

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«СТАВРОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИ-  
ВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

*На правах рукописи*

**Хералова Наталья Ивановна**

**ВЛИЯНИЕ АНТИМИКРОБНОГО НИСОМАЛЬНОГО ГЕЛЯ НА  
МИКРООРГАНИЗМЫ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ИНФИЦИРОВАННОГО ОЖОГА  
РОГОВИЦЫ**

1.5.11. – микробиология

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

Базиков Игорь Александрович

Ставрополь - 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Актуальность темы исследования.....	4
Степень разработанности темы исследования.....	6
Цель исследования.....	6
Задачи исследования.....	6
Научная новизна.....	7
Теоретическая и практическая значимость работы.....	8
Методология и методы исследования.....	9
Материалы исследования.....	10
Пациенты.....	10
Животные.....	11
Микробиологические методы исследования.....	11
Микроскопические методы исследования .....	12
Хромато-масс-спектрометрические методы исследования .....	13
Иммунологические методы исследования .....	13
Биотехнологические методы исследования.....	14
Гистологические методы исследования.....	14
Клинические методы исследования .....	14
Статистические методы исследования.....	14
Личное участие автора в получении результатов.....	15
Положения, выносимые на защиту.....	16
Степень достоверности и апробация результатов.....	16
ГЛАВА 1. Обзор литературы.....	18
1.1. Микробиоценоз роговицы в норме и при патологии.....	18
1.2. Механизмы повреждения роговицы при ожогах и современные методы лечения.....	28
1.3. Нанотехнологии для направленной доставки антимикробных пептидов.....	33
1.4. Заключение.....	41

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	43
ГЛАВА 2. Исследования микрофлоры у пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы.....	43
ГЛАВА 3. Разработка антимикробного ниосомального геля с пептидами.....	48
3.1. Технология получения антимикробного ниосомального геля с пептидами....	48
3.2. Антимикробная эффективность ниосомальных гелей с пептидами к микроорганизмам, выделенным у пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы.....	57
3.3. Изучение токсичности антимикробного ниосомального геля с пептидами....	58
ГЛАВА 4. Эффективность антимикробного ниосомального геля с пептидами у экспериментальных животных при инфицированном химическом ожоге роговицы.....	61
4.1. Уровень цитокинов у экспериментальных животных при инфицированном химическом ожоге роговицы.....	61
4.2. Результаты гистологического исследования эффективности лечения ожогов в эксперименте при применении антимикробного ниосомального геля.....	64
4.3. Изучение регенераторной способности антимикробного ниосомального геля с пептидами после инфицированного ожога в эксперименте.....	71
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	75
ВЫВОДЫ.....	86
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	88
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	89
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	90
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	92

# ВВЕДЕНИЕ

## Актуальность темы исследования

Согласно опубликованному 8 октября 2019 г. Всемирной организацией здравоохранения первому Всемирному докладу о проблемах зрения, более 1 миллиарда человек во всем мире живут с нарушениями зрения. По данным различных исследований, ожоги глаз составляют до 38% в общей структуре глазного травматизма [24]. Значительную часть ожоговых травм глаз составляют поражения химическими веществами, на долю которых приходится от 63,0 до 86,7 %, среди них, в 3/4 случаев встречаются щелочные [42, 72]. Это наиболее серьезные повреждения, как по характеру изменения в тканях, так и по исходу. При таких ожогах глаз 40-50 % пострадавших становятся инвалидами, а в 8-9% случаев это является причиной слепоты [23]. Слепота, вызванная патологией роговицы, находится на шестом месте в перечне основных причин нарушения зрения. В результате ожога, при нарушении целостности оболочек глаза, происходит контаминация внутренних структур условно-патогенными бактериями. Высокая вариабельность микробных возбудителей конъюнктивы, повышение роли оппортунистической, условно-патогенной микрофлоры и появление антибиотикорезистентной микрофлоры приводит к инфицированию ожогов [56, 101, 102]. Играет роль также загрязнение окружающей среды, бесконтрольное применением лекарственных препаратов, иммунодепрессантов. Антибиотикорезистентные микроорганизмы часто становятся причиной возникновения инфекционного процесса [17, 20, 39, 69, 181, 207].

Снижение защитных механизмов гуморального и местного иммунитета также приводит к развитию инфекционных осложнений ожогов глаз, и как следствие этого - затруднению социальной адаптации пациентов работоспособного возраста, резкому снижению качества жизни пациентов [71, 82]. Важным звеном гуморального иммунитета являются цитокины. Цитокины представляют собой группу белковых медиаторов, выполняющих регулирование защитной воспалительной

реакции. Исследование ключевой роли цитокинов в противостоянии инфицированному ожогу, позволит взглянуть по-новому на протекающие на тканевом, клеточном и молекулярном уровнях процессы.

Традиционные методы лечения пациентов с ожогами роговицы различной этиологии не всегда эффективны, в связи с чем поиск и разработка новых методов лечения инфицированных ожогов остаются все так же актуальными. Эндогенные антимикробные пептиды (дефензины) не вызывают резистентности бактерий или образование биопленки из-за их ионной структуры. Разработка методик получения эндогенных антимикробных пептидов из клеток крови человека и животных в современных условиях приобретает очевидную необходимость. В этой связи внимание исследователей привлечено к поиску возможностей разработки и изучения новых антимикробных средств с применением эндогенных антимикробных пептидов.

Один из перспективных методов лечения ожогов роговицы - использование плацентарных пептидов. Ранозаживляющая роль пептидов заключается в их мощном регенераторном потенциале, значительно улучшающем эпителизацию роговицы и восстановление тканей глаза, помимо этого известна высокая антимикробная активность экстракта клеток плаценты [63].

В тоже время, активно развивается новое направление в совершенствовании местного лечения - разработка носителей лекарственных средств, применение которых позволяет обеспечить оптимальный процесс эпителизации раневой поверхности и повышение эффективности ранозаживления. Так, в практике была отмечена высокая эффективность восстановительного лечения слизистой оболочки полости рта стоматологическим ниосомальным гелем, клиническая эффективность которого значительно превышает эффективность стандартных методов лечения [5, 8]. Поиск, разработка и изучение эффективности новых антимикробных наружных средств, позволяющих провести полноценное восстановление зрительных функций, являются важной задачей для клинической микробиологии и офтальмологии.

## **Степень разработанности темы исследования**

К настоящему времени, достижения медицины в области лечения инфицированных повреждений слизистой оболочки глаз связаны с использованием новых антимикробных и биологических модуляторов. К ним относятся низкомолекулярные пептиды с факторами роста и цитокинами (включая ингибиторы передачи сигналов и микро-РНК), генная терапия, стволовые клетки. Рядом учёных для стимуляции регенеративных процессов в роговице разработан гомологичный фибронектин и другие клеточные продукты [23, 140, 154, 158]. Авторами выявлено положительное влияние инстилляций фибронектина на раневой процесс в роговице при ожоговой болезни глаз. В последнее время перспективными разработками являются исследования по использованию наноконтейнеров для адресной доставки [120, 127, 128, 138, 145, 146]. Данные о высокой клинической эффективности применения ниосом кремнийорганической природы как наноконтейнеров [5, 6, 7] позволяют их позиционировать для доставки антимикробных комбинированных пептидов различной природы.

Тем не менее, используемые до настоящего времени методы лечения недостаточно эффективны [59, 79, 101, 102].

Необходимость разработки новых методов борьбы с осложнениями химических ожогов послужила основанием для проведения данной работы.

**Цель исследования** - разработка методики получения и изучение влияния антимикробных эндогенных пептидов в составе ниосомального геля на микроорганизмы при лечении инфицированного ожога роговицы.

### **Задачи исследования:**

1. Исследовать состав микрофлоры у пациентов с инфекционными осложнениями химического ожога роговицы.
2. Разработать антимикробный ниосомальный гель на основе технологии выделения эндогенных антимикробных и низкомолекулярных плацентарных пептидов и инкапсулирования их в кремнийорганические ниосомы.

3. Изучить антимикробную эффективность ниосомального геля с пептидами к микроорганизмам, выделенным у пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы.
4. Изучить безопасность антимикробного ниосомального геля с пептидами на экспериментальных животных.
5. Изучить уровень цитокинов и патоморфологические изменения у экспериментальных животных при лечении инфицированного ожога роговицы антимикробным ниосомальным гелем с пептидами.
6. Оценить антимикробную и регенераторную эффективность ниосомального геля с пептидами при заживлении инфицированных ожогов в эксперименте.

### **Научная новизна**

На основании микробиологических и микроскопических методов исследования проанализирован видовой состав нормобиоценоза слезной жидкости и роговицы человека, выделено и идентифицировано 103 культуры микроорганизмов, при изучении которых выявлено преобладание в структуре возбудителей коагулазонегативных стафилококков (*Staphylococcus epidermidis* - 53%), что свидетельствует о том, что условно-патогенная микрофлора может выступать в качестве этиологического агента в инфицировании химических ожогов роговицы.

В результате исследования впервые подобрана комбинация эндогенных антимикробных и низкомолекулярных плацентарных пептидов из тромбоцитарно-лейкоцитарной массы, на основе которых разработан новый антимикробный гель и отработана технология инкапсулирования пептидов в кремнийорганические ниосомы для повышения биодоступности и биосовместимости полученного геля.

Иммунологические показатели и патоморфологические изменения у экспериментальных животных при лечении инфицированного ожога роговицы продемонстрировали синергию антимикробного и регенераторного действия

ниосомального геля, проявленную в оптимизации процессов эпителизации раневой зоны.

В ходе эксперимента исследован уровень цитокинов в слезной жидкости у экспериментальных животных с химическими ожогами роговицы и показана их роль в регуляции механизмов ранозаживления, заключающаяся в стимулировании выработки провоспалительных цитокинов ИЛ-1, являющихся регулятором воспаления в организме при повреждении тканей глаза.

Доклинические исследования безопасности разработанного антимикробного ниосомального геля с выделенными пептидами в диапазоне переносимых, токсических и летальных доз не приводило к гибели экспериментальных животных и не вызвало изменений их поведения и основных физиологических функций, что свидетельствовало об отсутствии острой токсичности у испытуемого геля.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Дополнены современные представления о этиопатогенетической роли условно-патогенной микрофлоры кожи в развитии бактериальных осложнений при химических ожогах роговицы.

Обоснованы новые методологические подходы на основе применения эндогенных антимикробных и низкомолекулярных плацентарных пептидов, инкапсулированных в кремнийорганические ниосомы, в разработке антимикробных и ранозаживляющих наружных средств для полноценного восстановления зрительных функций.

Применение антимикробного ниосомального геля с пептидами в качестве наружного лечебного средства при экспериментальных химических ожогах способствовало более раннему началу эпителизации и сокращению сроков лечения - в 2,2 раза.

При использовании геля выявлено снижение количества осложнений в 2,8 раза, ранозаживление происходило с уменьшением васкуляризации роговицы с 81,2 % до 55,3 % случаев, в сравнении с традиционными методами лечения, что,

несомненно, будет оказывать влияние на работоспособность и уровень качества дальнейшей жизни пациентов, перенесших химические ожоги роговицы.

Доказанная антимикробная и регенераторная эффективность антимикробного наносомального геля на модели инфицированного ожога роговицы у экспериментальных животных позволяет рекомендовать его применение для лечения инфицированных ожогов роговицы в клинических условиях, в том числе обусловленными антибиотикорезистентными микроорганизмами.

Разработанный антимикробный гель продемонстрировал более высокую антимикробную активность, чем традиционно применяемый у пациентов с ожогами роговицы гель «Солкосерил».

Полученные при выполнении диссертации данные используются в учебном процессе на кафедрах микробиологии, а также биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (акты внедрения от 07.06.2021 г.). Разработаны технические условия (ТУ № 9158-007-76858530-2019 от 11 ноября 2019 г.) для производства антимикробного препарата на базе малого инновационного предприятия Ставропольского государственного медицинского Университета «Регенерация».

### **Методология и методы исследования**

Методологической основой настоящего исследования явился системный подход, в соответствии с поставленной целью и задачами, а также описанный в следующих работах: «О роли микробиоценоза роговицы в норме и при патологии» [13, 48, 52, 78]; «Об основных закономерностях адресной доставки при помощи наносом» [6, 7, 8]; «О фундаментальных механизмах и сущности влияния бактериальных осложнений на химические ожоги роговицы» [69, 85, 252].

Комплексный анализ и системный подход применялся для выполнения экспериментов и изложения результатов. Для достижения поставленных задач были внедрены современные технологии. Доказательность выполненного исследования основывалось на проведении экспериментального апробирования и микробиоло-

гического сравнения, контролируемого рандомизированного исследования, а также дедуктивного обобщения. Исследование включало выбор биологически активных действующих веществ, микробиологические и биотехнологические технологии, доклинические испытания токсичности на животных, инструментальные методы для определения иммунологических параметров, и гистологические методы изучения эффективности разработанных антимикробных средств. Предметом исследования явилось изучение микробиологический пейзажа и антибиотикочувствительности микроорганизмов, выделенных у пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы, технология выделения эндогенных антимикробных и низкомолекулярных плацентарных пептидов, разработка антимикробного геля, изучение его безопасности и эффективности на животных в соответствии с разрешением локального этического комитета СтГМУ (протокол № 60 от 15.12.2016 г.)

Эксперименты на животных проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg). В работе использованы микробиологические, иммунологические, биотехнологические, клинические, экспериментальные, гистологические, а также статистические методы исследования.

## **Материалы исследования**

### **Пациенты**

Под наблюдением в офтальмологическом отделении СККБ г. Ставрополя находились 100 пациентов с химическими ожогами различной локализации и этиологии, в том числе мужчин – 52 (52%), женщин – 48 (48%). Возраст пациентов варьировал от 18 до 79 лет (средний  $44,3 \pm 1,9$  лет). Выборка больных была сформирована в соответствии с критериями включения и исключения. Критерии включения: пациенты, поступившие в офтальмологическое отделение в возрасте от 19 до 70 лет, наличие информированного согласия на участие в исследовании. Критерии исключения: наличие других тяжелых хронических

заболеваний; отягощающего аллергологического анамнеза; хронических заболеваний ЖКТ, печени, почек, крови; хирургические вмешательства на ЖКТ (за исключением аппендэктомии); острых инфекционных заболеваний менее чем за 4 недели до начала исследования; прием лекарственных препаратов менее, чем за 30 дней до начала исследования; участие пациента в других клинических исследованиях в течение месяца до включения в данное исследование; отказ от участия в исследовании. В исследование не были включены лица, принадлежащие к группам, участие которых в исследованиях запрещено (заключённые, военнослужащие, контингент интернатов для инвалидов).

В качестве клинических образцов для бактериологического исследования микрофлоры использовали слёзную жидкость из конъюнктивальной полости пациентов.

### **Животные**

Исследование было выполнено на базе вивария Ставропольского государственного медицинского университета.

Для определения параметров острой токсичности исследуемого препарата использовали белых беспородных крыс весом 180–220 г и кроликов породы «Шиншилла», весом 2,1–2,3 кг.

### **Микробиологические методы исследования**

Проводили исследование микрофлоры конъюнктивальной полости пациентов, а также у экспериментальных животных при изучении эффективности разработанного антимикробного геля. Бактериологическое исследование слёзной жидкости проводили сразу же после её сбора, в течение 3 часов [3, 15, 63, 77, 79, 97]. Посев слёзной жидкости из конъюнктивальной полости осуществляли на следующие питательные среды: стафилококки выделяли на 2% желточно-солевом и 5% кровяном агарах; стрептококки на 5% кровяном агаре; дрожжеподобные грибы и грибы рода *Candida* на среде Сабуро; энтеробактерии на средах Эндо, Левина и Плоскирева (все среды производства ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия). Идентификацию выделенных культур микроорганизмов проводили при оценке морфологических, культуральных и биохимических свойств.

Использовали наборы стафи-, стрепто- и энтеротестов («ERBA LACHEMA», Чехия).

Проводили анализ чувствительности нормальной и выделенной у пациентов микрофлоры конъюнктивальной полости к антимикробному ниосомальному гелю с пептидами и офтальмологическому гелю «Солкосерил» (Меда Фарма ГмбХ и Ко КГ (Германия), используемому в качестве контроля. Чувствительность выделенных микроорганизмов определялась с помощью диско-диффузионного метода (ДДМ) на агаре Мюллера-Хинтона (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с использованием стандартизированных дисков (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия), пропитанных антимикробным ниосомальным гелем с выделенными пептидами в различной концентрации (1%; 5%; 10%) и офтальмологическим гелем «Солкосерил». Для количественного определения выросших микроорганизмов применяли систему колониеобразующих единиц – КОЕ/мл (CFU) и lg CFU.

#### **Микроскопические методы исследования**

Изучение кремнийорганических ниосом проводилось на сканирующем зондовом микроскопе Solver P47-PRO (NT-MDT, Россия), подключенному к ПК, с использованием кремниевых кантлеверов NSG01 (NTMDT, Россия), напыленных золотом, для полуконтактной АСМ (резонансная частота кантлевера составляла 120 кГц, константа жесткости – 5,5 Н/м) и CSG10 (NT-MDT, Россия) для контактной АСМ (резонансная частота кантлевера составляла 20 кГц, константа жесткости – 0,1 Н/м).

Отдельные этапы экспериментов выполняли с помощью световой микроскопии. Культурально-морфологические свойства выросших колоний оценивали с помощью стереоскопического микроскопа (Carl Zeiss, Германия, объектив PlanApo S 1,0 × FWD 60 mm; окуляр PI 10 x 23 Br foc) с подключением программного обеспечения Axio Imager (Carl Zeiss, Германия). Тинкториальные свойства изучали путем окраски по Граму (ЗАО «ЭКОлаб», Россия). Окрашенные мазки просматривали с помощью светового микроскопа Axio Scope A1 (объектив EC Plan-NEOFLUAR 100 x 1,3; окуляр PI 10 × 23 Br foc (Carl Zeiss, Германия)). Для обработки изображений использовалась программа Nova (NT-

MDT, Россия), позволяющая редактировать полученные изображения, а также представлять их в дву- (2D) и трехмерном (3D) формате.

### **Хромато-масс-спектрометрические методы исследования**

Эндогенные антимикробные пептиды выделяли по оригинальной методике из лейкоцитарно-тромбоцитарной массы крови доноров (Патент на изобретение №2729016 от 04.08.2020) [80]. Предварительно проводили вирусологический контроль крови. Определяли отсутствие антител к вирусам ВИЧ, гепатитов С и В с помощью тест-систем (АО «Вектор-Бест») в соответствии с инструкцией изготовителя. Контролировался рН ( $6,81 \pm 0,23$ ), а также содержание аминного азота ( $249,90 \pm 36,35$ ) мг %. Затем в течение 1 часа проводили ферментативный гидролиз стерильным раствором трипсина (ООО «БиолоТ», г. Санкт-Петербург, Россия). На 100 мл гидролизуемой смеси добавляли 10 мл трипсина в растворе фосфатного буфера рН 7,4. Осветляли полученный гидролизат добавляя 0,6 % перекись водорода. В дальнейшем проводили разделение компонентов на фракции с использованием хроматографической колонки с краном и фильтром (Симакс ЧСН ИСО 3585, Россия). Для гельфильтрации на поверхность фильтра наносили 1,5 г Сефадекса G-25 с последующей стерилизующей фильтрацией полученной субстанции через бактерицидные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм. Выделяли фракцию с антибактериальными пептидами массой 3-5 кДа, пропуская через гель раствор фосфатного буфера рН 7,4. Применяли высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) на хроматографе «Люмахром» (Россия). Устанавливали длину волны 214 нм, позволяющую определить максимальную концентрацию антимикробных пептидов. Фосфатный буфер рН 7,4 выступал в роли подвижной фазы со скоростью подачи  $150 \text{ мм}^3 / \text{мин}$ . Калибровочную кривую выстраивали применяя стандарт дефензина-альфа 1 компании Cloud-Clone Corporation (США) [10].

### **Иммунологические методы исследования**

Изучали уровень цитокинов у экспериментальных животных при инфицировании химических ожогов роговицы и лечении антимикробным ниосомальным гелем. Содержание провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-8 и TNF- $\alpha$  в слезной жидкости животных определяли методом иммуноферментного

анализа (ИФА) с помощью коммерческих тест-систем «Вектор-Бест» (Россия) согласно инструкции производителя.

### **Биотехнологические методы исследования**

Полученные ранее по оригинальной технологии низкомолекулярные плацентарные пептиды [5, 62, 63] и выделенные вышеуказанным способом эндогенные антимикробные пептиды инкапсулировали в наноконтейнеры - кремнийорганические нiosомы [8, 9, 10]. В дальнейшем получение нiosомальных гелей проводилось по оригинальной запатентованной нами технологии (Патент на изобретения РФ № 2655522) [80].

### **Гистологические методы исследования**

Гистологические исследования глаз животных проводили по общепринятым методикам. После энуклеации глаза применяли фиксацию в 10%-ном растворе формалина, обезвоживание в спиртах, заливку в парафин. Срезы толщиной 10-12 мкм получали на микротоме (Микротом санный НМ 430, механический, Thermo FS, Россия). При окраске использовали гематоксилин-эозин, по Ван-Гизону. Микроскопию полученных препаратов осуществляли при увеличении 150, 200, 400 раз с помощью светового микроскопа «Carl Zeiss» (Германия).

### **Клинические методы исследования**

Все исследования выполнялись на базе офтальмологического отделения ГБУЗ СК «Ставропольская краевая клиническая больница» и включали сведения анамнеза (возраст, пол, анамнез, преморбидные состояния, наличие хронических заболеваний, вакцинальный статус), время появления осложнений ожогов и их дальнейшая динамика, проводившееся лечение в амбулаторных условиях, данные объективного осмотра пациентов, результаты лабораторных и инструментальных методов обследования.

### **Статистические методы исследования**

Для статистической обработки применяли следующие программы: Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, США), Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., США), Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., США). Оценка достоверности различий между сравниваемыми величинами проводилась с использованием непараметрического критерия

Манна-Уитни. Достоверность различий принималась при  $P \leq 0,05$ . Среднее арифметическое (M) и ошибка среднего (SEM) использовалась для нормального распределения показателей.

### **Личное участие автора в получении результатов**

Автор самостоятельно провел анализ современных литературных источников, касающихся темы диссертации, с учетом чего разработаны дизайн исследования, протоколы экспериментов и описаны полученные результаты. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии в планировании и выполнении всех этапов работы. Автор принимал участие в заборе биологического материала и подготовки его к микробиологическим и иммунологическим исследованиям. Бактериологические исследования проведены на базе бактериологической лаборатории подготовки специалистов СтавНИПЧИ Роспотребнадзора совместно с д.м.н. Таран Т.В. Технология получения антимикробного ниосомального геля разработана в лаборатории нанотехнологии лекарственных средств СтГМУ совместно с к.б.н. Мальцевым А.Н. и м.н.с. Седых О.И. Доклинические исследования разработанного препарата выполнены в лаборатории фармакологии Научно-инновационного центра СтГМУ совместно с д.м.н., профессором Бейер Э.В.

Гистологические исследования - в патоморфологической лаборатории СтГМУ с участием д.м.н., профессора Боташевой В.С. При написании диссертационной работы автором выполнен сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и практических рекомендаций, активное участие в написании обзорных и оригинальных статей по теме диссертации.

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

1. Бактериологические исследования позволили установить преобладание в структуре выделенных возбудителей *Staphylococcus epidermidis* - 75,1 %, что определяет их доминирующую роль в этиологии инфекционных осложнений при ожогах глаза.
2. Разработанный подход по выделению эндогенных антимикробных пептидов из клеток крови позволяет получить ниосомальный гель для лечения ожогов, инфицированных антибиотикорезистентными микроорганизмами.
3. Определение чувствительности выделенных стафилококков к разработанному ниосомальному гелю с пептидами продемонстрировало его высокую антимикробную активность, значительно превышающую традиционно применяемые антибактериальные гели, что способствовало более раннему началу эпителизации и сокращению сроков лечения.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных результатов, представленных в работе, подтверждается достаточным объёмом, использованием современных методов исследования, а также высокотехнологичным оборудованием, имеющим сертификаты качества, свидетельства и аттестаты о метрологической поверке. Анализ экспериментальных данных был выполнен с использованием современного программного обеспечения и критериев статистического анализа. Применялись следующие методы исследования: классический бактериологический, иммунологический, биотехнологический с использованием нанотехнологий, экспериментальные исследования на животных, гистологический.

Работа выполнена в соответствии с планом научных работ Ставропольского государственного медицинского университета по теме: «Разработка трансдермальных препаратов с использованием ниосом - нановезикул кремнийорганической природы», номер государственной регистрации НИР: 01201372386.

Апробация диссертации проведена на совместном заседании коллективов кафедры микробиологии и кафедры офтальмологии ФГБОУ ВО Ставропольского

государственного медицинского Университета Министерства здравоохранения РФ (протокол № 17 от 26.04.2021 г).

Основные результаты выполненного диссертационного исследования были представлены на международных и всероссийских научных конференциях: «Биотехнология: взгляд в будущее» (2017, 2018, 2019, 2020 гг., г. Ставрополь), V Национальном Конгрессе бактериологов (2019 г., г. Москва).

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Микробиоценоз роговицы в норме и при патологии

Бактериальная инфекция занимает 85 % от всех инфекций глаз. Воспалительные процессы в роговице после ожогов являются одними из самых тяжелых патологий органа зрения, нередко приводящих к гибели глаза. Еще в 1907 г. И.И. Мечников предположил, что причиной возникновения большинства болезней является действие на клетки и ткани организма токсинов и метаболитов, продуцируемых микробами, обитающих на коже и слизистых оболочках человека и животных [35]. Рост инфекционных осложнений поражения роговицы, в большинстве случаев объясняется снижением иммунного статуса и резистентности микроорганизмов к антибиотикам. По мнению Кочергина С.А. (2012), проникновение патогенных микроорганизмов не всегда приводит к развитию заболевания. Это во многом зависит от индивидуального состояния защитных факторов организма в целом, и с видовым составом местной микрофлоры, в частности. Независимо от вирулентных свойств, все микроорганизмы подвергаются воздействию местных защитных факторов [52]. Несмотря на элиминацию микробов, исследования ряда учёных показали, что у здоровых людей в 80% случаев обнаруживаются микроорганизмы в полости слизистой оболочки глаза [39, 68, 89]. В последние годы в литературе появились сообщения о значении микрофлоры в поддержании местного гомеостаза и также роли в развитии различных патологий [40, 73, 94,103]. Организм человека в норме может содержать множество видов микроорганизмов, в том числе бактерии, вирусы и простейшие [79]. Большинство таких организмов представляют собой сапрофиты-комменсалы, когда сосуществование для одного из них - комменсала может быть полезным и безразличным для другого – (хозяина). Эти взаимоотношения могут носить как симбиотический, так и паразитический характер. На фоне антибиотикотерапии, после операций, травм, ожогов, при нарушениях обмена веществ, меняется видовой состав микробного сообщества [97, 104]. Согласно данным Околова И.Н. с соавт. (2009) видовой состав микрофлоры в конъюнктивальном мешке зависит от таких фак-

торов, как процессы метаболизма и продукции ферментов, конкуренции за питательные вещества, климата, географии, пола и возраста [78]. По данным этих авторов, имеют значение состояние анатомических барьерных функций тканей глаза и иммунный статус человека. Выявлено, что состав микрофлоры конъюнктивальной полости и ее размножение контролируется самим организмом с помощью механических (десквамация эпителия, смывание слезой, мигание), химических (рН секрета, протеолитические ферменты слезы), бактерицидных (компоненты неспецифической иммунологической защиты, содержащиеся в слезной жидкости секреторные иммуноглобулины) факторов [209].

Общепризнанным «золотым стандартом» этиологической диагностики различных инфекционных заболеваний является бактериологическое исследование. Отмечено, что при инфекционном поражении глаз бактериологические методы имеют первостепенное значение для постановки диагноза и назначения адекватного лечения [57]. Идентификация выделенных микроорганизмов подразумевает также определение чувствительности выделенных штаммов микроорганизмов к антимикробным соединениям с помощью диффузионного метода при использовании дисков, содержащих в них определенное количество антимикробных веществ [185, 205].

Микрообной спектр конъюнктивальной полости довольно обширен. Т. Rosebury (1962) установил, что для спектра наиболее характерны *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus aureus* и аэробные коринебактерии [218]. Сакович В.Н. и рядом других исследователей показано, что микрофлора в большей степени представлена монокультурой и реже имеет смешанный характер. Помимо вышеуказанных микроорганизмов, в составе микрофлоры обнаружены золотистые стафилококки, альфа-гемолитические стрептококки, грамотрицательные бактерии и микрококки [67, 89, 90, 245].

Инфекционная патология при заболеваниях глаз приводит к изменению состава конъюнктивальной микрофлоры. К примеру, бактериальные кератиты сни-

жают разнообразие видового количественного состава постоянной микрофлоры конъюнктивы и роговицы глаз [101]. Шаимова В.А. в 2006 г. при бактериальном кератите выделила в небольших количествах лишь непатогенные коринебактерии и нейссерии, эпидермальные стафилококки, сарцины. Выделение золотистых стафилококков, пневмококков, зеленающих стрептококков, микоплазм и энтеробактерий в больших количествах в течение длительного времени, по её мнению, может свидетельствовать о снижении самоочищающей функции конъюнктивы. Шевчук Н.Е. обращает внимание на то, что эпидермальный стафилококк, относящийся к условно-патогенной микрофлоре, можно выделить как на здоровых глазах, так и при бактериальном кератите [103].

Более 75% микроорганизмов при бактериальной инфекции глаз представлены коагулазонегативными стафилококками. Такие данные были получены Околовым И.Н. и соавт. при обследовании пациентов с острыми и хроническими конъюнктивитами [78].

Боровских Е.В. и соавт. изучали этиологические факторы инфекционно-воспалительных заболеваний глаз с целью оценки чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам [13]. Учёными были проведены 1726 бактериологических исследований биологического материала (мазки с конъюнктивы, соскобы с роговицы). В результате были выделены бактерии в 42,8%. В 94,72% случаев была обнаружена грамположительная микрофлора, представленная *Staphylococcus aureus* (19,76%), *Staphylococcus epidermidis* (42,9%), *Staphylococcus haemolyticus* (12,2%), *Staphylococcus intermedius* (1,9%), *Staphylococcus hominis* (1,5%), *Staphylococcus hyicus* (1,1%), *Streptococcus mutans* (1,5%), *Streptococcus salivarius* (1,6%), *Streptococcus viridans* (0,4%), *Enterococcus faecalis* (1,7%). Грамотрицательные микроорганизмы обнаружены в 5,28% и были представлены *Klebsiella oxytoca* (0,7%), *Escherichia coli* (0,5%), *Citrobacter* (0,5%), *Proteus* (0,8%), *Pseudomonas aeruginosa* (1,0%). Также были выделены грибы (*Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*) [176]. Наибольшая чувствительность выделенных микроорганизмов установлена к таким современным антибиотикам, применяемым в офтальмологической практике, как тобрамицин (87%),

офлоксацин (72%), ципрофлоксацин (71%). Учёные установили, что коагулазопозитивные микроорганизмы в монокультуре или в ассоциации со *S. aureus* имеют первостепенное значение в этиологии воспалительных заболеваний глаз [13].

С.А. Кочергин и соавт. (2012) сравнивал результаты исследований, полученных при обследовании здоровых лиц и пациентов с инфекционно-воспалительной патологией глаза. Исследователями обнаружено сдерживание роста условно- патогенной микрофлоры с помощью иммунной системы у здоровых лиц. Такой вывод сделан на основании того, что многие микроорганизмы (*S. epidermidis*, *S. aureus*, *Streptococcus spp.*, *S. pneumoniae*) высевает у здоровых и инфицированных пациентов. При снижении уровня иммунных клеток под действием различных факторов (травмы, ожоги, инфекции) происходит увеличение численности микробов-сапрофитов. Это приводит к интенсивному проникновению и размножению бактерий [53].

В.О. Анджелова с соавт. (2007) выявила, что полноценная диагностика в офтальмопатологии предусматривает оценку специфического гуморального и клеточного иммунного ответа на предполагаемый возбудитель [3, 4, 187].

Конькова А.Ю. в 2019 г. сравнивала биологические свойства бактерий рода *Staphylococcus* и геномоварианты *S. aureus*, выделенных из слезной жидкости пациентов с эндогенными увеитами для определения степени родства изолятов [49]. Авторами проанализированы фено- и генотипические характеристики штаммов *S. aureus*, изолированных из различных биотопов больных. Получены данные о том, что контаминация слёзной жидкости у больных с различной офтальмопатологией обусловлена перемещением микроорганизмов из носоглотки [50, 51]. Чаще всего, микроорганизмы *S. aureus* являются причиной инфекционных осложнений поражений глаза. При этом особая роль принадлежит наличию фона резидентного бактерионосительства этих штаммов, как фактора риска развития инфекции [48].

При бактериологических исследованиях микрофлоры конъюнктивы, не имеющей патологии, выявили её сходство с микрофлорой лица, шеи, ушей и волоси-

стой части головы [213]. Авторы установили обмен микрофлорой между различными участками кожных покровов и слизистой оболочкой глаза. Для патогенных микроорганизмов, наличие нормальной микрофлоры является препятствием [20, 39, 181, 207].

Кочергин с соавт. (2012) суммировал данные о выделении различных видов микроорганизмов (Таблица 1) [13, 20, 39, 78, 79, 101, 102].

Таблица 1 - Частота выделения различных видов микроорганизмов из конъюнктивы клинически здоровых индивидуумов

Виды бактерий	Частота выделения, %	Источники [13, 20, 39, 78, 79, 101, 102]
<i>S. epidermidis</i>	40–90	Околов И.Н., Гурченко П.А., Вохмяков А.В. (2008); Jensen M.K., Fiscella R.G. et al. (2005)
Коринеформные бактерии	0,5–35	Romero P., Mendez I. et al. (2006)
<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	4–65 0,4–13	Шаймова В.А. (2001); Боровских Е.В. (2001) Околов И.Н. с соавт. (2008); Romero P., Mendez I. et al. (2006)
<i>Propionibacterium spp.</i>	~ 17	Jensen M.K., Fiscella R.G., Crandall A.S. et al. (2005); Шаймова В.А. (2001)
<i>B. subtilis</i> <i>S. pneumoniae</i>	5–29 2–7	Bonfim R., Resende M.A. (2000); Каранадзе Н.А., Южаков А.М. (1984) Bonfim R., Resende M.A. (2000); Шаймова В.А. (2001); Боровских Е.В. (2001)

окончание таблицы 1

<b>Виды бактерий</b>	<b>Частота выделения, %</b>	<b>Источники [13, 20, 39, 78, 79, 101, 102]</b>
<i>C. albicans</i>	4–6	Ватченко А.А., Сакович В.Н., Максименко О.Н. (2007)
<i>Streptococcus spp.</i>	~ 4	Ватченко А.А., с соавт. (2007); Околов И.Н. с соавт. (2008)
<i>Neisseria spp.</i>	< 0,5	Bonfim R., Resende M.A. (2000); Шаимова В.А. (2001);
<i>Proteus spp</i>	0,5–2	Околов И.Н. с соавт. (2008)
<i>Enterobacteriaceae spp</i>	0,2–4	Ватченко А.А. с соавт. (2007); Околов И.Н. с соавт. (2008)
<i>Haemophilus spp.</i>	0,2–0,4	Bonfim R., Resende M.A. (2000); Шаимова В.А. (2001)

Околов И.Н. и соавт. (2008) также чаще всего в отделяемом из конъюнктивальной полости глаз выделяли при бактериальной инфекции коагулазонегативные стафилококки, причём среди обнаруженных грамположительных кокков доля коагулазонегативных стафилококков составила более 75% [79]. Учёными обнаружена резистентность коагулазонегативных стафилококков, выделенных у больных конъюнктивитами, к антибиотикам, применяемым для лечения данной патологии. Данные о видовом составе микроорганизмов, высеваемых при различных инфекционно-воспалительных заболеваний переднего отрезка глаза по данным разных исследователей, представлены в таблице 2 [18, 20, 39, 78, 68, 101, 102].

Таблица 2 - Частота выделения различных видов микроорганизмов из конъюнктивы при различных патологиях переднего отрезка глаза

<b>Возбудитель</b>	<b>Частота</b>	<b>Источники</b> [18, 20, 39, 78, 68, 101, 102]
<i>S. epidermidis</i>	> 48	Воронцова Т. Н. с соавт. (2010); Шаимова В.А. (2001); Околов И.Н. с соавт. (2008); Майчук Ю.Ф., Кононенко Л.А. (2008)
<i>S. aureus</i>	40-65	Шаимова В.А. (2001); Околов И.Н. с соавт. (2008); Майчук Ю.Ф., Кононенко Л.А. (2008)
<i>Staphylococcus spp</i>	> 20	Воронцова Т. Н. с соавт. (2010); Шаимова В.А. (2001); Майчук Ю.Ф., Кононенко Л.А. (2008)
<i>Streptococcus spp.</i>	> 7	Шаимова В.А. (2001); Околов И.Н. с соавт. (2008)
<i>S. pneumoniae</i>	> 6	Шаимова В.А. (2001); Майчук Ю.Ф., Кононенко Л.А. (2008)
<i>H. influenza</i>	> 5	Шаимова В.А. (2001)
<i>P. aeruginosa</i>	> 4	Шаимова В.А. (2001); Майчук Ю.Ф., Кононенко Л.А. (2008)

Сравнивая данные исследователей, можно сделать вывод о том, что многие микроорганизмы (*S. epidermidis*, *S.aureus*, *Streptococcus spp.*, *S. pneumoniae*) выделяются как в конъюнктивах клинически здоровых индивидуумов, так и в конъюнктивах при различных патологиях переднего отрезка глаза. Данный факт говорит о сдерживании силами иммунной системы роста условно-патогенной бактериальной популяции в норме. Снижение иммунитета приводит к резкому возрастанию численности популяции микробов сапрофитов и затем к инфекционно-воспалительному повреждению тканей глаза [52].

Отсутствие инфекционно-воспалительных изменений глаза обеспечивается каскадом оборонительных иммунных механизмов от внешних и внутренних раз-

дражителей, к примеру, секрецией определенных нейтрализующих веществ (цитокинов, гормонов, гормоноподобных веществ).

Каждый цитокин часто имеет много функций и может продуцироваться такими клетками семейства, как интерфероны, факторы некроза опухоли, факторы роста, лимфокины и хемокины (Таблица 3).

Таблица 3 - Основные цитокины, их свойства и концентрация в передней камере глаза [44, 52, 54]

Цитокины	Продуценты в тканях глаза	Основные эффекты	Концентрация в водянистой влаге, пг/мл
ИЛ-1	Клетки Лангерганса, макрофаги, клетки конъюнктивы, эпителий и строма роговицы, В-лимфоциты	Дифференциация лимфоцитов, хемоаттракция; рост адгезивности сосудистого эндотелия, прокоагулянтной активности, дегрануляция базофилов, секреция провоспалительных цитокинов, простагландинов, коллагена, фибронектина	ИЛ-1 $\alpha$ 0,5-5 ИЛ-1 $\beta$ 0,7-24
ИЛ-2	Активированные Т-лимфоциты и NK-клетки	Дифференциация Т- и В-лимфоцитов, активация моноцитов и макрофагов, секреция провоспалительных цитокинов	1,42-24
ИЛ-4	Базофилы, Th2-клетки	Пролиферация и дифференцировка Т- и В-лимфоцитов, снижение секреции ИЛ-1, ФНО, ИЛ-6; рост цитотоксической активности и миграции макрофагов, стимуляция секреции колониестимулирующих факторов	1,85-10
ИЛ-6	Базофилы, макрофаги, эпителий роговицы и конъюнктивы, строма роговицы, сосудистый эндотелий, Th2-клетки	Регуляция уровня воспаления, регуляция кровотока, секреция плазматических клеток, ингибирование синтеза ИЛ-1 и ФНО	5,8-438
ИЛ-8	Строма роговицы, макрофаги, эндотелий сосудов	Хемотаксис нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, стимуляция ангиогенеза	4,94-64
ИЛ-10	Эпителий конъюнктивы и роговицы, Th2-клетки, моноциты, макрофаги	Снижение продукции провоспалительных цитокинов, секреция антагониста рецепторов к ИЛ-1, снижение адгезивности лейкоцитов	0,7-7
ФНО	Макрофаги, Т- и В-клетки, эндотелий роговицы и конъюнктивы, трабекулярная сеть, базофилы	Провоспалительная активность, схожая с ИЛ-1 и ИЛ-6	0,88-3,1

окончание таблицы 3

Цитокины	Продуценты в тканях глаза	Основные эффекты	Концентрация в водянистой влаге, пг/мл
ИФН- $\gamma$	Строма роговицы, активированные Т-лимфоциты, NK-клетки	Рост секреции макрофагов, ингибирование секреторной активности Th2-клеток	1,49-5,1
ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\beta$	Эпителий роговицы; ИФН- $\alpha$ — моноциты, макрофаги, фибробласты, В-лимфоциты; ИФН- $\beta$ — фибробласты, макрофаги	Стимуляция синтеза ИЛ-1 и ИЛ-2. В высоких концентрациях ингибируют гуморальный и клеточный иммунитет, в умеренных осуществляют иммунорегуляцию	—
ТФР- $\beta$	Макрофаги, клетки цилиарного тела и трабекулярной сети	Ингибирование воспаления, роста эндотелия, ангиогенеза, пролиферации клеток цилиарного тела; синтез внеклеточного матрикса, активация фибробластов	ТФР- $\beta$ 1 — остаточное количество ТФР- $\beta$ 2 39,9-1680
Тромбоцитарный фактор роста	Эпителий роговицы, тромбоциты	Пролиферация роговичного эпителия, стимуляция миграции фибробластов и эпителия, хемоаттракция, синергизм действия ТФР- $\beta$ на фибробласты	Остаточное количество
Фактор роста фибробластов	Эндотелий роговицы и сосудов	Стимуляция митоза клеток эпителия и стромы роговицы, снижение синтеза ТФР- $\beta$	1,07-20,66
Сосудистый эндотелиальный фактор роста	Кератоциты, эпителий роговицы, тромбоциты, макрофаги	Ангиогенез, ингибирование апоптоза, АПК, индуцирование протеиназ	7,8 $\pm$ 5,9

Если посредством травмы, ожога, инфекции, нарушаются иммунологические механизмы защиты, то это приводит к проникновению внутрь глаза экзо- и аутоантигенов. В этом случае в тканях глаза, по мнению Керимова и соавт. (2005), формируется определенный тип реагирования — повышается уровень провоспалительных цитокинов: TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 (Таблица 4) [44].

Таблица 4 - Уровни содержания исследуемых цитокинов в слёзной жидкости при различных видах офтальмопатологии

Офтальмопатология	Выявленные изменения в уровнях цитокинов (в слезной жидкости методом ИФА)	Источники [1, 44, 46,103]
Хламидийный конъюнктивит	↑IL-1β, ↑IL-6, ↑IFN <sub>γ</sub>	Creuzot-Garcher C. (2001) Hoang-Xuan T., Baudouin C.,
	↑ IL-1β, ↑TNF <sub>α</sub>	Шевчук Н.Е., Мальханов В.Б. (2007)
	↑IL-4 (хроническое течение)	Шевчук Н.Е. (2007)
Герпетический кератит и кератоувеит	↓IFN <sub>α</sub>	Слепова О.С., Герасименко В.А., Макаров П.В. (1998)
	↑IL-1, ↑IL-6, ↑TNF <sub>α</sub> , ↑IFN <sub>γ</sub>	Шевчук Н.Е. с соавт. (2007, 2009)
Аденовирусный конъюнктивит	↑IL-1, ↑IL-6, ↑TNF <sub>α</sub>	Mondal S.K.(2008), Авдеева Ж.И.(2002)
	↑IL-6	Шевчук Н.Е. (2009)
Травмы глаза (средней степени и тяжелые)	↑IL-1β, ↑IL-2, ↑TNF <sub>α</sub>	Слепова О.С., Герасименко В.А., Макаров П.В. (1998), Ковалёва Л.А.(2013)
Ожоги глаз	↑IL-1β, ↑TNF <sub>α</sub> , ↑IL-6, ↑IL-4	Керимов К.Т. с соавт. (2005)
Болезнь трансплантата после кератопластики	↑IL-1β, ↑IL-2, ↑TNF <sub>α</sub>	Слепова О.С., Герасименко В.А., Макаров П.В. (1998)

Примечание: ↑ — повышенное содержание цитокина по сравнению с нормой, ↓ — снижение продукции цитокина по сравнению с нормой.

Не менее важную роль в поддержании интраокулярного гомеостаза, играет нормальная микрофлора. Конъюнктивальная микрофлора имеет особенные отличия от других микробных сообществ, к примеру, в ней никогда не определяются лакто- и бифидокультуры, а здоровая конъюнктура сдерживает рост популяций многих микробов (*S.epidermidis*, *S. aureus*, *Streptococcus spp.*, *Neisseria spp.*, *Enterobacteriaceae spp. и др.*). Конъюнктивальная микрофлора, представленная сапрофитами неспецифически стимулирует местные защитные реакции, что поддерживает локальный иммунитет в состоянии высокой функциональной активности. Однако, собственная условно-патогенная микрофлора может становиться ис-

точником бактериального роста, вплоть до панофтальмита [52]. Постоянно совершенствуются методы оценки конъюнктивальной микрофлоры. К примеру, уже используется новая технология детектирования микроорганизмов по нелетучим жирным кислотам клеточной стенки микроорганизмов методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии. По данным Кузнецовой О.Ю. и соавт., (2016) определение микробиоценоза глазной поверхности методом газовой хромато-масс-спектрометрии позволяет качественно и количественно оценить микробиоценоз глазной поверхности и индивидуально подобрать эффективную антимикробную, этиологическую и патогенетическую терапию [54].

Таким образом, дальнейшее изучение конъюнктивальной микрофлоры и иммунологических механизмов органа зрения позволяет более предметно объяснить патогенез травматического, ожогового и инфекционного воспаления глаза.

## **1.2 Механизмы повреждения роговицы при ожогах и современные методы лечения**

Актуальность проведения полноценного лечения пациентов с ожогами роговицы основана на необходимости учёта роли антибиотико-резистентной микрофлоры в офтальмопатологии. В подавляющем числе случаев происходит инфицирование ожога [101, 102]. Причиной такой ситуации является поливалентная устойчивость микроорганизмов к применяемым антимикробным препаратам. По данным Майчук Ю.Ф., (2010) исходы бактериальных осложнений ожогов роговицы составляют до 25% случаев инвалидности по зрению [17, 69]. Наиболее сложно протекают случаи с центральным расположением дефекта, что соответственно снижает качество жизни пациентов [95]. Химические ожоги глаза представляют собой нарушение целостности роговицы. По данным Пронкина И.А. и соавт. (2015), в нормальном состоянии незначительные поверхностные ожоги могут самостоятельно регенерировать в течение 1-7 суток [85]. При глубоко химическом ожоге роговицы с поражением базальной мембраны, инфекционно-воспалительным процессом, наличием лимбальной недостаточности, дистрофическими изменениями ткани роговицы, нейротрофическими поражен-

ями - нарушаются процессы нормальной эпителизации, что приводит к возникновению хронического или рецидивирующего дефекта ткани [235]. Такие поражения переднего отрезка глаза являются одной из наиболее обширных и тяжело поддающихся лечению патологий. Нередко осложнения химических ожогов глаза инфекционно-воспалительного характера приводят к инвалидизации [59, 72]. Распространенность в широких слоях населения также обуславливает высокую социальную и экономическую значимость данной проблемы [22, 24, 33]. Заживление ожоговой раны роговицы представляет интерес не только для фундаментальной науки, но также является важной медицинской проблемой. Повреждения слизистой оболочки глаз являются значительной клинической проблемой. По статистике ожоги глаз возникают примерно в 30% от числа всех случаев травм органов зрения, при этом приблизительно 40% пациентов в результате неэффективного лечения получают значительные нарушения, не позволяющие вернуться к полноценному образу жизни. Ожог глаз инициирует действие многочисленных процессов, нарушающих работу сосудистого тракта, склеры, конъюнктивы, роговицы и других структур глаза. По различным оценкам [21, 72] около 20% населения страдает от травмы глаз в течение всей своей жизни. Таким образом, уровень травм глаз составляет более миллиона человек в год. Эти высокие цифры иллюстрируют необходимость лучшего понимания механизмов заживления роговицы и разработки эффективных способов ускорения и улучшения заживления ожоговых ран. В этой связи необходимо своевременное эффективное комплексное лечение. Однако, современные возможности медицины не всегда эффективны для полноценного восстановления повреждений, связанных с ожогами. Причиной является сложный механизм повреждения и заживления глаза при ожогах. Химические щелочные ожоги растворяют белок тканей и способствуют развитию некроза внутренних структур глаза. Процесс развития ожога включает ряд связанных событий, которые имеют общую тему восстановления раны клетками роговицы [41]. Авторами установлено, что в результате каскада патологических реакций, спонтанная регенерация эпителия замедляется или не происходит. Вначале эпителиальный дефект роговицы в по-

следующем сопровождается инфильтрацией стромы полиморфноядерными лейкоцитами, изъязвлением и задержкой процессов регенерации роговицы в фазе протеолитического заживления [183]. В дальнейшем развивается десметоцеле (разрушение стромы до десцеметовой мембраны с протрузией и перфорация (прободение), что нередко приводит к гибели глаза. В этой связи, основным методом лечения легких и средних ожогов глаз, является регенерация роговицы. [74, 236]. Анатомические и функциональные нарушения приводят к потере прозрачности, появляются персистирующие эрозии и язвы, наступает васкуляризация роговицы [99]. Значительное снижение остроты зрения нередко приводят к поиску наиболее эффективных методов лечения переднего отрезка глаза [60, 80, 84, 86, 92, 96, 100, 147]. Лечение ожоговых дефектов роговицы является комплексным и включает различные комбинации лекарственных средств [16, 31, 37, 43, 58, 124]. Патологические реакции заживления сопровождаются нарушением окислительно-восстановительных процессов, снижением рецепторной вооруженности клеточных мембран, а также, нарушением основных ферментативных взаимодействий и снижением продукции цитокинов [32, 66, 88].

Феномен иммунологически привилегированного органа, возник у глаза, как физиологический процесс [9, 41, 91, 102]. Учёными установлено, что содержание иммунологической привилегированности заключается в действия ряда факторов и особом сосудистом русле, заключающемся в отсутствии лимфатического оттока у сосудов крови на фоне афферентного типа дренажа. Такой гематоглазной барьер обуславливает прочную защиту от чужеродных микроорганизмов [104, 132, 156, 174]. Помимо этого, существует иммуносупрессивное микроокружение (ТФРР,  $\alpha$ -МСГ, ВИП), CD8<sup>+</sup>-лимфоциты. Цитокины являются группой белковых медиаторов, выполняющих регуляторную функцию процесса заживления на всех его стадиях [1, 134, 153, 202]. Ряд учёных анализируя содержание цитокинов в жидкости передней камеры глаза в норме отмечают преобладание содержания противовоспалительных цитокинов над провоспалительными [148, 206, 224].

Последние достижения медицины в области лечения повреждений слизистой оболочки глаз связаны с использованием новых биологических модуляторов. К ним относятся низкомолекулярные пептиды с факторами роста и цитокинами (включая ингибиторы передачи сигналов и микро РНК), генная терапия, стволовые клетки, а также использование наноконтейнеров для адресной доставки [120, 127, 128, 138, 145, 146]. Рядом учёных доказано, что для стимуляции регенеративных процессов в роговице перспективным является использование капель гомологичного фибронектина [23, 140, 154, 158]. Авторами выявлено положительное влияние инстилляций фибронектина на раневой процесс в роговице при ожоговой болезни глаз.

Низкомолекулярные плацентарные пептиды содержат большое количество различных факторов роста, цитокинов и помимо регенераторного механизма, обладают, ещё и иммуностропным действием, обеспечивая антимикробный эффект [159, 163, 166, 188]. Пептиды опосредуют различные функции клеток, включая внутриклеточные и межклеточные сигнальные молекулы, в том числе интерлейкины, потенцирующие Т-клетки иммунной системы, реагирующие на микробные агенты. Тем не менее, повышение эффективности ранозаживления различных клеток роговицы является главным эффектом действия пептидов. Стволовые клетки, находящиеся в роговично-клеточном соединении и лимбе, обеспечивают запас пролиферирующих клеток для регенерации роговичного эпителия, который является самообновляющейся тканью [139, 192, 216, 220, 246, 247]. По данным ряда авторов, ранозаживление включает миграцию клеток, пролиферацию, адгезию и дифференциацию с расслоением клеточного слоя [133]. Crosson et al., (1986) отмечают особую роль факторов роста и цитокинов, а также внеклеточной матрицы (ЕСМ), опосредованных сигналом на месте раны [133]. Их роль в восстановлении целостности эпителия и гомеостаза роговицы. Учёные отмечают, что кинетика заживления эпителиальных ран делится на начальную фазу и включает клеточную и субклеточную реорганизацию для инициирования миграции эпителиальных клеток на кромке раны. Фаза закрытия включает миграцию клеток, с последующей пролиферацией и дифференциров-

кой клеток, которая путем стратификации приводит к восстановлению исходного многоклеточного эпителиального слоя. Факторы роста и цитокины являются важными регуляторами, которые стимулируют рост, пролиферацию, миграцию, дифференцировку, адгезию клеток для ранозаживления [108,109]. Передача сигналов эпидермального фактора роста включает в себя основной путь, который инициирует миграцию и пролиферацию клеток и стимулирует заживление раны эпителием роговицы [191, 257]. Zhang C. et al. (2015) установили, что в ранние периоды заживления эпителиальных ран роговицы, клеточная сигнализация [252] приводит к миграции и пролиферации клеток в эпителиальных клетках [152, 170, 191, 242, 243, 244, 248, 249, 253]. Wang F. et al. (2012), исследуя эпителиальные раны роговицы также продемонстрировала, что что сигнальные пути играют важную роль в самовоспроизведении роговичного эпителия и заживлении ран [243].

Центральное место в лечении инфекционных осложнений ожогов глаз занимают гелевые антимикробные композиции [82]. Авторами показано, что в зависимости от тяжести клинического поражения, они могут содержать антимикробные, противовоспалительные, антиаллергические средства, а также стимулирующие иммунную систему. Учёными сделан вывод о целесообразности применения комплексных препаратов, содержащих противовоспалительные и антибактериальные средства, к примеру, кортикостероид + антибиотик. Таким образом, антимикробная терапия, регенерация повреждённой ткани в комплексе с воздействием на клетки иммунитета - являются главными направлениями наружного лечения инфицированных ожогов роговицы.

Одним из перспективных методов лечения ожогов роговицы может быть применение плацентарных пептидов. Ранозаживляющая роль пептидов заключается в их мощном регенераторном потенциале, значительно улучшающем эпителизацию роговицы и восстановление тканей глаза, к тому же показано, что плацентарные пептиды обладают мощным антимикробным действием.

Инфекционные осложнения ожогов обусловлены появлением антибиотикорезистентной микрофлоры, загрязнением окружающей среды, бесконтрольным

применением лекарственных препаратов, иммунодепрессантов. Всё это является причиной снижения защитных механизмов гуморального и местного иммунитета, смены микробных возбудителей, повышения роли оппортунистической, условно-патогенной микрофлоры в развитии инфекционных осложнений ожогов глаз [93]. В результате, несмотря на применение мощного арсенала традиционного лечения, такие бактериальные осложнения относятся к тяжелой патологии органа зрения [82]. Все это объясняет необходимость поиска новых антимикробных средств при антибиотикорезистентности и изучения их антибактериальной эффективности в современных условиях. Применение наноконтейнеров позволяет обеспечить оптимальный процесс антимикробного воздействия и эпителизации раневой поверхности для повышения эффективности ранозаживления. Так, в практике была отмечена высокая эффективность антимикробного восстановительного лечения слизистой оболочки полости рта стоматологическим нисосомальным гелем [5, 6, 7, 8]

### **1.3. Нанотехнологии для направленной доставки антимикробных пептидов**

В настоящее время наиболее острые последствия и глобальная смертность вызваны преимущественно инфекционными заболеваниями [208]. Быстрое возникновение устойчивости к антибиотикам у патогенных микробов становится актуальной глобальной проблемой общественного здравоохранения [232]. В начале развития устойчивости к антибиотикам, обычные антибиотики, такие как пенициллин и метициллин, были неэффективны для устойчивых штаммов [155]. В последние годы появились устойчивые к ванкомицину и линезолиду штаммы. Это привело к постоянным потребностям в новых антибиотиках, ставя перед клиницистами дилемму, стоит ли тестировать новый мультирезистентный штамм с другим антибиотиком. К синтетическим антимикробным агентам, таким как салицилат, хлоргексидин, изотиазолиноны, тиосемикарбазоны, октенидин и даже четвертичные аммониевые соединения, также возможно развитие лекарственной устойчивости [110]. Учёными отмечено, что устойчивость к антибиотикам рассматривается как специфическая реакция бактерий на травму, вы-

званную антибиотиками, что означает, что ее нельзя полностью избежать, даже если будет создан новый антибиотик [195]. Повышение уровня устойчивости к антибиотикам, лекарственной аллергии и нехватки антибиотиков еще больше усложняет выбор антибактериальных средств [196]. Проблемы, с которыми сталкиваются традиционные противомикробные препараты, включают устойчивость к лекарствам, передозировку и цитотоксичность [198]. В этой связи очевидна необходимость создания эффективной и безопасной системы высвобождения лекарств, которая может задерживать высвобождение токсичных антимикробных агентов и снижать риск бактериальной устойчивости к лекарствам. Помимо антибиотиков, другие антимикробные материалы также имеют свои проблемы в клиническом применении.

Поиск, разработка и изучение эффективности новых антимикробных и ранозаживляющих наружных средств, позволяющих провести полноценное восстановление зрительных функций, особенно после осложнения ожогов роговицы антибиотико-резистентными микроорганизмами, являются важной задачей для клинической микробиологии и офтальмологии [25, 29, 34, 36, 45].

В последние годы появилась альтернатива традиционным антибиотикам. Это антимикробные пептиды, обладающие антимикробными свойствами (особенно короткими последовательностями) из-за их ионной структуры. Эти свойства помогают им не вызвать резистентность бактерии или образование биопленки [135, 177, 217, 225]. Однако антимикробные пептиды также являются гемолитическими, токсичными и легко теряют эффективность, и, следовательно, им нужна эффективная система доставки лекарств, чтобы избежать этих побочных эффектов [117, 118, 201]. В этом случае использование наноконтейнеров для целевой доставки антимикробных пептидов, является весьма перспективным направлением.

В течение последнего десятилетия нанотехнология оказала значительное влияние на медицину и способствовала ее улучшению. Учёные разработали инновационные системы доставки лекарств, демонстрирующие длительную физическую и химическую стабильность, легкие и надежные продукты, полезные

функции и разумную стоимость. Наночастицы, липосомы, ниосомы, твердые липидные частицы, мицеллы, везикулы поверхностно-активных веществ и квантовые точки использовались для доставки лекарств, белков, пептидов, нуклеиновых кислот с различными физико-химическими и терапевтическими свойствами [106, 125, 180, 229]. Наноконтейнеры, изготовленные из органических и биосовместимых материалов, представляют собой наилучшее решение для доставки пептидов. Фактически, они могут захватывать различные вещества, многократно снижая их токсичность и могут быть модифицированы путем конъюгирования с направляющими и селективными молекулами [197]. Наноконтейнеры могут также совместно доставлять как терапевтические молекулы, так и диагностические вещества [219]. Значительный исследовательский интерес к области доставки лекарств проявляется с использованием систем доставки частиц в виде носителей как для малых, так и для больших молекул. К примеру, наночастицы имеют размер от 10 до 1000 нм и могут быть синтезированы из липидов, белков и углеводов, а также нескольких натуральных и синтетических полимеров [141]. Для доставки лекарство растворяют, инкапсулируют или присоединяют к матрице наночастиц. В зависимости от способа получения могут быть сконструированы наночастицы, наносферы или нанокапсулы. Системы наночастиц используются для различных биомедицинских применений [143]. К примеру, для улучшения терапевтического индекса инкапсулированных лекарств, либо путем защиты их от ферментативной дегградации [179], изменения фармакокинетики [223], снижения токсичности [171] или обеспечения контролируемого высвобождения в течение продолжительного периода времени [113, 160]. Наночастицы могут повышать пероральную биодоступность слаборастворимых лекарств и проникновение в ткани после парентерального введения через прилипание к капиллярной стенке. Они также улучшают доставку определенных лекарств через мембраны [142]. Будучи небольшими по размеру, у наночастиц есть потенциал, чтобы из сосудов проникнуть в места воспаления [136]. Ограничение размера наночастиц для преодоления различных биологических барьеров зависит от ткани, места мишени и кровообращения [121]. Наночастицы подвер-

жены фагоцитозу и эндоцитозу, благодаря их гидрофобной поверхности, они быстро опсонизируются (покрываются) белками плазмы и поглощаются мононуклеарной фагоцитарной системой, которая обнаруживается в таких органах, как печень, селезенка и костный мозг. Однако покрытие полиэтиленгликолем (ПЭГ) или гидрофильным сополимером, приводит к повышенной гидрофильности, что позволяет длительно циркулировать в кровотоке и, следовательно, потенциально накапливаться в органах и в местах воспаления [136]. Такими свойствами обладают ниосомы кремнийорганической природы, имеющие стенку из ПЭГ12-диметикона [28]. Самоорганизующиеся при встряхивании и обработке ультразвуком ниосомы состоят из гидрофобного основания и гидрофильной оболочки, которые считаются превосходными носителями лекарственных средств [178, 250]. Второй тип наночастиц представляет собой полимер, который может быть синтезирован различными способами [214], в соответствии с потребностями применения и типа лекарственного средства. Полимерные наночастицы имеют свойства контролируемого субклеточного размера и биосовместимости с тканями и клетками [212]. Растворимость и фармакокинетические свойства лекарств могут быть улучшены путем инкапсулирования внутрь наночастиц [107]. Исследователи к настоящему времени использовали различные типы наночастиц для таких химиопрепаратов, как нарингенин [233], куркумин [119] и эпигаллокатехин галлат [169, 228]. Учёные установили, что наночастицы стабильны в кровяном русле, нетоксичны, не тромбогенны, не иммуногенны, не активируют нейтрофилы, не вызывают воспаление и применимы к доставке различных типов молекул, в том числе, антимикробных пептидов [137].

Ниосомы являются наиболее перспективными наночастицами для доставки лекарств, и поскольку они неионные, они менее токсичны и улучшают терапевтический индекс лекарств, ограничивая их действие на клетки-мишени. Ниосомы представляют собой микроскопические слоистые структуры, которые образуются на примеси неионного поверхностно-активного вещества класса эфира алкила или диалкилполиглицерина и холестерина с последующей гидратацией в водных средах [193]. Они напоминают липосомы в своей архитектуре и могут

быть использованы в качестве эффективной альтернативы липосомальным носителям лекарств [238]. Характеристики рецептуры везикул являются переменными и контролируемыми. Это относится к изменению состава пузырьков, размеров, ламеллярности, захваченного объема, поверхностного заряда и концентрации [26, 27]. Везикулы могут выступать в качестве депо, контролируя высвобождение. Ниосомы осмотически активны, стабильны и повышают стабильность инкапсулированного лекарственного средства. Они улучшают пероральную биодоступность слабо абсорбированных лекарств и улучшают проникновение в кожу. Ниосомную дисперсию в водной фазе можно эмульгировать в неводной фазе для регулирования скорости доставки лекарственного средства и введения нормального везикула во внешней неводной фазе. Ниосомы были предложены для ряда потенциальных терапевтических применений, то есть в качестве иммунологических адъювантов [172], противоопухолевых [7], антимикробных [112, 162], противовоспалительных препаратов [226] и в качестве диагностических средств визуализации [238]. Кроме того, ниосомы являются универсальными системами-носителями и могут управляться различными путями. Особые усилия были направлены на использование ниосом в качестве эффективных трансдермальных систем доставки лекарств [116, 130].

Создание высокоэффективного антимикробного средства с высокой проникающей способностью и длительным пролонгированным действием, необходимым для эффективной регенерации ожогов роговицы возможно с использованием вышеперечисленных нанотехнологий для направленной доставки. В этом случае необходима новая система доставки антимикробных пептидов с характеристиками замедленного высвобождения. Наноматериалы с присущей им антимикробной активностью или наноматериалы, которые могут повысить эффективность и безопасность антимикробных препаратов, называются наноантимикробными [182, 204]. Они могут быть эффективной альтернативой обычным антибиотикам путем обеспечения улучшенной биодоступности, защиты, мукоадгезии, абсорбции, контролируемого высвобождения и целевой доставки для инкапсулированных или адсорбированных на поверхности антимикробных пепти-

дов [173]. Набор органических, неорганических и органических компонентов в структуре ниосомального геля, контролирует высвобождение антимикробных пептидов [126, 165, 203]. На этот процесс могут оказывать влияние изменения рН, температуры, ферментативный катализ, ультрафиолетовое гамма-излучение и даже воспаление [251, 252, 253]. Антимикробный гель можно наносить на мочевые катетеры, центральные венозные катетеры [210], контактные линзы, суставные и зубные имплантаты для полного заживления ран [157, 168, 227]. Различные типы гелей также обладают разнонаправленными антимикробными свойствами [221, 237]. К примеру, ниосомальный гель обладает антимикробным действием за счёт самих ниосом кремнийорганической природы. В ниосомальных гелях антибактериальные пептиды можно использовать в более низкой дозе, чем при системном введении, что позволяет преодолеть проблему устойчивости и в некоторой степени уменьшить другие нежелательные побочные эффекты [8, 167]. Эти характеристики привлекли большое внимание в фармацевтической и медицинской областях, особенно для разработки противомикробных препаратов на основе эндогенных антимикробных пептидов (АМП). АМП представляют собой многочисленную и разнообразную группу молекул, продуцируемых многоклеточными организмами в качестве защитного механизма от конкурирующих патогенных микробов [149]. Они признаны в качестве возможного источника панацеи для лечения устойчивых к антибиотикам бактериальных инфекций [122], поскольку АМП обладают высокой антимикробной активностью в отношении очень широкого спектра микроорганизмов, включая грамположительные и грамотрицательные бактерии, грибы и вирусы [184]. Хотя до сих пор не достигнуто единое мнение о конкретном механизме АМП, известно, что АМП воздействуют на мембраны и, в конечном итоге, приводят к гибели бактерий [149]. Однако у АМП есть свои недостатки. Они не стабильны и легко биodeградируются. Более того, антимикробные свойства природных АМП не так хороши, как у антибиотиков. Чтобы преодолеть все эти недостатки, исследователи разработали некоторые рекомбинантные АМП с короткими цепями, которые обладают

улучшенными антибактериальными свойствами [117, 118]. Однако, их высокая стоимость получения не позволяет наладить массовое производство.

Гели также могут быть хорошей наружной формой для АМП с целью предотвращения быстрой деградации. Последние достижения в области создания природных и синтетических гелей имеют свойство носителей. Гидрогели в качестве антимикробных биоматериалов могут быть альтернативой традиционным антибиотикам, поскольку из-за неправильного использования антибиотиков и других противомикробных препаратов было создано слишком много устойчивых к лекарствам бактерий [200]. Контролируемое и пролонгированное высвобождение, местное введение, стимулированное включение-выключение, повышенная механическая прочность и улучшенная биосовместимость - являются важными преимуществами, которые может принести широкое разнообразие гелей. Новые антимикробные биоматериалы, новая комбинация этих материалов и новые подходы принесут новые перспективы и дальнейшие перспективы в антимикробном лечении [87, 98, 105, 144]. Для лечения микробных инфекций крайне важно, чтобы антимикробные компоненты могли высвобождаться для проникновения в иммунные клетки и уничтожения патогенных микроорганизмов изнутри [70, 81, 123]. Гидрогели, содержащие антибиотики, наночастицы металлов, антимикробные полимеры и пептиды, могут устойчиво высвобождать антимикробные агенты, что важно для эффективного лечения инфекций и предотвращения образования биопленок. Учёными разработаны также самосборные пептиды с хорошей антибактериальной активностью и большей специфичностью к клеткам, проявляющими высокую антибактериальную активность [222, 240]. Инкапсулированные в структуру гидрогеля, самосборные пептиды обладали антибактериальной активностью к грамположительным микроорганизмам [190]. По данным ряда исследователей, высокоактивный антимикробный пептид иммобилизованный на поверхности гидрогеля на основе полиэтиленгликоля, обладал бактерицидной активностью против *S. aureus* и *S. epidermidis* [131]. В исследованиях, проведенных учёными [175, 186, 189, 254] мультидоменные пептиды продемонстрировали лучшую антимикробную активность в

гидрогелях, чем в растворе. Было доказано, что гидрогели, содержащие цистеин и нитрат серебра, обладают определенной антибактериальной активностью [114]. Установлены более высокие значения индекса антимикробной биосовместимости по сравнению с синтетическими лекарственными средствами с аналогичными структурами [111, 150, 215, 231]. Song et al. (2012) разработал клеточный адгезивный полипептид и гидрогель на основе ПЭГ с присущей ему антибактериальной активностью для заживления кожных ран [230]. Кроме того, Vuhrman J.S. (2013) с соавторами иммобилизировал функциональный белок в микросферах полиэтиленгликоля, демонстрируя новый метод высокой терапевтической эффективности без токсичности [123]. В исследованиях Xie Z. et al. (2015) и др. биоразлагаемый гель функционализированный АМП, обеспечивал превосходное ингибирование бактерий и способствовал заживлению ран без проявления цитотоксичности [247]. Интересно, что наноструктурированные гидрогели с D-аминокислотами и АМП продемонстрировали высокую антимикробную активность без цитотоксичности [199]. Эти исследования принесли возможность применения АМП в качестве антибиотиков в клинике. Кроме того, Bardajee GR. et al. (2012) были разработаны композитные гидрогели, снизившие минимальную дозировку антибиотиков [115]. Синергетический подход повысил эффективность композитных гидрогелей в решении проблемы устойчивости к антибиотикам и снижению побочных эффектов. Синергетически эффективные композитные гели продемонстрировали большой клинический потенциал расширив антибактериальный спектр. Когда различные антимикробные ингредиенты были объединены в гель, антибактериальный спектр геля оказался более широким, и антимикробная эффективность выше по сравнению с гелями, загруженными одним агентом отдельно [115, 239]. Для будущих клинических применений крайне важно протестировать антимикробные гели против клинически изолированных микробов, особенно штаммов с множественной лекарственной устойчивостью, и оценить биосовместимость гидрогелей и инкапсулированных грузов *in vitro* и *in vivo*. Благодаря рациональному дизайну, химическому составу синтетических полимеров и всесторонней оценке *in vitro* и *in vivo* гидрогеле-

вые системы с широким спектром антимикробной активности против микробов с множественной лекарственной устойчивостью, высокой селективностью и незначительной токсичностью могли бы найти большой потенциал в профилактике и лечении инфекций.

#### **1.4. Заключение**

Исследования, направленные на поиск и изучение новых антимикробных препаратов, распространены и актуальны во всем мире [82]. Это связано с глобальной проблемой антибиотикорезистентности микроорганизмов. Инфекционные осложнения ожогов обусловлены появлением антибиотико-резистентной микрофлоры, а также загрязнением окружающей среды, бесконтрольным применением лекарственных препаратов, иммунодепрессантов. Всё это является причиной снижения защитных механизмов гуморального и местного иммунитета, смены микробных возбудителей, повышения роли оппортунистической, условно-патогенной микрофлоры в развитии инфекционных осложнений ожогов глаз [93].

Альтернативой традиционным антибиотикам являются эндогенные антимикробные пептиды, обладающие антимикробными свойствами, не вызывающие резистентность бактерии или образование биопленки. Одним из перспективных методов лечения ожогов роговицы может быть применение комбинации антимикробных и регенераторных пептидов. Синергия таких пептидов заключается в их мощном антимикробном и регенераторном потенциале, значительно улучшающем эпителизацию роговицы и восстановление тканей глаза.

Нанотехнологии помогают разрабатывать инновационные системы доставки антимикробных молекул. Такие контейнеры пролонгируют высвобождение компонентов, снижая токсичность и повышая эффективность. Они имеют длительную физическую и химическую стабильность, разумную стоимость. К ним относятся такие наночастицы, как липосомы, ниосомы, твердые липидные частицы, мицеллы, везикулы поверхностно-активных веществ [106, 125, 180,

229]. Применение наноконтейнеров позволяет обеспечить оптимальный процесс антимикробного воздействия и эпителизации раневой поверхности.

Все это объясняет необходимость поиска новых антимикробных средств и изучения их свойств для повышения эффективности ранозаживления инфекционных осложнений, в том числе при ожогах роговицы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### ГЛАВА 2. Исследования микрофлоры у пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы

На долю бактериальной инфекции приходится до 85 % всех от общего количества инфекций глаз. Воспалительные процессы в роговице, обусловленные бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы являются одними из самых тяжелых патологий органа зрения, нередко приводящих к гибели глаза. Рост такой патологии в большинстве случаев объясняется снижением иммунного статуса и резистентности к антибиотикотерапии. Вначале эпителиальный дефект роговицы сопровождается инфильтрацией (просачивание) стромы полиморфно-ядерными лейкоцитами (нейтрофилы), изъязвлением, задержкой процессов регенерации роговицы в фазе протеолитического заживления с исходом в десметоцеле (разрушение стромы до десцеметовой мембраны с протрузией (выбухание) последней) и перфорацию (прободение), приводящих в ряде случаев к гибели глаза.

Количество и частоту выделения микроорганизмов из конъюнктивальной полости регистрировали у здоровых лиц (контроль) и у пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы. Материалом для бактериологического исследования служила слёзная жидкость. Под наблюдением находились 100 пациентов с химическими ожогами различной локализации и этиологии, в том числе мужчин – 52 (52%), женщин – 48 (48%). Возраст пациентов варьировал от 18 до 79 лет (средний  $44,3 \pm 1,9$  лет). Выборка больных была сформирована в соответствии с критериями включения и исключения.

Из слёзной жидкости больных с химическими ожогами выделено и идентифицировано 103 культуры микроорганизмов, изучены их основные биологические свойства. Результаты проведенных бактериологических исследований показали (Рисунок 1), что нормальный микробиоценоз конъюнктивальной полости и роговицы у пациентов контрольной группы (с интактной, здоровой роговицей) имел следующий состав: коагулазоотрицательные стафилоккоки, в основном –

*Staphylococcus epidermidis* - 53 (53%), *Streptococcus spp.*- 14 (14%), коагулазоположительные стафилококки, в основном *Staphylococcus aureus* - 4 (4 %), *E.coli* – 3(3%), *Micrococcus spp.* - 8 (8%), *Staphylococcus haemolyticus* -3 (3%), *Streptococcus pneumoniae* - 2 (2%), стерильная конъюнктивальная полость – 10 (10%), неидентифицированная форма – 3 (3%) (Рисунок 1).

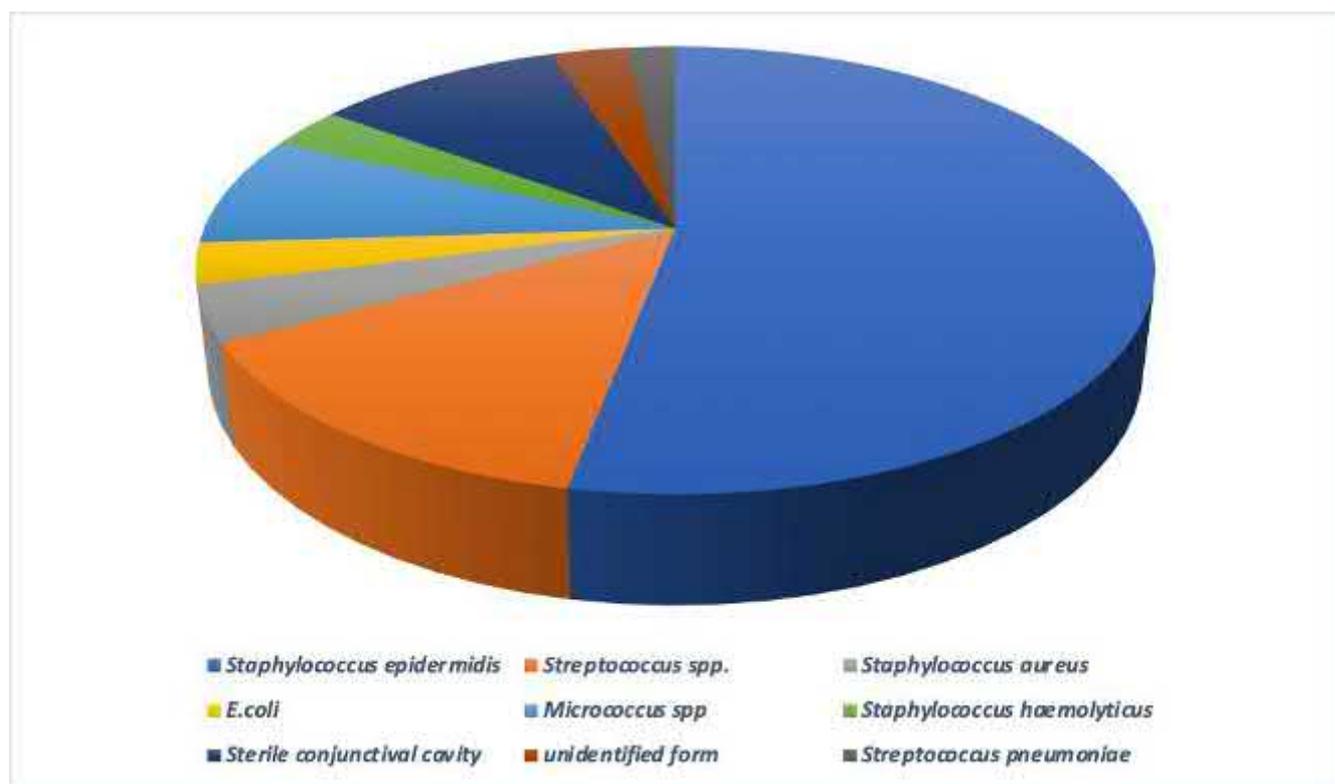


Рисунок 1 - Нормальный микробиоценоз конъюнктивальной полости и роговицы у пациентов контрольной группы

Структура частоты распространения этиологических факторов инфекционного воспаления (Таблица 5, Рисунок 2) располагалась в следующем порядке: *Staphylococcus spp.* - 53%, *Streptococcus spp.* - 8%, *Enterobacteriaceae spp.* - 10%, *Sterile conjunctival cavity* – 7%, *Candida spp.* -13%, *S. aureus* – 2%, *Enterococcus spp.* - 4%, *P. aeruginosa* – 3%.

Таблица 5 - Структура частоты распространения этиологических факторов

Микроорганизмы	<i>S. epidermidis</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Enterobacteriaceae spp</i>	<i>Sterile conjunctival cavity</i>	<i>Candida spp.</i>	<i>Micrococcus spp.</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Unidentified form</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Контроль (n=100)	53	17	-	10	-	8	4	2		3	3	-
Опыт 1 (n=100)	53	8	10	7	13	-	2	-	4	-	-	3
Опыт 2 (n=100)	78	4	-	-	2	-	14	-	2	-	-	-

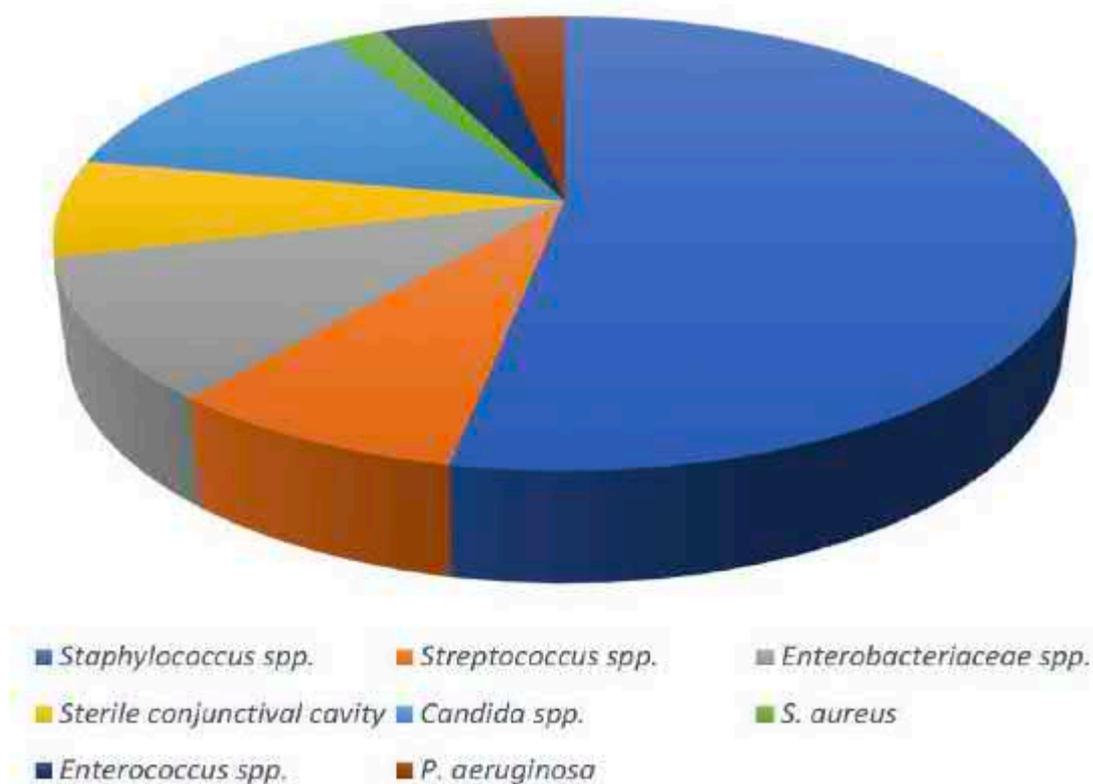


Рисунок 2 - Структура частоты распространения этиологических факторов

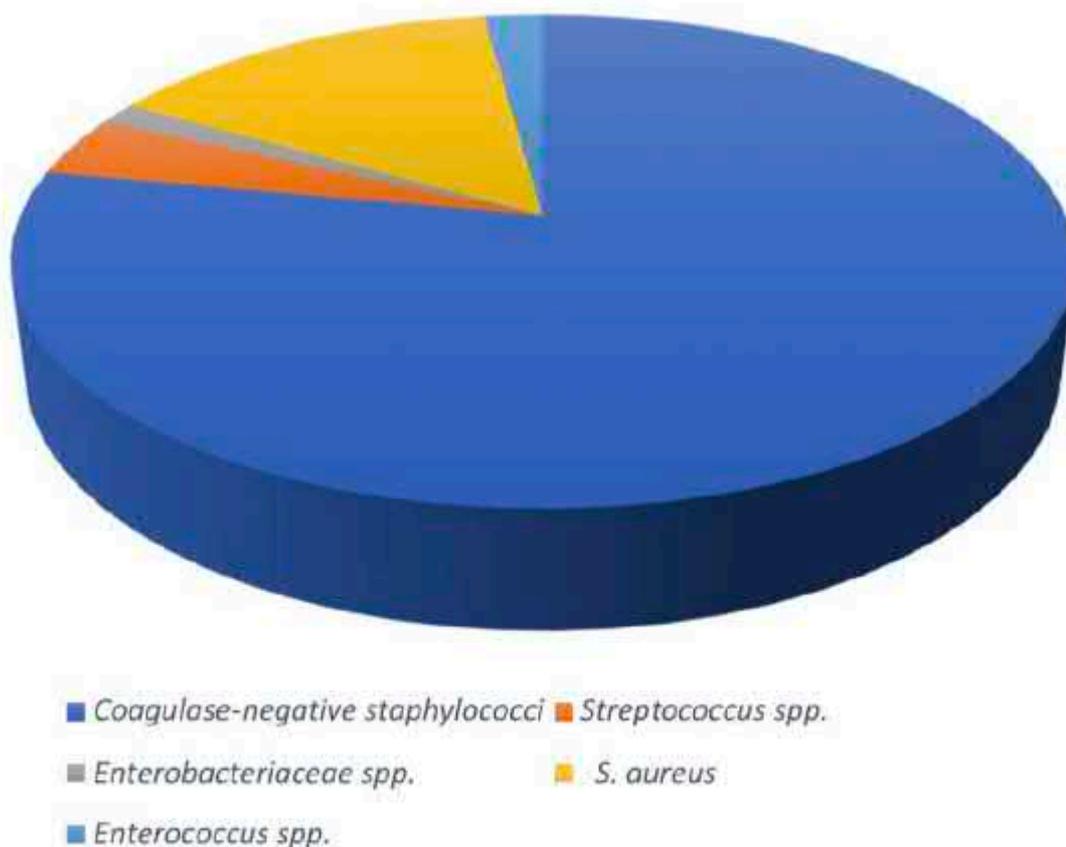


Рисунок 3 - Микробиоценоз конъюнктивальной полости и роговицы у пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов

У пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы патогенные штаммы стафилококков, как сопутствующая микрофлора, способствовала созданию благоприятной почвы для наслоения кандидозной инфекции. При инфицированном химическом ожоге роговицы (Рисунок 3) было установлено изменение содержания нормальной микрофлоры конъюнктивальной полости и роговицы глаза такими патогенными микроорганизмами, как *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Aspergillus spp.*, *Candida spp.*, *Dermatophytes spp.* Грамположительная флора встречалась в 98%, грамотрицательная - в 1,9% и грибы – в 0,1%. Среди грамположительных кокков: коагулазонегативные стафилококки: *S. aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi subsp. coagulans*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus lutrae*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus pseudintermedius* - 76,2%; *S. aureus* – 14,1%; *Streptococcus spp.* – 3,9%; *Enterococcus spp.* – 2,1%; грамотрицательная микрофлора

ра: *Enterobacteriaceae spp.* – 1,4%. Выделение грамотрицательной флоры колебалось от 1,4 до 2,1%. Она была представлена семействами *Enterobacteriaceae spp.*: *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia marcesens*, *Providencia rettgeri*, *Morganella morganii* и неферментирующими бактериями - *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*.

## ГЛАВА 3. Разработка антимикробного ниосомального геля с пептидами

### 3.1. Технология получения антимикробного ниосомального геля с пептидами

Первоначально характеризовали выделенные пептиды. Низкомолекулярные плацентарные пептиды, полученные по оригинальной технологии (5), имели сигналы в диапазоне 2000 - 10500 Da (Рисунок 4). У фракций с молекулярной массой пептидов менее 2000 Da длина пептидной цепи не превышала 20-30 аминокислотных остатков. Низкомолекулярные плацентарные пептиды имели пептидные цепи 20 - 200 аминокислотных остатков, что говорит о высокой биологической активности, тканеспецифичности и отсутствии видоспецифичности и иммуногенности [8]. Эксклюзионная хроматография показала основной пик, соответствующий преобладающей фракции белков с наибольшей молекулярной массой. Характер сигнала и данные масс-спектрометрии образца свидетельствуют о том, что эта фракция соответствует группе сигналов на масс-спектрах с  $m/z$  около 6000 Da (Рисунок 5, Таблица 6).

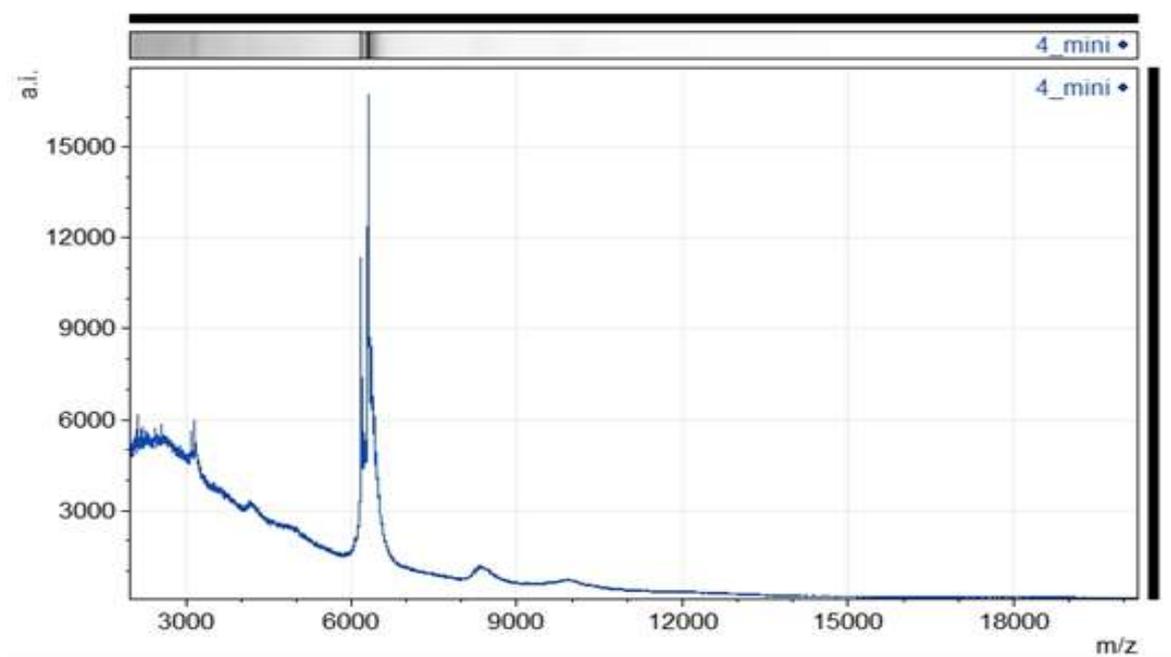


Рисунок 4 - Данные масс-спектрометрического анализа низкомолекулярных плацентарных пептидов

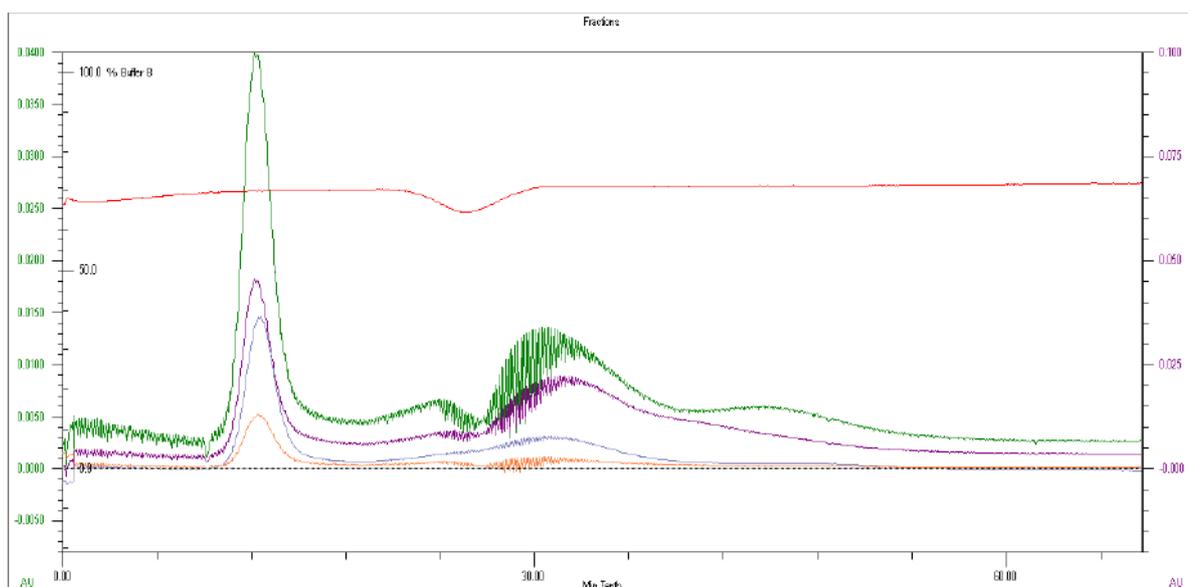


Рисунок 5 - Хроматограмма низкомолекулярных плацентарных пептидов

*Примечание:* кривые на хроматограмме: красная – проводимость ПФ, зеленая – детекция при 280 нм, фиолетовая – 260 нм, синяя – 214 нм, оранжевая – 410 нм

Таблица 6 - Основные характеристики сигналов на хроматограмме низкомолекулярных плацентарных пептидов

№ п/п	Пик (группа пиков) на хроматограмме, среднее время удерживания, мин.	Высота пиков, AU (280 нм)
1.	13,5 мин.	0,040
2.	около 23 мин. (гр. сигналов)	0,005
3.	около 32 мин. (гр. сигналов)	0,012
4.	около 51 мин. (гр. сигналов)	0,004

Полученные результаты коррелировали с данными масс-спектрометрического исследования. Результаты позволили установить наличие, помимо компонентов с молекулярной массой до 6000 Da, дополнительно ещё компоненты с относительно дискретной высокомолекулярной фракцией белков. Общеизвестно, что пептиды с молекулярной массой 1000-10000 Da представляют собой цитомедины [7].

Полученные данные масс-спектрометрического анализа и эксклюзивной хроматографии позволяют сделать вывод о преимущественном содержании пептидов с низкой молекулярной массой (около 6000 Da). Это свидетельствует о наличии ценных биологически-активных компонентов факторов роста, цитокинов

и других веществ, способствующих регенерации и пролиферации клеток [9, 10, 11, 12, 13].

Выделенные низкомолекулярные плацентарные пептиды стандартизированы по антимикробной эффективности и регенераторной активности. Таким образом, антимикробное и регенерирующее действие низкомолекулярных плацентарных пептидов основано на сигналах межклеточного взаимодействия, что позволяет их использовать для иммунорегуляции, ранозаживления, нейротрофической терапии, и, безусловно, в лечении инфицированных ожогов роговицы [5, 62, 63].

Разработанный в данной работе метод выделения эндогенных антимикробных пептидов из лейкоцитарно-тромбоцитарной массы крови доноров включал проведение вирусологического контроля крови. Исследовали отсутствие антител к вирусам ВИЧ, гепатитов С и В. Контролировался рН ( $6,81 \pm 0,23$ ), а также содержание аминного азота ( $249,90 \pm 36,35$ ) мг %. Затем в течение 1 часа проводили ферментативный гидролиз стерильным раствором трипсина. На 100 мл гидролизуемой смеси добавляли 10 мл трипсина в растворе фосфатного буфера рН 7,4. Осветляли полученный гидролизат добавляя 0,6 % перекись водорода. В дальнейшем проводили разделение компонентов на фракции с использованием хроматографической колонки с краном и фильтром (Симакс ЧСН ИСО 3585, Россия). Для гельфильтрации на поверхность фильтра наносили 1,5 г Сефадекса G-25 с последующей стерилизующей фильтрацией полученной субстанции через бактерицидные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм. Выделяли фракцию с антибактериальными пептидами массой 3-5 кДа, пропуская через гель раствор фосфатного буфера рН 7,4. Применяли высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) на хроматографе «Люмахром» (Россия). Устанавливали длину волны 214 нм, позволяющую определить максимальную концентрацию антимикробных пептидов. Фосфатный буфер рН 7,4 выступал в роли подвижной фазы со скоростью подачи 150 мм<sup>3</sup> /мин. Калибровочную кривую выстраивали, применяя стандарт дефензина-альфа 1. Этот препарат брали из диагностических наборов для ИФА компании Cloud-Clone Corp.(США) [7,8].

Выделенные из лейкоцитарно-тромбоцитарной массы антимикробные эндогенные пептиды представляли собой дефензины-альфа. Калибровочный график концентраций дефензин-альфа представлен на рисунке 6, где по оси абсцисс указана концентрация, а по оси ординат – площадь пика. Полученную фракцию еще раз стерилизовали фильтрацией через мелкопористые фильтры с диаметром пор 0,2 мкм. На рисунке 7 представлена хроматограмма фракции АМП, полученная без использования разделительной колонки. По оси абсцисс указано время измерения в минутах, а по оси ординат оптическая плотность (mAU). Помимо дефензина альфа, выделены и другие виды дефензинов в остаточном количестве, отражённые в таблице 7, где пик 1-фракция дефензина альфа, а 2,3,4-фракции других дефензинов. В дальнейшем полученные пептиды подвергали лиофильному высушиванию. На рисунке 8 представлена хроматограмма фракции АМП после промывки, регенерации и высушивания при использовании разделительной колонки без дополнительной замены Сефадекса G-25. По оси абсцисс указано время измерения в минутах, а по оси ординат - оптическая плотность. В таблице 8 отображены данные хроматограммы после промывки регенерации и высушивания при использовании разделительной колонки без дополнительной замены Сефадекса G-25

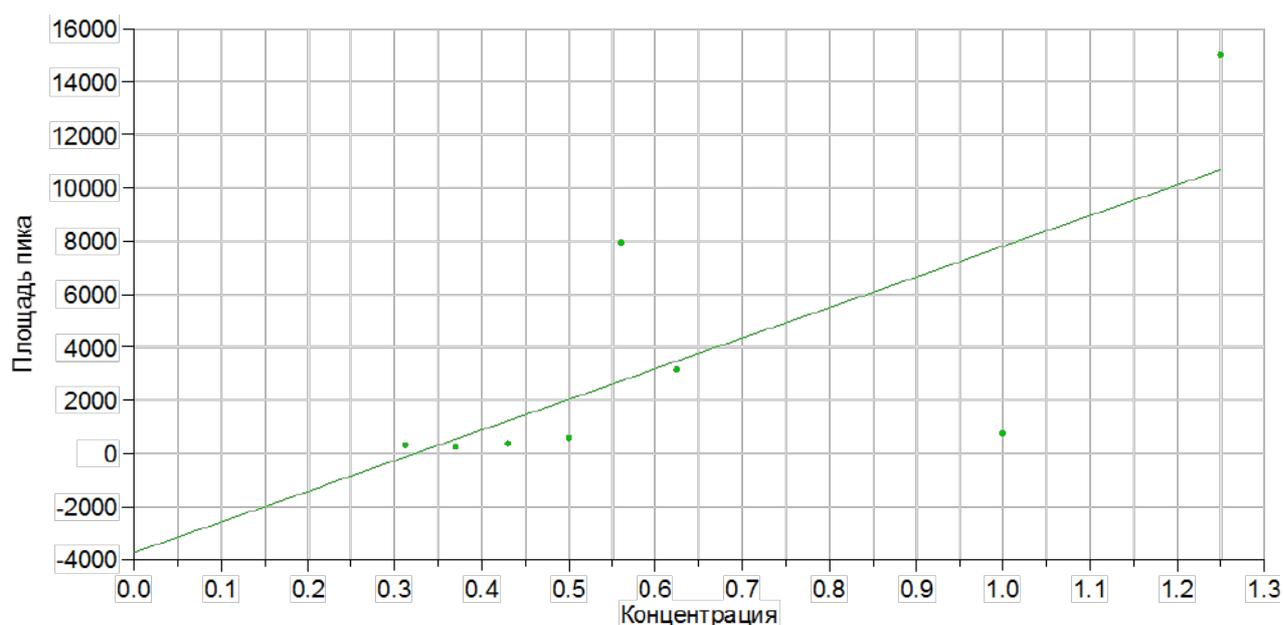


Рисунок 6 - Калибровочный график концентраций АМП (дефензин-альфа 1)

*Примечание:* по оси абсцисс указана концентрация АМП, а по оси ординат – площадь пика

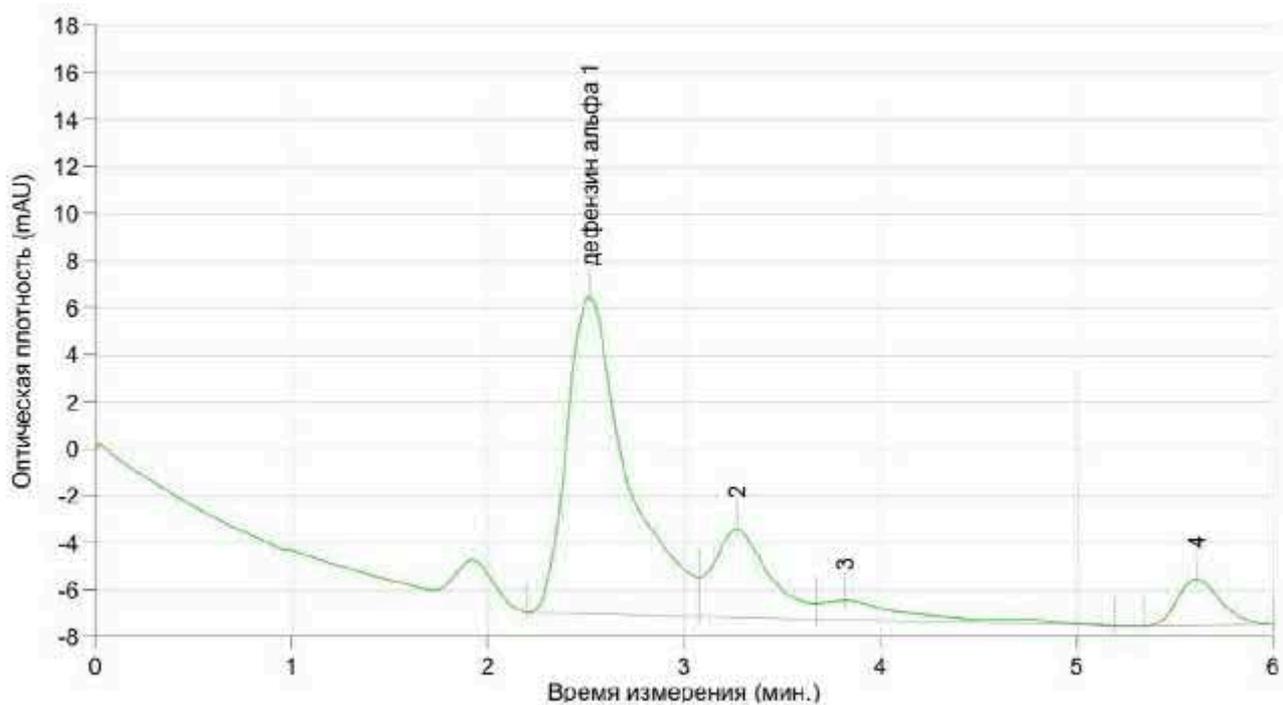


Рисунок 7 - Хроматограмма фракции АМП, полученная без использования разделительной колонки

*Примечание:* по оси абсцисс указано время измерения в минутах, а по оси ординат оптическая плотность (mAU) массы крови, (пик 1-фракция дефензина альфа, а пики 2,3,4-фракции других дефензинов в остаточном количестве)

Таблица 7 - Данные хроматограммы после промывки без использования разделительной колонки без дополнительной замены Сефадекса G-25

Пик	Время (мин)	Компонент	Конц. (мкг/мл)	Высота	Площадь	Полуширина
1	2.52	дефензин альфа 1	0.038	13.503	288.288	16.907
2	3.27			3.748	74.265	18.617
3	3.82			0.816	26.851	21.490
4	5.61			1.976	30.067	14.199

Полученные результаты показали, что оптимизированная технология выделения эндогенных низкомолекулярных пептидов перспективна для дальнейшего создания фармацевтических композиций.

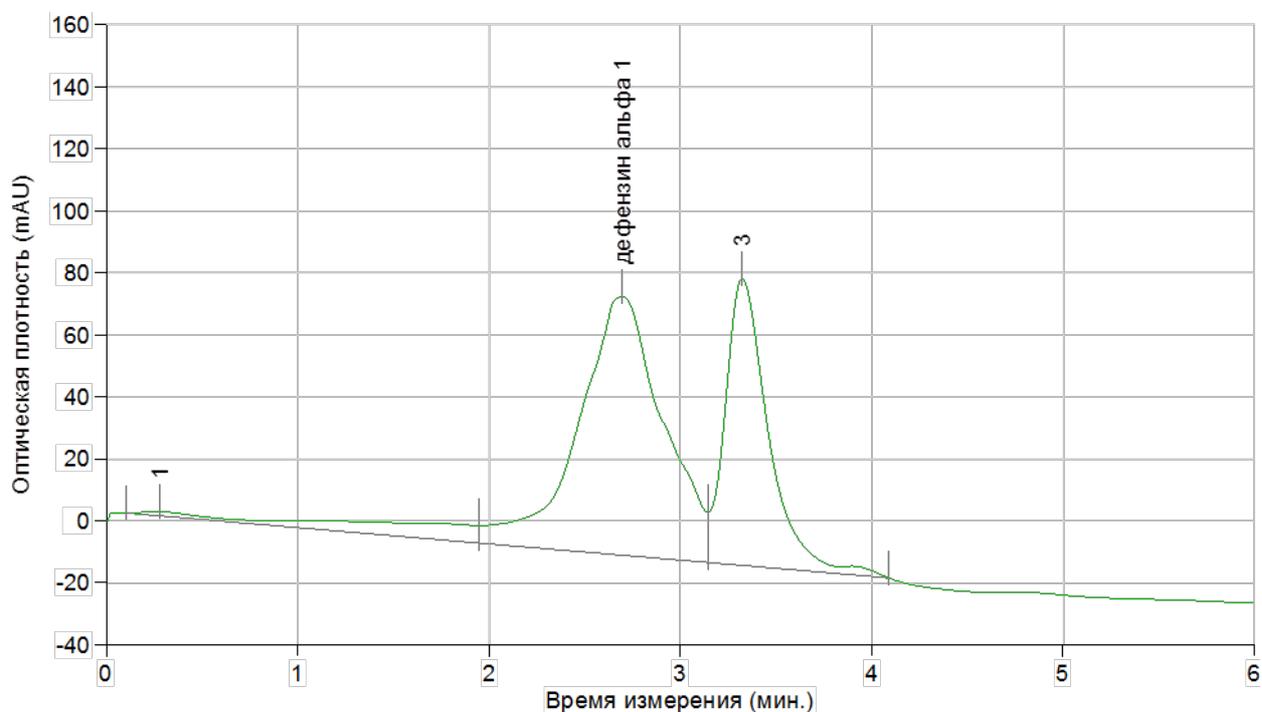


Рисунок 8 - Хроматограмма фракции АМП после промывки, регенерации и высушивания при использовании разделительной колонки без дополнительной замены Сефадекса G-25

Таблица 8 - Данные хроматограммы после промывки, регенерации и высушивания при использовании разделительной колонки без дополнительной замены Сефадекса G-25

Пик	Время (мин)	Компонент	Конц. (мкг/мл)	Высота	Площадь	Полуширина
1	0.28			1.249	297.730	17.732
2	2.69	дефензин альфа	0.335	83.363	2574.624	27.460
3	3.32	1		92.425	1454.809	13.406

Конструирование геля заключалось в иммобилизации выделенных низкомолекулярных плацентарных и антимикробных эндогенных пептидов в кремнийорганические наноконтейнеры – ниосомы, обладающие доказанной высокой проникающей способностью. Данная рецептура позволяет снизить терапевтическую дозу и повысить эффективность за счет увеличения биодоступности препарата и пролонгированности высвобождения. Инкапсулирование выделенных пептидов в кремнийорганические ниосомы, обладающие наноразмером и значительной проникающей способностью, позволяет им беспрепятственно проникать в роговицу и пролонгировать терапевтический эффект. Ниосомы, представляющие собой мультислойные везикулы размером от 20 до 100 нм (Рисунок 9).

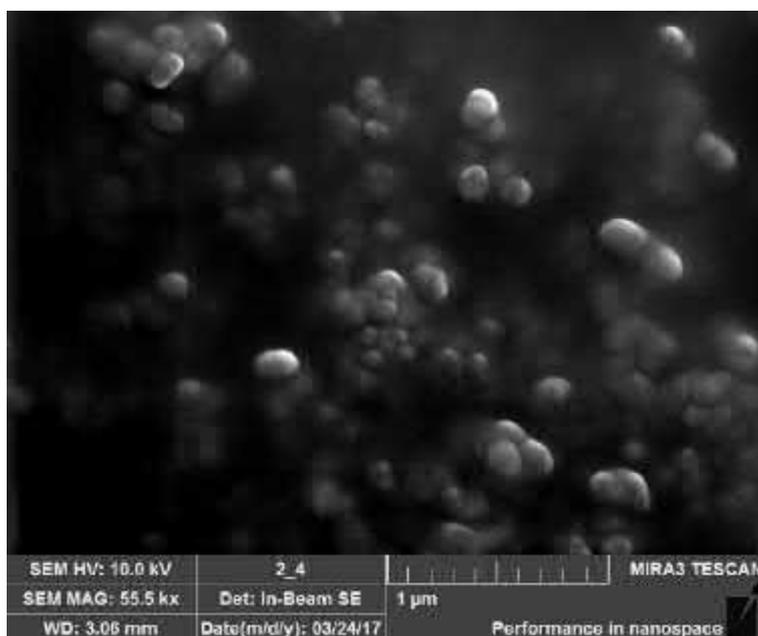


Рисунок 9 - Результаты электронной микроскопии кремнийорганических ниосом на сканирующем зондовом микроскопе Solver P47-PRO (NT-MDT, Россия)

Во внутренний объем ниосом инкапсулировали активную субстанцию – выделенные с помощью жидкостной хроматографии пептиды. Предварительно готовили точную навеску 100 г выделенных пептидов (в равном объеме эндогенных антимикробных и низкомолекулярных плацентарных) из расчета 100 мг в 1 мл готового средства. Затем растворяли при перемешивании в 100 мл 70% пропиленгликоля и в полученный раствор добавляли 100 мл ПЭГ-12 диметикона. Пеп-

тиды, обладающие тропностью к ПЭГ-12 диметикону (липидной природы), иммобилизовались в ниосомы при длительном ультразвуковом воздействии. Ультразвуковой метод получения ниосом использовали для иммобилизации выделенных пептидов следующим образом. В заключительной стадии эмульсию ниосом эмульгировали с очищенной водой до 1000 мл, содержащей 50 мл гелеобразователя и консервант Kathon CG 0,04-0,06 г (Таблица 9).

Таблица 9 - Состав антимикробного ниосомального геля

Состав геля:	
Эндогенные антимикробные и плацентарные пептиды	100 г
Пропиленгликоль 70 %	100 мл
ПЭГ -12 диметикон	100 мл
Гелеобразователь	50 мл
Консервант Kathon CG	0,04-0,06 г
Вода очищенная	до 1000,0 мл

В ходе проведенных исследований по формированию эмульсий с содержанием низкомолекулярных пептидов 5, 10 и 15 масс%, экспериментальным путем установлено, что наибольшей стабильностью обладают композиции с 10 масс.% содержанием низкомолекулярных пептидов.

Отработаны фазы приготовления и рецептура антимикробного ниосомального геля с выделенными пептидами (Таблица 10).

Таблица 10 - Фазы приготовления и рецептура антимикробного ниосомального геля с эндогенными антимикробными и плацентарными пептидами

№п/п	Фазы приготовления и рецептура геля с выделенными эндогенными антимикробными и плацентарными пептидами	
	Наименование ингредиента	Содержание в % (по массе)
Фаза А		
Интенсивное механическое встряхивание на шейкере ПЭГ- 12 диметикона		
Фаза Б		
Ультразвуковая обработка дисперсии ниосом		
Фаза В		
Механическое перемешивание всех компонентов в смесителе		
1	Дистиллированная вода	до 100
2	Гелеобразователь	2,5
3	Эмульсия ниосом, содержащая выделенные пептиды в равной пропорции	1, 5, 10
4	ПЭГ-12 диметикон	2
Фаза Г		
	Эмульгирование геля на АПВ гомогенизаторе	

### **3.2. Антимикробная эффективность ниосомальных гелей с пептидами к микроорганизмам, выделенным у пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы**

Антимикробную эффективность разработанных ниосомальных гелей определяли с помощью диско–диффузионного метода (ДДМ). Чувствительность преобладающей выделенной микрофлоры выявляли к антимикробному ниосомальному гелю с пептидами в концентрации 5% и 10% (опыт) и контролям (Рисунок 10). Бактериологические исследования антимикробной активности ниосомальных гелей проводили с использованием контролей. В качестве контролей применяли офтальмологический гель «Солкосерил» и свободные, не пропитанные диски (Рисунок 10). Чаще всего от пациентов с химическими ожогами роговицы выделяли *S.epidermidis*. Зона задержки роста этого микроорганизма в отношении 5% ниосомального геля с пептидами находилась в пределах  $36,8 \pm 0,12$  мм. Используемые в качестве контроля свободные от геля, не пропитанные диски, не обладали антибактериальной активностью (Рисунок 10). Выявлено, что антибактериальная эффективность 10% ниосомального геля с пептидами была в три раза больше, чем у геля «Солкосерил» (контроль) и составила  $42,1 \pm 0,18$  мм .

Зоны задержки роста *S.epidermidis* для геля «Солкосерил» составила  $14,8 \pm 0,12$  мм соответственно. Аналогичная ситуация наблюдалась к использованным в качестве контроля свободным от геля дискам, которые не обладали антибактериальной активностью (Рисунок 10).

Таким образом, бактериологические исследования антимикробной активности ниосомальных гелей показали, что разработанные гели с пептидами подавляют рост выделенных микроорганизмов со значительно превосходящей контроли эффективностью.

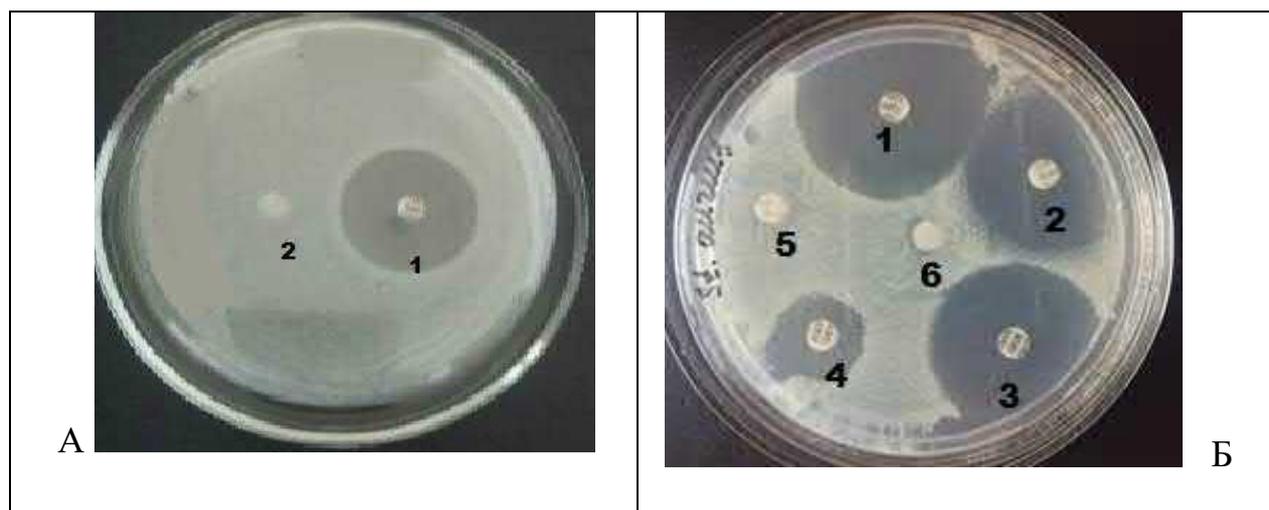


Рисунок 10 - Антибиотикочувствительность *S. epidermidis*

*Примечание:* Рисунок А: 1-диск с 10% антимикробным ниосомальным гелем (опыт), 2- диск без геля (контроль) Рисунок Б: 1-диск с 10% антимикробным ниосомальным гелем (опыт), 2-диск с 5% антимикробным ниосомальным гелем (опыт), 3-диск с 15% антимикробным ниосомальным гелем (опыт), 4- диск с гелем «Солкосерил» (контроль), 5, 6- диски без геля (контроль)

### 3.3. Изучение токсичности антимикробного ниосомального геля с пептидами

На экспериментальных животных проводили изучение безопасности антимикробного ниосомального геля с выделенными пептидами. Исследования выполняли согласно утвержденному письменному протоколу, плану доклинических исследований в соответствии со Стандартными операционными процедурами исследователя (СОП). В основе дизайна исследования использованы методические указания «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая» (2012). Дизайн и организация исследования направлены на решение поставленной цели и базируются на общих принципах организации исследований по изучению токсических свойств веществ в остром опыте на лабораторных животных. Исследование было выполнено на базе вивария Ставропольского государственного медицинского университета. После доставки из специализированного питомника животные в течение 2-х недель находились на карантинном режиме в стандартных условиях вивария, с соблюдением всех

правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований на территории РФ. Животные содержались в стандартных условиях вивария с температурой воздуха  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  и влажностью 40–60%. Световой цикл в помещениях был инвертирован для исключения негативного влияния суточных биоритмов на пищевое и питьевое поведение животных.

Для определения параметров острой токсичности исследуемого препарата использовали белых беспородных крыс весом 180–220 г и кроликов весом 2,1–2,3 кг.

Каждая из 4 опытная группа крыс массой 180- 220 г самцов и самок состояла из 12 животных. Каждая из 4 групп кроликов состояли из 3 животных. Подбор животных в группы проводили произвольно методом «случайных чисел», используя в качестве критерия массу тела. Индивидуальные значения массы тела не отклонялись от среднего значения в группе более чем на 10%.

Экспериментальным путем и в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств (2012) была подобрана терапевтическая доза (ТД), обеспечивающая равномерное распределение в поражённой области. В расчёт дозы антимикробного ниосомального геля брали также оптимальное содержание ниосом в геле. Исходя из этого был определен исследуемый диапазон доз с необходимой терапевтической концентрацией (10%).

В течение 2 недель проводили наблюдение за общим состоянием и поведением животных, а также проявлением симптомов интоксикации. Регистрировали кожно–раздражающее, кожно–резорбтивное и сенсibiliзирующее действие антимикробного ниосомального геля, интенсивность и характер двигательной активности, наличие и характер судорог, координация движений, тонуса скелетных мышц, реакции на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, частоты и глубины дыхательных движений, состояния волосяного и кожного покровов, окраски слизистых оболочек, особенности потребления корма и воды, изменения массы тела.

Доклинические исследования на животных являются показателем

безопасности разработанных антимикробных соединений. При изучении безопасности антимикробного ниосомального геля с выделенными пептидами исследован диапазон переносимых, токсических и летальных доз антимикробного ниосомального геля. Применение геля не привело к гибели экспериментальных животных и не вызвало изменений их поведения и основных физиологических функций. Эти данные свидетельствовали об отсутствии острой токсичности у испытуемого геля (Таблица 11).

Таблица 11 - Определение острой токсичности антимикробного ниосомального геля с выделенными пептидами при нанесении на кожу у крыс и кроликов

Показатель	Крысы				Кролики			
	0,08	0,2	0,8	2	0,08	0,2	0,8	2
Исследуемые дозы (мг/кг)	0,08	0,2	0,8	2	0,08	0,2	0,8	2
Количество животных в группе	12	12	12	12	3	3	3	3
Выжило	12	12	12	12	3	3	3	3
Погибло	0	0	0	0	0	0	0	0

## **ГЛАВА 4. Эффективность антимикробного нiosомального геля с пептидами у экспериментальных животных при инфицированном химическом ожоге роговицы**

### **4.1. Уровень цитокинов у экспериментальных животных при инфицированном химическом ожоге роговицы**

В регуляции процессов заживления инфицированных химических ожогов роговицы основную роль отводят цитокинам, влияющим на межклеточные взаимодействия [38,46]. В начальных фазах воспаления происходит увеличение количества провоспалительных цитокинов (хемокинов, TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-6, фибринопептидов, кининов и др.). Это имеет патологический характер, если их активация сохраняется в течение всего заболевания [55]. Химический ожог обуславливает гипериндукцию цитокиновой системы в организме. Гиперергические клеточные реакции сопровождаются выделением большого количества разных цитокинов [1,7].

Для изучения действия разработанного антимикробного нiosомального геля на течение регенерации инфицированных химических ожогов роговицы исследовали цитокиновый статус у экспериментальных животных. Исследования выполнены на кроликах, разделенных на 3 группы: 1 – интактные; 2 – лабораторные животные с инфицированным щелочным ожогом, без лечения (контроль); 3 – лабораторные животные с инфицированным щелочным ожогом, которым наносили нiosомальный антимикробный гель с пептидами. У животных 2 и 3 групп вызывали щелочной ожог III-B степени. Животным 3 группы сразу после химического воздействия и последующего инфицирования в течение всего периода эксперимента (28 суток) на обожженную поверхность роговицы наносили тонким слоем нiosомальный антимикробный гель. На 3, 7, 14, 21 и 28-е сутки проводили визуальное наблюдение за течением раневого процесса и определяли уровень цитокинов.

Развитие ожоговой раны в группе контроля (с инфицированным щелочным ожогом, без лечения) обуславливает повышение уровня провоспалительных цитокинов. Количество IL-1 $\beta$  увеличивалось на протяжении 3 недель наблюдения, TNF- $\alpha$  и IL-8 в течение 28 дней. В сравнении с интактными животными на 3 сутки

количество цитокинов IL-1 $\beta$  было повышено на 27 %, на 7 – на 62 %, на 14 – на 120 %, на 21 – на 43 %. Уровень TNF- $\alpha$  был выше в течение всего периода эксперимента. Исследование показало, что на 3 и 7 сутки уровень TNF- $\alpha$  вырос в целом в 2 раза в сравнении с интактными животными. Затем к 21 дню эксперимента уровень TNF- $\alpha$  снижался, но был выше, чем у интактных животных. Через 2 недели уровень TNF- $\alpha$  повышался на 70 %, на 21 сутки – на 40 %, на 28 суток – на 34 % в сравнении с уровнем TNF- $\alpha$  интактных кроликов. Исследование уровня IL-8 показало его повышение в течение всего времени исследования в сравнении с интактными кроликами. Содержание IL-8 увеличивалось на 19 % на 3 сутки, и на 33 % на 7 сутки в сравнении с интактными кроликами. Через 2 недели уровень IL-8 и IL-1 $\beta$ , был максимальным до окончания эксперимента, в целом выше нормы в 1,5 раза. Через 3 и 4 недели содержание IL-8 было выше, чем у интактных кроликов, что превышало аналогичный показатель животных на 37 % и 30% соответственно. Такой уровень цитокинов обуславливал персистирующее воспаление без лечения и препятствовал нормальному заживлению раны с инфицированным химическим ожогом. У лабораторных животных с инфицированным щелочным ожогом, которым наносили ниосомальный антимикробный гель с пептидами, течение раневого инфицированного процесса было более благоприятным, чем в группе контроля. В сравнении с предыдущей группой эпителизация раневого дефекта и уменьшение зоны некроза происходили быстрее. Эти процессы были очевидными на протяжении двух недель наблюдения (до 21 суток). Через три недели (к 28 суткам) ожоговая рана полностью эпителизовалась, на месте дефекта образовался нежный рубец.

Лечение животных антимикробным ниосомальным гелем с пептидами сопровождалось снижением всех исследованных цитокинов, в сравнении с самопроизвольным развитием инфицированного химического ожога. Концентрация цитокина IL-1 $\beta$  была более высокой по сравнению с интактными животными. Этот процесс был зафиксирован в течение первой недели эксперимента. Так, показатели цитокина IL-1 $\beta$  на 3 сутки были на 30 %, а на 7 сутки – на 37 % выше чем в первой группе. Через 2 недели уровень этих цитокинов достигал значений нормы

и снижался в 2,5 раза, в сравнении с животными из группы с ожогами без применения лекарственных средств. Через 3 недели уровень IL-1 $\beta$  снижался в 1,2 раза в сравнении с аналогичными показателями у животных с ожогами, но без лечения. Уровень цитокинов TNF- $\alpha$  в начальные сроки эксперимента на 3–14 сутки был выше, чем аналогичные показатели у интактных животных. Так, количество TNF- $\alpha$  превышало значения интактных кроликов на 3 сутки – в 1,4 раза, на 7 сутки – в 1,2 раза, на 14 сутки – в 1,2 раза. Причём эти данные были достоверно ниже показателей слёзной жидкости животных из группы с ожогом без лечения. Через 3-4 недели количество TNF- $\alpha$  снижалось до уровня нормы. Концентрация IL-8 в крови понижалось к норме со 2 недели до конца эксперимента. Уровень IL-8 в слезной жидкости животных до конца 4 недели эксперимента снижался в сравнении с показателями животных с ожогами без лечения. Так, через неделю было зафиксировано снижение IL-8 – в 1,1 раз, через 2 и 3 недели – в 1,4 раза и через 4 недели – в 1,3 раза.

В целом, инфицированный химический ожог сопровождался длительным повышением провоспалительных цитокинов в крови (IL-1 $\beta$  на протяжении 3 недель наблюдения, TNF- $\alpha$  и IL-8 в течение 28 дней). Повышение уровня цитокинов сопровождалось замедлением заживления ожоговой раны. Роль провоспалительных цитокинов в антибактериальном механизме подтверждена данными, полученными в результате применения ниосомального антимикробного геля с пептидами. Его применение сокращает период цитокиновой активности при нормализации концентрации IL-1 $\beta$  и IL-8 на 14 сутки, а TNF- $\alpha$  – на 21 сутки. Это сопровождается ускорением процессов заживления инфицированного химического ожога.

В результате проведенного исследования было показано, что у животных с инфицированным ожоговым поражением глаза цитокины ИЛ-1  $\beta$  обнаруживаются в количестве 48+9,3 пкг/мл в 100% случаев, в то время как в норме его нет. ФНО- $\alpha$  был обнаружен во всех группах, причём его концентрация не отличалась от нормальных показателей. В целом, при инфицированных химических ожогах выявлен дисбаланс цитокиновой системы с преобладанием провоспалительных цитокинов. При ожоге происходит повреждение тканей глаза. Это стимулирует вы-

работку ИЛ-1, так как этот цитокин является регулятором воспаления в организме. Понижение концентрации ФНО- $\alpha$  в слёзной жидкости животных с ожоговым поражением глаза объясняется тем, что наступает повреждение кератоцитов, являющихся их продуцентами.

#### **4.2. Результаты гистологического исследования эффективности лечения ожогов в эксперименте при применении антимикробного ниосомального геля**

Первоначально была создана модель щелочного ожога глаза у кроликов. Эксперименты проведены на 30 кроликах породы шиншилла весом 2,1-3,5 кг, которым наносили антимикробный ниосомальный гель с выделенными пептидами для лечения инфицированных химических ожогов роговицы. Химический ожог получали с помощью 10% раствора едкого натра. Предварительно животным проводили анестезию 0,5% раствором дикаина. Через два часа оценивали степень ожога роговой оболочки и животных распределяли по группам. У кроликов отмечались химические ожоги роговицы 3 степени. Экспериментальные животные были разделены на три группы: одна опытная и две контрольные по 10 кроликов (20 глаз в каждой группе). Через 3 часа после фиксирования ожогов роговицы приступали к нанесению антимикробного ниосомального геля с пептидами.

После воспроизведения ожога и оценки тяжести состояния животным первой опытной группы осуществлялось лечение с помощью нанесения 0,05 мл антимикробного ниосомального геля с пептидами на ожоговую поверхность 1 раз в сутки. Для изучения антимикробной активности разработанного ниосомального геля, животных опытной группы инфицировали наиболее часто встречающимся в клинической практике типовым лабораторным штаммом *S. aureus* ATCC 29213. Живую культуру наносили в стационарной фазе роста, разводили ее физиологическим раствором до  $10^5$ - $10^6$  Мк/мг. Для заражения язвенной поверхности роговицы использовали 1 мл культуры. В первой контрольной группе животным проводили лечение офтальмологическим гелем «Солкосерил» в течение всего периода наблюдения. Другие животные из второй контрольной группы не получали ника-

кого лечения. Для выведения кроликов из эксперимента в определённые планы исследования сроки проводили декапитацию. Энуклеацию осуществляли на 1, 3, 7, 10 и 30 сутки.

Для гистологической оценки глаз животных использовали общепринятые методы. Энуклеированные глаза фиксировали в 10%-ном растворе формалина, обезвоживали в спиртах, заливали в парафин. Затем на автоматическом ротационном микротоме (Leica RM 2255, Германия) получали срезы толщиной 10-12 мкм, которые окрашивали гистологическим красителем гематоксилин – эозин (производство «AppliChem / Panreac», Испания) по Ван-Гизону. В дальнейшем с помощью светового микроскопа «Carl Zeiss» (Германия) осуществляли микроскопию полученных препаратов при увеличении 150, 200, 400 раз.

После получения животными химических ожогов роговицы, через 3 часа начинали лечение антимикробным ниосомальным гелем. Оценка динамики эпителизации и площади дефекта эпителия роговицы проводилась ежедневно. Для этих целей использовалось фокальное освещение и фоторегистрация с помощью цифровой фотокамеры «Nicon», (Япония). Эффективность лечения разработанным антимикробным гелем оценивали по срокам исчезновения микрофлоры и динамике регенерации повреждённой при ожоге роговичной ткани. Использовались также такие клинические параметры, как: снижение воспалительной реакции и гнойного отделяемого, интенсивности эпителизации роговицы, новообразования сосудов. Оценку физического состояния животных, их неврологического статуса, поведенческих реакций проводили в течение всего эксперимента.

До начала эксперимента гистологическая оценка показала, что роговица глаза кролика покрыта многослойным плоским неороговевающим эпителием. Эпителий расположен на базальной мембране. Собственная оболочка роговицы представлена гомогенными соединительнотканными пластинами (Рисунок 11А).

Морфологическое определение признаков токсического действия продуктов распада поврежденных клеток показало, что через 3 суток от начала эксперимента эпителиальные клетки роговицы были увеличены в размерах, они набухали и приобретали округлую форму. Этот процесс сопровождался появлением в эпите-

лиальных клетках эозинофильной зернистости и мелких вакуолей (Рисунок 11Б). В собственной оболочке роговицы появляются участки небольшого отека, отмечается расслоение коллагеновых волокон, набухание основного вещества соединительной ткани. Между коллагеновыми волокнами появляются мелкоочаговые воспалительные инфильтраты из лимфоцитов, плазматических клеток, макрофагов (Рисунок 11В). В краевой зоне роговицы наблюдается отек, полнокровие сосудов, стазы (Рисунок 11Г).

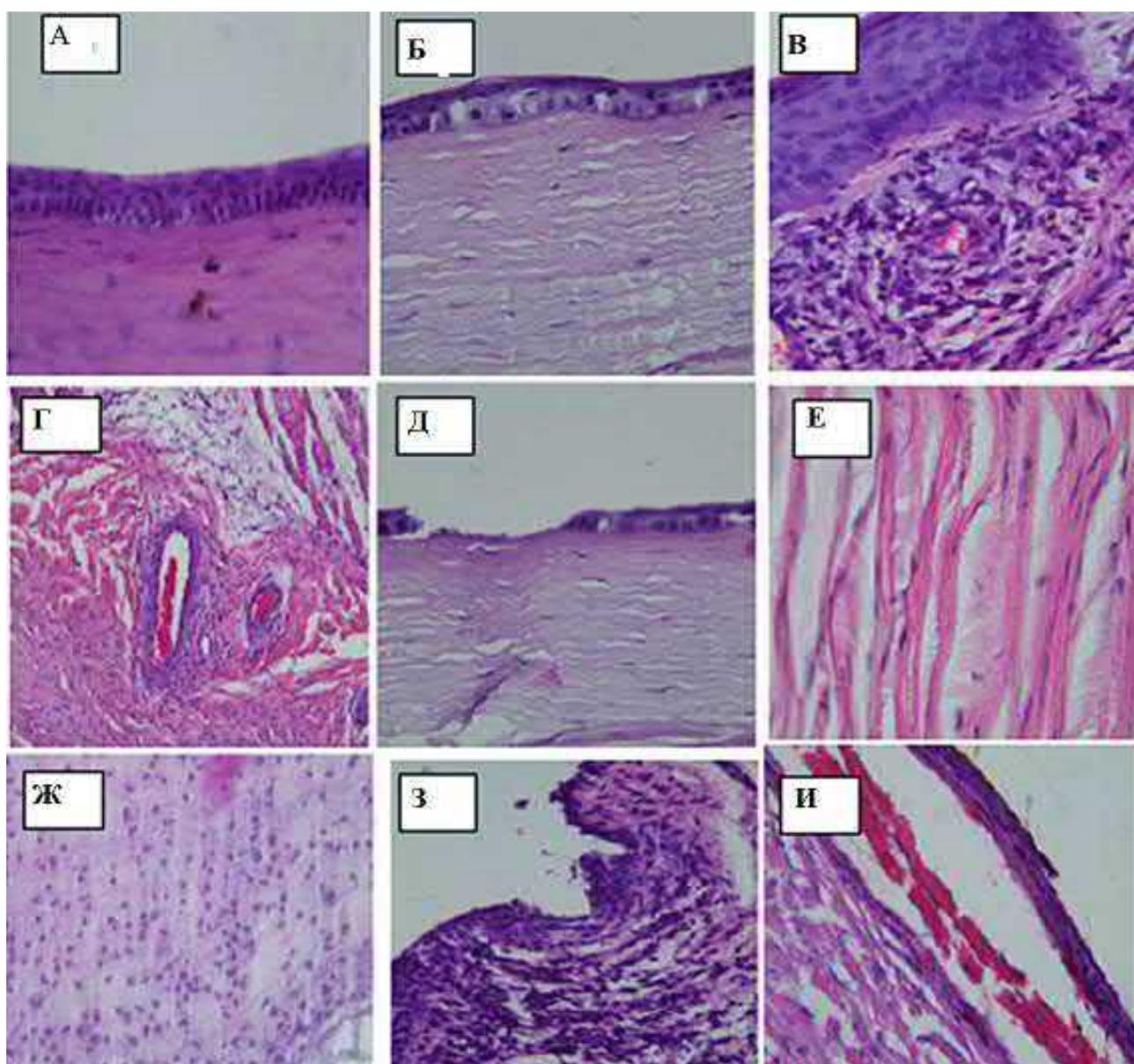


Рисунок 11 - Гистологические изменения роговицы после химического ожога до лечения антимикробным ниосомальным гелем

*Примечание:* микроскоп Carl Zeiss Microscopy, GmbH; диапазон увеличений - 10x - 200x, окраска гематоксилином и эозином

На пятый день эксперимента эпителий роговицы характеризовался гидропической и баллонной дистрофией. На всём протяжении эпителиального пласта был отмечен некроз и десквамация с образованием эрозий (Рисунок 11Д). Эндотелий роговицы местами десквамирован, в сохранившихся эндотелиальных клетках отмечаются дистрофические изменения. В эти же сроки в собственной оболочке роговицы наблюдалось набухание эндотелия, сопровождающееся диффузным отёком (Рисунок 11Е). Отмечалось пропитывание коллагеновых волокон отёчной жидкостью. Они были набухшими и склееными между собой. Воспалительная инфильтрация нарастала и сопровождалась преобладанием полиморфноклеточных лейкоцитов, лимфоцитов и макрофагов (Рисунок 11Ж). Длительно существующий воспалительный процесс препятствовал формированию прочных стромально-эпителиальных взаимоотношений и, как следствие, полной эпителизации ожоговой роговицы.

Через 7 суток после химического ожога у интактных животных наблюдалось усиление дистрофических и деструктивных изменений. Этот процесс сопровождался интенсивным некрозом эпителия и образованием крупных эрозий на значительном протяжении. На дне эрозий в эпителии роговицы отмечалось увеличение воспалительной инфильтрации (Рисунок 11З). За счёт отека происходило поднятие и отслоение многослойного плоского эпителия роговицы. Под эпителием накапливалась отечная жидкость (Рисунок 11И). В эндотелии роговицы наблюдались выраженные дистрофические и деструктивные изменения, десквамированные на значительном протяжении. В ткани выявлено увеличение отёчности и воспалительной инфильтрации. Преобладающее большинство эмигрирующих лейкоцитов составили нейтрофилы. Помимо них, наблюдались лимфоциты, моноциты, базофильные гранулоциты и эозинофилы. Данные клетки продвигались в зону повреждения роговицы между волокнистыми структурами по направлению к центру воспаления, где и наблюдалось их наибольшее скопление. Коллагеновые волокна были пропитаны отечной жидкостью, набухшие, с участками деструкции и фрагментации волокон, также обнаружены участки кератомалиции. Обобщая полученные результаты, можно сделать вывод о том, что щелочное повреждение

роговицы экспериментальных животных (кроликов) приводило к развитию некротического воспаления.

Исследования динамики заживления ожогового дефекта роговицы показали, что применение антимикробного ниосомального геля в опытной группе способствовало уменьшению частоты формирования глубоких дефектов роговицы по сравнению с контролем. Так в нашем эксперименте на 3 день лечения наблюдалось восстановление целостности эпителиального пласта. В эпителиальной выстилке отмечалось сохранение упорядоченности слоев. В собственной оболочке были обнаружены единичные клетки с признаками гидропической дистрофии. В эпителии роговицы по сравнению с интактными животными наблюдалось уменьшение отёка. В данный период лечения в оболочке роговицы было отмечено снижение количества очаговых инфильтратов. В инфильтратах обнаруживались лимфоциты, плазматические клетки и немного нейтрофилов (Рисунок 12А). На 5-е сутки лечения кератита антимикробным ниосомальным гелем патологические изменения в роговице были купированы. Многослойный плоский эпителий роговицы был восстановлен на всем протяжении (Рисунок 12Б). Отмечалась полная регенерация эндотелия роговицы. Базальные мембраны роговицы были целыми. Собственная оболочка роговицы приобретала нормальную гистологическую структуру. По сравнению с интактной группой при лечении химического ожога антимикробным ниосомальным гелем с пептидами воспалительные инфильтраты были мелкими, располагались преимущественно в субэпителиальных зонах (Рисунок 12В). В данный период лечения в инфильтрате роговицы преобладали лимфоциты. Отек собственной оболочки значительно уменьшился, отмечалось набухание коллагеновых волокон, но очаги деструкции не обнаружены (Рисунок 12Г). Площадь стромальных дефектов в опытной группе на протяжении всего срока наблюдения была значительно ниже размеров дефектов в контрольной группе.

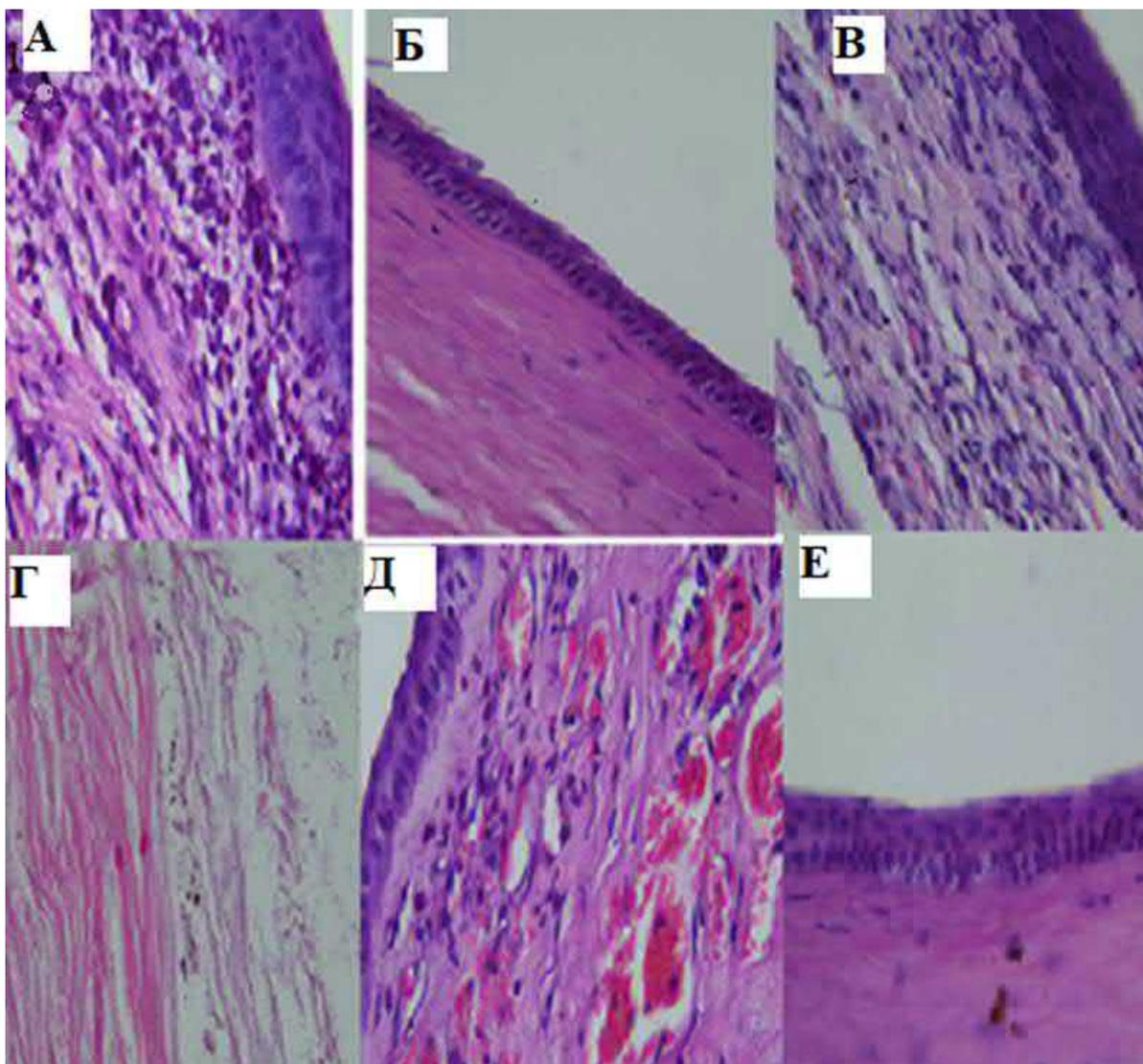


Рисунок 12 - Гистологические изменения роговицы после химического ожога при лечении антимикробным ниосомальным гелем

*Примечание:* микроскоп Carl Zeiss Microscopy, GmbH; диапазон увеличений - 10x – 200 x , окраска гематоксилином и эозином

На 7-е сутки лечения химического ожога роговицы антимикробным ниосомальным гелем в роговице глаза кролика наблюдалось врастание сосудов в роговицу при воспалительном процессе, что способствовало купированию отека и экссудативной реакции (Рисунок 12Д). Врастание сосудов и нервов после повреждения, в том числе, и после ожогов, имело значительное влияние на процессы восстановления и дифференцировки эпителиальной и соединительной ткани роговицы. Врастание нервных волокон в регенерат обеспечивало нервную связь регенерата с организмом, а это означало обеспечение трофической и функциональ-

ной регуляции восстановительных процессов. Учитывая присущее низкомолекулярным пептидам экстракта плаценты нейротрофическое действие, а также интенсивность течения репаративных процессов в опытной группе, мы предполагаем, что применение антимикробного ниосомального геля с пептидами способствует также стимуляции реиннервации в ожоговой роговице. Так, в нашем эксперименте наблюдалось восстановление структурной целостности эпителия роговицы (Рисунок 12Е). В опытной группе, в отличие от контрольной, к концу эксперимента отмечено восстановление прочных эпителиально-стромальных взаимоотношений, обусловленных формированием нормальной архитектоники волокнистых компонентов межклеточного вещества.

Таким образом, в ходе проведенного экспериментального исследования показано, что химический ожог приводил к изменениям собственной оболочки роговицы. В тканях имели место деструктивные и воспалительные процессы. Дистрофические изменения эпителия и эндотелии сопровождались процессами гидропической и баллонной дистрофии, развивался некроз эпителиоцитов и эндотелиоцитов. В тканях наблюдалась десквамация, изъязвление, приводящее к образованию эрозий. Воспалительные процессы характеризовались появлением отёка и воспалительной инфильтрации. В первые 3-е суток появлялся серозный кератит, переходящий затем на 5-е сутки в гнойный. К 7-м суткам в собственной оболочке роговицы наблюдались очаги кератомалиции, сопровождающиеся набуханием, деструкцией и распадом коллагеновых волокон. На этом фоне происходила отслойка эпителиального пласта и его десквамация. Дистрофические изменения приводили также к эрозированию собственной оболочки роговицы. Применение антимикробного ниосомального геля с пептидами приводило к оптимизации процессов эпителизации раневой зоны, стимуляции митотической активности базальных и шиповатых клеток переднего эпителия, лимитировании апоптотической доминанты эпителиоцитов и фибробластов собственного вещества роговицы. Воспалительные инфильтраты и отёк уменьшались, восстанавливалась целостность эпителиального пласта и эндотелия. Восстановление гистологической структуры сопровождалось снижением деструктивных изменений в тканях орга-

на. Ниосомы способствовали равномерному и долговременному эффекту присутствия на поверхности роговицы выделенных пептидов геля, пролонгируя их непрерывное поступление в более глубокие слои очага поражения, восстанавливая дефекты более глубоких слоев эпителия роговицы и практически полностью снижая воспалительные реакции.

#### **4.3. Изучение регенераторной способности антимикробного ниосомального геля с пептидами после инфицированного ожога в эксперименте**

Щелочной ожог сопровождался признаками роговичного синдрома: блефароспазмом, светобоязнью, слезотечением. Наблюдалась перилимбальная ишемия (побледнение) (Рисунок 13А). Согласно литературным данным степень перилимбальной ишемии является важным прогностическим показателем восстановления роговицы в будущем, поскольку лимбальные ростковые клетки отвечают за обновление роговичного эпителия.

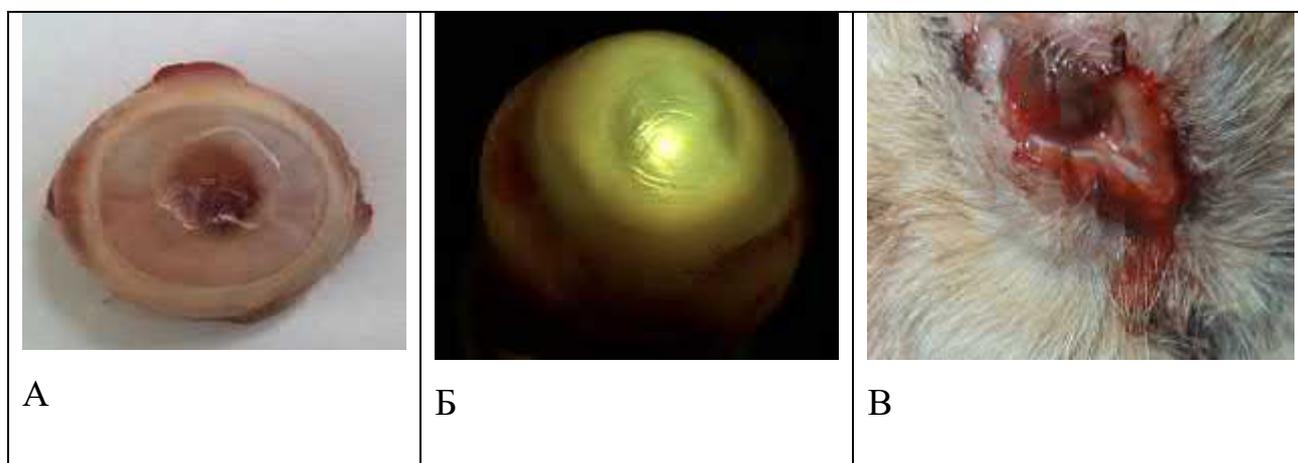


Рисунок 13 - Химический ожог глаз

*Примечание:* А - помутнение роговицы, Б, В - рубцевание посттравматического дефекта

Выраженная ишемия означает неблагоприятный прогноз. Гидроксид натрия приводил к формированию эрозии роговицы в виде круга диаметром до 8 мм, что сопровождалось признаками реактивного воспаления: отеком и инъекцией конъю-

юнктивы. В зоне роговицы, отмечали гибель и десквамацию клеток переднего слоя эпителия роговицы, фрагментацию и исчезновение клеток стромы. Исследование конъюнктивы показало, что ток крови замедлялся, в мелких сосудах формировались тромбы, плазма выходила в окружающие ткани, что сопровождалось отеком конъюнктивы. В более поздние сроки эксперимента наблюдалось стромальное помутнение. В эксперименте наблюдались изменения характерные для 4 бальной степени помутнения роговицы (выраженное помутнение роговицы, захватывающее оптическую зону и занимающее поверхность с выраженными сосудами) (Рисунок 13Б). Это встречается в случае тяжелого повреждения, когда способность к заживлению роговицы снижены. Повреждение роговицы экспериментальных животных приводило к развитию некротического воспаления. Исход альтернативного воспаления зависел от глубины поражения и повреждения тканей глаза (по срокам наблюдений) и, как правило, заканчивался рубцеванием посттравматического дефекта (Рисунок 13В). Согласно литературным данным воспалительная реакция переднего отдела глаза обычно более выражена при повреждении щелочами в связи со способностью их проникать вглубь [235]. Щелочи растворяют белок и вызывают колликвационный некроз без четко отграниченной зоны поражения. Образующийся при этом щелочной альбуминат не препятствует проникновению токсических метаболитов вглубь тканей. Это приводит к нарушению функции чувствительных и трофических нервов и к глубокой некротизации тканей.

Применение офтальмологического геля «Солкосерил» ускоряло и стимулировало регенерацию (восстановление) поврежденной роговицы и конъюнктивы при химическом ожоге (Рисунок 14) по сравнению с интактными животными. Также в эксперименте наблюдалось снижение перилимбальной ишемии (Рисунок 14А). В исследованиях отмечено восстановление дефектов эпителия роговицы (Рисунок 14Б), снижались стромальное помутнение и воспалительные реакции переднего отдела глаза (Рисунок 14В, Г). Данные изменения наблюдались на 10 день эксперимента.

Нанесение 0,05 мл ниосомального геля с низкомолекулярными пептидами

на ожоговую поверхность 1 раз в сутки в течение 10 дней способствовало эпителизации раневого дефекта у всех животных опытной группы к 4 суткам на в области воздействия щелочи отмечали нежное поверхностное помутнение (незначительное полупрозрачное помутнение роговицы, охватывающее часть оптической зоны, врастание сосудов от зоны лимба до 2 - 3 мм).

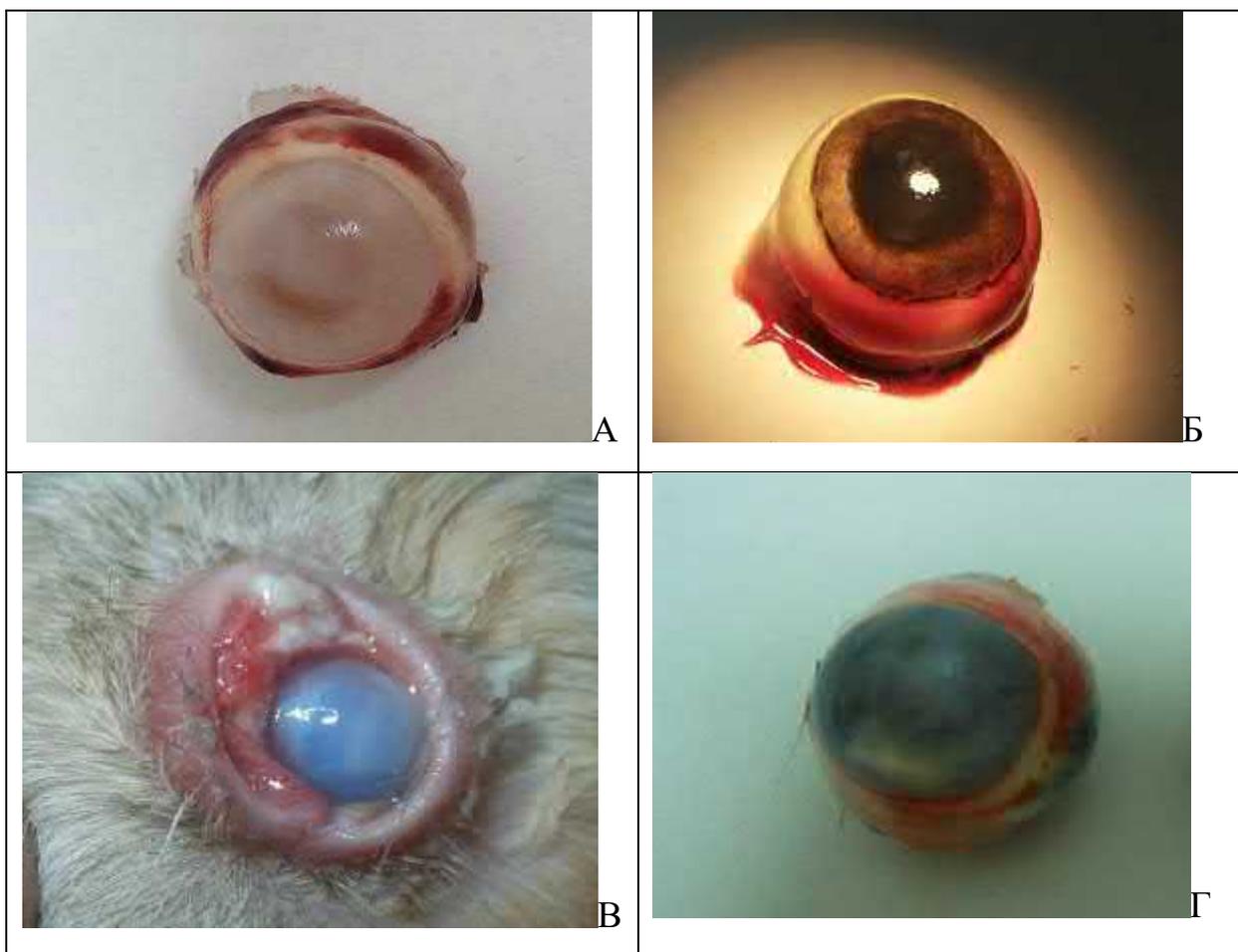


Рисунок 14 - Лечение инфицированного химического ожога офтальмологическим гелем «Солкосерил»

*Примечание:* А - снижение перилимбальной ишемии, Б - восстановление дефектов эпителия роговицы, В - снижение стромального помутнения, Г- снижение воспалительной реакции переднего отдела глаза

В то время как в контрольной группе дефект сохранялся до 10 суток. Так же было отмечено, что признаки асептического воспаления в опытной группе проходили на трое суток раньше, чем в контрольной группе. В эксперименте также наблюдалось более эффективное снижение перилимбальной ишемии (Рисунок

14А), активнее восстанавливались дефекты эпителия роговицы (Рисунок 14Б), практически полностью снижались воспалительные реакции переднего отдела глаза (Рисунок 14В, Г).

В результате проведенной работы было показано, что химический ожог вызывает гидролиз структуры белка и разрушение клеток, приводя к некрозу тканей. Наблюдается гидратация, с последующим помутнением стромы роговицы и трабекулярной сети, что при увеличении выработки факторов воспаления может привести к потере зрения. Использование ниосомального геля ускоряло и стимулировало регенерацию поврежденной роговицы и конъюнктивы намного эффективнее по сравнению с гелем «Солкосерил». Ниосомы способствовали равномерному и долговременному эффекту присутствия на поверхности роговицы активных веществ ниосомального геля, пролонгируя их непрерывное поступление в более глубокие слои очага поражения, восстанавливая дефекты эпителия роговицы и практически полностью снижая воспалительные реакции.

Таким образом, при изучении регенераторной способности антимикробного ниосомального геля с пептидами после инфицированного ожога в эксперименте установлено более раннее начало эпителизации, сокращение в 2,2 раза сроков лечения, а также снижение количества осложнений в 2,8 раза, причем васкуляризация роговицы уменьшилась с 81,2 % (при традиционной терапии) до 55,3 % случаев.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Антибиотикорезистентность является глобальным вызовом человечеству. Поливалентная устойчивость микроорганизмов к традиционно применяемым антимикробным препаратам в подавляющем числе случаев приводит к инфицированию в офтальмопатологии. При химических ожогах это потеря зрения той или иной степени, а в 8-9% случаев - анатомическая гибель глаза [102]. В нормальных условиях, без патологии, веки и конъюнктивы создают условия для персистенции популяции микроорганизмов, не вызывающих инфекционные заболевания. В результате травмы или ожога, при нарушении целостности оболочек глаза, происходит контаминация внутренних структур условно-патогенными бактериями, что приводит к развитию патологического процесса. В неблагоприятных условиях при ослаблении защитных сил макроорганизма, травматизации тканей глаза и экзогенной инфекции эти микроорганизмы образуют токсические вещества, что и становится причиной возникновения инфекционного процесса [181, 207]. Состав нормальной микрофлоры глазного яблока по данным разных авторов довольно вариабелен [161]. Ранними исследованиями Rosebury Т. (1962) установлено, что для нормальной микрофлоры здоровой конъюнктивы наиболее характерны коагулазонегативные стафилококки (*S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. capitis*, *S. intermedius*, *S. wameri*, *S. lugdunensis*, *S. aureus*) и аэробные коринебактерии [218]. Более поздними исследованиями учёными выяснено, что нормальная микрофлора конъюнктивальной полости более разнообразна. Исследователями были выделены дифтероиды, белый и золотистый стафилококк, грамотрицательные бактерии, негемолитические стрептококки, микрококки [39, 68]. По другим данным, микрофлора, в основном, представлена монокультурой и, значительно реже, имеет смешанный характер [89]. В тоже время у определённой части здоровых людей результаты бактериологических исследований микрофлоры из конъюнктивы дали отрицательные результаты [101]. С другой стороны, Воронцова Т.Н. с соавт. (2010) выявляли микрофлору в 63,8% случаев, даже при отсутствии клинических симптомов воспаления переднего отдела глазного яблока [18].

Результаты проведенных бактериологических исследований в нашей работе показали, что нормальный микробиоценоз конъюнктивальной полости и роговицы у пациентов контрольной группы (с интактной, здоровой роговицей) имел следующий состав: коагулаза-отрицательные стафилококки, в основном *S. epidermidis* – 53 (53%), коагулаза-положительные стафилококки, в основном *S. aureus* - 4 (4%), *E. coli* – 3(3%), *Micrococcus spp.* - 8 (8%), *Streptococcus spp.* -3 (3%), *S. pneumoniae* - 2 (2%), стерильная конъюнктивальная полость – 10 (10%), неидентифицированная форма – 3 (3%). Структура частоты распространения этиологических факторов инфекционного воспаления располагалась в следующем порядке: *Staphylococcus spp.* - 53%, *S. pneumoniae* - 8%, *Enterobacteriaceae spp.* - 10%, *Pseudomonas spp.* - 3%, грибы - 13%, простейшие - 2%. У пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы патогенные штаммы стафилококков, как сопутствующая микрофлора, способствовала созданию благоприятной почвы для наложения кандидозной инфекции. При инфицированном химическом ожоге роговицы было установлено изменение содержания нормальной микрофлоры конъюнктивальной полости и роговицы глаза такими патогенными микроорганизмами, как гемолитический стафилококк, стрептококк, пневмококк, синегнойная палочка, грибы (*Aspergillus spp.*, *Candida spp.*), дерматомицеты. Грамположительная флора встречалась в 98%, грамотрицательная - в 1,9% и грибы -0,1%. Среди грамположительных кокков: коагулазонегативные стафилококки - 76,2%; *S. aureus* – 14,1%; *Streptococcus spp.* – 3,9%; *Enterococcus spp.* – 2,1%; грамотрицательная микрофлора: *Enterobacteriaceae spp.* – 1,4%. Выделение грамотрицательной флоры колебалось от 1,4 до 2,1% (по зарубежным данным 6,8 до 10,1%). Она была представлена семействами *Enterobacteriaceae spp.* (*E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *S. marcescens*, *P. rettgeri*, *M. organii*) и неферментирующими бактериями (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*).

Высокая вариабельность микробных возбудителей конъюнктивы, повышение роли оппортунистической, условно-патогенной микрофлоры и появление антибиотикорезистентной микрофлоры неминуемо приводит к инфицированию ожогов. Играет роль также загрязнение окружающей среды, бесконтрольное приме-

нением лекарственных препаратов, иммунодепрессантов. Всё это является причиной снижения защитных механизмов гуморального и местного иммунитета, что также неминуемо приводит к развитию инфекционных осложнений ожогов глаз [56, 82]. На фоне растущей антибиотикорезистентности очевидна проблема поиска альтернативы традиционным антибиотикам. Эндогенные антимикробные пептиды не вызывают резистентность бактерий или образование биопленки из-за их ионной структуры [64, 65]. Разработка и изучение новых антимикробных средств на их основе в современных условиях приобретает очевидную необходимость.

Ниосомы, как нановекторы, представляют двухслойную структуру, сходную с липосомами, и могут доставлять терапевтические агенты в различные биологические ткани, а также взаимодействовать с биологическими мембранами [9, 10]. В частности, ниосомы, которые являются однослойными или многослойными неионными везикулами поверхностно-активных веществ, могут быть использованы в качестве терапевтических и нанопереносчиков [11, 12]. Для повышения эффективности лечения в медицине, направленной доставки, пролонгации действия лекарственных молекул и снижения их токсичности приобретают значение разработка и использование таких наноконтейнеров, как ниосомы. В настоящее время получены ниосомы кремнийорганической природы, повышающих эффективность терапии в различных областях практического здравоохранения [5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 61, 62, 63, 64, 65]. Ниосомы представляют собой стабильные неионные микроскопические везикулы, состоящие из одной или нескольких мембран различных структур [211]. Широкое применение неионогенных ПАВ при конструировании таких систем обусловлено их биосовместимостью и способностью к биodeградации. Характерные отличительные признаки кремнийорганических ниосом позволяют увеличить биодоступность лекарственных препаратов за счет увеличения проникновения через биологическую мембрану и избирательного накопления на месте патологического очага. Дискаева с соавт. (2018, 2019) [26, 27, 28], исследуя физико-химические параметры кремнийорганических ниосом, выявила их большое преимущество для плохо растворимых лекарств. По мнению авторов, ниосомы увеличивали растворимость лекарства, контролируя высвобождение и продле-

вая его активность в течение определенного периода времени [27]. Анализ влияния нагрева ниосомальной дисперсии на средний размер частиц выявлял тенденцию к уменьшению диаметра ниосом с повышением температуры. Ниосомы, подвергнутые термической обработке, становились более стабильными во времени и сохраняли средний размер частиц около 100 нм. Этот подход был рекомендован для дальнейшего совершенствования методов приготовления и хранения стабильных лекарственных форм [28]. Представляют интерес исследования взаимодействия ниосом и клеточной стенки микроорганизмов. Учёные установили, что модификация рН может влиять на супрамолекулярную структуру и морфологию ниосом. По данным авторов [212], при нейтральном и кислотном рН, ниосомы проявляют различные физико-химические свойства. Выявлена зависимость от соотношения поверхностно-активных веществ и липидов, необходимых для самоорганизации ниосом, что играет роль в их структуре и стабильности. Ниосомы, содержащие рН-чувствительные компоненты, при пониженном рН, демонстрировали дестабилизацию бислоя-носителя. Этот подход может быть полезен для преодоления проблем, связанных с механизмами резистентности бактерий к лекарственным средствам. Глубокие исследования физико-химических особенностей ниосом и прогнозирование потенциального расположения двухслойной структуры, реагирующей на специфические внешние раздражители, может быть важным инструментом для понимания потенциального взаимодействия между ниосомами и биологическими мембранами микроорганизмов *in vivo* [141, 142, 143].

Полученные ранее по оригинальной технологии низкомолекулярные плацентарные пептиды [5, 62, 63] и выделенные вышеуказанным способом эндогенные антимикробные пептиды инкапсулировали в наноконтейнеры- кремнийорганические ниосомы. Имобилизация пептидов в кремнийорганические ниосомы позволила получить гель, обеспечивающий пролонгированную эффективную доставку пептидов в зону очага инфицированного ожога. В ходе проведенных исследований по формированию эмульсий с содержанием низкомолекулярных пептидов 5, 10 и 15 масс.%, выявлена антимикробная эффективность с 10 масс.% содержанием низкомолекулярных пептидов.

Доклинические исследования на животных являются обязательным критериальным показателем безопасности разработанных антимикробных соединений. При изучении безопасности антимикробного ниосомального геля с выделенными пептидами в исследовании диапазон переносимых, токсических и летальных доз антимикробного ниосомального геля. Применение геля не привело к гибели крыс и мышей и не вызвало изменений их поведения и основных физиологических функций. Полученные факты свидетельствуют об отсутствии острой токсичности у испытуемого геля.

С помощью диско–диффузионного метода (ДДМ) определена антимикробная эффективность разработанных ниосомальных гелей с пептидами. Чувствительность преобладающей выделенной микрофлоры определяли к антимикробному ниосомальному гелю с пептидами в концентрации 5% и контролям. В качестве контролей применяли офтальмологический гель «Солкосерил» и свободные, не пропитанные диски. Чаще всего от пациентов с химическими ожогами роговицы выделяли *S. epidermidis*. Зона задержки роста этого микроорганизма в отношении ниосомального геля с пептидами находилась в пределах  $36,8 \pm 0,12$  мм. Используемые в качестве контроля свободные от геля, не пропитанные диски не обладали антибактериальной активностью. Выявлено, что антибактериальная эффективность 10% ниосомального геля с пептидами была в три раза больше, чем у геля «Солкосерил» (контроль) и составила  $42,1 \pm 0,18$  мм.

Зоны задержки роста *S. epidermidis* для геля «Солкосерил» составила  $14,8 \pm 0,12$  мм соответственно. Аналогичная ситуация наблюдалась к использованным в качестве контроля свободным от геля дискам, которые не обладали антибактериальной активностью. Таким образом, бактериологические исследования антимикробной активности ниосомальных гелей показали, что разработанные гели с пептидами подавляют рост выделенных микроорганизмов со значительно превосходящей контроли эффективности.

По данным Бусыревой В.Н. и соавт. (2008) развитие инфекционных осложнений при травмах глаза в значительной степени связано с патогенным потенциалом микроорганизмов, при этом результативность микробиологической диагностики

составляет 23% [14, 129, 234]. Доминирующими представителями микрофлоры являлись представители рода *Staphylococcus*, доля которых составила  $87,6 \pm 4,3\%$ , из них гемолитической активностью обладало  $23,7 \pm 5,5\%$ , коагулазопозитивными свойствами -  $12,5 \pm 3,6\%$ , а в 75,1% случаев был изолирован *S. epidermidis* [14]. Учёными в  $4,1 \pm 1,5\%$  случаев также была выделена грамотрицательная микрофлора, то есть более трети патогенов имела достаточно высокую вирулентность, проявляющуюся при благоприятных условиях. *Staphylococcus spp.*, в отличие от признанных патогенов, относятся к числу условно-патогенных микроорганизмов. Их вирулентные свойства проявляются только при снижении иммунореактивности макроорганизма и колонизации [19]. В этом контексте исследования клеток иммунитета при инфицированном ожоговом поражении глаза приобретают особую клиническую значимость.

Феномен иммунологически привилегированного органа появился у глаза в процессе эволюции [9, 41, 91, 102]. Учёными установлено, что содержание иммунологической привилегированности заключается в действии ряда факторов и особом сосудистом русле, заключающемся в отсутствии лимфатического оттока у сосудов крови на фоне афферентного типа дренажа. Такой гемато-глазной барьер обуславливает прочную защиту от чужеродных микроорганизмов [104, 132, 156, 174]. Помимо этого, существует иммуносупрессивное микроокружение (ТФРР, а-МСГ, ВИП), CD8<sup>+</sup>-лимфоциты. В.П. Еричев с соавт. (2009) установил, что эти факторы включают: иммуносупрессивное микроокружение, CD8<sup>+</sup>-лимфоциты, но лидирующую роль занимают цитокины [30]. Цитокины представляют собой группу белковых медиаторов, выполняющих регуляторную функцию в развитии и регулировании защитной воспалительной реакции, а также пластических и репаративных процессов.

Цитокины синтезируются рядом клеток, являясь важным звеном гуморального иммунитета. Настолько важным, что, к примеру, играют определённую роль в патогенезе заболевания, вызванного ретровирусом COVID-19, семейства *Coronaviridae* в человеческом организме. Известно, что вирусы используют эндосомальный путь для внутриклеточного проникновения. Наиболее серьёзной про-

блемой для макроорганизма является иммунная активация вирусом COVID-19 цитокиновой атаки (цитокиновый шторм). Чрезмерная активация цитокинов приводит к эндотелиальной дисфункции, например, вызывая утечку жидкости и ее накопление в плевральной полости, приводящее, в частности, к воспалению альвеол [44, 52, 54]. Затем эти сосудистые нарушения могут приводить к остановке вентиляции лёгких.

Исследование цитокинов в слёзной жидкости активно используется при изучении патогенеза множества заболеваний переднего отрезка глаза. Опубликованы исследования, посвященные изменению системного и локального цитокинового профиля при офтальмопатологиях [30]. Благодаря исследованиям цитокинов были объяснены различные варианты течения воспаления при инфекционных поражениях переднего отрезка глаза [1, 47]. Исследование ключевой роли цитокинов позволило взглянуть на протекающие патологические процессы уже не на тканевом, а на клеточном и молекулярном уровнях. Обладая знаниями о роли иммунных клеток в патогенезе инфицированного ожога глаза, можно подходить к вопросу прогнозирования болезни и подбора патогенетически ориентированной терапии [52, 53].

Для изучения действия разработанного антимикробного ниосомального геля на течение регенерации инфицированных химических ожогов роговицы исследовали цитокиновый статус экспериментальных животных. Развитие ожоговой раны в группе контроля (с инфицированным щелочным ожогом, без лечения) обуславливает повышение уровня провоспалительных цитокинов. Количество IL-1 $\beta$  увеличивалось на протяжении 3 недель наблюдения, TNF- $\alpha$  и IL-8 в течение 28 дней. Это сопровождалось нарушением репаративной регенерации и снижением скорости заживления химического ожога. Свидетельством роли провоспалительных цитокинов в антибактериальном механизме являлись данные, полученные в результате применения ниосомального антимикробного геля с пептидами. Его применение сокращало период цитокиновой активности (нормализация IL-1 $\beta$  и IL-8 на 14 сутки, TNF- $\alpha$  – на 21 сутки), что приводило к ускорению процессов заживления инфицированной ожоговой раны.

В целом, инфицированный химический ожог сопровождался длительным повышением провоспалительных цитокинов в крови (IL-1 $\beta$  на протяжении 3 недель наблюдения, TNF- $\alpha$  и IL-8 в течение 28 дней). Повышение уровня цитокинов сопровождалось замедлением заживления ожоговой раны. Роль провоспалительных цитокинов в антибактериальном механизме подтверждена данными, полученными в результате применения ниосомального антимикробного геля с пептидами. Его применение сокращает период цитокиновой активности при нормализации концентрации IL-1 $\beta$  и IL-8 на 14 сутки, а TNF- $\alpha$  – на 21 сутки. Это сопровождается ускорением процессов заживления инфицированного химического ожога. В результате проведенного исследования было показано, что у животных с инфицированным ожоговым поражением глаза цитокины ИЛ-1  $\beta$  обнаруживаются в количестве 52+11,5 пкг/мл в 100% случаев, в то время как в норме его нет. ФНО- $\alpha$  был обнаружен во всех группах, причём его концентрация не отличалась от нормальных показателей. В целом, при инфицированных химических ожогах выявлен дисбаланс цитокиновой системы с преобладанием провоспалительных цитокинов. При ожоге происходит повреждение тканей глаза. Это стимулирует выработку ИЛ-1, так как этот цитокин является регулятором воспаления в организме. Понижение концентрации ФНО- $\alpha$  в слёзной жидкости животных с ожоговым поражением глаза объясняется тем, что наступает повреждение кератоцитов, являющихся их продуцентами.

Гистологические исследования являются важным критерием эффективности лечения антимикробного ниосомального геля с пептидами при лечении инфицированных химических ожогов в эксперименте. Такие исследования были проведены на животных, получивших стандартные, тяжелые химические ожоги роговицы 3 степени. При экспериментальном химическом ожоге в роговице развивались дистрофические, деструктивные и воспалительные изменения в эпителии, эндотелии и собственной оболочке. Дистрофические изменения эпителия и эндотелия характеризуются развитием гидропической и баллонной дистрофии, некроза эпителиоцитов и эндотелиоцитов, десквамацией и изъязвлением с образованием эрозий. В собственной оболочке роговицы наблюдается отек и воспалительная

инфильтрация с развитием серозного, а затем гнойного кератита, образованием очагов кератомалиции, набуханием и распадом коллагеновых волокон. Серозный кератит наблюдается в первые 3-е суток, а затем переходит в гнойный (5-е сутки). На 7-е сутки на фоне гнойного кератита появляются очаги кератомалиции, деструкции коллагеновых волокон, отслойка эпителиального пласта и десквамация его на значительном протяжении с эрозированием поверхности. Применение антимикробного ниосомального геля с пептидами приводит к оптимизации процессов эпителизации раневой зоны, стимуляции митотической активности базальных и шиповатых клеток переднего эпителия, лимитированию апоптотической доминанты эпителиоцитов и фибробластов собственного вещества роговицы. Происходит купирование отека, рассасывание воспалительных инфильтратов, сохранение целостности эпителиального пласта и эндотелия, отсутствуют деструктивные изменения в тканях роговицы, полностью восстанавливается гистологическая структура органа. Ниосомы способствовали равномерному и долговременному эффекту присутствия на поверхности роговицы выделенных пептидов геля, пролонгируя их непрерывное поступление, в более глубокие слои очага поражения, восстанавливая дефекты более глубоких слоев эпителия роговицы и практически полностью снижая воспалительные реакции.

Изучение регенераторной способности антимикробного ниосомального геля с пептидами после инфицированного химического ожога проводили также в эксперименте. Исследования выполнены на 60 глазах 30 кроликов породы шиншилла обоего пола массой 2,1 - 3,5 кг. Изучена эффективность применения антимикробного ниосомального геля с пептидами для лечения инфицированных химических ожогов роговицы. Модель химического ожога воспроизводили при помощи 10 % раствора едкого натра, время экспозиции 20 секунд, после предварительной инсталляционной анестезии 0,5 % раствором алкаина. Через 2 часа после нанесения ожога проводилась контрольная оценка тяжести ожогов роговой оболочки и распределение животных по группам. У всех животных были получены стандартные, тяжелые химические ожоги роговицы 3 степени. Лечение гелем начинали через 3 часа после нанесения химического ожога. Животные были разделены на две

группы опытную и контрольную по 10 кроликов (20 глаз в каждой группе). В опытной группе лечение осуществлялось с помощью нанесения 0,05 мл ниосомального геля с низкомолекулярными пептидами на ожоговую поверхность 1 раз в сутки в течение 10 дней. Контролем служила группа животных, которым проводили стандартное лечение офтальмологическим гелем «Солкосерил». В результате проведенной работы было показано, что химический ожог вызывают гидролиз структуры белка и разрушение клеток, приводя к некрозу тканей. Наблюдается гидратация, с последующим помутнением стромы роговицы и трабекулярной сети, что при увеличении выработки факторов воспаления может привести к потере зрения. Использование ниосомального геля ускоряло и стимулировало регенерацию поврежденной роговицы и конъюнктивы намного эффективнее по сравнению с гелем «Солкосерил». Ниосомы способствовали равномерному и долговременному эффекту присутствия на поверхности роговицы активных веществ ниосомального геля, пролонгируя их непрерывное поступление в более глубокие слои очага поражения, восстанавливая дефекты эпителия роговицы и практически полностью снижая воспалительные реакции. Установлено, что применение антимикробного ниосомального геля с пептидами в качестве наружного лечебного средства, при экспериментальных химических ожогах, способствуют более раннему началу эпителизации, сокращению сроков лечения - в 2,2 раза. При использовании геля выявлено снижение количества осложнений в 2,8 раза, причем васкуляризация роговицы уменьшилась с 81,2 (при традиционной терапии) до 55,3 % случаев.

Полученные результаты позволяют расширить антибактериальный спектр и улучшить антимикробную эффективность к антибиотико-резистентным штаммам при использовании разработанного геля. Новый способ борьбы с устойчивостью к антибиотикам в дальнейшем будет апробирован в клинических исследованиях. Однако очевидно, что антимикробные ниосомальные гели на основе дефензинов могут помочь решить современные проблемы устойчивости к антибиотикам. Преимущественные механизмы их применения заключаются в следующем: 1) разработанные гели, как новая система доставки лекарств, обеспечивающая

устойчивое высвобождение антимикробных эндогенных пептидов, могут оказывать пролонгированное антимикробное действие и избегать скрининга резистентных бактерий; 2) в соответствии с множественными механизмами наноконтейнеров кремнийорганической природы и других антибактериальных ингредиентов бактериям трудно развить устойчивость, направленную только на одну цель; 3) различные ингредиенты могут проявлять синергетический эффект.

## ВЫВОДЫ

1. Проанализирован микробиоценоз конъюнктивы у пациентов с инфекционными осложнениями химических ожогов роговицы, который имел следующий видовой состав: *Staphylococcus epidermidis* - 53 (53%), *Streptococcus spp.*- 14 (14%), коагулазоположительные стафилококки, в основном *Staphylococcus aureus* - 4 (4 %), *E.coli* – 3(3%), *Micrococcus spp.* - 8 (8%), *Staphylococcus haemolyticus* -3 (3%), *Streptococcus pneumoniae* - 2 (2%), стерильная конъюнктивальная полость – 10 (10%), неидентифицированная форма – 3 (3%), что подтверждает ведущую роль представителей нормальной микрофлоры кожных и слизистых покровов в этиологии инфекционных осложнений при ожогах глаза.
2. Разработана технология выделения эндогенных антимикробных и низкомолекулярных пептидов, их инкапсулирование в кремнийорганические ниосомы, что позволило получить гель, обеспечивающий пролонгированную эффективную доставку пептидов в зону очага инфицированного ожога.
3. Бактериологические исследования чувствительности выделенных стафилококков к ниосомальному гелю с пептидами продемонстрировали его антимикробную активность, превышающую в 2,8 раз традиционно применяемый антибактериальный гель «Солкосерил».
4. Результаты исследований безопасности полученного ниосомального геля на разных группах животных свидетельствовали об отсутствии его токсичности.
5. Изучение уровня цитокинов в слезной жидкости показало их роль в процессе ранозаживления, патоморфологические изменения у экспериментальных животных при лечении инфицированного ожога роговицы продемонстрировали синергию антимикробного и регенераторного действия ниосомального геля, проявленную в оптимизации процессов эпителизации раневой зоны и восстановлению гистологической структуры.
6. Применение антимикробного ниосомального геля с пептидами в качестве наружного лечебного средства при экспериментальных химических ожогах

способствовало более раннему началу эпителизации, сокращению сроков лечения - в 2,2 раза. При использовании геля выявлено снижение количества осложнений в 2,8 раза, причем васкуляризация роговицы уменьшилась с 81,2 % (при традиционной терапии) до 55,3 % случаев.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

При выделении *S. epidermidis* из переднего отрезка глаза при ожогах роговицы целесообразно проводить бактериологические исследования чувствительности выделенных стафилококков к антимикробным препаратам и рассматривать эти микроорганизмы в качестве этиологических агентов инфекционных осложнений.

Выявление стафилококкового бактерионосительства следует рассматривать как фактор риска развития инфекционных осложнений при травмах и ожогах глаза. В случае резидентного носительства необходимо проведение санации роговицы с целью элиминации возбудителя.

Исследование уровня цитокинов в жидкости передней камеры глаза является критерием развития антибактериального механизма инфицированного ожога. Повышение уровня провоспалительных цитокинов характеризует благоприятное течение ранозаживления инфицированного ожога роговицы.

Применение разработанного ниосомального антимикробного геля будет способствовать повышению клинической эффективности лечения пациентов с инфицированными ожогами роговицы, обусловленными антибиотикорезистентными микроорганизмами.

Доказанная антимикробная и регенераторная эффективность антимикробного ниосомального геля на модели инфицированного ожога роговицы у экспериментальных животных позволяет рекомендовать его применение для лечения инфицированных ожогов роговицы в клинических условиях.

## **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Теоретический и практический интерес представляют дальнейшие исследования по изучению эффекта синергии, продемонстрированные в усилении антимикробной и регенераторной эффективности при действии плацентарных пептидов и эндогенных дефензинов, выделенных из клеток крови.

Антимикробные ниеosomalные гели можно использовать локально, что позволяет избежать побочного эффекта системного применения. Однако контролируемое высвобождение лекарств не может быть пока очень точным. В будущем эти проблемы все еще требуют решения при дополнительных исследованиях.

Влияние эндогенных пептидов на течение различных патологических процессов в слизистых и тканях других органов является перспективной темой для дальнейшего исследования.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМП - антимикробные пептиды

БАВ – биологически активные вещества

ВАК – Высшая аттестационная комиссия

ВЭЖХ –высокоэффективная жидкостная хроматография

ВИЧ – вирус иммунодефицита

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

г - грамм

Гц - Герц

ДДМ – диско–диффузионный метод

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЕСМ - внеклеточная матрица

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИЛ- интерлейкины

кДа - килодальтон

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

МКБ – международная классификация болезней

Мкл - микролитр

мкМ – микрометр

мл – миллилитр

мл/мин –миллилитр в минуту

НИР – научно–исследовательская работа

нм – нанометр

об/мин –оборотов в в минуту

ПАВ – поверхностно–активное вещество

ПЭГ – полиэтиленгликоль

РФ – Российская Федерация

см - сантиметр

СтГМУ – Ставропольский государственный медицинский университет

СтавНИПЧИ- Ставропольский государственный медицинский Университет

ГБУЗ СК «СККБ» - Государственное бюджетное учреждение здравоохранения  
Ставропольского края «Ставропольская краевая клиническая больница»  
США – Соединённые Штаты Америки  
ТД – терапевтическая доза  
ТУ – техническое условие  
ТФР- тромбоцитарный фактор роста  
УФ – ультрафиолетовые лучи  
ФС – Федеральный стандарт  
°С - градусы по Фарингейту  
Да - дальтон  
GF – growth factor  
IL – интерлейкины  
М - моль  
МВТ- масс бактериальный тест-стандарт  
NCCLS – Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам  
р – уровень значимости  
рН – водородный показатель

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеева, Ж.И. Препараты системы цитокинов / Ж.И. Авдеева, Н.В. Медуницын // Цитокины и воспаление. — 2002. - Т. 1, № 2. - С. 33.
2. Аветисов, С.Э. Офтальмология: Национальное руководство под ред. С.Э. Аветистова, Е.А. Егорова, Л.К. Мошетовой, В.В. Нероева // М. ГЕОТАР-Медиа, 2008. – С. 443-444.
3. Анджелов, В.О. Лабораторная диагностика офтальмоинфекций: задачи, методы, критерии оценки клинической значимости / В.О. Анджелов, Г.И. Кричевская // Материалы научно-практической конференции. Офтальмоиммунология. Итоги и перспективы, 25-27 ноября 2007 г. – Москва, 2007. - С. 36–39.
4. Анджелов, В.О. Основные тенденции развития современной офтальмоиммунологии и офтальмовирусологии / В.О. Анджелов, Н.С. Зайцева, О.С. Слепова // Сб. науч.-практ. конф.: основные тенденции развития современной офтальмологии. - Москва, 1995. - С.68–72.
5. Базиков, И.А. Оценка репаративной способности, антимикробной и лимфоцитарной активности ниосомального геля "Регенерин" в стоматологической практике / И.А. Базиков, А.А. Долгалев, А.Н. Квочко, В.А. Зеленский, М.А. Матюта, А.А. Долгалева, Е.А. Гоптарева, В.И. Королькова // Бактериология. - 2018. - Т. 3, № 2. - С. 7-11.
6. Базиков, И.А. Влияние опытного образца трансдермального седативного геля на психофизиологическое состояние экспериментальных животных / И.А. Базиков, А.Н. Мальцев, Э.В. Бейер, О.И. Боев, О.И. Седых // Медицинский вестник Северного Кавказа. - 2019. –Т.14, №1. - С.156-158.
7. Базиков, И.А. Гистологические исследования органов в эксперименте при применении ниосомальной формы противоопухолевого вещества / А.В. Аксенов, А.Н. Мальцев, В.С. Боташева, А.В. Корниенко, В.И. Королькова, Ф.И. Базиков // Медицинский вестник Северного Кавказа. - 2019. - № 4. - С. 672-675.

8. Базиков, И.А. Выделение эндогенных антимикробных пептидов и инкапсулирование их в кремнийорганические ниосомы / И.А. Базиков, А.Н. Мальцев, О.И. Седых, В.А. Батулин, А.Д. Болатчиев, А.А. Ефременко // Бактериология. - 2019. - Т. 4, № 3. - С. 14-17.
9. Бикбов, М.М. Цитокины в клинической офтальмологии / М.М. Бикбов, Н.Е. Шевчук, В.Б. Мальханов - Уфа: ГБУ «Уфимский НИИ глазных болезней АН РБ», 2008. - 152 с.
10. Болатчиев, А.Д. Разработка ниосомального лекарственного геля с альфа-дефензином hnp-1/ А.Д. Болатчиев, И.А. Базиков, А.Н. Мальцев, О.И. Седых // В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее. Материалы 4 международной научно-практической конференции. - Ставрополь, 2018. - С.16-17.
11. Болатчиев, А.Д. Изучение эффективности ниосомального лекарственного геля с альфа-дефензином hnp-1 при лечении больных с диагнозом: сахарный диабет с синдромом диабетической стопы / А.Д. Болатчиев, И.А. Базиков, А.Н. Мальцев, О.И. Седых // В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее. Материалы 4 международной научно-практической конференции. – Ставрополь, 2018. - С.18-20.
12. Болатчиев, А.Д. Влияние ниосомального антимикробного пептида hBD-1 на скорость заживления инфицированных ран у крыс / А.Д. Болатчиев, В.А. Батулин, И.А. Базиков, А.Н. Мальцев // Медицинский вестник Северного Кавказа. - 2018. - № 3. - С. 515-517.
13. Боровских, Е.В. Микробный спектр и чувствительность к антибиотикам микрофлоры, встречающейся у больных с воспалительными заболеваниями глаз / Е.В. Боровских, И.М. Боробова, В.В. Егоров // Офтальмологические ведомости. - 2014. - Т. 7, № 1. - С. 13–18.
14. Бусырева, В. Н. Исследование резистентности микроорганизмов, полученных от больных с инфекционными осложнениями травмы глаза / В.Н. Бусырева // Материалы научной сессии ПГМА. - 2008. - С. 112–116.

15. Варданян, И.Р. Клинико-иммунологическая характеристика и лечение больных с ожогами глаз и послеожоговыми бельмами роговицы: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.08 / Варданян Игорь Рудикович. - М., 2000. - 201 с.
16. Вериго, Е.Н. Консервативная терапия в реабилитации больных с повреждениями органа зрения / Е.Н. Вериго, И.А. Кузнецова, Е.Н. Орлова, Ю.А. Капитонов, И.Ю. Романова // Вестник офтальмологии. – 2002. - №3. – С.34-37.
17. Внутриглазная раневая инфекция / А.М. Южаков, Р.А. Гундорова, В.В. Нероев, А.В. Степанов. — М.: Мед. информ. агенство, 2007. — 240 с.
18. Воронцова, Т.Н. Микрофлора конъюнктивальной полости и ее чувствительность к антибактериальным препаратам у детей в норме и при некоторых воспалительных заболеваниях глаз / Т.Н. Воронцова, В.В. Бржеский, Е.Л. Ефимова // Офтальмологические ведомости. — 2010. — Т. 3, № 2. — С. 61–65.
19. Воротеляк, Е.А. Стволовые клетки эпителиальных тканей / Е.А. Воротеляк, В.В. Терских // Биология стволовых клеток и клеточные технологии (под ред. М.А. Пальцева). — М.: Медицина, 2009. — Т. 2. — С. 53–74.
20. Вохмяков, А.В. Выбор оптимального антибиотика для профилактики инфекционных осложнений в офтальмохирургии / А.В. Вохмяков, И.Н. Околов, П.А. Гурченко // Клиническая офтальмология. — 2007. — Т. 8, № 1. — С. 37–40.
21. Гундорова, Р.А. Смещение акцентов в этиологии ожоговой болезни / Р.А. Гундорова // Ожоги глаз и их последствия: Мат. науч.-практ. Конференции. — Москва, 1997. — С. 1–2.
22. Гундорова, Р.А. Приоритетные направления в проблеме глазного травматизма / Р.А. Гундорова // Материалы VII съезда офтальмологов России, 23-24 апреля 2000 г., Москва. — Москва, 2000. — С. 55–60.
23. Гундорова, Р.А. Пролиферативный синдром при ожоговой болезни глаз / Р.А. Гундорова, П.В. Макаров, А.Э. Кугушева // VII международная научно-практическая конференция «Пролиферативный синдром в офтальмологии». Сб. науч. тр. — Москва, 2012. — С. 37–39.

24. Гундорова, Р.А. История научных исследований по диагностике, хирургическому и медикаментозному лечению патологии роговицы: практическое руководство / Р.А. Гундорова. — М.: 2014. — 80 с.
25. Гусева, М.Р. Научно-практический анализ травм глаз у детей по данным глазного стационара Морозовской детской клинической городской больницы / М.Р. Гусева, Н.С. Бадинова, М.Б. Бесланеева, Е.Д. Горбунова, Ю.Д. Кузнецова, И.Г. Кан // Российская педиатрическая офтальмология. - 2008. - № 2. - С. 6 - 10.
26. Дискаева, Е.И. Оценка применимости фотометрического метода для определения размера везикул ниосомной дисперсии / Е.И. Дискаева, И.А. Базиков, О.В. Вечер, В.П. Тимченко, М.А. Селимов // Медицинский вестник Северного Кавказа. -2018. - Т.1, № 1.- С. 108-110.
27. Дискаева, Е.И. Корреляция размера ниосомальных везикул и оптической плотности раствора ниосомальной дисперсии / Е.И. Дискаева, И.А. Базиков, А.Н. Мальцев, О.В. Вечер, Ф.И. Базиков // В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее. Материалы 5 международной научно-практической конференции. - Ставрополь, 2019. - С.166-168.
28. Дискаева, Е.И. Изучение скорости движения кремнийорганических ниосом с парамагнитными свойствами / Е.И. Дискаева, И.А. Базиков, А.Н. Мальцев, О.В. Вечер, Ф.И. Базиков // В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее. Материалы 5 международной научно-практической конференции. - Ставрополь, 2019. - С.103-108.
29. Егоров, Е.А. Новые стимуляторы репаративной регенерации роговицы / Е.А. Егоров, Н.И. Калинич, А.П. Киясов // Вестник офтальмологии. — 1999. — Т.115, №6. — С.13–16.
30. Еричев, В.П. Роль цитокинов в патогенезе глазных болезней / В.П. Еричев, С.Ю. Петров, А.М. Суббот // Национальный журнал глаукома. — 2017. — №1. — С.85–99.
31. Егорова, Н.С. Репаративный эффект биоконструкции на основе коллагена I типа и клеток буккального эпителия при лечении глубоких дефектов рого-

- вицы в эксперименте / Н.С. Егорова, Е.В. Ченцова, М.С. Макаров // Трансплантология. — 2017. — Т. 9, №3. - С.54-57.
32. Егорова, Н.С. Технологии создания, оценка биосовместимости и безопасности коллагенового матрикса в составе биоинженерной клеточной конструкции / Н.С. Егорова, Е.В. Ченцова, С.В. Флора // Российский офтальмологический журнал. — 2017. — №2. — С.71–78.
33. Ермолаев, В.Г. Клинические и хрономедицинские аспекты производственного глазного травматизма / В.Г. Ермолаев, А.В. Ермолаев // Теоретические и клинические исследования как основа медикаментозного и хирургического лечения травм органа зрения. Материалы научно-практической конференции. — Москва, 2000. — С.7–8.
34. Ермолов, А.С. Биологическая повязка для лечения ожоговых ран 3а степени / А.С. Ермолов, С.В. Смирнов, З.Б. Хзатов, Л.П. Истранов, Л.Л. Миронова, Е.Г. Колокольчикова, М.В. Сычевский, В.С. Бочарова // Хирургия. - 2008. - № 10. - С.4-9.
35. Зильбер, Н.А. И.И. Мечников и учение об иммунитете / Н.А. Зильбер. Научное наследие. — М.-Л.: Издательство АН СССР, 1948. — Т. 1. — С. 482–519.
36. Калинин, Н.И. Новые стимуляторы репаративной регенерации роговицы в лечении заболеваний переднего отрезка глаза: автореферат дис. ... канд. мед. наук: 14.00.08 / Калинин Нелли Ильясовна. — М., 2000. — 24с.
37. Капитонов, Ю.А. Коррекция протеолиза роговицы в ранние сроки после химического ожога: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.08 / Капитонов Юрий Александрович. — М., 2001. — 260 с.
38. Капитонов, Ю.А. Локальная регуляция протеолиза в роговице после щелочного ожога / Ю.А. Капитонов, Е.В. Ченцова, Н.Б. Чеснокова // Ожоги глаз и их последствия. Мат. науч.-практ. конференции. — Москва, 1997. — С. 16–19.

39. Каранадзе, Н.А. Изучение бактериальной флоры конъюнктивы глаз и ее чувствительности к антибиотикам / Н.А. Каранадзе, А.М. Южаков // Офтальмологический журнал. — 1984. — № 1. — С. 54–57.
40. Каспаров, А.А. Офтальмогерпес / А.А. Каспаров. — М.: Медицина, 1994. — 224 с.
41. Каспарова, Е.А. О применении цитокинов и их комплексов в офтальмологии / Е.А. Каспарова // Вестник офтальмологии. — 2002. — № 4. — С. 47–49.
42. Каспарова, Е.А. Послеоперационная буллезная кератопатия: трансплантационные и нетрансплантационные методы лечения / Е.А. Каспарова, С.В. Труфанов, Н.В. Бородина // Тезисы докладов Девятого съезда офтальмологов России. — Москва, 2010. — С. 307.
43. Каспарова, Е.А. Рецидивирующая эрозия роговицы: диагностика и лечение / Е.А. Каспарова, А.А. Каспаров, Н.Р. Марченко // Вестник офтальмологии. — 2010. — Т. 126, № 5. — С. 3–8.
44. Керимов, К.Т. Ожоги глаз: патогенез и лечение / К.Т. Керимов, А.И. Джафаров, Ф.С. Гахраманов. — Москва: РАМН, 2005. — 462 с.
45. Ковалева, Л.А. Алгоритмы фармакотерапии бактериальных язв роговицы / Л.А. Ковалева, Е.С. Вахова // Эффективная фармакотерапия. — 2013. — Т. 23, № 1. — С. 46-48.
46. Ковалева, Л.А. Роль аутоиммунного компонента при центральных язвах роговицы / Л.А. Ковалева, О.С. Слепова, И.Г. Куликова, Е.А. Миронкова // Российский офтальмологический журнал. — 2013. — Т. 6, № 2. — С. 29-31.
47. Ковалева, Л.А. Патогенетическая роль системной тканеспецифической аутосенсibilизации при инфекционных язвах роговицы центральной локализации / Л.А. Ковалева, И.Г. Куликова, О.С. Слепова, Е.В. Яни // VI Междисциплинарный конгресс по заболеваниям органов головы и шеи. Тезисы докладов. — Москва, 2016. — С. 33-34.
48. Конькова, А.Ю. Анализ причин возникновения воспалительных заболеваний сосудистого тракта глаза / А.Ю. Конькова, Д.А. Бояршинов, Т.В. Гав-

- рилова, М.Б. Гитман // Российский журнал биомеханики. — 2019. — Т. 23, № 1. — С. 22–32.
49. Конькова, А.Ю. Опыт серологического обследования пациентов с увеитами с целью расшифровки этиологии заболевания / А.Ю. Конькова, Э.С. Горовиц, Т.В. Гаврилова // Медицинский вестник Башкортостана. — 2014. — Т. 9, № 2. — С. 181–183.
50. Конькова, А.Ю. Роль комплексного клинико-anamnestического и лабораторного обследования при уточнении этиологии эндогенных увеитов / А.Ю. Конькова, Э.С. Горовиц, Т.В. Гаврилова, М.Д. Пожарицкий, М.В. Черешнева // Офтальмология. — 2019. — Т. 16, № 2. — С.202–209.
51. Конькова, А.Ю. Сравнительная характеристика биологических свойств стафилококков, изолированных из слезной жидкости, полости носа и зева пациентов с эндогенными увеитами / А.Ю. Конькова, Э.С. Горовиц, Т.В. Гаврилова // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. — 2019. — Вып. 2. — С. 159–166.
52. Кочергин, С.А. Иммунитет глазного яблока и конъюнктивальная микрофлора / С.А. Кочергин, Г.М. Чернакова, Е.А. Клещева // Инфекция и иммунитет. — 2012. — Т. 2, № 3. — С. 635–644.
53. Кочергин, С.А. Локальный цитокиновый профиль при аденовирусной инфекции / С.А. Кочергин, Г.М. Чернакова, Е.А. Клещева, М.Е. Шаповал, М.В. Мезенцева // Офтальмологические ведомости. — 2011. — № 3. — С.32–40.
54. Кузнецова, О.Ю. Первый опыт определения микробиоценоза глазной поверхности методом газовой хромато-масс-спектрометрии / О.Ю. Кузнецова, М.Г. Комарова, О.В. Никулина // Современные технологии в офтальмологии. — 2016. — № 3. — С. 166–171.
55. Куликова, И.Г. Цитокины во влаге передней камеры глаза и их роль в развитии системного иммунного ответа на антигены тканей глаза / И.Г. Куликова, О.С. Слепова, Е.В. Денисова, Л.А. Ковалева, П.В. Макаров, Д.Н. Ловпаче // Медицинская иммунология. - 2015. - Т.17, № 2. - С. 179-182.

56. Куликова, И.Г. Частота сдвигов от нормы в субпопуляционном составе крови у пациентов с центральной язвой роговицы / И.Г. Куликова, Н.В. Балацкая, Л.А. Ковалева, П.В. Макаров // Медицинская иммунология. - 2018. - Т. 20, № 2. – С. 263-270.
57. Лабинская, А.С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская, Л.П. Блинкова, А.С. Ещина. — М.: Медицина, 2004. — 576 с.
58. Лошкарева, А.О. Применение богатой тромбоцитами плазмы у пациентов с хроническими эрозиями роговицы / А.О. Лошкарева, Д.Ю. Майчук // Офтальмохирургия. – 2016. - №4. – С.131-132
59. Макаров, П.В. К хирургической тактике лечения тяжелой и особо тяжелой ожоговой травмы глаз (сообщение 2) / П.В. Макаров // Вестник офтальмологии. — 2002. — № 4. — С. 8–10.
60. Макаров, П.В. Лимбальная трансплантация в хирургической реабилитации пациентов, перенесших тяжелые ожоги глаз / П.В. Макаров, Р.А. Гундорова, И.С. Чернетский, О.Г. Оганесян // Вестник офтальмологии. - 2007. - Т. 123, №3. - С. 9-12.
61. Мальцев, А.Н. Влияние применения ниосомального седативного геля с фитоэкстрактами на гематологические показатели крови лабораторных животных / А.Н. Мальцев, И.А. Базиков, Э.В. Бейер, О.И. Седых // В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее материалы v международной научно-практической конференции. - 2019. - С. 152-154.
62. Мальцев, А.Н. Количественная и функциональная оценка регенераторной эффективности антимикробных средств для кожных покровов при сочетанном применении с низкомолекулярными плацентарными пептидами препарата «Регенерин» / А.Н. Мальцев, И.А. Базиков, О.И. Седых // В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее. Материалы 4 международной научно-практической конференции. – Ставрополь, 2018. - С.29-39.
63. Мальцев, А.Н. Эффективность сочетанного применения антимикробных средств и пептидного препарата «Регенерин» при лечении гнойных ран в

- эксперименте /А.Н. Мальцев, И.А. Базиков, О.И. Седых // В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее. Материалы 4 международной научно-практической конференции. – Ставрополь, 2018. - С. 39-45.
64. Мальцев, А.Н. Определение оптимальных эффективных доз содержания пептидов в антимикробных препаратах / А.Н. Мальцев, И.А. Базиков, О.И. Седых // Сборник материалов 4 международной научно-практической конференции: Биотехнология: взгляд в будущее. – Ставрополь, 2018. - С. 45-48.
65. Мальцев, А.Н. Выделение природных антимикробных пептидов из лейкоцитарно-эритроцитарно-тромбоцитарной массы крови / А.Н. Мальцев, И.А. Базиков, В.Н. Батурин, А.А. Ефременко, Л.В. Лысогора // Сборник материалов VI Всероссийской научной-практической конференции с международным участием. 29 ноября Москва. - Москва, 2019.- С.138.
66. Манукян, М.Е. Репаративная регенерация роговицы при кислотном и щелочном ожоге и ее стимуляция: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.07 / Манукян Марат Евгеньевич. — Тбилиси, 1983. — 19 с.
67. Майчук, Ю.Ф. Профилактика и эпидемиология слепоты в мире / Ю.Ф. Майчук. — М., 1986. — 80 с.
68. Майчук, Ю.Ф. Терапевтические алгоритмы при инфекционных язвах роговицы / Ю.Ф. Майчук // Вестник офтальмологии — 2000. — № 3. — С. 35–37.
69. Майчук, Ю.Ф. Современные возможности диагностики и терапии инфекционных поражений глазной поверхности / Ю.Ф. Майчук // Материалы IX съезда офтальмологов России. — Москва, 2010. — С. 338–340.
70. Майчук, Ю.Ф. Выбор лекарственной терапии при различных клинических формах болезни сухого глаза / Ю.Ф. Майчук, Е.В. Яни // Офтальмология. — 2012. — №9. — С. 58–64.
71. Майчук, Ю.Ф. Новые подходы в лечении блефаритов / Ю.Ф. Майчук, Е.В. Яни // Катаральная и рефракционная хирургия. — 2012. — №1. — С. 59–62.

72. Мороз, О.В. Современные аспекты лечения ран с использованием биологически активных повязок в офтальмохирургии / О.В. Мороз // Офтальмохирургия. — 2014. — Т. 1. — С. 90–94.
73. Никитин, Н.А. Роль TGFβ в офтальмологии / Н.А. Никитин, Ш.Р. Кузбеков // Цитокины и воспаление. — 2009. — Т. 8, № 1. — С. 3–9.
74. Николаева, Л.Р. Лимбальная клеточная недостаточность / Л.Р. Николаева, Е.В. Ченцова // Вестник офтальмологии. — 2006. — Т. 122, № 3. — С. 43–47.
75. Новикова, И.С. Применение коллагена в медицинских целях / И.С. Новикова, С.А. Сторублевцев // ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий». - Воронеж, 2012.- С.32-34.
76. Новицкий, И.Я. Трансплантация амниотической оболочки с фиксацией в слоях роговицы / И.Я. Новицкий, М.Н. Сарахман, Т.М. Смаль // Офтальмохирургия. – 2003. - № 3. - С. 4-7.
77. Овчарова, Н.Г. Применение покрытия «Цитокол» в лечении комбинированных ожогов глаз: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.08 / Овчарова Наталья Георгиевна. – Москва, 2012. –180 с.
78. Околов, И.Н. Нормальная микрофлора конъюнктивы у офтальмохирургических пациентов / И.Н. Околов, П.А. Гурченков, А.В. Вохмяков // Офтальмол. ведомости. — 2008. — Т. 1, № 3. — С. 18–21.
79. Околов, И.Н. Резистентность к антибиотикам коагулазонегативных стафилококков, выделенных у больных конъюнктивитами / И.Н. Околов, П.А. Гурченков, А.В. Вохмяков // Офтальмол. ведомости. — 2009. — Т. 2, № 2. — С. 43–47.
80. Патент 2655522 Российская Федерация, МПК А61К9/127 Антимикробный гель для лечения инфицированных ран, ожогов и трофических язв/ А.Д. Болатчиев, В.А. Батурин, И.А. Базиков; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО СтГМУ Минздрава России. - № 2017125898; заявл. 18.07.2017; опубл. 28.05.2018, Бюл. № 5.- 6 с.

81. Полонская, М.В. Разработка состава и технологии лиофилизированных глазных препаратов на коллагене: дис. ... канд. фарм. наук: 15.00.01 / Полонская Мария Викторовна. — М., 2001. — 130 с.
82. Полуниин, Г.С. Блефарогели 1 и 2 – новое направление в профилактике и лечении блефаритов / Г.С. Полуниин, В.В. Куренков, Е.А. Каспарова, Е.Г. Полунина // Новое в офтальмологии. – 2004. - №1. - С. 44-47.
83. Полуниин, Г.С. Ингибиторы плазминоподобных ферментов и аутофибронектина в лечении эпителиальных дефектов роговицы / Г. С. Полуниин, А.А. Каспаров, И.А. Макаров // Вестник офтальмологии. — 1993. — №4. — С. 14–16.
84. Полуниин, Г.С. Показания и способы ферментотерапии в офтальмологической практике: дис. ... докт. мед. наук: 14.00.08 / Полуниин Геннадий Серафимович. — М., 1990. —284 с.
85. Пронкин, И.А. Рецидивирующая эрозия роговицы: этиология, патогенез, методы диагностики и лечения / И.А. Пронкин, Д.Ю. Майчук // Офтальмохирургия. — 2015. — №1. — С. 62.
86. Романова, И.Ю. Применение адгелона в терапии рецидивирующей посттравматической эрозии роговицы / И.Ю. Романова, Е.В. Ченцова, Ю.А. Капитонов // Сборник научных трудов. – Москва, 1998. — С. 156.
87. Романова, И.Ю. Применение адгелона при травматических поражениях роговой оболочки: дис. ... канд. мед.наук: 14.00.08 / Романова Ирина Юрьевна. — М., 2004. — 269 с.
88. Романова, И.Ю. Способ лечения химических ожогов глаз / И.Ю. Романова, Ю.А. Капитонов, Е.В. Ченцова // Современные лазерные технологии в диагностике и лечении повреждений органа зрения и их последствий: Материалы научно-практич. конф. — Москва, 1999. — С.134–135.
89. Сакович, В.Н. Характер микрофлоры конъюнктивальной полости глаза и ее чувствительность к антибиотикам при гнойных кератитах / В.Н. Сакович // Офтальмологический журнал. — 1991. — № 3. — С. 189–190.

90. Самойлов, А.Я. Туберкулезные заболевания глаз /А.Я. Самойлов, Ф.И. Юзефова, Н.С. Азарова. — Ленинград: Медгиз., 1963. — 256 с.
91. Симбирцев, А.С. Цитокины — новая система регуляции защитных реакций организма / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. — 2002. — № 1. — С. 9–16.
92. Ситник, Г.В. Современные клеточные биотехнологии в офтальмологии. Амниотическая мембрана как субстрат для культивирования стволовых эпителиальных клеток / Г.В. Ситник // Белорусский медицинский журнал. — 2006. — Т.4, №18. — С. 15–21.
93. Современная офтальмология: руководство / под редакцией проф. В.Ф. Даниличева. — 2-е изд. — СПб: Питер, 2009. — 688 с.
94. Теплинская, Л.Е. Эффективность лечения увеитов препаратом «Суперлимф» / Л.Е. Теплинская, Н.С. Филичкина, К.С. Матевосова // Вестник офтальмологии. — 2005. — № 4. — С. 22.
95. Федуненко, В.В. Экспериментально-морфологическое исследование влияния гидрогелевой основы повязки «Аполло-ПАК» на регенераторные процессы в роговице кролика / В.В. Федуненко, Д.В. Давыдов, А.В. Яковлев // Рефракционная хирургия и офтальмология. — 2005. — Т. 5, № 4 — С. 57–60.
96. Фомина, И.А. Применение фетальных клеток эпителия и кератобластов роговицы человека в эксперименте: дис. ... канд. мед.наук: 14.00.08 / Фомина Инга Александровна. — М., 2001. — 133 с.
97. Хаитов, Р.М. Аллергология и иммунология. Национальное руководство / Р.М. Хаитов. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. — 636 с.
98. Ченцова, Е.В. Система патогенетически обоснованного лечения ожоговой травмы глаз: дис. ... докт.мед.наук: 14.00.08 / Ченцова Екатерина Валериановна. — М., 1996. — 304 с.
99. Ченцова, Е.В. Особенности течения ожоговой болезни глаз: пособие для врачей / Е.В. Ченцова, Ю.А. Капитонов, И.Ю. Романова. — М., 1999. — 10 с

100. Ченцова, Е.В. Оптимизация метода выделения и культивирования клеток буккального эпителия на коллагеновых подложках для применения в офтальмологии / Е.В. Ченцова, О.И. Конюшко, М.С. Макаров // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2015. — № 1. — С.56–60.
101. Шаимова, В.А. Изучение состава микрофлоры клинически здоровой конъюнктивы и при бактериальном кератите / В.А. Шаимова // Актуальные проблемы офтальмологии: сб. тез. 9-й науч.-практ. конф. — Москва, 2006. — С. 85–87.
102. Шаимова, В.А. Роль провоспалительных цитокинов при заболеваниях глаз / В.А. Шаимова // Цитокины и воспаление. — 2005. — № 2. — С. 13–15.
103. Шевчук, Н.Е. Интерфероновый статус больных герпетическим кератитом / Н.Е. Шевчук, В.Б. Мальханов, З.Р. Марванова // Проблемы офтальмологии. — 2007. — № 1. — С. 29–32.
104. Ярилин, А.А. Иммунология: учебник / А.А. Ярилин. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 752 с.
105. Ямскова, В.П. Современный подход к правовой трансформации лекарственных веществ в офтальмотравматологии / В.П. Ямскова, Ю.А. Капитонов, Е.П. Гурмизов, И.Ю. Романова // Неотложная помощь, реабилитация и лечение осложнений при травмах органа зрения и в чрезвычайных ситуациях: Материалы научно-практич. конф. — Москва, 2003. — С.183-186.
106. Abdelkader, H. Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (nio-somes): self-assembly, fabrication, characterization, drug delivery applications and limitations / H. Abdelkader, A.W. Alani, R.G. Alany // Drug Delivery. — 2014. — Vol. 21. — P. 87–100.
107. Alexis, F. HER-2-targeted nanoparticle-affibody bioconjugates for cancer therapy / F. Alexis, P. Basto, E. Levy-Nissenbaum // ChemMedChem. — 2008. — Vol. 3. — P. 1839–1843.
108. Anderson, D.J. Can stem cells cross lineage boundaries? / D.J. Anderson, F.H. Gage, I.L Weissman // Nat. Med. — 2001. — Vol. 7. — P. 393–395.

109. Anderson, D.J. Stem cells and pattern formation in the nervous system: The possible versus the actual / D.J. Anderson // *Neuron*. — 2001. — V.30. — P.19–35.
110. Aoki, W. Next generation of antimicrobial peptides as molecular targeted medicines / W. Aoki, K. Kuroda, M. Ueda // *J. Biosci Bioeng.* —2012. — Vol. 114. — P. 365–370.
111. Ashby, M. Cationic antimicrobial peptides as potential new therapeutic agents in neonates and children: a review / M. Ashby, A. Petkova, K. Hilpert // *Curr. Opin. Infect. Dis.* — 2014. — Vol. 27. — P. 258–267.
112. Balasubramaniam, A. Formulation and in vivo evaluation of niosome-encapsulated daunorubicin hydrochloride / A. Balasubramaniam, V.A. Kumar, K.S. Pillai // *Drug Dev. Ind. Pharm.* — 2002. — Vol. 28. — P. 1181–1193.
113. Bansal, S.S. Advanced drug delivery systems of curcumin for cancer chemoprevention / S.S. Bansal, M. Goel, F. Aqil // *Cancer Prevent. Res.* — 2011. — Vol. 4. — P. 1158–1171.
114. Baranova, O. Medical hydrogels based on bioactive compounds. Synthesis, properties, and possible application for preparing bactericidal materials / O. Baranova, N. Kuz'min, T. Samsonova // *Fibre Chem.* — 2011. — Vol. 43. — P. 90–103.
115. Bardajee, G.R. A novel and green biomaterial based silver nanocomposite hydrogel: synthesis, characterization and antibacterial effect / G.R. Bardajee, Z. Hooshyar, H. Rezanezhad // *J. Inorg. Biochem.* — 2012. — Vol. 117. — P. 367–373.
116. Barry, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful trans-dermal drug delivery / B.W. Barry // *Eur. J. Pharm. Sci.* — 2001. — Vol. 14. — P. 101–114.
117. Bolatchiev, A.D. Effect of niosomal antimicrobial peptide hbd-1 on the healing rate of infected wounds in rats / A.D. Bolatchiev, V.A. Baturin, I.A. Bazikov, A.N. Maltsev // *Медицинский вестник Северного Кавказа*. - 2018. -Т. 13, № 3. - С. 515-517.
118. Bolatchiev, A. Effect of antimicrobial peptides HNP-1 and hBD-1 on *Staphylococcus aureus* strains in vitro and in vivo / A.D. Bolatchiev, V.A. Baturin, I.A.

- Bazikov, A.N. Maltsev // *Fundamental and Clinical Pharmacology*. - 2020. - T. 34, № 1. - P. 102-108.
119. Bisht, S. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy / S. Bisht, G. Feldmann, S. Soni // *J. Nanobiotechnol.* — 2007. — Vol. 5. — P. 3.
120. Branch, M.J. Mesenchymal stem cells in the human corneal limbal stroma / M.J. Branch, K. Hashmani, P. Dhillon // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2012. — Vol. 53. — P. 5109–5116.
121. Brannon-Peppas, L. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy / L. Brannon-Peppas, J.O. Blanchette // *Adv. Drug. Deliver. Rev.* — 2004. — Vol. 56. — P. 1649–1659.
122. Brogden, K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? / K.A. Brogden // *Nat. Rev. Microbiol.* — 2005. — Vol. 3. — P. 238–250.
123. Buhrman, J.S. Proteolytically activated anti-bacterial hydrogel microspheres / J.S. Buhrman, L.C. Cook, J.E. Rayahin // *J. Control. Rel.* — 2013. — Vol. 171. — P. 288–295.
124. Burman, S. Ophthalmic application of preserved human amniotic membrane: a review of current indications / S. Burman, S. Tejwani, G.K. Vemuganti // *Cell and Tissue Banking*. — 2004. — Vol. 5. — P. 161–175.
125. Carafa, M. A new vesicle-loaded hydrogel system suitable for topical applications: preparation and characterization / M. Carafa, C. Marianecchi, L. Di Marzio // *J. Pharm. Pharm. Sci.* — 2011. — Vol. 14. — P. 336–346.
126. Cavalieri, F. Nanomedicines for antimicrobial interventions / F. Cavalieri, M. Tortora, A. Stringaro // *J. Hosp. Infect.* — 2014. — Vol. 88. — P. 183–190.
127. Chen, H.J. Persistence of transplanted oral mucosal epithelial cells in human cornea / H.J. Chen, H.L. Chen, J.Y. La // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. — 2009. — Vol. 50. — P. 4660–4668.

128. Chen, Z. Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia / Z. Chen, C.S. De Paiva, L. Luo // *Stem Cells*. — 2004. — Vol. 22 (3). — P. 355–366.
129. Cho, B.J. Tandem scanning confocal microscopic analysis of differences between epithelial healing in limbal stem cell deficiency and normal corneal reepithelization in rabbits / B.J. Cho, A.R. Djalilian, E.J. Holland // *Cornea*. — 1998. — Vol. 17. — P. 68–73.
130. Choi, M.J. Liposomes and niosomes as topical drug delivery systems / M.J. Choi, H.I. Maibach // *Skin. Pharmacol. Physi.* — 2005. — Vol. 18. — P. 209–219.
131. Cleophas, R.T. Characterization and activity of an immobilized antimicrobial peptide containing bactericidal PEG-hydrogel / R.T. Cleophas, J. Sjol-lemma, H.J. Busscher // *Biomacromolecules*. — 2014. — Vol. 15. — P. 3390–3395.
132. Cohen, S. Commentary. Similarities of T-cell function in cell-mediated immunity and antibody production / S. Cohen, P.E. Bigazzi, T. Yoshida // *Cell Immunology*. — 1974. — Vol. 12. — P. 150–159.
133. Crosson, G.E. Epithelial wound closure in the rabbit cornea. A bifasic process / G.E. Crosson, S.D. Klyce, R.W. Benerman // *Invest. Ophthalmol.* — 1986. — Vol. 27, № 4. — P. 464–473.
134. Cunnane, G. The effects of treatment with interleukin-1 receptor antagonist on the inflamed synovial membrane in rheumatoid arthritis / G. Cunnane, A. Madigan, E. Murphy // *Rheumatology*. — 2001. — Vol. 40. — P. 62–69.
135. Dasgupta, A. Peptide hydrogels / J.H. Mondal, D. Das // *RSC Adv.* — 2013. — Vol. 3. — P. 9117–9149.
136. Davis, S.S. Biomedical applications of nanotechnology – implications for drug targeting and gene therapy / S.S. Davis // *Trends Biotechnol.* — 1997. — Vol. 15. — P. 217–224.
137. Des Rieux, A. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach / A. des Rieux, V. Fievez, M. Garinot // *J. Control. Release*. — 2006. — Vol. 116. — P. 1–27.

138. Dhamodaran, K. Characterization of ex vivo cultured limbal, conjunctival, and oral mucosal cells: A comparative study with implications in trans-plantation medicine / K. Dhamodaran, M. Subramani, N. Jeyabalan // *Mol. Vis.* — 2015. — Vol. 21. — P. 828–845.
139. Di Girolamo, N. Tracing the fate of limbal epithelial progenitor cells in the murine cornea / N. Di Girolamo, S. Bobba, V. Raviraj // *Stem Cells.* — 2015. — Vol. 33. — P. 157–69.
140. Ding, M. Fibronectin in corneal wound healing / M. Ding, N. Burstein // *J. Ocul. Pharmacol.* — 1988. — Vol. 4. — P. 75–91.
141. Diskaeva, E.I. Particle size analysis of niosomes as a function of temperature/ E.I. Diskaeva, O.V. Vecher, I.A. Bazikov, D.S. Vakalov // *Наносистемы: физика, химия, математика.* -2018. -Т. 9, № 2. - P. 290-294.
142. Diskaeva, E.I. Investigation ultrasound influence on the size of niosomes vesicles on the based of peg-12 dimethicone / Diskaeva, I.A. Bazikov, O.V. Vecher, K.S. Elbekyan, L.S. Месуаева // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.* - 2018. – Т. 9, № 6. - P. 1016-1021.
143. Diskaeva, E.I. Dispersion analysis of niosomes different composition / E.I. Diskaeva, I.A. Bazikov, O.V. Vecher, A. N. Maltsev // *Journal of Nanoparticle Research.* - 2019. -Т. 21, № 1.- P. 21-24.
144. Dodson, J.W. Secretion of collagen by corneal epithelium. Effect of the underlying substratum on secretion and polymerization of epithelial products / J.W. Dodson // *The Journal of Experimental Zoology.* — 1972. —Т.1, №2. - P. 189–251.
145. Dominici, M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K.L. Blanc, I. Mueller // *Cytherapy.* —2006. — Vol. 8. — P. 315–317.
146. Dua, H.S. Limbal stem cells of the corneal epithelium / H.S. Dua, A. Azuara-Blanco // *Surv. Ophthalmol.* — 2000. — Vol. 44. — P. 415–425.

147. Dua, H.S. The corneoscleral limbus in human corneal epithelial wound healing / H.S. Dua, J.V. Forrester // *Am. J. Ophthalmol.* — 1990. — Vol. 110. — P. 646–656.
148. Durum, S.K. Interleukin 1: an immunological perspective / S.K. Durum, J.A. Schmidt, J.J. Oppenheim // *Ann. Rev. Immunology.* — 1985. — Vol. 3. — P. 263–287.
149. Fjell, C.D. Designing antimicrobial peptides: form follows function / C.D. Fjell, J.A. Hiss, R.E. Hancock, G. Schneider // *Nat. Rev. Drug. Discov.* — 2011. — Vol. 11. — P. 37–51.
150. Forbes, S. Comparative surface antimicrobial properties of synthetic bi-ocides and novel human apolipoprotein E derived antimicrobial peptides / S. Forbes, A.J. McBain, S. Felton-Smith // *Biomaterials.* — 2013. — Vol. 34. — P. 5453–5464.
151. Frucht-Pery, J. Limbal cell autograft transplantation for severe ocular surface disorders / J. Frucht-Pery, C.S. Siganos, A. Solomon // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* — 1998. — Vol. 236. — P. 582–587.
152. Funari, V.A. Differentially expressed wound healing-related microRNAs in the human diabetic cornea / V.A. Funari, M. Winkler, J. Brown J // *PLoS One.* — 2013. — Vol. 8. — P. 48-50
153. *Fundamental Immunology* / editor E.P. William. — 7th edition. — Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. — 1283 p.
154. Funderburgh, J.L. Stem cells in the limbal stroma / J.L. Funderburgh, M.L. Funderburgh, Y. Yiqin Du // *Ocul. Surf.* — 2016. — Vol. 14. — P. 113–120.
155. Garcia-Barrasa, J. Silver nanoparticles: synthesis through chemical methods in solution and biomedical applications / J. Garcia-Barrasa, J.M. Lopez-de-Luzuriaga, M. Monge // *Cent. Eur. J. Chem.* — 2010. — Vol. 9. — P. 7–19.
156. Gery, I. Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens II. The cellular source of potentiating mediator(s) / I. Gery, B.H. Waksman // *J. Exper. Medicine.* — 1972. — Vol. 136. — P. 143–155.

157. Ghobril, C. The chemistry and engineering of polymeric hydrogel adhesives for wound closure: a tutorial / C. Ghobril, M.W. Grinstaff // *Chem. Soc. Rev.* — 2015. — Vol. 44. — P. 1820–1835.
158. Ghoubay-Benallaoua, D. Easy xeno-free and feeder free method for isolation and growing limbal stromal and epithelial stem cells of the human cornea / D. Ghoubay-Benallaoua, C. De Sousa, R. Martos // *Plos One.* —2017. — Vol. 17. — P. 1–18.
159. Gonzalez, G. Limbal stem cells: identity, developmental origin, and therapeutic potential / G. Gonzalez, Y. Sasamoto, B.R. Ksander // *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* — 2017. — Vol. 7. — P. 303.
160. Grabovac, V. Development and in vitro evaluation of surface modified poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles with chitosan-4-thiobutylamidine / V. Grabovac, A. Bernkop-Schnurch // *Drug. Dev. Ind. Pharm.* — 2007. — Vol. 33. — P. 767–774.
161. Guarner, F. Gut flora in health and disease / F. Guarner, J.R. Malagelada // *The Lancet.* — 2003. — Vol. 361, N 8. — 512–519.
162. Gude, R.P. Effects of niosomal cisplatin and combination of the same with theophylline and with activated macrophages in murine B16F10 melanoma model / R.P. Gude, M.G. Jadhav, S.G. Rao, A.G. Jagtap // *Cancer Biother. Radiopharm.* — 2002. — Vol. 17. — P. 183–192.
163. Haagdorens, M. Limbal stem cell deficiency: Current treatment options and emerging therapies / M. Haagdorens, S.I. Van Acker, V. Van Gerwen // *Stem Cells Int.* —2016. - Vol.16. - P. 22-24.
164. Hall, G. Ocular Cultures. In H.Iseburg (Ed.) *Clinical Microbiology Procedures Handbook* / G. Hall, M. York // ASM Press. — 2004. — Vol. 1. — P. 3101–3108.
165. Hamidi, M. Hydrogel nanoparticles in drug delivery / M. Hamidi, A. Azadi, P. Rafiei // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* — 2008. — Vol. 60. — P. 1638–1649.

166. Hashmani, K. Characterization of corneal stromal stem cells with the potential for epithelial transdifferentiation / K. Hashmani, M.J. Branch, L.E. Sidney // *Stem Cell Res. Ther.* — 2013. — Vol. 4. — P. 1–13.
167. Hemeg, H.A. Nanomaterials for alternative antibacterial therapy / H.A. Hemeg // *Int. J. Nanomedicine.* — 2017. — Vol. 12. — P. 8211–8225.
168. Hetrick, E.M. Reducing implant-related infections: active release strategies / E.M. Hetrick, M.H. Schoenfisch // *Chem. Soc. Rev.* — 2006. — Vol. 35. — P. 780–789.
169. Hu, B. Nanochemoprevention by encapsulation of (-)-epigallocatechin-3-gallate with bioactive peptides/chitosan nanoparticles for enhancement of its bioavailability / B. Hu, Y.W. Ting, X.Q. Yang // *Chem. Commun.* — 2012. — Vol. 48. — P. 2421–2423.
170. Imanishi, J. Growth factors: Importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea / J. Imanishi, K. Kamiyama, I. Iguchi // *Prog. Ret. Eye Res.* — 2000. — Vol. 19. — P. 113–129.
171. Italia, J.L. PLGA nanoparticles for oral delivery of cyclosporine: Nephrotoxicity and pharmacokinetic studies in comparison to Sandimmune Neoral / J.L. Italia, D.K. Bhatt, V. Bhardwaj // *J. Control. Release.* — 2007. — Vol. 119. — P. 197–206.
172. Jain, S. Mannosylated niosomes as adjuvant-carrier system for oral genetic immunization against Hepatitis B / S. Jain, P. Singh, V. Mishra, S.P. Vyas // *Immunol. Lett.* — 2005. — Vol. 101. — P. 41–49.
173. Jamil, B. Factors pivotal for designing of nanoantimicrobials: an exposition / B. Jamil, M. Imran // *Crit. Rev. Microbiol.* — 2018. — Vol. 44. — P. 79–94.
174. Jasin, H.E. Human mononuclear cell factors mediate cartilage matrix degradation through chondrocyte activation / H.E. Jasin, J.T. Dingle // *J. Clin. Invest.* — 1981. — Vol. 68. — P. 571–581.
175. Jiang, L. Self-assembly of cationic multidomain peptide hydrogels: supramolecular nanostructure and rheological properties dictate antimicrobial activ-

- ity / L. Jiang, D. Xu, T.J. Sellati, H. Dong // *Nanoscale*. — 2015. — Vol. 7. — P. 19160–19169.
176. Kakimaru-Hasegawa, A. Clinical application of real-time polymerase chain reaction for diagnosis of herpetic diseases of the anterior segment of the eye / A. Kakimaru-Hasegawa // *Japanese journal of ophthalmology*. — 2008. — Vol. 52, № 1. — P. 24–31.
177. Kang, H.K. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review / H.K. Kang, C. Kim, C.H. Seo, Y. Park // *J. Microbiology*. — 2017. — Vol. 55. — P. 1–12.
178. Kataoka, K. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance / K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki // *Adv. Drug. Deliver. Rev.* — 2001. — Vol. 47. — P. 113–131.
179. Khan, J.A. Water soluble nanoparticles from PEG-based cationic hyper-branched polymer and RNA that protect RNA from enzymatic degradation / J.A. Khan, R.K. Kainthan, M. Ganguli // *Biomacromolecules*. — 2006. — Vol. 7. — P. 1386–1388.
180. Kim, H. Cuboplexes: Topologically Active siRNA Delivery / H. Kim, C. Leal // *ACS Nano*. — 2015. — Vol. 9. — P. 10214–10226.
181. Kirkwood, B. J. Normal flora of the external eye / B.J. Kirkwood // *Amer. Sci. Ophthalm. Regist. Nurs.* — 2007. — Vol. 32, N 1. — P. 12–13.
182. Kong, M. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review / M. Kong, X.G. Chen, K. Xing, H.J. Park // *Int. J. Food. Microbiol.* — 2010. — Vol. 144. — P. 51–63.
183. Kruse, F.E. Retinoic acid regulates clonal growth and differentiation of cultured limbal and peripheral corneal epithelium / F.E. Kruse, S.C. Tseng // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 1994. — Vol. 35, №5. — P.2405–2420.
184. Lakshmaiah Narayana, J. Antimicrobial peptides: possible antiinfective agents / J. Lakshmaiah Narayana, J.Y. Chen // *Peptides*. — 2015. — Vol. 72. — P. 88–94.
185. Larone, D. *Medical Important Fungi* / D. Larone. — ASM Press, 2002. — 409 p.

186. Laverty, G. Antimicrobial peptide incorporated poly (2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels for the prevention of *Staphylococcus epidermidis*-associated bio-material infections / G. Laverty, S.P. Gorman, B.F. Gilmore // J. Biomed. Mater. Res. A. — 2012. — Vol. 100. — P. 1803–1814.
187. Levinson, R.D. Tubulointerstitial nephritis and uveitis syndrome / R.D. Levinson // Int. Ophthalmol. Clin. — 2008. — Vol. 3, № 48. — P.51–59.
188. Li, G.G. Mesenchymal stem cells derived from human limbal niche cells / G.G. Li, Y.T. Zhu, H.T. Xie // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2012. — Vol. 53. — P. 5686–5697.
189. Li, Y.Q. Antibacterial characteristics and mechanisms of  $\epsilon$ -poly-lysine against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* / Y.Q. Li, Q. Han, J.L. Feng // Food Control. — 2014. — Vol. 43. — P. 22–27.
190. Liu, Y. Stimuli-responsive self-assembling peptides made from antibacterial peptides / Y. Liu, Y. Yang, C. Wang, X. Zhao // Nanoscale. — 2013. — Vol. 5. — P. 6413–6421.
191. Lu, W. Reduced expression of laminin-5 in corneal epithelial cells under high glucose condition / W. Lu, N. Ebihara, K. Miyazaki, A. Murakami // Cornea. — 2006. — Vol. 25. — P. 61–67.
192. Luznik, Z. Effect of cryopreserved amniotic membrane orientation on the expression of limbal mesenchymal and epithelial stem cell markers in prolonged limbal explant cultures / Z. Luznik, M. Hawlina, E. Malicev // PLoS One. — 2016. — Vol. 11. — P. 1–17.
193. Malhotra, M. Niosomes as drug carriers / M. Malhotra, N.K. Jain // Indian Drugs. — 1994. — Vol. 31. — P. 81–86.
194. Malmsten, M. Antimicrobial and antiviral hydrogels / M. Malmsten // Soft Matter. — 2011. — Vol. 7. — P. 8725–8736.
195. Martinez, J.L. A global view of antibiotic resistance / J.L. Martinez, A. Fajardo, L. Garmendia // FEMS Microbiol. Rev. — 2009. — Vol. 33. — P. 44–65.
196. Martinez, J.L. Metabolic regulation of antibiotic resistance / J.L. Martinez, F. Rojo // FEMS Microbiol. Rev. — 2011. — Vol. 35. — P. 768–789.

197. Massey, M. Mind your P's and Q's: The coming of age of semiconductor-ing polymer dots and semiconductor quantum dots in biological applications / M. Massey, M. Wu, E.M. Conroy, W.R. Algar // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2015. — Vol. 34. — P. 30–40.
198. Mazer-Amirshahi, M. Newly approved antibiotics and antibiotics reserved for resistant infections: implications for emergency medicine / M. Mazer-Amirshahi, A. Pourmand, L. May // *Am. J. Emerg. Med.* — 2017. — Vol. 35. — P. 154–158.
199. Melchionna, M. The unexpected advantages of using D-amino acids for peptide self-assembly into nanostructured hydrogels for medicine / M. Melchionna, K.E. Styan, S. Marchesan // *Curr. Top. Med. Chem.* — 2016. — Vol. 16. — P. 2009–2018.
200. Mishra, B. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery / B. Mishra, B.B. Patel, S. Tiwari // *Nanomed.-Nanotechnol.* — 2010. — Vol. 6. — P. 9–24.
201. Mitra, R.N. Antimicrobial activity, biocompatibility and hydrogelation ability of dipeptide-based amphiphiles / R.N. Mitra, A. Shome, P. Paul, P.K. Das // *Org. Biomol. Chem.* — 2009. — Vol. 7. — P. 94–102.
202. Mizel, S.B. Revised nomenclature for antigen-non-specific T-cell proliferation and helper factors / S.B. Mizel, J.J Farrar // *Cell Immunology.* — 1979. — Vol. 48. — P. 433–436.
203. Mohamed, R.R. Synthesis and characterization of antibacterial semi-interpenetrating carboxymethyl chitosan/poly (acrylonitrile) hydrogels / R.R. Mohamed, R.S. Seoudi, M.W. Sabaa // *Cellulose.* — 2012. — Vol. 19. — P. 947–958.
204. Munoz-Bonilla, A. Polymeric materials with antimicrobial activity / A. Munoz-Bonilla, M. Fernandez-Garcia // *Prog. Polym. Sci.* — 2012. — Vol. 37. — P. 281–339.
205. Murrey, P. *Pocket Guide to Clinical Microbiology* / P. Murrey. — ASM Press, 1988. — 358 p.

206. Nakanishi, K. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses / K. Nakanishi, T. Yoshimoto, H. Tsutsui, H. Okamura // *Ann. Rev. Immunology*. — 2001. — Vol. 19. — P. 423–474.
207. Nelson, J. The conjunctiva: normal flora // *Cornea: Fundamentals of cornea and external disease* / J. Nelson, J. Cameron, J. Krachmer, D. Palay. — 1998. — Vol. 1. — Mosby CD online.
208. Ng, V.W. Antimicrobial hydrogels: a new weapon in the arsenal against multi-drug-resistant infections / V.W. Ng, J.M. Chan, H. Sardon // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* — 2014. — Vol. 78. — P. 46–62.
209. Niederkorn, J.V. Mechanisms of immune privilege in the eye and hair follicle / J.V. Niederkorn // *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* — 2003. — Vol. 8, N 2. — P. 168–172.
210. Noimark, S. The role of surfaces in catheter-associated infections / S. Noimark, C.W. Dunnill, M. Wilson, I.P. Parkin // *Chem. Soc. Rev.* — 2009. — Vol. 38. — P. 3435–3448.
211. Oerlemans, C. Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release / C. Oerlemans, W. Bult, M. Bos // *Pharm. Res.* — 2010. — Vol. 27. — P. 2569–2589.
212. Panyam, J. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue / J. Panyam, V. Labhasetwar // *Adv. Drug Deliv. Rev.* — 2003. — Vol. 55. — P. 329–347.
213. Pelczar, M.J. *Microbiology* / M.J. Pelczar, E.C.S. Chan, N.R. Kreig // 5th ed. — N.Y.: McGraw-Hill Book Company, 1986. — 915 p.
214. Pinto Reis, C. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles / C. Pinto Reis, R.J. Neufeld, A.J. Ribeiro, F. Veiga // *Nanomed.: Nanotechnol., Biol., Med.* — 2006. — Vol. 2. — P. 8–21.
215. Pletzer, D. Antibiofilm peptides: potential as broad-spectrum agents / D. Pletzer, R.E. Hancock // *J. Bacteriol.* — 2016. — Vol. 198. — P. 2572–2578.
216. Polisetty, N. Mesenchymal cells from limbal stroma of human eye / N. Polisetty, A. Fatima, S.L. Madhira // *Mol. Vis.* — 2008. — Vol. 14. — P. 431–442.

217. Ramesh, S. Short AntiMicrobial Peptides (SAMPs) as a class of extraordinary promising therapeutic agents / S. Ramesh, T. Govender, H.G. Kruger // *J. Pept. Sci.* — 2016. — Vol. 22. — P. 438–451.
218. Rosebury, T. Microorganisms indigenous to man / T. Rosebury // N.Y.: McGraw-Hill, 1962. — 435 p.
219. Rostami, E. Drug targeting using solid lipid nanoparticles / E. Rostami, S. Kashanian, A.H. Azandaryani // *Chem. Phys. Lipids.* — 2014. — Vol. 181. — P. 56–61.
220. Sacchetti, M. Limbal stem cell transplantation: Clinical results, limits, and perspectives / M. Sacchetti, P. Rama, A. Bruscolini, A. Lambiase // *Stem Cells Int.* — 2018. — Vol. 11. — P. 1–12.
221. Sahiner, N. Biocompatible and biodegradable poly (Tannic Acid) hydrogel with antimicrobial and antioxidant properties / N. Sahiner, S. Sagbas, M. Sahiner // *Int. J. Biol. Macromol.* — 2016. — Vol. 82. — P. 150–159.
222. Salick, D.A. Inherent antibacterial activity of a peptide-based  $\beta$ -hairpin hydrogel / D.A. Salick, J.K. Kretsinger, D.J. Pochan, J.P. Schneider // *J. Am. Chem. Soc.* — 2007. — Vol. 129. — P. 14793–14799.
223. Schluep, T. Pharmacokinetics and tumor dynamics of the nanoparticle IT-101 from PET imaging and tumor histological measurements / T. Schluep, J. Hwang, I.J. Hildebrandt // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2009. — Vol. 106. — P. 11394–11399.
224. Schmitz, J. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines / J. Schmitz, A. Owyang, E. Oldham // *Immunity.* — 2005. — Vol. 23. — P. 479–490.
225. Scorciapino, M.A. Antimicrobial dendrimeric peptides: structure, activity and new therapeutic applications / M.A. Scorciapino, I. Serra, G. Manzo, A.C. Rinaldi // *Int. J. Mol. Sci.* — 2017. — Vol. 18. — P. 542–556.
226. Shahiwala, A. Studies in topical application of niosomally entrapped Nimesulide / A. Shahiwala, A. Misra // *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences: A*

- Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne des Sciences Pharmaceutiques. — 2002. — Vol. 5. — P. 220–225.
227. Shea, L.D. Bioengineering the ovarian follicle microenvironment / L.D. Shea, T.K. Woodruff, A. Shikanov // *Annu Rev. Biomed. Eng.* — 2014. — Vol. 16. — P. 29–52.
228. Siddiqui, I.A. Introducing nanochemoprevention as a novel approach for cancer control: proof of principle with green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate / I.A. Siddiqui, V.M. Adhami, D.J. Bharali // *Cancer Res.* — 2009. — Vol. 69. — P. 1712–1716.
229. Smith, B.R. Real-Time Intravital Imaging of RGD-Quantum Dot Binding to Luminal Endothelium in Mouse Tumor Neovasculature / B.R. Smith, Z. Cheng, A. De // *Nano Lett.* — 2008. — Vol. 8. — P. 2599–2606.
230. Song, A. Antibacterial and cell-adhesive polypeptide and polyethylene glycol hydrogel as a potential scaffold for wound healing / A. Song, A.A. Rane, K.L. Christman // *Acta Biomater.* — 2012. — Vol. 8. — P. 41–50.
231. Steckbeck, J.D. Antimicrobial peptides: new drugs for bad bugs? / J.D. Steckbeck, B. Deslouches, R.C. Montelaro // *Expert. Opin. Biol. Ther.* — 2014. — Vol. 14. — P. 11–14.
232. Stone, P.W. State of infection prevention in US hospitals enrolled in the National Health and Safety Network / P.W. Stone, M. Pogorzelska-Maziarz, C.T. Herzig // *Am. J. Infect. Control.* — 2014. — Vol. 42. — P. 94–99.
233. Sulfikkarali, N. Chemopreventive efficacy of naringenin-loaded nanoparticles in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene / N. Sulfikkarali, N. Krishnakumar, S. Manoharan, R.M. Nirmal // *Pathol. Oncol. Res.* — 2013. — Vol. 19. — P. 287–296.
234. Taravati, P. Role of molecular diagnostics in ocular microbiology / P. Taravati, D. Lam, R. N. Van Gelder // *Current ophthalmology reports.* — 2013. — Vol. 1, № 4. — P. 181–189.
235. Tripathi, R. Ultrastructural study of non-traumatic recurrent corneal erosion / R. Tripathi, A. Bron // *Br. J. Ophthalmol.* — 1972. — Vol. 56, № 2. — P. 73–85.

236. Tsai, R.J. Comparison of limbal and conjunctival autograft transplantation in corneal surface reconstruction in rabbits / R.J. Tsai, T. Sun, S.C. Tseng // *Ophthalmology*. — 1990. — Vol. 97. — P. 446–455.
237. Tsao, C.T. Antibacterial activity and biocompatibility of a chitosan-gamma-poly(glutamic acid) polyelectrolyte complex hydrogel / C.T. Tsao, C.H. Chang, Y.Y. Lin // *Carbohydr. Res.* — 2010. — Vol. 345. — P. 1774–1780.
238. Uchegbu, I.F. Nonionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery / I.F. Uchegbu, S.P. Vyas // *Int. J. Pharm.* — 1998. — Vol. 172. — P. 33–70.
239. Varkoly, G. The corneal wound healing and the extracellular matrix / G. Varkoly, J. Bencze, T. Hortobagyi // *Orv Hetil.* — 2016. — Vol. 157, № 25. — P. 995–999.
240. Veiga, A.S. Arginine-rich self-assembling peptides as potent antibacterial gels / A.S. Veiga, C. Sinthuvanich, D. Gaspar // *Biomaterials*. — 2012. — Vol. 33. — P. 8907–8916.
241. Versen-Höynck, F. Application of sterilised human amnion for reconstruction of the ocular surface / F. Versen-Höynck, U. Hesselbarth, D.E. Möller // *Cell and Tissue Banking*. — 2004. — Vol. 5. — P. 57–65.
242. Wang, F. Reduced innervation and delayed reinnervation after epithelial wounding in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats / F. Wang, N. Gao, J. Yin, F.S. Yu // *Am. J. Pathol.* — 2012. — Vol. 181. — P. 2058–2066.
243. Wang, W. Lacritin-mediated regeneration of the corneal epithelia by protein polymer nanoparticles / W. Wang, J. Despanie, P. Shi // *J. Mater. Chem. B*, — 2014. — Vol. 2. — P. 8131–8141.
244. Winkler, M.A. Targeting miR-146a to treat delayed wound healing in human diabetic organ-cultured corneas / M.A. Winkler, C. Dib, A.V. Ljubimov, M. Saghizadeh // *PLoS One*. — 2014. — Vol. 9. — P. 18–36.
245. Wirostko, W.J. Recurrent poststreptococcal uveitis / W.J. Wirostko, T.B. Connor, P.F. Wagner // *Archives of Ophthalmology*. — 1999. — Vol. 117, № 12. — P. 1649–1650.

246. Xie H.T. Isolation and expansion of human limbal stromal niche cells / H.T. Xie, S.Y. Chen, G.G. Li, S.C.G. Tseng // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2012. — Vol. 53. — P. 279–286.
247. Xie, Z. Design of antimicrobial peptides conjugated biodegradable citric acid derived hydrogels for wound healing / Z. Xie, N.V. Aphale, T.D. Ka-dapure // *J. Biomed. Mater. Res. A.* — 2015. — Vol. 103. — P. 3907–3918.
248. Xu, K. Impaired epithelial wound healing and EGFR signaling pathways in the corneas of diabetic rats / K. Xu, F.S. Yu // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2011. — Vol. 52. — P. 3301–3308.
249. Xu, K.P. High glucose suppresses EGFRPI3K-AKT signaling pathway and attenuates corneal epithelial wound healing / K.P. Xu, Y. Li, A.V. Ljubimov, F.X. Yu // *Diabetes.* — 2009. — Vol. 58. — P. 1077–1085.
250. Yokoyama, M. Toxicity and antitumor-activity against solid tumors of micelle-forming polymeric anticancer drug and its extremely long circulation in blood / M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai // *Cancer Res.* — 1991. — Vol. 51. — P. 3229–3236.
251. Zhang, C. Interleukin-1 $\beta$  and tumour necrosis factor- $\alpha$  levels in conjunctiva of diabetic patients with symptomatic moderate dry eye: case-control study / C. Zhang, L. Xi, S. Zhao // *BMJ Open.* — 2016. — Vol. 6. — P. 11-36.
252. Zhang, S. An inflammation-targeting hydrogel for local drug delivery in inflammatory bowel disease / S. Zhang, J. Ermann, M.D. Succi // *Sci Transl. Med.* — 2015. — Vol. 7. — P. 56-67.
253. Zhang, Y. Epidermal growth factor stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase during wound closure in rabbit corneal epithelial cells / Y. Zhang, R.A. Akhtar // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 1997. — Vol. 38. — P. 1139–1148.
254. Zhou, C. A photopolymerized antimicrobial hydrogel coating derived from epsilon-poly-l-lysine / C. Zhou, P. Li, X. Qi // *Biomaterials.* — 2011. — Vol. 32. — P. 2704–2712.

255. Zieske, J.D. Activation of epidermal growth factor receptor during corneal epithelial migration / J.D. Zieske, H. Takahashi, A.E. Hutcheon, A.C. Dalbone // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2000. — Vol. 41. — P. 1346–1355.
256. Zieske, J.D. Basement membrane assembly and differentiation of cultured corneal cells: importance of culture environment and endothelial cell in-teraction / J.D. Zieske, V.S. Mason, M.E. Wasson // *Exp. Cell Res.* — 1994. — Vol. 214. — P. 621–633.
257. Zieske, J.D. Extracellular matrix and wound healing / J.D. Zieske // *Curr. Opin. Ophthalmol.* — 2001. — Vol. 12. — P. 237–241.
258. Zieske, J.D. Kinetics of keratocyte proliferation in response to epithelial debridement / J.D. Zieske, S.R. Guimarães, A.E. Hutcheon // *Exp. Eye Res.* — 2001. — Vol. 72. — P. 33–39.