяется, судя по результатам определения АОА.

Зилеутон и ДМСО

В нашем исследовании мы показали безопасность инстилляций ДМСО на ткани глаза. Также нами впервые была продемонстрирована высокая эффективность ДМСО для подавления образования ПОЛ в СЖ при ССГ. Ранее было показано, что 40% раствор ДМСО имеет противовоспалительное действие при экспериментальном ожоге роговицы у кроликов и приводит к ускорению реэпителизации роговицы [223]. В совокупности это позволило нам сделать заключение о возможности создания инстилляционных форм, содержащих ДМСО в качестве вспомогательного и дополнительного вещества для плохо растворимых в водных средах препаратов и, в частности, Зилеутона.

Зилеутон - единственный специфический ингибитор 5-LOX, одобренный FDA США на момент начала настоящей работы [224]. Предложенный подход дал выраженный терапевтический эффект, предотвращая инфильтрацию нейтрофилами и другие признаки воспаления, тем самым ускоряя заживление роговицы. Основные механизмы включали селективное ингибирование воспаления, не влияя на антиоксидантную активность. Несмотря на то, что нами были разработаны глазные капли с ДМСО и Зилеутоном, а также проведено их изучение, требуются ещё дополнительные исследования для более детального выяснения действия этих компонентов при ССГ, вызванном нарушением мигательного рефлекса. Кроме того, выраженное действие ДМСО дополнило введение Зилеутона; это привело к существенному улучшению терапевтического эффекта глазных капель в условиях экспериментальной модели ССГ. Так, по нашим гистологическим данным, в группе ДМСО признаки воспаления, такие как инфильтрация нейтрофилами и

неоваскуляризация, сохранялись в течение 24-72 часов, тогда как в группе Зилеутона эти признаки отсутствовали. Так, Зилеутон оказывал дополнительные, более специфические противовоспалительные эффекты. В частности, таким эффектом Зилеутона было снижение содержания в СЖ провоспалительного медиатора LTB₄. Было показано, что этот оксипролин регулирует воспаление в глазу, секретирясь в эпителии роговицы, конъюнктивы и мейбомиевой железе в ответ на действие липополисахаридов [225]. Учитывая, что LTB₄ был установлен в качестве ключевого фактора в рекрутинге нейтрофилов и эффекторных Т-клеток, его подавление Зилеутоном может специфически ограничивать, в частности, Т-клеточный ответ при хроническом ССГ. [226]. Таким образом, в целом можно сделать вывод, что высокая эффективность предложенной комплексной терапии обусловлена синергетическим действием ее компонентов - ДМСО и Зилеутона. Общее действие ДМСО включает подавление простагландинов и ПОЛ. Между тем, Зилеутон сдерживает цитокин-зависимые воспалительные механизмы, по-видимому, тормозит Т-клеточный ответ посредством селективного ингибирования LTB₄. Основываясь на этих данных, мы предполагаем, что предложенный терапевтический подход может рассматриваться в будущем как один из перспективных методов лечения ССГ.

SkQ1

Помимо обеспечения клеток энергией, митохондрии принимают участие в регуляции многих сигнальных каскадов, запускаемых ОС, и остаются основным источником АФК [227]. В соответствии с этим, митохондрии рассматриваются как привлекательные мишени для антиоксидантной терапии при различных патологических процессах. Поскольку митохондрии непроницаемы для природных антиоксидантов, недавно были разработаны новые подходы к их целевой доставке в органеллы [228, 229]. Первая стратегия заключалась в использовании пептидной структуры, цель которой — «притягивать» и нейтрализовывать АФК. Во-вторых, были синтезированы мембранопроницаемые катионы для транспортировки низкомолекулярных антиоксидантов к этим органеллам. Последние соединения продемонстрировали свою эффективность, например, в предотвращении АФК-индуцированных модификаций кардиолипина, ключевого фосфолипидного компонента митохондрий и общей мишени окисления [230]. В настоящем исследовании мы использовали митохондриально-адресованный антиоксидант SkQ1, который был разработан ранее с использованием

второго подхода. В его состав входит природный антиоксидант пластохинон, конъюгированный с транспортной молекулой трифенилфосфонием, что обеспечивает проникновение препарата в клетку и его накопление в митохондриях [228].

Наши гистологические данные показали, что инстилляции 7,5 мкМ SkQ1 предотвращали повреждение роговицы путем ингибирования некротических, пренекротических и апоптотических изменений в эпителии роговицы. Аналогичная защитная активность SkQ1 была продемонстрирована для ряда тканей. Например, он проявлял заметный защитный эффект при инфаркте сердца и почек, вызванном ишемией/реперфузией, а также при ишемическом инсульте или почечной недостаточности [231]. Кроме того, антиапоптотическая активность SkQ1 по отношению к нейронам была продемонстрирована на моделях болезни Альцгеймера и возрастной ретинопатии [232]. Мы показали, что инстилляции SkQ1 позволяют стабилизировать уровень ТИМП-1 в СЖ при ССГ, вызванном нарушением мигательного рефлекса, что коррелирует с улучшением клинической картины глазной поверхности, а также с сохранением барьерной функции эпителия роговицы. На основании полученных нами результатов мы предположили, что ТИМП-1 участвует в патологическом процессе ССГ. Для подтверждения этого предположения необходимы дальнейшие исследования.

Применение SkQ1 в нашей экспериментальной модели ССГ привело к существенному улучшению состояния качества СЖ по данным биохимических исследований. В частности, он не допускал снижения уровня АОА и СОД в СЖ. Поддержание антиоксидантного статуса СЖ осуществлялось также в снижении уровня накопления МДА в СЖ. SkQ1 тормозил развитие провоспалительных реакций на глазной поверхности, обнаруживаемых в СЖ. В частности, его применение подавляло накопление в СЖ провоспалительных оксилипинов (LTB₄, PGE₂ и PGF_{2α}).

Подводя итог проведенных исследований на разработанной нами новой модели ССГ, вызванного блокированием мигательного рефлекса мы впервые показали, что развитие патологического процесса сопровождается снижением антиоксидантной защиты СЖ и развитием окислительного стресса. Наши данные также свидетельствуют в пользу инициации провоспалительных реакций и инфильтрации нейтрофилов на глазной поверхности, что при длительном нарушении мигательного рефлекса может привести к развитию хронического воспаления. Важное наблюдение, которое было нами сделано, предполагает участие в развитии нарушения межклеточных контактов эпителия

роговицы ММП-9 и его ингибитора ТИМП-1. Сопоставляя клинические, гистологические и биохимические данные можно говорить о возможном использовании разработанной нами модели для более детальных исследований механизмов развития и создание с ее помощью новых терапевтических подходов для лечения ССГ, вызванного нарушением мигательного рефлекса. В частности, с использованием нашей модели, мы подтвердили возможную роль ОС и воспаления в развитии ССГ, вызванном нарушением мигательного рефлекса. Нами впервые было показано, что использование ингибиторов LOX может оказать положительное действие на ССГ. Мы впервые показали эффективность применения митохондриально-адресованного антиоксиданта SkQ1 при нарушении мигательного рефлекса. С учетом наших данных SkQ1 может найти более широкое применение в офтальмологической практике, где в настоящее время он используется при ССГ, вызванного дефицитом слёзопroduкции.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная диссертационная работа была посвящена изучению механизмов развития окислительного стресса и его патогенетической роли при синдроме сухого глаза, связанном с нарушением мигательного рефлекса, а также поиску подходов для его коррекции. В первой части нашей работы мы разработали экспериментальную модель ССГ, вызванного нарушением мигательного рефлекса. На этой модели мы обнаружили, что нарушение паттернов мигательного рефлекса приводит к значительным повреждениям эпителия роговицы, которые проявляются уже через 3 часа после начала индукции модели. Интактный эпителий роговицы имеет плотные межклеточные соединения и служит основным барьером роговицы от окружающей среды и внешних факторов. Гистологические исследования показали, что эпителиальные клетки роговицы подвергались апоптозу и обнажали строму этой ткани через 6 часов после нарушения мигательного рефлекса. Основываясь на полученных результатах, была разработана следующая схема моделирования заболевания: животные находились в условиях общей анестезии при 30% влажности воздуха, нарушение мигательного рефлекса достигалось с помощью векорасширителей, и экспозиция глазной поверхности осуществлялась в течение 6 часов. Затем оценивалась динамика регенерации роговицы и изменения показателей в слёзной жидкости через 24, 72 и 168 часов. Ключевым результатом исследования стало выявление окислительного стресса как возможного патогенетического фактора развития ССГ, связанного с нарушением мигательного рефлекса. Выявлены низкомолекулярные антиоксиданты (аскорбиновая кислота, глутатион, мочесвая кислота, цистеин) и показано, что более 60% в общую антиоксидантную активность вносит аскорбиновая кислота, высокой активностью обладает супероксиддисмутаза в слёзной жидкости. При развитии ССГ происходит снижение концентрации низкомолекулярных антиоксидантов и общей антиоксидантной активности, а также падает супероксиддисмутазная активность; в это же время происходит накопление малонового диальдегида в слёзной жидкости. Это исследование является первым, в котором проведено количественное определение сигнальных липидных медиаторов в слёзной жидкости у людей и кроликов в отсутствие воспаления глаз и проведено сравнение их профилей. Это позволило впервые одновременно детектировать до 23 и 24 соединений в слёзной жидкости человека и кроликов.

Сравнительный анализ показал сходство липидного состава (19 соединений) слезы кроликов с таковым у человека, что является дополнительным подтверждением использования этого вида для изучения динамики изменений липидома слёзной жидкости и тестирования методов лечения воспалительных заболеваний глазной поверхности человека. Разработанный метод позволил выявить изменения профиля ПНЖК и оксилипинов при развитии ССГ. В слёзной жидкости кроликов уже через 6 часов после начала моделирования был выявлен рост простагландинов E2, F2 α , D2, лейкотриена B4 и 5-HETE, а также 9- и 13-HODE, 9- и 13-KODE. Наблюдаемые изменения указывали на инициацию воспалительного процесса глазной поверхности, что, в частности отражается в соотношении арахидоновой к докозагексаеновой кислоте: преобладание арахидоновой кислоты достигает максимальных значений через 24 часа после моделирования заболевания. Продемонстрирована возможная ключевая роль липидных продуктов липоксигеназного пути метаболизма арахидоновой и линолевой кислот при развитии воспаления глазной поверхности при ССГ, вызванном нарушением мигательного рефлекса. На основании полученных результатов мы предложили возможный патофизиологический механизм развития синдрома сухого глаза, вызванный нарушением мигательного рефлекса. А именно нарушение паттернов мигательного рефлекса приводит к экспонированию роговицы к кислороду воздуха и одновременно происходит увеличение гиперосмолярности слезы и нестабильность слёзной пленки, что запускает каскад событий: изменение редокс-статуса слезы, окислительное повреждение липидного слоя слёзной пленки, а также повреждение клеток и межклеточных контактов поверхности роговицы. Поэтому для проведения дальнейших испытаний было выбрано несколько вариантов экспериментальной терапии заболевания. По результатам анализа сигнального липидома в исследование был включен селективный ингибитор липоксигеназы – Зилеутон. С учетом наличия признаков окислительного повреждения клеточных мембран было признано целесообразным использование водорастворимого антиоксиданта ДМСО, который способен связываться с клеточной поверхностью, а также антиоксиданта SkQ1, обладающего повышенной проницаемостью в клетки и способностью накапливаться в митохондриях.

Мы показали высокую эффективность комплексной терапии диметилсульфоксидом и Зилеутоном. Действие ДМСО заключается в подавлении образования малонового диальдегида, продукта перекисного окисления липидов, а также

синтеза простагландинов в слёзной жидкости. В то же время Зилеутон, по-видимому, сдерживает инфильтрацию роговицы нейтрофилами за счет снижения уровня образования лейкотриена В₄ и способствует разрешению воспаления с помощью повышения уровня докозагексаеновой кислоты в слёзной жидкости. Таким образом, эти соединения действуют синергетически, охватывая практически все аспекты механизма, лежащего в основе воспалительной реакции при ССГ. На основании этих данных мы предполагаем, что предложенный терапевтический подход в будущем может стать одним из перспективных методов лечения ССГ.

Впервые показано, что SkQ1 снижает уровень матричной металлопротеиназы-9 в слёзной жидкости, что помогает сохранять межклеточные контакты и барьерную функцию эпителия роговицы при нарушении мигательного рефлекса. Наконец, мы описали новые свойства SkQ1, такие как способность повышать активность низкомолекулярных антиоксидантов, супероксиддисмутазы, подавлять накопление продуктов перекисного окисления липидов и провоспалительных оксилипинов в слёзной жидкости. В совокупности наши результаты демонстрируют эффективность применения глазных капель с 7,5 мкМ SkQ1 для профилактики ССГ, вызванного нарушением мигательного рефлекса.

6. ВЫВОДЫ

1. Нарушение мигательного рефлекса приводит к развитию ССГ у кроликов, характеризуется выраженными клинико-морфологическими изменениями роговицы и нарушением барьерной функции глазной поверхности, а также сопровождается биохимическими изменениями в слёзной жидкости, ведущими к развитию окислительного стресса и провоспалительному ответу.
2. При ССГ, вызванном нарушением мигательного рефлекса, происходит изменение липидного состава и индекса воспаления слёзной жидкости; ключевую роль в этом выполняют ферменты семейства липоксигеназ.
3. Местное введение ДМСО оказывает выраженное действие на клиническую картину заболевания и подавляет накопление продуктов перекисного окисления липидов в слёзной жидкости.
4. Применение высокоспецифичного ингибитора 5-липоксигеназы – Зилеутона оказывает явное положительное действие на накопление провоспалительных оксилипинов в слёзной жидкости на фоне нарушения мигательного рефлекса.
5. Митохондриально-адресованный антиоксидант SkQ1 препятствует развитию окислительного стресса и накоплению провоспалительных медиаторов в слёзной жидкости, а также сохраняет барьерную функцию эпителия роговицы.

7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АК – аскорбиновая кислота

АО – антиоксиданты

АОА – антиоксидантная активность

АФК – активные формы кислорода

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemной масс - спектрометрией

ДМСО – диметилсульфоксид

ИФА – иммуноферментный анализ

МДА – малоновый диальдегид

МК – мочевая кислота

ММП-9 – металлопротеиназа 9

ОС – окислительный стресс

ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СЖ – слёзная жидкость

СОД – супероксиддисмутаза

ССГ – синдром сухого глаза

ТИМП-1 – тканевый ингибитор 1 типа

ФНО- α – фактор некроза опухоли альфа

АА – арахидоновая кислота

4-HNE – 4-гидрокси-2-ноненал

СОХ – циклооксигеназы

СYP – монооксигеназа цитохрома P450

DHA – докозагексаеновая кислота

DiHODE – дигидроксиоктадекадиеновые кислоты

DiHOME – дигидроксиоктадекамоноеновые кислоты

EPA – эйкозапентаеновая кислота

EpODE – эпоксиоктадекадиеновые кислоты

EpOME – эпоксиоктадекамоноеновые кислоты

HETE – гидроксикоизотетраеновые кислоты

HODE – гидроксиктадекадиеновые кислоты

HOTrE – гидроксиктадекатриеновые кислоты

HrODE – гидропероксиктадекадиеновые кислоты

HrOTrE – гидропероксиктадекатриеновые кислоты

LOX – липоксигеназы

LT – лейкотриены

LTB₄ – лейкотриен B₄

MAPK – митоген-активируемые протеинкиназы

NF-κB – ядерный фактор «каппа-би»

PG – простагландины

8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kels B. D., Grzybowski A., Grant-Kels J. M. Human ocular anatomy // Clin Dermatol. – 2015. – Т. 33, № 2. – С. 140-6.
2. Bourne R. R. A., Flaxman S. R., Braithwaite T., Cicinelli M. V., Das A., Jonas J. B., Keeffe J., Kempen J. H., Leasher J., Limburg H., Naidoo K., Pesudovs K., Resnikoff S., Silvester A., Stevens G. A., Tahhan N., Wong T. Y., Taylor H. R., Vision Loss Expert G. Magnitude, temporal trends, and projections of the global prevalence of blindness and distance and near vision impairment: a systematic review and meta-analysis // Lancet Glob Health. – 2017. – Т. 5, № 9. – С. e888-e897.
3. Craig J. P., Nichols K. K., Akpek E. K., Caffery B., Dua H. S., Joo C. K., Liu Z., Nelson J. D., Nichols J. J., Tsubota K., Stapleton F. TFOS DEWS II Definition and Classification Report // Ocul Surf. – 2017. – Т. 15, № 3. – С. 276-283.
4. Bashir H., Seykora J. T., Lee V. Invisible Shield: Review of the Corneal Epithelium as a Barrier to UV Radiation, Pathogens, and Other Environmental Stimuli // J Ophthalmic Vis Res. – 2017. – Т. 12, № 3. – С. 305-311.
5. Kureshi A. K., Dziasko M., Funderburgh J. L., Daniels J. T. Human corneal stromal stem cells support limbal epithelial cells cultured on RAFT tissue equivalents // Sci Rep. – 2015. – Т. 5. – С. 16186.
6. Eghrari A. O., Riazuddin S. A., Gottsch J. D. Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development // Prog Mol Biol Transl Sci. – 2015. – Т. 134. – С. 7-23.
7. Lu N., Lin F., Huang Z., He Q., Han W. Changes of Corneal Wavefront Aberrations in Dry Eye Patients after Treatment with Artificial Lubricant Drops // J Ophthalmol. – 2016. – Т. 2016. – С. 1342056.
8. Meloni M., De Servi B., Marasco D., Del Prete S. Molecular mechanism of ocular surface damage: application to an in vitro dry eye model on human corneal epithelium // Mol Vis. – 2011. – Т. 17. – С. 113-26.
9. Kheirkhah A., Saboo U. S., Abud T. B., Dohlman T. H., Arnoldner M. A., Hamrah P., Dana R. Reduced Corneal Endothelial Cell Density in Patients With Dry Eye Disease // Am J Ophthalmol. – 2015. – Т. 159, № 6. – С. 1022-1026 e2.
10. Gipson I. K. Goblet cells of the conjunctiva: A review of recent findings // Prog Retin Eye Res. – 2016. – Т. 54. – С. 49-63.
11. Zhang X., Volpe E. A., Gandhi N. B., Schaumburg C. S., Siemasko K. F., Pangelinan S. B., Kelly S. D., Hayday A. C., Li D. Q., Stern M. E., Niederkorn J. Y., Pflugfelder S. C., De Paiva C. S. NK cells promote Th-17 mediated corneal barrier disruption in dry eye // PLoS One. – 2012. – Т. 7, № 5. – С. e36822.

12. Lee M. J., Ko A. Y., Ko J. H., Lee H. J., Kim M. K., Wee W. R., Khwarg S. I., Oh J. Y. Mesenchymal stem/stromal cells protect the ocular surface by suppressing inflammation in an experimental dry eye // *Mol Ther.* – 2015. – T. 23, № 1. – C. 139-46.
13. Pflugfelder S. C., Corrales R. M., de Paiva C. S. T helper cytokines in dry eye disease // *Exp Eye Res.* – 2013. – T. 117. – C. 118-25.
14. Volpe E. A., Henriksson J. T., Wang C., Barbosa F. L., Zaheer M., Zhang X., Pflugfelder S. C., de Paiva C. S. Interferon-gamma deficiency protects against aging-related goblet cell loss // *Oncotarget.* – 2016. – T. 7, № 40. – C. 64605-64614.
15. Xuan J., Shen L., Malyavantham K., Pankewycz O., Ambrus J. L., Jr., Suresh L. Temporal histological changes in lacrimal and major salivary glands in mouse models of Sjogren's syndrome // *BMC Oral Health.* – 2013. – T. 13. – C. 51.
16. Alghadyan A., Aljindan M., Alhumeidan A., Kazi G., McMhon R. Lacrimal glands in cystic fibrosis // *Saudi J Ophthalmol.* – 2013. – T. 27, № 2. – C. 113-6.
17. Knop N., Knop E. [Meibomian glands. Part I: anatomy, embryology and histology of the Meibomian glands] // *Ophthalmologe.* – 2009. – T. 106, № 10. – C. 872-83.
18. Knop E., Knop N., Schirra F. [Meibomian glands. Part II: physiology, characteristics, distribution and function of meibomian oil] // *Ophthalmologe.* – 2009. – T. 106, № 10. – C. 884-92.
19. Borchman D., Foulks G. N., Yappert M. C., Milliner S. E. Differences in human meibum lipid composition with meibomian gland dysfunction using NMR and principal component analysis // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2012. – T. 53, № 1. – C. 337-47.
20. Chang M., Lee H., Park M. S., Baek S. The clinical characteristics and new classification of sticky eyelid syndrome in East Asian patients // *Acta Ophthalmol.* – 2014. – T. 92, № 8. – C. e667-70.
21. Geerling G., Tauber J., Baudouin C., Goto E., Matsumoto Y., O'Brien T., Rolando M., Tsubota K., Nichols K. K. The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on management and treatment of meibomian gland dysfunction // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2011. – T. 52, № 4. – C. 2050-64.
22. Bolanos-Jimenez R., Navas A., Lopez-Lizarraga E. P., de Ribot F. M., Pena A., Graue-Hernandez E. O., Garfias Y. Ocular Surface as Barrier of Innate Immunity // *Open Ophthalmol J.* – 2015. – T. 9. – C. 49-55.
23. Zhou L., Beuerman R. W. Tear analysis in ocular surface diseases // *Prog Retin Eye Res.* – 2012. – T. 31, № 6. – C. 527-50.
24. McDermott A. M. Antimicrobial compounds in tears // *Exp Eye Res.* – 2013. – T. 117. – C. 53-61.
25. Braun R. J., King-Smith P. E., Begley C. G., Li L., Gewecke N. R. Dynamics and function of the tear film in relation to the blink cycle // *Prog Retin Eye Res.* – 2015. – T. 45. – C. 132-64.

26. VanderWerf F., Brassinga P., Reits D., Aramideh M., Ongerboer de Visser B. Eyelid movements: behavioral studies of blinking in humans under different stimulus conditions // *J Neurophysiol.* – 2003. – T. 89, № 5. – C. 2784-96.
27. Liu H., Begley C. G., Chalmers R., Wilson G., Srinivas S. P., Wilkinson J. A. Temporal progression and spatial repeatability of tear breakup // *Optom Vis Sci.* – 2006. – T. 83, № 10. – C. 723-30.
28. Stahl U., Willcox M., Stapleton F. Osmolality and tear film dynamics // *Clin Exp Optom.* – 2012. – T. 95, № 1. – C. 3-11.
29. Willmann G., Schatz A., Fischer M. D., Schommer K., Zrenner E., Bartz-Schmidt K. U., Gekeler F., Gekeler K. Exposure to high altitude alters tear film osmolarity and breakup time // *High Alt Med Biol.* – 2014. – T. 15, № 2. – C. 203-7.
30. Lee Y. B., Koh J. W., Hyon J. Y., Wee W. R., Kim J. J., Shin Y. J. Sleep deprivation reduces tear secretion and impairs the tear film // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2014. – T. 55, № 6. – C. 3525-31.
31. Fortes M. B., Diment B. C., Di Felice U., Gunn A. E., Kendall J. L., Esmaeelpour M., Walsh N. P. Tear fluid osmolarity as a potential marker of hydration status // *Med Sci Sports Exerc.* – 2011. – T. 43, № 8. – C. 1590-7.
32. Walsh N. P., Fortes M. B., Raymond-Barker P., Bishop C., Owen J., Tye E., Esmaeelpour M., Purslow C., Elghenzai S. Is whole-body hydration an important consideration in dry eye? // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2012. – T. 53, № 10. – C. 6622-7.
33. Li L., Braun R. J., Driscoll T. A., Henshaw W. D., Banks J. W., King-Smith P. E. Computed tear film and osmolarity dynamics on an eye-shaped domain // *Math Med Biol.* – 2016. – T. 33, № 2. – C. 123-57.
34. Wolffsohn J. S., Arita R., Chalmers R., Djalilian A., Dogru M., Dumbleton K., Gupta P. K., Karpecki P., Lazreg S., Pult H., Sullivan B. D., Tomlinson A., Tong L., Villani E., Yoon K. C., Jones L., Craig J. P. TFOS DEWS II Diagnostic Methodology report // *Ocul Surf.* – 2017. – T. 15, № 3. – C. 539-574.
35. Szalai E., Berta A., Szekanecz Z., Szucs G., Modis L., Jr. Evaluation of tear osmolarity in non-Sjogren and Sjogren syndrome dry eye patients with the TearLab system // *Cornea.* – 2012. – T. 31, № 8. – C. 867-71.
36. Chao W., Belmonte C., Benitez Del Castillo J. M., Bron A. J., Dua H. S., Nichols K. K., Novack G. D., Schrader S., Willcox M. D., Wolffsohn J. S., Sullivan D. A. Report of the Inaugural Meeting of the TFOS i(2) = initiating innovation Series: Targeting the Unmet Need for Dry Eye Treatment // *Ocul Surf.* – 2016. – T. 14, № 2. – C. 264-316.
37. Suzuki M., Massingale M. L., Ye F., Godbold J., Elfassy T., Vallabhajosyula M., Asbell P. A. Tear osmolarity as a biomarker for dry eye disease severity // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2010. – T. 51, № 9. – C. 4557-61.

38. McMonnies C. W. Conjunctival Tear Layer Temperature, Evaporation, Hyperosmolarity, Inflammation, Hyperemia, Tissue Damage, and Symptoms: A Review of an Amplifying Cascade // *Curr Eye Res.* – 2017. – T. 42, № 12. – C. 1574-1584.
39. Tan J. H., Ng E. Y., Acharya U. R. Evaluation of tear evaporation from ocular surface by functional infrared thermography // *Med Phys.* – 2010. – T. 37, № 11. – C. 6022-34.
40. Ozdemir M., Temizdemir H. Age- and gender-related tear function changes in normal population // *Eye (Lond).* – 2010. – T. 24, № 1. – C. 79-83.
41. McCulley J. P., Aronowicz J. D., Uchiyama E., Shine W. E., Butovich I. A. Correlations in a change in aqueous tear evaporation with a change in relative humidity and the impact // *Am J Ophthalmol.* – 2006. – T. 141, № 4. – C. 758-60.
42. Tomlinson A., Doane M. G., McFadyen A. Inputs and outputs of the lacrimal system: review of production and evaporative loss // *Ocul Surf.* – 2009. – T. 7, № 4. – C. 186-98.
43. Cerretani C. F., Ho N. H., Radke C. J. Water-evaporation reduction by duplex films: application to the human tear film // *Adv Colloid Interface Sci.* – 2013. – T. 197-198. – C. 33-57.
44. Lam S. M., Tong L., Reux B., Duan X., Petznick A., Yong S. S., Khee C. B., Lear M. J., Wenk M. R., Shui G. Lipidomic analysis of human tear fluid reveals structure-specific lipid alterations in dry eye syndrome // *J Lipid Res.* – 2014. – T. 55, № 2. – C. 299-306.
45. Kunnen C. M., Brown S. H., Lazon de la Jara P., Holden B. A., Blanksby S. J., Mitchell T. W., Papas E. B. Influence of Meibomian Gland Expression Methods on Human Lipid Analysis Results // *Ocul Surf.* – 2016. – T. 14, № 1. – C. 49-55.
46. Butovich I. A. Tear film lipids // *Exp Eye Res.* – 2013. – T. 117. – C. 4-27.
47. Brown S. H., Kunnen C. M., Duchoslav E., Dolla N. K., Kelso M. J., Papas E. B., Lazon de la Jara P., Willcox M. D., Blanksby S. J., Mitchell T. W. A comparison of patient matched meibum and tear lipidomes // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2013. – T. 54, № 12. – C. 7417-24.
48. Rantamaki A. H., Holopainen J. M. The Effect of Phospholipids on Tear Film Lipid Layer Surface Activity // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2017. – T. 58, № 1. – C. 149-154.
49. Rantamaki A. H., Seppanen-Laakso T., Oresic M., Jauhiainen M., Holopainen J. M. Human tear fluid lipidome: from composition to function // *PLoS One.* – 2011. – T. 6, № 5. – C. e19553.
50. Borchman D., Yappert M. C., Milliner S. E., Smith R. J., Bhola R. Confirmation of the presence of squalene in human eyelid lipid by heteronuclear single quantum correlation spectroscopy // *Lipids.* – 2013. – T. 48, № 12. – C. 1269-77.
51. Lam S. M., Tong L., Duan X., Acharya U. R., Tan J. H., Petznick A., Wenk M. R., Shui G. Longitudinal changes in tear fluid lipidome brought about by eyelid-warming treatment in a cohort of meibomian gland dysfunction // *J Lipid Res.* – 2014. – T. 55, № 9. – C. 1959-69.

52. Xiao X. Y., Liu Z. G. [Abnormal of tear lipid layer and recent advances in clinical study of dry eye] // *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. – 2012. – T. 48, № 3. – C. 282-5.
53. Lam S. M., Tong L., Duan X., Petznick A., Wenk M. R., Shui G. Extensive characterization of human tear fluid collected using different techniques unravels the presence of novel lipid amphiphiles // *J Lipid Res*. – 2014. – T. 55, № 2. – C. 289-98.
54. Strott C. A., Higashi Y. Cholesterol sulfate in human physiology: what's it all about? // *J Lipid Res*. – 2003. – T. 44, № 7. – C. 1268-78.
55. Hattrup C. L., Gendler S. J. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins // *Annu Rev Physiol*. – 2008. – T. 70. – C. 431-57.
56. Craig J. P., Willcox M. D., Argueso P., Maissa C., Stahl U., Tomlinson A., Wang J., Yokoi N., Stapleton F., members of T. I. W. o. C. L. D. The TFOS International Workshop on Contact Lens Discomfort: report of the contact lens interactions with the tear film subcommittee // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2013. – T. 54, № 11. – C. TFOS123-56.
57. Corfield A. P. Mucins: a biologically relevant glycan barrier in mucosal protection // *Biochim Biophys Acta*. – 2015. – T. 1850, № 1. – C. 236-52.
58. Moore J. E., Vasey G. T., Dartt D. A., McGilligan V. E., Atkinson S. D., Grills C., Lamey P. J., Leccisotti A., Frazer D. G., Moore T. C. Effect of tear hyperosmolarity and signs of clinical ocular surface pathology upon conjunctival goblet cell function in the human ocular surface // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2011. – T. 52, № 9. – C. 6174-80.
59. Hodges R. R., Dartt D. A. Tear film mucins: front line defenders of the ocular surface; comparison with airway and gastrointestinal tract mucins // *Exp Eye Res*. – 2013. – T. 117. – C. 62-78.
60. Thornton D. J., Rousseau K., McGuckin M. A. Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus // *Annu Rev Physiol*. – 2008. – T. 70. – C. 459-86.
61. Zhang J., Yan X., Li H. Analysis of the correlations of mucins, inflammatory markers, and clinical tests in dry eye // *Cornea*. – 2013. – T. 32, № 7. – C. 928-32.
62. Uchino Y., Uchino M., Yokoi N., Dogru M., Kawashima M., Okada N., Inaba T., Tamaki S., Komuro A., Sonomura Y., Kato H., Argueso P., Kinoshita S., Tsubota K. Alteration of tear mucin 5AC in office workers using visual display terminals: The Osaka Study // *JAMA Ophthalmol*. – 2014. – T. 132, № 8. – C. 985-92.
63. Dogru M., Matsumoto Y., Okada N., Igarashi A., Fukagawa K., Shimazaki J., Tsubota K., Fujishima H. Alterations of the ocular surface epithelial MUC16 and goblet cell MUC5AC in patients with atopic keratoconjunctivitis // *Allergy*. – 2008. – T. 63, № 10. – C. 1324-34.
64. Yu D. F., Chen Y., Han J. M., Zhang H., Chen X. P., Zou W. J., Liang L. Y., Xu C. C., Liu Z. G. MUC19 expression in human ocular surface and lacrimal gland and its alteration in Sjogren syndrome patients // *Exp Eye Res*. – 2008. – T. 86, № 2. – C. 403-11.

65. Fini M. E., Jeong S., Gong H., Martinez-Carrasco R., Laver N. M. V., Hijikata M., Keicho N., Argueso P. Membrane-associated mucins of the ocular surface: New genes, new protein functions and new biological roles in human and mouse // *Prog Retin Eye Res.* – 2020. – T. 75. – C. 100777.
66. Woodward A. M., Argueso P. Expression analysis of the transmembrane mucin MUC20 in human corneal and conjunctival epithelia // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2014. – T. 55, № 10. – C. 6132-8.
67. Mantelli F., Argueso P. Functions of ocular surface mucins in health and disease // *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* – 2008. – T. 8, № 5. – C. 477-83.
68. Gipson I. K., Spurr-Michaud S. J., Senchyna M., Ritter R., 3rd, Schaumberg D. Comparison of mucin levels at the ocular surface of postmenopausal women with and without a history of dry eye // *Cornea.* – 2011. – T. 30, № 12. – C. 1346-52.
69. Albertsmeyer A. C., Kakkassery V., Spurr-Michaud S., Beeks O., Gipson I. K. Effect of pro-inflammatory mediators on membrane-associated mucins expressed by human ocular surface epithelial cells // *Exp Eye Res.* – 2010. – T. 90, № 3. – C. 444-51.
70. Ahmad M. T., Zhang P., Dufresne C., Ferrucci L., Semba R. D. The Human Eye Proteome Project: Updates on an Emerging Proteome // *Proteomics.* – 2018. – T. 18, № 5-6. – C. e1700394.
71. Zhou L., Zhao S. Z., Koh S. K., Chen L., Vaz C., Tanavde V., Li X. R., Beuerman R. W. In-depth analysis of the human tear proteome // *J Proteomics.* – 2012. – T. 75, № 13. – C. 3877-85.
72. Dor M., Eperon S., Lalive P. H., Guex-Crosier Y., Hamedani M., Salvisberg C., Turck N. Investigation of the global protein content from healthy human tears // *Exp Eye Res.* – 2019. – T. 179. – C. 64-74.
73. Huang J. F., Zhang Y., Rittenhouse K. D., Pickering E. H., McDowell M. T. Evaluations of tear protein markers in dry eye disease: repeatability of measurement and correlation with disease // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2012. – T. 53, № 8. – C. 4556-64.
74. Zhou L., Beuerman R. W., Chan C. M., Zhao S. Z., Li X. R., Yang H., Tong L., Liu S., Stern M. E., Tan D. Identification of tear fluid biomarkers in dry eye syndrome using iTRAQ quantitative proteomics // *J Proteome Res.* – 2009. – T. 8, № 11. – C. 4889-905.
75. Ryckman C., Vandal K., Rouleau P., Talbot M., Tessier P. A. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion // *J Immunol.* – 2003. – T. 170, № 6. – C. 3233-42.
76. Dartt D. A. Tear lipocalin: structure and function // *Ocul Surf.* – 2011. – T. 9, № 3. – C. 126-38.
77. Tong L., Zhou L., Beuerman R. W., Zhao S. Z., Li X. R. Association of tear proteins with Meibomian gland disease and dry eye symptoms // *Br J Ophthalmol.* – 2011. – T. 95, № 6. – C. 848-52.
78. Foell D., Wittkowski H., Ren Z., Turton J., Pang G., Daebritz J., Ehrchen J., Heidemann J., Borody T., Roth J., Clancy R. Phagocyte-specific S100 proteins are released from affected mucosa and promote immune responses during inflammatory bowel disease // *J Pathol.* – 2008. – T. 216, № 2. – C. 183-92.

79. Versura P., Nanni P., Bavelloni A., Blalock W. L., Piazzzi M., Roda A., Campos E. C. Tear proteomics in evaporative dry eye disease // *Eye (Lond)*. – 2010. – T. 24, № 8. – C. 1396-402.
80. Perumal N., Funke S., Pfeiffer N., Grus F. H. Proteomics analysis of human tears from aqueous-deficient and evaporative dry eye patients // *Sci Rep*. – 2016. – T. 6. – C. 29629.
81. Ligtenberg A. J., Veerman E. C., Nieuw Amerongen A. V., Mollenhauer J. Salivary agglutinin/glycoprotein-340/DMBT1: a single molecule with variable composition and with different functions in infection, inflammation and cancer // *Biol Chem*. – 2007. – T. 388, № 12. – C. 1275-89.
82. Pappa A., Chen C., Koutalos Y., Townsend A. J., Vasiliou V. Aldh3a1 protects human corneal epithelial cells from ultraviolet- and 4-hydroxy-2-nonenal-induced oxidative damage // *Free Radic Biol Med*. – 2003. – T. 34, № 9. – C. 1178-89.
83. Aqrabi L. A., Galtung H. K., Vestad B., Ovstebo R., Thiede B., Rusthen S., Young A., Guerreiro E. M., Utheim T. P., Chen X., Utheim O. A., Palm O., Jensen J. L. Identification of potential saliva and tear biomarkers in primary Sjogren's syndrome, utilising the extraction of extracellular vesicles and proteomics analysis // *Arthritis Res Ther*. – 2017. – T. 19, № 1. – C. 14.
84. Soria J., Acera A., Merayo L. J., Duran J. A., Gonzalez N., Rodriguez S., Bistolas N., Schumacher S., Bier F. F., Peter H., Stocklein W., Suarez T. Tear proteome analysis in ocular surface diseases using label-free LC-MS/MS and multiplexed-microarray biomarker validation // *Sci Rep*. – 2017. – T. 7, № 1. – C. 17478.
85. Lanza N. L., Valenzuela F., Perez V. L., Galor A. The Matrix Metalloproteinase 9 Point-of-Care Test in Dry Eye // *Ocul Surf*. – 2016. – T. 14, № 2. – C. 189-95.
86. Schargus M., Ivanova S., Kakkassery V., Dick H. B., Joachim S. Correlation of Tear Film Osmolarity and 2 Different MMP-9 Tests With Common Dry Eye Tests in a Cohort of Non-Dry Eye Patients // *Cornea*. – 2015. – T. 34, № 7. – C. 739-44.
87. Aragona P., Aguenouz M., Rania L., Postorino E., Sommario M. S., Roszkowska A. M., De Pasquale M. G., Pisani A., Puzzolo D. Matrix metalloproteinase 9 and transglutaminase 2 expression at the ocular surface in patients with different forms of dry eye disease // *Ophthalmology*. – 2015. – T. 122, № 1. – C. 62-71.
88. Hessen M., Akpek E. K. Dry eye: an inflammatory ocular disease // *J Ophthalmic Vis Res*. – 2014. – T. 9, № 2. – C. 240-50.
89. Pflugfelder S. C., Farley W., Luo L., Chen L. Z., de Paiva C. S., Olmos L. C., Li D. Q., Fini M. E. Matrix metalloproteinase-9 knockout confers resistance to corneal epithelial barrier disruption in experimental dry eye // *Am J Pathol*. – 2005. – T. 166, № 1. – C. 61-71.
90. Sullivan D. A., Rocha E. M., Aragona P., Clayton J. A., Ding J., Golebiowski B., Hampel U., McDermott A. M., Schaumberg D. A., Srinivasan S., Versura P., Willcox M. D. P. TFOS DEWS II Sex, Gender, and Hormones Report // *Ocul Surf*. – 2017. – T. 15, № 3. – C. 284-333.

91. Liberati V., de Feo G., Madia F., Marcozzi G. Effect of oral contraceptives on lacrimal fluid peroxidase activity in women // *Ophthalmic Res.* – 2002. – T. 34, № 4. – C. 251-3.
92. Marcozzi G., Liberati V., Madia F., Centofanti M., de Feo G. Age- and gender-related differences in human lacrimal fluid peroxidase activity // *Ophthalmologica.* – 2003. – T. 217, № 4. – C. 294-7.
93. Shen L., Suresh L. Autoantibodies, detection methods and panels for diagnosis of Sjogren's syndrome // *Clin Immunol.* – 2017. – T. 182. – C. 24-29.
94. Nobuhara Y., Kawano S., Kageyama G., Sugiyama D., Saegusa J., Kumagai S. Is SS-A/Ro52 a hydrogen peroxide-sensitive signaling molecule? // *Antioxid Redox Signal.* – 2007. – T. 9, № 3. – C. 385-91.
95. Ryo K., Yamada H., Nakagawa Y., Tai Y., Obara K., Inoue H., Mishima K., Saito I. Possible involvement of oxidative stress in salivary gland of patients with Sjogren's syndrome // *Pathobiology.* – 2006. – T. 73, № 5. – C. 252-60.
96. Kurimoto C., Kawano S., Tsuji G., Hatachi S., Jikimoto T., Sugiyama D., Kasagi S., Komori T., Nakamura H., Yodoi J., Kumagai S. Thioredoxin may exert a protective effect against tissue damage caused by oxidative stress in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome // *J Rheumatol.* – 2007. – T. 34, № 10. – C. 2035-43.
97. Choi W., Lian C., Ying L., Kim G. E., You I. C., Park S. H., Yoon K. C. Expression of Lipid Peroxidation Markers in the Tear Film and Ocular Surface of Patients with Non-Sjogren Syndrome: Potential Biomarkers for Dry Eye Disease // *Curr Eye Res.* – 2016. – T. 41, № 9. – C. 1143-9.
98. Cejkova J., Ardan T., Simonova Z., Cejka C., Malec J., Dotrelova D., Brunova B. Decreased expression of antioxidant enzymes in the conjunctival epithelium of dry eye (Sjogren's syndrome) and its possible contribution to the development of ocular surface oxidative injuries // *Histol Histopathol.* – 2008. – T. 23, № 12. – C. 1477-83.
99. Wakamatsu T. H., Dogru M., Matsumoto Y., Kojima T., Kaido M., Ibrahim O. M., Sato E. A., Igarashi A., Ichihashi Y., Satake Y., Shimazaki J., Tsubota K. Evaluation of lipid oxidative stress status in Sjogren syndrome patients // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2013. – T. 54, № 1. – C. 201-10.
100. Schechter J. E., Warren D. W., Mircheff A. K. A lacrimal gland is a lacrimal gland, but rodent's and rabbit's are not human // *Ocul Surf.* – 2010. – T. 8, № 3. – C. 111-34.
101. Chen Z. Y., Liang Q. F., Yu G. Y. Establishment of a rabbit model for keratoconjunctivitis sicca // *Cornea.* – 2011. – T. 30, № 9. – C. 1024-9.
102. Gilbard J. P., Rossi S. R., Gray K. L. A new rabbit model for keratoconjunctivitis sicca // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 1987. – T. 28, № 2. – C. 225-8.
103. Li C., Song Y., Luan S., Wan P., Li N., Tang J., Han Y., Xiong C., Wang Z. Research on the stability of a rabbit dry eye model induced by topical application of the preservative benzalkonium chloride // *PLoS One.* – 2012. – T. 7, № 3. – C. e33688.

104. Shafiee A., Bucolo C., Budzynski E., Ward K. W., Lopez F. J. In vivo ocular efficacy profile of mapracorat, a novel selective glucocorticoid receptor agonist, in rabbit models of ocular disease // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2011. – T. 52, № 3. – C. 1422-30.
105. Beutel J., Schroder C., von Hof K., Rades D., Kosmehl H., Wedel T., Sieg P., Geerling G., Hakim S. G. Pharmacological prevention of radiation-induced dry eye-an experimental study in a rabbit model // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* – 2007. – T. 245, № 9. – C. 1347-55.
106. Thomas P. B., Zhu Z., Selvam S., Samant D. M., Stevenson D., Mircheff A. K., Schechter J. E., Song S. W., Trousdale M. D. Autoimmune dacryoadenitis and keratoconjunctivitis induced in rabbits by subcutaneous injection of autologous lymphocytes activated ex vivo against lacrimal antigens // *J Autoimmun.* – 2008. – T. 31, № 2. – C. 116-22.
107. Honkanen R. A., Huang L., Xie G., Rigas B. Phosphosulindac is efficacious in an improved concanavalin A-based rabbit model of chronic dry eye disease // *Transl Res.* – 2018. – T. 198. – C. 58-72.
108. Demetriades A. M., Leyngold I. M., D'Anna S., Eghrari A. O., Emmert D. G., Grant M. P., Merbs S. L. Intraglandular injection of botulinum toxin a reduces tear production in rabbits // *Ophthalmic Plast Reconstr Surg.* – 2013. – T. 29, № 1. – C. 21-4.
109. Toshida H., Nguyen D. H., Beuerman R. W., Murakami A. Evaluation of novel dry eye model: preganglionic parasympathetic denervation in rabbit // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2007. – T. 48, № 10. – C. 4468-75.
110. Wang X. D., Sheng M. J., Lin A. J. Evaluation of establishing meibomian gland dysfunction dry eye model by cauterizing the meibomian gland orifices and excising the tertiary eyelid // *Chinese Ophthalmic Research.* – 2010. – T. 28. – C. 827-831.
111. Bhattacharya D., Ning Y., Zhao F., Stevenson W., Chen R., Zhang J., Wang M. Tear Production After Bilateral Main Lacrimal Gland Resection in Rabbits // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2015. – T. 56, № 13. – C. 7774-83.
112. Li N., Deng X., Gao Y., Zhang S., He M., Zhao D. Establishment of the mild, moderate and severe dry eye models using three methods in rabbits // *BMC Ophthalmol.* – 2013. – T. 13. – C. 50.
113. Xiong C., Chen D., Liu J., Liu B., Li N., Zhou Y., Liang X., Ma P., Ye C., Ge J., Wang Z. A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2008. – T. 49, № 5. – C. 1850-6.
114. Miyake H., Oda T., Katsuta O., Seno M., Nakamura M. A Novel Model of Meibomian Gland Dysfunction Induced with Complete Freund's Adjuvant in Rabbits // *Vision (Basel).* – 2017. – T. 1, № 1.

115. Lambert R. W., Smith R. E. Pathogenesis of blepharoconjunctivitis complicating 13-cis-retinoic acid (isotretinoin) therapy in a laboratory model // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 1988. – T. 29, № 10. – C. 1559-64.
116. Jester J. V., Rife L., Nii D., Luttrull J. K., Wilson L., Smith R. E. In vivo biomicroscopy and photography of meibomian glands in a rabbit model of meibomian gland dysfunction // *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* – 1982. – T. 22, № 5. – C. 660-667.
117. Gire A., Kwok A., Marx D. P. PROSE treatment for lagophthalmos and exposure keratopathy // *Ophthalmic Plast Reconstr Surg.* – 2013. – T. 29, № 2. – C. e38-40.
118. Dua H. S., Said D. G., Messmer E. M., Rolando M., Benitez-Del-Castillo J. M., Hossain P. N., Shortt A. J., Geerling G., Nubile M., Figueiredo F. C., Rauz S., Mastropasqua L., Rama P., Baudouin C. Neurotrophic keratopathy // *Prog Retin Eye Res.* – 2018. – T. 66. – C. 107-131.
119. Catron T., Hern H. G. Herpes zoster ophthalmicus // *West J Emerg Med.* – 2008. – T. 9, № 3. – C. 174-6.
120. Tan P., Wong J., Siah W. F., Malhotra R. Outcomes of lower eyelid retractor recession and lateral horn lysis in lower eyelid elevation for facial nerve palsy // *Eye (Lond).* – 2018. – T. 32, № 2. – C. 338-344.
121. Jammal H., Khader Y., Shihadeh W., Ababneh L., Aljizawi G., AlQasem A. Exposure keratopathy in sedated and ventilated patients // *J Crit Care.* – 2012. – T. 27, № 6. – C. 537-41.
122. Dinakaran S. Exposure keratopathy following phacoemulsification under local anaesthesia // *Eur J Ophthalmol.* – 2002. – T. 12, № 4. – C. 331-2.
123. Levinson B. A., Rapuano C. J., Cohen E. J., Hammersmith K. M., Ayres B. D., Laibson P. R. Referrals to the Wills Eye Institute Cornea Service after laser in situ keratomileusis: reasons for patient dissatisfaction // *J Cataract Refract Surg.* – 2008. – T. 34, № 1. – C. 32-9.
124. Albietz J. M., Lenton L. M., McLennan S. G. Chronic dry eye and regression after laser in situ keratomileusis for myopia // *J Cataract Refract Surg.* – 2004. – T. 30, № 3. – C. 675-84.
125. Denoyer A., Landman E., Trinh L., Faure J. F., Auclin F., Baudouin C. Dry eye disease after refractive surgery: comparative outcomes of small incision lenticule extraction versus LASIK // *Ophthalmology.* – 2015. – T. 122, № 4. – C. 669-76.
126. Uchino M., Yokoi N., Uchino Y., Dogru M., Kawashima M., Komuro A., Sonomura Y., Kato H., Kinoshita S., Schaumberg D. A., Tsubota K. Prevalence of dry eye disease and its risk factors in visual display terminal users: the Osaka study // *Am J Ophthalmol.* – 2013. – T. 156, № 4. – C. 759-66.
127. Cardona G., Gomez M., Quevedo L., Gispets J. Effects of transient blur and VDT screen luminance changes on eyeblink rate // *Cont Lens Anterior Eye.* – 2014. – T. 37, № 5. – C. 363-7.

128. Cardona G., Garcia C., Seres C., Vilaseca M., Gispets J. Blink rate, blink amplitude, and tear film integrity during dynamic visual display terminal tasks // *Curr Eye Res.* – 2011. – T. 36, № 3. – C. 190-7.
129. Bron A. J., de Paiva C. S., Chauhan S. K., Bonini S., Gabison E. E., Jain S., Knop E., Markoulli M., Ogawa Y., Perez V., Uchino Y., Yokoi N., Zoukhri D., Sullivan D. A. TFOS DEWS II pathophysiology report // *Ocul Surf.* – 2017. – T. 15, № 3. – C. 438-510.
130. Sacca S. C., Cutolo C. A., Ferrari D., Corazza P., Traverso C. E. The Eye, Oxidative Damage and Polyunsaturated Fatty Acids // *Nutrients.* – 2018. – T. 10, № 6.
131. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2007. – T. 39, № 1. – C. 44-84.
132. Ung L., Pattamatta U., Carnt N., Wilkinson-Berka J. L., Liew G., White A. J. R. Oxidative stress and reactive oxygen species: a review of their role in ocular disease // *Clin Sci (Lond).* – 2017. – T. 131, № 24. – C. 2865-2883.
133. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine // *Redox Biol.* – 2015. – T. 4. – C. 180-3.
134. Kruk J., Kubasik-Kladna K., Aboul-Enein H. Y. The Role Oxidative Stress in the Pathogenesis of Eye Diseases: Current Status and a Dual Role of Physical Activity // *Mini Rev Med Chem.* – 2015. – T. 16, № 3. – C. 241-57.
135. Cabrera M. P., Chihuailaf R. H. Antioxidants and the integrity of ocular tissues // *Vet Med Int.* – 2011. – T. 2011. – C. 905153.
136. Deng R., Hua X., Li J., Chi W., Zhang Z., Lu F., Zhang L., Pflugfelder S. C., Li D. Q. Oxidative stress markers induced by hyperosmolarity in primary human corneal epithelial cells // *PLoS One.* – 2015. – T. 10, № 5. – C. e0126561.
137. Clouzeau C., Godefroy D., Riancho L., Rostene W., Baudouin C., Brignole-Baudouin F. Hyperosmolarity potentiates toxic effects of benzalkonium chloride on conjunctival epithelial cells in vitro // *Mol Vis.* – 2012. – T. 18. – C. 851-63.
138. Kojima T., Wakamatsu T. H., Dogru M., Ogawa Y., Igarashi A., Ibrahim O. M., Inaba T., Shimizu T., Noda S., Obata H., Nakamura S., Wakamatsu A., Shirasawa T., Shimazaki J., Negishi K., Tsubota K. Age-related dysfunction of the lacrimal gland and oxidative stress: evidence from the Cu,Zn-superoxide dismutase-1 (Sod1) knockout mice // *Am J Pathol.* – 2012. – T. 180, № 5. – C. 1879-96.
139. Ibrahim O. M., Dogru M., Matsumoto Y., Igarashi A., Kojima T., Wakamatsu T. H., Inaba T., Shimizu T., Shimazaki J., Tsubota K. Oxidative stress induced age dependent meibomian gland dysfunction in Cu, Zn-superoxide dismutase-1 (Sod1) knockout mice // *PLoS One.* – 2014. – T. 9, № 7. – C. e99328.

140. Uchino Y., Kawakita T., Miyazawa M., Ishii T., Onouchi H., Yasuda K., Ogawa Y., Shimmura S., Ishii N., Tsubota K. Oxidative stress induced inflammation initiates functional decline of tear production // *PLoS One*. – 2012. – T. 7, № 10. – C. e45805.
141. Liu H., Sheng M., Liu Y., Wang P., Chen Y., Chen L., Wang W., Li B. Expression of SIRT1 and oxidative stress in diabetic dry eye // *Int J Clin Exp Pathol*. – 2015. – T. 8, № 6. – C. 7644-53.
142. Lee H. S., Chauhan S. K., Okanobo A., Nallasamy N., Dana R. Therapeutic efficacy of topical epigallocatechin gallate in murine dry eye // *Cornea*. – 2011. – T. 30, № 12. – C. 1465-72.
143. Pastori V., Tavazzi S., Lecchi M. Lactoferrin-loaded contact lenses: eye protection against oxidative stress // *Cornea*. – 2015. – T. 34, № 6. – C. 693-7.
144. Amico C., Tornetta T., Scifo C., Blanco A. R. Antioxidant effect of 0.2% xanthan gum in ocular surface corneal epithelial cells // *Curr Eye Res*. – 2015. – T. 40, № 1. – C. 72-6.
145. Debbasch C., De La Salle S. B., Brignole F., Rat P., Warnet J. M., Baudouin C. Cytoprotective effects of hyaluronic acid and Carbomer 934P in ocular surface epithelial cells // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2002. – T. 43, № 11. – C. 3409-15.
146. Hua X., Deng R., Li J., Chi W., Su Z., Lin J., Pflugfelder S. C., Li D. Q. Protective Effects of L-Carnitine Against Oxidative Injury by Hyperosmolarity in Human Corneal Epithelial Cells // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2015. – T. 56, № 9. – C. 5503-11.
147. Bu J., Liu Y., Zhang R., Lin S., Zhuang J., Sun L., Zhang L., He H., Zong R., Wu Y., Li W. Potential New Target for Dry Eye Disease-Oxidative Stress // *Antioxidants (Basel)*. – 2024. – T. 13, № 4.
148. Pisoschi A. M., Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review // *Eur J Med Chem*. – 2015. – T. 97. – C. 55-74.
149. Aragona P., Rolando M. Towards a dynamic customised therapy for ocular surface dysfunctions // *Br J Ophthalmol*. – 2013. – T. 97, № 8. – C. 955-60.
150. Cancarini A., Fostinelli J., Napoli L., Gilberti M. E., Apostoli P., Semeraro F. Trace elements and diabetes: Assessment of levels in tears and serum // *Exp Eye Res*. – 2017. – T. 154. – C. 47-52.
151. Gakhramanov F. S., Kerimov K. T., Dzhaferov A. I. Use of natural antioxidants for the correction of changes in general and local parameters of lipid peroxidation and antioxidant defense system during experimental eye burn // *Bull Exp Biol Med*. – 2006. – T. 142, № 6. – C. 696-9.
152. Crouch R. K., Goletz P., Snyder A., Coles W. H. Antioxidant enzymes in human tears // *J Ocul Pharmacol*. – 1991. – T. 7, № 3. – C. 253-8.
153. Versura P., Bavelloni A., Grillini M., Fresina M., Campos E. C. Diagnostic performance of a tear protein panel in early dry eye // *Mol Vis*. – 2013. – T. 19. – C. 1247-57.
154. Kojima T., Dogru M., Ibrahim O. M., Wakamatsu T. H., Ito M., Igarashi A., Inaba T., Shimizu T., Shirasawa T., Shimazaki J., Tsubota K. Effects of Oxidative Stress on the Conjunctiva in Cu, Zn-

- Superoxide Dismutase-1 (Sod1)-Knockout Mice // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2015. – T. 56, № 13. – C. 8382-91.
155. Seen S., Tong L. Dry eye disease and oxidative stress // *Acta Ophthalmol.* – 2018. – T. 96, № 4. – C. e412-e420.
156. Lan W., Petznick A., Heryati S., Rifada M., Tong L. Nuclear Factor-kappaB: central regulator in ocular surface inflammation and diseases // *Ocul Surf.* – 2012. – T. 10, № 3. – C. 137-48.
157. Gabbs M., Leng S., Devassy J. G., Monirujjaman M., Aukema H. M. Advances in Our Understanding of Oxylipins Derived from Dietary PUFAs // *Adv Nutr.* – 2015. – T. 6, № 5. – C. 513-40.
158. Walter S. D., Gronert K., McClellan A. L., Levitt R. C., Sarantopoulos K. D., Galor A. omega-3 Tear Film Lipids Correlate With Clinical Measures of Dry Eye // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2016. – T. 57, № 6. – C. 2472-8.
159. Shim J., Park C., Lee H. S., Park M. S., Lim H. T., Chauhan S., Dana R., Lee H., Lee H. K. Change in prostaglandin expression levels and synthesizing activities in dry eye disease // *Ophthalmology.* – 2012. – T. 119, № 11. – C. 2211-9.
160. Guidera A. C., Luchs J. I., Udell I. J. Keratitis, ulceration, and perforation associated with topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs // *Ophthalmology.* – 2001. – T. 108, № 5. – C. 936-44.
161. Li Y., Liu H., Zeng W., Wei J. Edaravone protects against hyperosmolarity-induced oxidative stress and apoptosis in primary human corneal epithelial cells // *PLoS One.* – 2017. – T. 12, № 3. – C. e0174437.
162. Xie Y., Hou W., Song X., Yu Y., Huang J., Sun X., Kang R., Tang D. Ferroptosis: process and function // *Cell Death Differ.* – 2016. – T. 23, № 3. – C. 369-79.
163. Marshall K. D., Baines C. P. Necroptosis: is there a role for mitochondria? // *Front Physiol.* – 2014. – T. 5. – C. 323.
164. Vakifahmetoglu-Norberg H., Ouchida A. T., Norberg E. The role of mitochondria in metabolism and cell death // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2017. – T. 482, № 3. – C. 426-431.
165. Valavanidis A., Vlachogianni T., Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis // *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* – 2009. – T. 27, № 2. – C. 120-39.
166. Kim S. J., Cheresh P., Williams D., Cheng Y., Ridge K., Schumacker P. T., Weitzman S., Bohr V. A., Kamp D. W. Mitochondria-targeted Ogg1 and aconitase-2 prevent oxidant-induced mitochondrial DNA damage in alveolar epithelial cells // *J Biol Chem.* – 2014. – T. 289, № 9. – C. 6165-76.
167. Stapleton F., Argueso P., Asbell P., Azar D., Bosworth C., Chen W., Ciolino J. B., Craig J. P., Gallar J., Galor A., Gomes J. A. P., Jalbert I., Jie Y., Jones L., Konomi K., Liu Y., Merayo-Llodes J., Oliveira F. R., Perez V. L., Rocha E. M., Sullivan B. D., Sullivan D. A., Vehof J., Vitale S., Willcox M.,

- Wolffsohn J. S., Dogru M. TFOS DEWS III: Digest // *Am J Ophthalmol.* – 2025. – T. 279. – C. 451-553.
168. Munshi S., Varghese A., Dhar-Munshi S. Computer vision syndrome-A common cause of unexplained visual symptoms in the modern era // *Int J Clin Pract.* – 2017. – T. 71, № 7.
169. Wu Z., Begley C. G., Situ P., Simpson T. The effects of increasing ocular surface stimulation on blinking and sensation // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2014. – T. 55, № 3. – C. 1555-63.
170. Cruz A. A., Garcia D. M., Pinto C. T., Cechetti S. P. Spontaneous eyeblink activity // *Ocul Surf.* – 2011. – T. 9, № 1. – C. 29-41.
171. Argiles M., Cardona G., Perez-Cabre E., Rodriguez M. Blink Rate and Incomplete Blinks in Six Different Controlled Hard-Copy and Electronic Reading Conditions // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2015. – T. 56, № 11. – C. 6679-85.
172. Hirota M., Uozato H., Kawamorita T., Shibata Y., Yamamoto S. Effect of incomplete blinking on tear film stability // *Optom Vis Sci.* – 2013. – T. 90, № 7. – C. 650-7.
173. Ousler G. W., 3rd, Hagberg K. W., Schindelar M., Welch D., Abelson M. B. The Ocular Protection Index // *Cornea.* – 2008. – T. 27, № 5. – C. 509-13.
174. Chu C. A., Rosenfield M., Portello J. K. Blink patterns: reading from a computer screen versus hard copy // *Optom Vis Sci.* – 2014. – T. 91, № 3. – C. 297-302.
175. Tsubota K., Nakamori K. Dry eyes and video display terminals // *N Engl J Med.* – 1993. – T. 328, № 8. – C. 584.
176. Kojima T., Ibrahim O. M., Wakamatsu T., Tsuyama A., Ogawa J., Matsumoto Y., Dogru M., Tsubota K. The impact of contact lens wear and visual display terminal work on ocular surface and tear functions in office workers // *Am J Ophthalmol.* – 2011. – T. 152, № 6. – C. 933-940 e2.
177. Lee H. S., Cui L., Li Y., Choi J. S., Choi J. H., Li Z., Kim G. E., Choi W., Yoon K. C. Correction: Influence of Light Emitting Diode-Derived Blue Light Overexposure on Mouse Ocular Surface // *PLoS One.* – 2016. – T. 11, № 11. – C. e0167671.
178. Marek V., Melik-Parsadaniantz S., Villette T., Montoya F., Baudouin C., Brignole-Baudouin F., Denoyer A. Blue light phototoxicity toward human corneal and conjunctival epithelial cells in basal and hyperosmolar conditions // *Free Radic Biol Med.* – 2018. – T. 126. – C. 27-40.
179. O'Hagan J. B., Khazova M., Price L. L. Low-energy light bulbs, computers, tablets and the blue light hazard // *Eye (Lond).* – 2016. – T. 30, № 2. – C. 230-3.
180. Papas E. B., Sweeney D. F. Interpreting the corneal response to oxygen: Is there a basis for re-evaluating data from gas-goggle studies? // *Exp Eye Res.* – 2016. – T. 151. – C. 222-6.
181. Dillehay S. M. Does the level of available oxygen impact comfort in contact lens wear?: A review of the literature // *Eye Contact Lens.* – 2007. – T. 33, № 3. – C. 148-55.

182. Yazdani M. Technical aspects of oxygen level regulation in primary cell cultures: A review // *Interdiscip Toxicol.* – 2016. – T. 9, № 3-4. – C. 85-89.
183. Wilhelmus K. R. The Draize eye test // *Surv Ophthalmol.* – 2001. – T. 45, № 6. – C. 493-515.
184. Gulidova O. V., Lyubitskii O. B., Klebanov G. I., Chesnokova N. B. Antioxidant activity of tear fluid in experimental alkali eye burns // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* – 1999. – T. 128, № 5. – C. 1155-1158.
185. Ou B., Chang T., Huang D., Prior R. L. Determination of total antioxidant capacity by oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using fluorescein as the fluorescence probe: First Action 2012.23 // *J AOAC Int.* – 2013. – T. 96, № 6. – C. 1372-6.
186. Hadwan M. H., Abed H. N. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity // *Data Brief.* – 2016. – T. 6. – C. 194-9.
187. Datkhile K. D., Mukhopadhyaya R., Dongre T. K., Nath B. B. Increased level of superoxide dismutase (SOD) activity in larvae of *Chironomus ramosus* (Diptera: Chironomidae) subjected to ionizing radiation // *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* – 2009. – T. 149, № 4. – C. 500-6.
188. Sakimoto T., Shoji J., Kanno H., Sawa M. Gelatinase expression in ocular surface disorders // *Jpn J Ophthalmol.* – 2004. – T. 48, № 1. – C. 17-22.
189. Chistyakov D. V., Grabeklis S., Goriainov S. V., Chistyakov V. V., Sergeeva M. G., Reiser G. Astrocytes synthesize primary and cyclopentenone prostaglandins that are negative regulators of their proliferation // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2018. – T. 500, № 2. – C. 204-210.
190. Zernii E. Y., Gancharova O. S., Baksheeva V. E., Golovastova M. O., Kabanova E. I., Savchenko M. S., Tiulina V. V., Sotnikova L. F., Zamyatnin A. A., Jr., Philippov P. P., Senin, II. Mitochondria-Targeted Antioxidant SkQ1 Prevents Anesthesia-Induced Dry Eye Syndrome // *Oxid Med Cell Longev.* – 2017. – T. 2017. – C. 9281519.
191. Zernii E. Y., Baksheev V. E., Kabanova E. I., Tiulina V. V., Golovastova M. O., Gancharova O. S., Savchenko M. S., Sotikova L. F., Zamyatnin A. A., Jr., Filippov P. P., Senin, II. Effect of General Anesthesia Duration on Recovery of Secretion and Biochemical Properties of Tear Fluid in the Post-Anesthetic Period // *Bull Exp Biol Med.* – 2018. – T. 165, № 2. – C. 269-271.
192. Chistyakov D. V., Azbukina N. V., Astakhova A. A., Goriainov S. V., Chistyakov V. V., Tiulina V. V., Baksheeva V. E., Kotelin V. I., Fedoseeva E. V., Zamyatnin A. A., Jr., Philippov P. P., Kiseleva O. A., Bessmertny A. M., Senin, II, Iomdina E. N., Sergeeva M. G., Zernii E. Y. Comparative lipidomic analysis of inflammatory mediators in the aqueous humor and tear fluid of humans and rabbits // *Metabolomics.* – 2020. – T. 16, № 2. – C. 27.
193. Chistyakov D. V., Gancharova O. S., Baksheeva V. E., Tiulina V. V., Goriainov S. V., Azbukina N. V., Tsarkova M. S., Zamyatnin A. A., Jr., Philippov P. P., Sergeeva M. G., Senin, II, Zernii E. Y.

Inflammation in Dry Eye Syndrome: Identification and Targeting of Oxylin-Mediated Mechanisms // *Biomedicines*. – 2020. – T. 8, № 9.

194. Tashbayev B., Utheim T. P., Utheim O. A., Raeder S., Jensen J. L., Yazdani M., Lagali N., Vitelli V., Dartt D. A., Chen X. Utility of Tear Osmolarity Measurement in Diagnosis of Dry Eye Disease // *Sci Rep*. – 2020. – T. 10, № 1. – C. 5542.

195. Sobrin L., Liu Z., Monroy D. C., Solomon A., Selzer M. G., Lokeshwar B. L., Pflugfelder S. C. Regulation of MMP-9 activity in human tear fluid and corneal epithelial culture supernatant // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2000. – T. 41, № 7. – C. 1703-9.

196. Aragona P., Di Pietro R. Is it safe to use topical NSAIDs for corneal sensitivity in Sjogren's syndrome patients? // *Expert Opin Drug Saf*. – 2007. – T. 6, № 1. – C. 33-43.

197. Rossi A., Pergola C., Koeberle A., Hoffmann M., Dehm F., Bramanti P., Cuzzocrea S., Werz O., Sautebin L. The 5-lipoxygenase inhibitor, zileuton, suppresses prostaglandin biosynthesis by inhibition of arachidonic acid release in macrophages // *Br J Pharmacol*. – 2010. – T. 161, № 3. – C. 555-70.

198. Valerio G. S., Lin C. C. Ocular manifestations of herpes simplex virus // *Curr Opin Ophthalmol*. – 2019. – T. 30, № 6. – C. 525-531.

199. Gelzinis A., Simonaviciute D., Krucaite A., Buzzonetti L., Dollfus H., Zemaitiene R. Neurotrophic Keratitis Due to Congenital Corneal Anesthesia with Deafness, Hypotonia, Intellectual Disability, Face Abnormality and Metabolic Disorder: A New Syndrome? // *Medicina (Kaunas)*. – 2022. – T. 58, № 5.

200. Wolffsohn J. S., Lingham G., Downie L. E., Huntjens B., Inomata T., Jivraj S., Kobia-Acquah E., Muntz A., Mohamed-Noriega K., Plainis S., Read M., Sayegh R. R., Singh S., Utheim T. P., Craig J. P. TFOS Lifestyle: Impact of the digital environment on the ocular surface // *Ocul Surf*. – 2023. – T. 28. – C. 213-252.

201. Yuan Y., Wang J., Chen Q., Tao A., Shen M., Shousha M. A. Reduced tear meniscus dynamics in dry eye patients with aqueous tear deficiency // *Am J Ophthalmol*. – 2010. – T. 149, № 6. – C. 932-938 e1.

202. Bron A. J., Tomlinson A., Foulks G. N., Pepose J. S., Baudouin C., Geerling G., Nichols K. K., Lemp M. A. Rethinking dry eye disease: a perspective on clinical implications // *Ocul Surf*. – 2014. – T. 12, № 2 Suppl. – C. S1-31.

203. Wang Y., Zhang Y., Tian N. Cause and Management of Suture-related Ocular Complications after Buried-suture Double-eyelid Blepharoplasty // *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. – 2021. – T. 74, № 12. – C. 3431-3436.

204. Ziai K., Thomas S., Weller C., Lighthall J. G. Corneal Neurotization in the Setting of Facial Paralysis: A Comprehensive Review of Surgical Techniques // *J Craniofac Surg*. – 2021. – T. 32, № 6. – C. 2210-2214.

205. Kato H., Yokoi N., Watanabe A., Komuro A., Sonomura Y., Sotozono C., Kinoshita S. Relationship Between Ocular Surface Epithelial Damage, Tear Abnormalities, and Blink in Patients With Dry Eye // *Cornea*. – 2019. – T. 38, № 3. – C. 318-324.
206. Kook K. Y., Jin R., Li L., Yoon H. J., Yoon K. C. Tear Osmolarity and Matrix Metalloproteinase-9 in Dry Eye Associated with Sjogren's Syndrome // *Korean J Ophthalmol*. – 2020. – T. 34, № 3. – C. 179-186.
207. Chotikavanich S., de Paiva C. S., Li de Q., Chen J. J., Bian F., Farley W. J., Pflugfelder S. C. Production and activity of matrix metalloproteinase-9 on the ocular surface increase in dysfunctional tear syndrome // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2009. – T. 50, № 7. – C. 3203-9.
208. Galis Z. S., Asanuma K., Godin D., Meng X. N-acetyl-cysteine decreases the matrix-degrading capacity of macrophage-derived foam cells: new target for antioxidant therapy? // *Circulation*. – 1998. – T. 97, № 24. – C. 2445-53.
209. Guo X., Zuo X., Zheng W., Zhao D., Dong C., Zou Z., Shen Y., Xu C., He C., Wang F. Catalase-encapsulated matrix metalloproteinase-9 responsive nanogels for modulation of inflammatory response and treatment of neutrophilic asthma // *J Nanobiotechnology*. – 2025. – T. 23, № 1. – C. 374.
210. Ralay Ranaivo H., Hodge J. N., Choi N., Wainwright M. S. Albumin induces upregulation of matrix metalloproteinase-9 in astrocytes via MAPK and reactive oxygen species-dependent pathways // *J Neuroinflammation*. – 2012. – T. 9. – C. 68.
211. Gogia R., Richer S. P., Rose R. C. Tear fluid content of electrochemically active components including water soluble antioxidants // *Curr Eye Res*. – 1998. – T. 17, № 3. – C. 257-63.
212. Saijyothi A. V., Fowjana J., Madhumathi S., Rajeshwari M., Thennarasu M., Prema P., Angayarkanni N. Tear fluid small molecular antioxidants profiling shows lowered glutathione in keratoconus // *Exp Eye Res*. – 2012. – T. 103. – C. 41-6.
213. Wang L., Zhang Z., Koch D. D., Jia Y., Cao W., Zhang S. Anterior chamber interleukin 1beta, interleukin 6 and prostaglandin E2 in patients undergoing femtosecond laser-assisted cataract surgery // *Br J Ophthalmol*. – 2016. – T. 100, № 4. – C. 579-82.
214. Ambaw Y. A., Chao C., Ji S., Raida M., Torta F., Wenk M. R., Tong L. Tear eicosanoids in healthy people and ocular surface disease // *Sci Rep*. – 2018. – T. 8, № 1. – C. 11296.
215. Panthi S., Chen J., Wilson L., Nichols J. J. Detection of Lipid Mediators of Inflammation in the Human Tear Film // *Eye Contact Lens*. – 2019. – T. 45, № 3. – C. 171-181.
216. Larsson N., Lundstrom S. L., Pinto R., Rankin G., Karimpour M., Blomberg A., Sandstrom T., Pourazar J., Trygg J., Behndig A. F., Wheelock C. E., Nording M. L. Lipid mediator profiles differ between lung compartments in asthmatic and healthy humans // *Eur Respir J*. – 2014. – T. 43, № 2. – C. 453-63.

217. Setty B. N. Y., Betal S. G., Miller R. E., Brown D. S., Meier M., Cahill M., Lerner N. B., Apollonsky N., Stuart M. J. Relationship of Omega-3 fatty acids DHA and EPA with the inflammatory biomarker hs-CRP in children with sickle cell anemia // *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. – 2019. – T. 146. – C. 11-18.
218. Park H. J., Ock S. M., Kim H. J., Park H. J., Lee Y. B., Choi J. M., Cho C. S., Lee J. Y., Cho B. K., Cho D. H. Vitamin C attenuates ERK signalling to inhibit the regulation of collagen production by LL-37 in human dermal fibroblasts // *Exp Dermatol*. – 2010. – T. 19, № 8. – C. e258-64.
219. Kuo S. M., Burl L. R., Hu Z. Cellular phenotype-dependent and -independent effects of vitamin C on the renewal and gene expression of mouse embryonic fibroblasts // *PLoS One*. – 2012. – T. 7, № 3. – C. e32957.
220. Kasetsuwan N., Wu F. M., Hsieh F., Sanchez D., McDonnell P. J. Effect of topical ascorbic acid on free radical tissue damage and inflammatory cell influx in the cornea after excimer laser corneal surgery // *Arch Ophthalmol*. – 1999. – T. 117, № 5. – C. 649-52.
221. Stojanovic A., Ringvold A., Nitter T. Ascorbate prophylaxis for corneal haze after photorefractive keratectomy // *J Refract Surg*. – 2003. – T. 19, № 3. – C. 338-43.
222. Altan S., Sagsoz H., Ogurtan Z. Topical dimethyl sulfoxide inhibits corneal neovascularization and stimulates corneal repair in rabbits following acid burn // *Biotech Histochem*. – 2017. – T. 92, № 8. – C. 619-636.
223. Altan S., Ogurtan Z. Dimethyl sulfoxide but not indomethacin is efficient for healing in hydrofluoric acid eye burns // *Burns*. – 2017. – T. 43, № 1. – C. 232-244.
224. Rao N. L., Dunford P. J., Xue X., Jiang X., Lundeen K. A., Coles F., Riley J. P., Williams K. N., Grice C. A., Edwards J. P., Karlsson L., Fourie A. M. Anti-inflammatory activity of a potent, selective leukotriene A4 hydrolase inhibitor in comparison with the 5-lipoxygenase inhibitor zileuton // *J Pharmacol Exp Ther*. – 2007. – T. 321, № 3. – C. 1154-60.
225. Sahin A., Kam W. R., Darabad R. R., Topilow K., Sullivan D. A. Regulation of leukotriene B4 secretion by human corneal, conjunctival, and meibomian gland epithelial cells // *Arch Ophthalmol*. – 2012. – T. 130, № 8. – C. 1013-8.
226. Goodarzi K., Goodarzi M., Tager A. M., Luster A. D., von Andrian U. H. Leukotriene B4 and BLT1 control cytotoxic effector T cell recruitment to inflamed tissues // *Nat Immunol*. – 2003. – T. 4, № 10. – C. 965-73.
227. Munro D., Treberg J. R. A radical shift in perspective: mitochondria as regulators of reactive oxygen species // *J Exp Biol*. – 2017. – T. 220, № Pt 7. – C. 1170-1180.
228. Antonenko Y. N., Avetisyan A. V., Bakeeva L. E., Chernyak B. V., Chertkov V. A., Domnina L. V., Ivanova O. Y., Izyumov D. S., Khailova L. S., Klishin S. S., Korshunova G. A., Lyamzaev K. G., Muntyan M. S., Nepryakhina O. K., Pashkovskaya A. A., Pletjushkina O. Y., Pustovidko A. V.,

- Roginsky V. A., Rokitskaya T. I., Ruuge E. K., Saprunkova V. B., Severina, II, Simonyan R. A., Skulachev I. V., Skulachev M. V., Sumbatyan N. V., Sviryaeva I. V., Tashlitsky V. N., Vassiliev J. M., Vyssokikh M. Y., Yaguzhinsky L. S., Zamyatnin A. A., Jr., Skulachev V. P. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and in vitro studies // *Biochemistry (Mosc)*. – 2008. – T. 73, № 12. – C. 1273-87.
229. Zhao K., Luo G., Giannelli S., Szeto H. H. Mitochondria-targeted peptide prevents mitochondrial depolarization and apoptosis induced by tert-butyl hydroperoxide in neuronal cell lines // *Biochem Pharmacol*. – 2005. – T. 70, № 12. – C. 1796-806.
230. Skulachev V. P., Antonenko Y. N., Cherepanov D. A., Chernyak B. V., Izyumov D. S., Khailova L. S., Klishin S. S., Korshunova G. A., Lyamzaev K. G., Pletjushkina O. Y., Roginsky V. A., Rokitskaya T. I., Severin F. F., Severina, II, Simonyan R. A., Skulachev M. V., Sumbatyan N. V., Sukhanova E. I., Tashlitsky V. N., Trendeleva T. A., Vyssokikh M. Y., Zvyagilskaya R. A. Prevention of cardiolipin oxidation and fatty acid cycling as two antioxidant mechanisms of cationic derivatives of plastoquinone (SkQs) // *Biochim Biophys Acta*. – 2010. – T. 1797, № 6-7. – C. 878-89.
231. Anisimov V. N., Bakeeva L. E., Egormin P. A., Filenko O. F., Isakova E. F., Manskikh V. N., Mikhelson V. M., Panteleeva A. A., Pasyukova E. G., Pilipenko D. I., Piskunova T. S., Popovich I. G., Roshchina N. V., Rybina O. Y., Saprunkova V. B., Samoylova T. A., Semchenko A. V., Skulachev M. V., Spivak I. M., Tsybul'ko E. A., Tyndyk M. L., Vyssokikh M. Y., Yurova M. N., Zabezhinsky M. A., Skulachev V. P. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 5. SkQ1 prolongs lifespan and prevents development of traits of senescence // *Biochemistry (Moscow)*. – 2008. – T. 73, № 12. – C. 1329-1342.
232. Skulachev V. P. Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases // *J Alzheimers Dis*. – 2012. – T. 28, № 2. – C. 283-9.