

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИКО-СТОМАТОЛОГИЧЕСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ А.И. ЕВДОКИМОВА»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

---

*На правах рукописи*

**Агаммедов Мушвиг Балами оглы**

**СПОСОБ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-СТРОМАЛЬНЫХ  
ДЕФЕКТОВ РОГОВИЦЫ ПРИ ПОМОЩИ БИОДЕГРАДИРУЕМОЙ  
КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ ФИБРОИНА ШЕЛКА  
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

3.3.3. Патологическая физиология

3.1.5. Офтальмология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

С. А. Борзенок

доктор медицинских наук, профессор

Н. А. Гаврилова

Москва – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	7
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	15
1.1. Предпосылки использования биodeградируемых изделий для восстановления роговичной ткани	15
1.2. Основные современные биodeградируемые материалы для восстановления поврежденной поверхности роговицы	19
1.3. Оценка влияния факторов роста на процесс восстановления роговичной ткани	24
1.4. Восстановление нервных волокон при помощи контролируемых систем доставки факторов роста	28
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	32
2.1. Дизайн исследования и общая характеристика материалов и методов	32
2.1.1. Перечень использованного лабораторного оборудования, инструментария, расходного и экспериментального материалов	33
2.2. Оценка влияния глиального нейротрофического фактора на процесс регенерации роговицы	38
2.2.1. Получение культуральной среды с глиальным нейротрофическим фактором	38
2.2.2. Моделирование эпителиальных и эпителиально-стромальных дефектов роговицы	39
2.2.3. Проведение иммуногистохимического исследования роговиц в ходе и по окончании процесса регенерации	40
2.3. Разработка и анализ биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка для доставки глиального нейротрофического фактора в область дефекта роговицы	42
2.3.1. Получение биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка	42

2.3.2.	Сканирующая электронная микроскопия полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка	44
2.3.3.	Сканирующая зондовая нанотомография полученных биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка	45
2.3.4.	Оценка механических свойств полученных биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка	46
2.3.5.	Оценка скорости биodeградации полученных конструкций на основе фиброина шелка	46
2.3.6.	Оценка интенсивности высвобождения глиального нейротрофического фактора из полученных биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка	47
2.4.	Оценка безопасности полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка в ходе культивирования совместно с кератоцитами роговицы человека	49
2.4.1.	Выделение кератоцитов из трупных донорских роговиц	49
2.4.2.	Культивирование кератоцитов стромы роговицы человека с полученными биodeградируемыми конструкциями	50
2.4.3.	Оценка жизнеспособности полученных клеточных культур кератоцитов после культивирования с биodeградируемыми конструкциями, содержащими глиальный нейротрофический фактор	53
2.5.	Оценка эффективности полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка в эксперименте <i>in vitro</i>	53
2.5.1.	Оценка пролиферативной активности клеточных культур кератоцитов при культивировании совместно с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка	54

2.5.2. Иммуноцитохимическое исследование клеточных культур кератоцитов при культивировании совместно с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка	55
2.6. Оценка эффективности применения полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка для доставки глиального нейротрофического фактора в зону дефекта роговицы в эксперименте <i>in vivo</i>	56
2.6.1. Формирование эпителиального дефекта роговиц мышей с последующим применением полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка	57
2.6.2. Иммуногистохимическое исследование роговиц мышей после применения полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка	60
2.7. Статистические методы исследования	61
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ</b>	<b>62</b>
3.1. Результаты изучения влияния глиального нейротрофического фактора на процесс регенерации дефектов роговицы	62
3.1.1. Макроскопическая характеристика моделированных дефектов роговицы в ходе и по окончании процесса регенерации	63
3.1.2. Иммуногистохимическое исследование роговиц в ходе и по окончании процесса регенерации	65
3.2. Результаты разработки и анализа биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка для доставки глиального нейротрофического фактора в область дефекта роговицы	71

3.2.1. Результаты получения биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка	71
3.2.2. Результаты сканирующей электронной микроскопии полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка	72
3.2.3. Результаты сканирующей зондовой нанотомографии полученных биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка	73
3.2.4. Результаты оценки механических свойств полученных биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка	75
3.2.5. Результаты оценки скорости биodeградации полученных конструкций на основе фиброина шелка	76
3.2.6. Результаты оценки интенсивности высвобождения глиального нейротрофического фактора из полученных биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка	78
3.3. Результаты оценки безопасности полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка в ходе культивирования совместно с кератоцитами роговицы человека	79
3.3.1. Результаты выделения и культивирования кератоцитов роговицы человека	80
3.3.2. Культивирование кератоцитов с полученной биodeградируемой конструкцией на основе фиброина шелка, содержащей глиальный нейротрофический фактор	81
3.3.3. Результаты оценки жизнеспособности полученных клеточных культур кератоцитов после совместного культивирования с биodeградируемыми конструкциями, содержащими глиальный нейротрофический фактор	83

3.4. Результаты оценки эффективности полученной биodeградируемой конструкции в эксперименте <i>in vitro</i>	84
3.4.1. Проллиферативная активность клеточных культур кератоцитов при культивировании совместно с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка	85
3.4.2. Результаты иммуноцитохимического исследования пролиферативной активности клеточных культур кератоцитов после культивирования совместно с полученными биodeградируемыми конструкциями	87
3.5. Результаты оценки эффективности применения полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка для доставки глиального нейротрофического фактора в зону дефекта роговицы в эксперименте <i>in vivo</i>	88
3.5.1. Оценка площади эпителиального дефекта роговиц мышей на фоне применения полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка	89
3.5.2. Результаты иммуногистохимического исследования роговиц мышей после применения полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка	92
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	99
<b>ВЫВОДЫ</b>	109
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ</b>	110
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ТЕРМИНОВ</b>	111
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	112

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования и степень её разработанности**

Во всем мире насчитывается около 4,9 миллиона человек с двусторонней роговичной слепотой [Pascolini D. и соавт., 2012]. Для таких пациентов трансплантация трупных донорских роговиц является одним из основных методов лечения [Борзенко С.А., 1988 - 2021]. Однако во всем мире наблюдается значительный дефицит трупных донорских роговиц, что является качественным стимулом к поиску и разработке принципиально новых методов лечения роговичной слепоты [Griffith M. и соавт., 2009; Williams A.M. и соавт., 2018].

В связи с этим одним из наиболее перспективных направлений в создании эквивалента трупной донорской роговицы является разработка биоинженерных конструкций, обладающих подходящими оптическими и биомеханическими свойствами [Wu Z. и соавт., 2018].

В последние годы были предложены многие виды биоинженерных конструкций, базирующихся на основе различных веществ биологического и синтетического происхождения. Одним из наиболее перспективных и широко используемых природных материалов, который демонстрирует высокую способность к восстановлению дефектов роговицы, является фиброин шелка [Gil E.S. и соавт., 2010].

Фиброин шелка представляет собой биополимер природного происхождения, который выделяется из коконов тутового шелкопряда (лат. *Bombyx mori*) [Агапова О.И. и соавт., 2018]. Для культивирования эпителиальных клеток трупных донорских роговиц на данном материале используют 2D пленки, для культивирования эквивалентов стромального слоя – 3D условия [Yokoo S. и соавт., 2014]. Фиброин шелка является прозрачным биоматериалом, обладает высокой прочностью на разрыв, прост в обращении и обработке, не изменяется при стерилизации и не препятствует росту и культивированию клеток [Omenetto F.G. и соавт., 2010; Kundu S.C. и соавт., 2012].

Известно, что пленки из фиброина шелка поддерживают рост клеток переднего и заднего эпителия роговицы [Liu J. и соавт., 2012; Chirila T. и соавт., 2008; Bray L.J. и соавт., 2011]. Проведенные доклинические исследования на кроликах показали способность пленок из фиброина шелка выступать в качестве подходящего носителя эпителиальных клеток для регенерации дефектов роговицы [Higa K. и соавт., 2014].

При этом сообщается, что пролиферация эпителиальных клеток на пленках из фиброина шелка происходит медленнее, чем на амниотических мембранах, что может быть связано с присутствием в амниотических мембранах факторов роста [Koizumi N.J. и соавт., 2000; Tseng S.C. и соавт., 2004]. Однако амниотические мембраны имеют известные недостатки: низкую механическую прочность и слабое светопропускание по сравнению с фиброином шелка, а также амниотические мембраны имеют потенциальную опасность передачи различных инфекций, поскольку являются донорской тканью [Tran S.H. и соавт., 2018].

В последние годы показана возможность фиброина шелка выступать в качестве субстрата для доставки в очаг поражения различных лекарственных препаратов, факторов роста и биоактивных молекул [Sivak W.N. и соавт., 2017; Wani S.U.D. и соавт., 2018; Farokhi M. и соавт., 2018; Tomeh M.A. и соавт., 2019].

Для восстановления эпителиально-стромальных дефектов роговицы необходимо использовать безопасный носитель клеточных популяций, такой как фиброин шелка в сочетании с глиальным нейротрофическим фактором (GDNF), который представляет безусловный интерес в регулировании регенерации роговицы за счет своих биологических эффектов.

В настоящее время в литературе не представлены и не разработаны способы эффективного восстановления эпителиально-стромальных дефектов роговицы при помощи биоинженерных конструкций на основе фиброина шелка в сочетании с глиальным нейротрофическим фактором, что явилось актуальной проблемой, определившей цель данного исследования.



## **Цель настоящего исследования**

Разработать метод восстановления эпителиального и эпителиально-стромального повреждения роговицы путём доставки глиального нейротрофического фактора (GDNF).

## **Задачи исследования**

1. Изучить влияние глиального нейротрофического фактора на процесс регенерации эпителиального и эпителиально-стромального повреждения роговицы в эксперименте на лабораторных животных.
2. Разработать биodeградируемую конструкцию из фиброина шелка для доставки глиального нейротрофического фактора (GDNF) в зону эпителиального и эпителиально-стромального повреждения роговицы.
3. В эксперименте *in vitro* на клеточной культуре кератоцитов оценить безопасность полученной биodeградируемой конструкции.
4. В эксперименте *in vitro* на клеточной культуре кератоцитов оценить эффективность полученной биodeградируемой конструкции.
5. В эксперименте на лабораторных животных доказать эффективность применения полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка для доставки глиального нейротрофического фактора (GDNF) в зону эпителиального и эпителиально-стромального повреждения роговицы.

## **Научная новизна**

1. Впервые в эксперименте на животных показано, что глиальный нейротрофический фактор на различных сроках наблюдения оказывает эффективную стимуляцию эпителизации роговицы с эпителиальным и эпителиально-стромальным повреждением.
2. Впервые получена конструкция на основе биodeградируемого материала из фиброина шелка, содержащая в своем составе глиальный нейротрофический фактор для его доставки в зону дефекта роговицы.

3. Впервые проведена оценка жизнеспособности клеточных культур кератоцитов, выделенных из кадаверных глаз человека, в процессе культивирования совместно с каркасом на основе фиброина шелка, содержащих глиальный нейротрофический фактор.
4. Впервые проведена оценка эффективности полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка в процессе культивирования с клеточными культурами кератоцитов, выделенными из кадаверных роговиц человека.
5. Впервые с участием лабораторных животных проведена оценка эффективности полученных биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка в качестве материала для доставки глиального нейротрофического фактора в зону повреждения роговицы.

### **Практическая значимость**

1. Разработанная в данном исследовании биodeградируемая конструкция на основе фиброина шелка, примененная в качестве материала для доставки глиального нейротрофического фактора, обеспечит эффективную эпителизацию повреждений роговицы.
2. Разработанная биodeградируемая конструкция на основе фиброина шелка в сочетании с глиальным нейротрофическим фактором не оказывает влияния на жизнеспособность и является безопасной для клеточной популяции кератоцитов.
3. Систематизация абсолютных и относительных показаний к применению биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка в сочетании с глиальным нейротрофическим фактором в дальнейшем позволит проводить эффективное восстановление ткани роговицы после эпителиальных и эпителиально-стромальных повреждений различной природы.

### **Методология и методы исследования**

Работа является экспериментальным исследованием. Для решения поставленных задач проведено иммуногистохимическое исследование с целью определения уровней содержания pERK 1/2, pJNK 1/2, Bcl2, Вах, c-Met, MMP9, Ki67, TIMP-1, TGF- $\beta$ , цитокератинов 5 и 18, GAP43 в ткани роговицы;

Сканирующая электронная микроскопия и сканирующая зондовая нанотомография для изучения структуры полученных биodeградируемых конструкций; проведена оценка механических качеств полученных биodeградируемых конструкций, в том числе: оценка предела прочности на растяжение и упругости; скорость биodeградации и интенсивность высвобождения и накопления GDNF из полученных конструкций на основе фиброина шелка изучена в эксперименте *in vitro*; для оценки влияния полученных биodeградируемых конструкций на кератоциты роговицы человека в работе проводился этап клеточного культивирования с использованием трупных донорских роговиц.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Полученная биodeградируемая конструкция на основе фиброина шелка, содержащая в своем составе глиальный нейротрофический фактор, способствует восстановлению роговичного эпителия после эпителиальных и эпителиально-стромальных повреждений роговицы на различных сроках наблюдения, а также не оказывает угнетающего воздействия на клеточные культуры кератоцитов, выделенные из кадаверных глаз человека, что подтверждалось данными, полученными в ходе иммуноцитохимического анализа данных клеточных культур.
2. Предложенный способ восстановления эпителиальных и эпителиально-стромальных повреждений роговицы при помощи биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка и содержащий в своем составе глиальный нейротрофический фактор в концентрации 250 нг/мл и 500 нг/мл в серии экспериментальных исследований на животных стимулировал восстановление роговичного эпителия, а также было показано, что местное применение изолировано глиального нейротрофического фактора также стимулирует реэпителизацию, однако с меньшей скоростью, чем при его применении с опорными конструкциями из фиброина шелка, что подтверждает возможность данных методик применяться в качестве перспективных способов восстановления поврежденной роговичной ткани.

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

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом использованного в работе экспериментального материала, перечнем применённых методов исследования, соответствующих поставленным задачам, а также применением методов статистического анализа.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены в рамках следующих научных и научно-практических конференций: «IV Российского национального конгресса с международным участием «Трансплантация и донорство органов» 7 - 9 октября 2019 г. (Москва); СXXXIV Международной заочной научно-практической конференции «Инновационные подходы в современной науке» 30 января 2023 г. (Москва); LXVIII международной научно-практической конференции «Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования» 03 февраля 2023 г. (Москва).

## **Внедрение в практику**

Результаты данного исследования внедрены в работу головной организации и филиалов ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Результаты данного диссертационного исследования применяются в лекционных курсах для клинических ординаторов и аспирантов на кафедре глазных болезней Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также используются в лекционных курсах для ординаторов, аспирантов и курсантов Института непрерывного профессионального образования ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

### **Личный вклад автора в исследование**

Автор принимал непосредственное участие в организации структуры, постановке цели и задач исследования, анализе отечественных и зарубежных источников литературы, осуществлял сбор материала для исследования, участвовал и самостоятельно проводил экспериментальные исследования. Автором самостоятельно проведена статистическая обработка, анализ и интерпретация данных, полученных в ходе экспериментальных исследований.

### **Публикации**

По теме диссертационного исследования опубликовано 4 научные работы, из них 3 в центральных научных рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Российской Федерации и 1 в издании, включенном в базу данных Scopus.

### **Структура и объем диссертации**

Текст диссертации представлен на 126 страницах, содержит 12 таблиц и 32 рисунка. Работа имеет классическую структуру и состоит из введения, 3 глав: обзора литературы, материалов и методов исследования и результатов проведенного исследования, а также из заключения, выводов, практических рекомендаций, списка используемых сокращений и терминов, списка литературы. Список литературы включает 144 источника, из которых 12 отечественных и 132 из иностранной литературы.

Фундаментальные исследования выполнялось на базе Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем при Федеральном государственном автономном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва) под руководством заведующего Центром, д.м.н., профессора, академика РАЕН Сергея Анатольевича Борзенка.

Экспериментальная работа выполнялась на базе Лаборатории бионанотехнологий при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации под руководством заведующего Лабораторией, д.б.н., профессора Игоря Ивановича Агапова.

Работа с кадаверным материалом проводилась на базе Глазного тканевого банка Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва) под руководством заведующей Глазным тканевым банком, к.м.н. Мадины Хетаговны Хубецовой.

Искренне благодарю моих научных руководителей и научных консультантов: д.м.н., профессора Сергея Анатольевича Борзенка, д.м.н., профессора Наталью Александровну Гаврилову, д.б.н., профессора Игоря Ивановича Агапова и д.б.н. Антона Евгеньевича Ефимова за помощь на всех этапах выполнения работы.

Выражаю искреннюю признательность сотрудникам Глазного тканевого банка и Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургии глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, а также кафедры глазных болезней ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России: к.б.н. Островскому Дмитрию Сергеевичу, к.м.н. Керимову Тимуру Захировичу, к.м.н. Тищенко Ольге Евгеньевне, Комовой Ольге Евгеньевне, Желтоножке Александре Александровне за неоценимый вклад в данную работу.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Предпосылки использования биodeградируемых изделий для восстановления роговичной ткани

В настоящее время во всем мире насчитывается от 4,9 до 10 миллионов людей с роговичной слепотой [94]. Слепота по причине поражения роговицы не только оказывает значительное снижение качества жизни пациента, но и приводит к существенным экономическим потерям, как со стороны пациента, так и со стороны общества и государства [70]. Так, по данным Frick K.D. и соавт.,(2007 г.) ежегодные государственные экономические затраты на медицинское обслуживание и поддержку слепых в США составляют более 5 миллиардов долларов [48].

Крайне важным аспектом оказывается социальное и эмоциональное состояние пациента с роговичной слепотой. Так, возникновение депрессии у данных пациентов отмечается в 2 раза чаще по сравнению с частотой встречаемости в популяции. Помимо данного эффекта у пациентов с роговичной слепотой отмечается снижение уровня социального функционирования и ощущения общего благополучия, а также присутствует нарушение социальных отношений [124]. В ходе исследования, проведенного группой ученых во главе с Taylor H.R., было установлено, что потеря зрения - это инвалидность, которой больше всего боятся люди в современном обществе [122].

В развивающихся странах основной причиной роговичной слепоты являются кератиты, возникшие после поражения роговицы вирусом простого герпеса 1 типа [63]. Для регионов со слабо развитой инфраструктурой общественного здравоохранения наиболее характерна роговичная слепота, вызванная осложнениями трахомы [123; 135]. Около 1,3 миллиона случаев слепоты во всем мире вызваны данным инфекционным агентом [59]. Также для регионов с низким социально-экономическим уровнем населения наиболее характерна роговичная слепота вследствие бактериальных и грибковых инфекций [29]. Ксерофтальмия,

развивающаяся по причине дефицита витамина А, также является частой причиной возникновения роговичной слепоты у детей [108].

Среди дистрофических заболеваний роговицы, приводящих к роговичной слепоте, наиболее часто встречается кератоконус, который характеризуется прогрессирующим выпячиванием и истончением роговицы, что приводит к нерегулярному астигматизму и нарушению зрительной функции [127]. При этом распространенность кератоконуса по данным проведенного мета-анализа составляет 1,38 на 1000 человек и в значительной мере зависит от региона и исследуемой популяции [55].

На травмы роговицы ежегодно приходится до 2 миллионов новых случаев односторонней роговичной слепоты. Травма роговицы часто описывается, как ведущая причина односторонней роговичной слепоты в развивающихся странах [52]. Стоит отметить, что травма роговицы может сказаться на всех гистологических слоях данной ткани. Так, при локальном непроникающем ранении и вовлечении только переднего эпителия клеточная популяция роговичного эпителия восстанавливается в течение 24 - 48 часов [21]. Гораздо сложнее протекают поражения роговицы, вызванные термическими и химическими ожогами, при которых может развиваться состояние, называемое синдромом лимбальной недостаточности [10]. Данное состояние характеризуется гибелью лимбальных эпителиальных стволовых клеток, что вызывает нарушение реэпителизации роговицы, ее неоваскуляризацию и замещение роговичного эпителия тканью конъюнктивального происхождения [20; 111].

Разнообразие воздействующих на роговицу факторов обуславливает наличие множества консервативных терапевтических подходов. Однако в случаях, когда профилактические либо лечебные мероприятия оказались недостаточно эффективными прибегают к хирургическим методикам. Наибольшее распространение среди последних получила сквозная кератопластика.

На сегодня сквозная кератопластика (трансплантация роговицы) является одной из наиболее часто выполняемых аллогенных трансплантаций в развитых



странах [49]. С момента первой успешной пересадки роговицы, которую произвел в 1905 году Эдуард Зирм, техника проведения данного хирургического вмешательства не переставала обновляться и совершенствоваться [18]. В результате накопленного опыта удалось достичь 93% вероятности приживления трансплантата при лечении кератоконуса на протяжении трех лет после трансплантации и 77% вероятности приживления трансплантата при лечении герпетических кератитов на таком же сроке наблюдения [22].

В связи с этим трансплантация роговицы представляется как наиболее успешный вид трансплантации тканей человека [117]. Это объясняется исключительными анатомическими и физиологическими особенностями данной ткани. Так, роговица представляет собой гистологический комплекс, состоящий из пяти основных слоев: переднего эпителия, Боуменовой мембраны, стромы, Десцеметовой мембраны, заднего эпителия. Сила преломления роговицы 40 – 44 D, что составляет около 70% от всей физической рефракции глаза. Показатель преломления роговицы 1,376. Толщина роговицы в центральной зоне лежит в диапазоне от 551 до 565 мкм, в то время как толщина данной ткани на периферии обычно больше и составляет от 612 до 640 мкм [46].

Также роговица является одной из наиболее иннервируемых тканей в организме: считается, что роговица в 300 раз более чувствительна к раздражителям, чем кожа [142]. Чувствительная иннервация роговицы обеспечивается первой ветвью тройничного нерва (n. ophthalmicus). Известно, что трофическая иннервация роговицы обусловлена трофическими нервами, входящими в состав тройничного и лицевого нерва.

Высокая плотность нервных окончаний выполняет как защитную функцию, так и помогает поддерживать целостность глазной поверхности, при этом чувствительность роговицы и плотность нервных волокон являются важными критериями восстановления роговицы после различных хирургических вмешательств [8; 9; 16; 96].

Востребованность трансплантации роговицы неизбежно сталкивается с многими ограничениями, важнейшим из которых является дефицит необходимого трупного донорского материала – кадаверных роговиц человека [4; 5]. На сегодня во всем мире наблюдается острая нехватка донорских роговиц для трансплантации, при этом количество пациентов, нуждающихся в трансплантации, значительно превышает количество доступных трупных донорских роговиц [133].

Дефицит донорского материала также вызван необходимостью проведения инфекционного контроля доноров, поскольку кадаверная роговица может представлять потенциальную опасность передачи таких инфекций, как: вирус иммунодефицита человека, вирус гепатита В, вирус гепатита С, а также сифилис, прионы и латентной инфекции, вызванной различными типами герпесвирусов человека [6].

В послеоперационном периоде с трансплантатом роговицы также могут быть связаны некоторые патологические реакции. Одним из часто встречающихся состояний является нарушение реэпителизации трансплантата, которое диагностируют, если после стандартной пересадки роговицы эпителий роговицы не восстанавливается в течение 14 дней [104]. При неблагоприятном исходе, либо при отсутствующем лечении у таких пациентов возможно присоединение вторичной инфекции, изъязвление роговицы и прорастание в нее новообразованных сосудов, что вызывает снижение послеоперационной остроты зрения [130]. На основании проведенных исследований было показано, что эпителиальные дефекты возникали чаще у пациентов с трансплантацией роговицы по поводу герпесвирусных инфекций [53; 104].

Для восстановления патологически измененной ткани роговицы, а также с целью снижения потребности в трупных донорских роговицах было предложено использовать биodeградируемые изделия на основе различных материалов природного и синтетического происхождения [1; 2; 3; 51].

## **1.2. Основные современные биodeградируемые материалы для восстановления поврежденной поверхности роговицы**

Общемировая проблема дефицита трупных донорских роговиц, подходящих для трансплантации, обуславливает появление различных биodeградируемых материалов природного и синтетического происхождения, максимально приближенных по структуре к роговичной ткани.

Материалы, используемые для восстановления ткани роговицы, должны повторять структурные и функциональные особенности данной ткани. Так, принципиальное значение имеет механическая прочность, способность выступать в качестве каркаса для клеток и клеточных слоев, а также поддерживать прозрачность и биodeградируемость.

В последние годы широкую распространенность получили изделия на основе коллагена. Известно, что коллаген I типа является ключевым компонентом сухожилий, связок, дермы и представляет собой основной компонент внеклеточного матрикса [13; 101]. К безусловным преимуществам коллагена относится наличие RGD-последовательностей (трипептид аргинин-глицин-аспартат) в первичной структуре, благодаря чему возможна адгезия клеток к данному материалу [64]. К основным недостаткам коллагена относят относительно низкую механическую прочность и эластичность [73; 100]. Для улучшения прочностных характеристик при сохранении биологических качеств применяют кросслинкинг коллагена [45]. Известно, что коллагеновый гель после кросслинкинга может быть получен в форме мембраны, подходящей в качестве субстрата для роста клеточных культур и конструирования искусственного биоинженерного аналога роговицы [62; 80; 88].

Однако сохраняется сложность в обращении с коллагеновыми мембранами, в связи с чем были предложены разновидности алифатических полимеров, содержащих полимолочную кислоту (PLGA) для создания сэндвич-подобных структур [99]. К сожалению, данные полимеры не обладали достаточной

светопроводящей способностью, что ограничивает их применение в вопросе восстановления светопроводящей функции роговицы [65].

Продуктом гидролиза коллагена является желатин – широко распространенный материал природного происхождения. Применение желатина для восстановления повреждений роговицы в основном связано с конструированием мембран посредством кросслинкинга, как правило, при помощи химических методик. По сравнению с коллагеном желатин более прозрачен и обладает большей упругостью [107]. Также к преимуществам желатина по сравнению с коллагеном можно отнести более высокую цитосовместимость, устойчивость к изменению температуры и более низкую стоимость [132].

Мембраны из желатина в настоящее время широко применяются в качестве аналогов амниотических мембран, применяемых при синдроме лимбальной недостаточности. Так, было показано, что возможно использование желатина с хитозаном в качестве носителя эпителиальных лимбальных стволовых клеток. В ходе данной работы было установлено, что соотношение хитозана и желатина (20:80) позволяло сохранить нативный фенотип лимбальных эпителиальных стволовых клеток, по сравнению с аналогичной клеточной культурой, культивированной на пластике [58].

В исследовании Chen Z. и соавт. (2018) было показано, что желатин по сравнению с коллагеном обеспечивает большую прозрачность при использовании в качестве материала для восстановления роговицы [36]. В связи с этим желатиновые мембраны больше подходят для восстановления роговицы, чем коллагеновые, однако имеют желтый оттенок, что некоторыми авторами описывается как возможность данного материала обеспечивать дополнительную защиту клеток сетчатки от воздействия света ультрафиолетового спектра [121].

К недостаткам желатина относят более быструю биоразлагаемость (биodeградируемость), чем у коллагена, что связано с утратой поперечных связей в структуре желатина [78].

В последние годы активно изучаются различные комбинации природных биоматериалов. Так, для лечения повреждений эпителия роговицы и ускорения регенерации были предложены сочетания природных биоматериалов, таких как коллаген с хитозаном, желатином и гиалуронатом натрия [35; 81].

Хитозан, также как желатин, является широко распространённым полимером природного происхождения, однако синтез хитозана происходит путем деацетилирования хитина. Данный материал в основном применяется в качестве носителя клеточных культур для восстановления поверхностных слоев роговицы, в том числе эпителиальных клеток роговицы и в настоящее время в части работ описан как заменитель амниотической мембраны. Так, в эксперименте было показано, что эпителиальные клетки роговицы крупного рогатого скота, культивированные на мембране из хитозана, прикреплялись и пролиферировали быстрее, чем такие же клетки на амниотической мембране. При этом в обеих клеточных культурах использованные мембраны не вызывали фенотипической трансформации данных клеток [139].

Комбинация хитозана с коллагеном в качестве потенциального субстрата для эпителиальных клеток роговицы крупного рогатого скота способствовала оптической прозрачности и механической прочности производимых коллагеновых мембран [75].

Однако чистый хитозан редко используется в качестве материала для регенерации роговицы. Так, часто исследователями используется гидроксипропилхитозан, обладающий лучшей растворимостью по сравнению с хитозаном. В проведенных работах сообщается, что мембраны из гидроксипропилхитозана, желатина и хондроитин сульфата стимулируют рост эпителиальных клеток роговицы крупного рогатого скота и восстанавливают роговичный эпителий в эксперименте *in vitro* [50; 76]. В экспериментах на животных (кролики) была также подтверждена способность хитозана стимулировать пролиферацию и миграцию клеток эпителия роговицы в процессе заживления непроникающих повреждений роговицы [41].

Одним из наиболее приближенных к физическим свойствам роговицы материалом является фиброин шелка. Данный белок является структурным компонентом нитей тутового шелкопряда (лат. *Bombyx mori*) и имеет ряд преимуществ, к которым относят отсутствие иммунной реакции на данный материал, подконтрольную скорость разложения, и физические свойства, приближенные к роговице человека.

Значительным преимуществом фиброина шелка перед другими биodeградируемыми материалами является его прозрачность, которая в вопросе восстановления роговицы является одним из ключевых факторов.

Мембраны фиброина шелка изучались в качестве субстратов для эпителиальных клеток роговицы. В результате проведенных исследований было установлено, что прозрачная и проницаемая мембрана из фиброина шелка, полученная методом испарения либо электроспиннинга, способна стимулировать формирование единого пласта многослойного эпителия и рост клеток лимбального эпителия роговицы человека аналогично росту клеток на амниотической мембране, однако без риска передачи инфекции [25; 37].

Считается, что в реконструктивной хирургии роговицы фиброин шелка является базовым и наиболее предпочтительным материалом для восстановления поврежденных слоев и позволяет переносить культивированные *ex vivo* клеточные пласты на поврежденный участок на созданных мембранах [71].

В результате оценки свойств биосовместимости на грызунах и крупных млекопитающих, проведенных различными группами исследователей, было показано, что тонкие мембраны, сетки, гидрогели, наночастицы и жидкие растворы на основе фиброина шелка не вызывают побочных реакций, тем самым подтверждая, что фиброин шелка является биосовместимым полимером [14; 60; 83; 86; 128]. Также было показано, что результаты данных исследований справедливы и в организме человека, однако уточняется, что биоразлагаемость фиброина шелка зависит от условий обработки и заготовки данного материала, а также от места имплантации [56; 125].

К преимуществам биоразлагаемых конструкций на основе фиброина шелка относят также возможность автоклавирования данного материала [19; 84; 105].

На сегодня наиболее часто используемым материалом для реконструкции эпителия роговицы является амниотическая мембрана из-за её способности подавлять воспаление, рубцевание тканей и ангиогенез. Однако восстановление повреждений роговицы при помощи амниотической мембраны сопряжено с некоторыми рисками. Так, по сравнению с мембранами на основе фиброина шелка, амниотическая мембрана имеет более низкую механическую прочность, что создает определенные трудности в обращении с данным материалом. При этом амниотическая мембрана полупрозрачна, что ограничивает возможности её применения в реконструкции роговицы. Также, поскольку амниотическая мембрана является донорским материалом, возможна передача инфекций, таких как ВИЧ, вирусы гепатита В и С, а также сифилиса [79; 112; 129]. В связи с этим применение биоразлагаемых конструкций на основе фиброина шелка, не имеющих вышеуказанных недостатков, представляется различными исследователями как перспективное направление в реконструктивной хирургии роговицы.

Одним из центральных разделов в изучении свойств фиброина шелка является определение роли белка серицина, покрывающего шелковую нить. Серицин составляет от 25 до 30% веса кокона тутового шелкопряда и представляет собой клееобразную субстанцию белкового происхождения, покрывающую кокон. Оставшиеся 70 – 75% представлены собственно фиброином шелка.

Считается, что серицин может инициировать возникновение у человека аллергической реакции 1-го типа [38; 42; 143]. Однако последние исследования гидрогелей на основе серицина продемонстрировали низкий аллергенный и иммуногенный уровень *in vivo*, сопоставимый с аналогичным уровнем для фиброина шелка [61]. В экспериментах на immortalized клеточных культурах роговицы и на животных показана возможность очищенной фракции серицина ускорять пролиферацию эпителиальных клеток роговицы [92].

В настоящее время обсуждается роль децеллюляризованной роговицы в качестве материала для восстановления роговицы [47; 97]. К основным преимуществам данного материала относят сходные с трупной донорской роговицей механические и оптические свойства, а также низкую иммуногенность [136; 138]. Основными недостатками данного метода являются необходимость в получении фрагмента роговичной ткани для децеллюляризации и сложности в освобождении данного образца от химически активных веществ, которые используют в ходе децеллюляризации, таких как лаурилсульфат натрия (SDS), поскольку они способны оказывать цитотоксическое действие на клеточные культуры [40; 77; 134].

### **1.3. Оценка влияния факторов роста на процесс восстановления роговичной ткани**

Факторы роста представляют собой вещества белковой природы, регулирующие процесс заживления роговичных повреждений, и способные стимулировать миграцию, митоз и дифференцировку клеточных культур *in vitro* [66; 89; 113].

Поскольку роговица человека является наиболее иннервированной тканью организма, в последние годы наблюдается высокий интерес к разработке подходов к восстановлению нервных волокон роговицы, поврежденных в ходе различных заболеваний, травм и операций [91].

Сообщается, что повреждение нервных волокон роговицы неизбежно приводит к активации патофизиологических механизмов, что вызывает нарушение нормального восстановления эпителия и заживления роговичной ткани [23; 82]. Среди известных патологических состояний, повреждающих нервную сеть роговицы и замедляющих процессы регенерации роговицы, наиболее распространены герпесвирусные и нейротрофические кератиты, а также синдром сухого глаза и диабет [109].



Высокая плотность нервных окончаний, лишенных миелиновой оболочки при отсутствии сосудов и прозрачности, характеризует роговицу как ткань с уникальными свойствами и позволяет применять роговицу в качестве модели для исследований в области регенеративной медицины. Так, проходящие в роговице процессы могут быть охарактеризованы как функционально, так и морфологически. Также роговица представляет собой полезную модель для оценки процессов нейрорегенерации и новых нейрорегенеративных терапевтических подходов [110].

Афферентные нейроны роговицы представлены полимодальными рецепторами, которые реагируют на механические, термические и химические раздражители, а также механорецепторами, активируемыми механическим воздействием, и холодовыми рецепторами [91]. Чувствительные нервные окончания роговицы реагируют на повреждение её поверхности, вызывая симптомы боли и раздражения, а также защитные рефлексы, такие как моргание и слезотечение [110].

На клеточном уровне нервные окончания роговицы за счет высвобождения нейромедиаторов и факторов роста обеспечивают трофическую поддержку роговицы, поддерживают анатомическую целостность и стимулируют заживление повреждений роговицы [87; 91; 114].

Согласно современным представлениям считается, что роговичные нервы экспрессируют несколько нейромедиаторов, к которым относятся ацетилхолин, холецистокенин, норадреналин, серотонин, нейропептид Y, мозговой натрийуретический пептид, вазопрессин и т.д. для поддержания нормальной жизнедеятельности, трофической функции и для регенерации эпителия роговицы [114]. В свою очередь эпителий роговицы производит и высвобождает нейротрофические факторы для поддержания трофической функции, регенерации и дифференцировки нервных волокон: фактор роста нервов (NGF), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), цилиарный нейротрофический

фактор (CNTF), эпидермальный фактор роста (EGF) и нейротрофический фактор глиальных клеток (GDNF) [68; 87;131].

В последнее десятилетие была показана клиническая эффективность применения факторов роста в процессе регенерации роговицы. Так, местная терапия повреждений роговицы при помощи глазных капель на основе фактора роста нервов, показана как эффективная методика восстановления функции поврежденных нервных волокон. В процессе изучения влияния инстилляций фактора роста нервов на примере 14 глаз (12 пациентов) с тяжелыми нейротрофическими язвами роговицы было показано, что заживление роговицы начиналось на 2 – 14 день от начала лечения, при этом у всех пациентов произошло полное заживление язв роговицы через 10 дней – 6 недель лечения. По мнению авторов данного исследования, местное применение фактора роста нервов является эффективным методом лечения пациентов с тяжелыми поражениями нервных волокон роговицы [69].

Клинические испытания глазных капель Ценегермин, содержащих фактор роста нервов, показали высокую эффективность и безопасность данного терапевтического препарата в лечении нейротрофического кератита. Начиная с 2017 года глазные капли Ценегермин, содержащие фактор роста нервов, разрешены к использованию Европейским союзом, а с 2018 года – одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов в США для клинического использования [115].

Также в настоящее время проводятся экспериментальные исследования на животных по применению факторов роста в качестве терапевтического средства для лечения синдрома сухого глаза. Сообщается, что местные инстилляции эпидермального фактора роста мышам с синдромом сухого глаза, вызванным бензалкония хлоридом, приводят к восстановлению слезной пленки и сохранению целостности эпителия. Авторы исследования сообщают, что глазные капли на основе эпидермального фактора роста могут рассматриваться в качестве

потенциально эффективного средства для лечения клинически значимых проявлений синдрома сухого глаза [137].

Изучается роль глиального нейротрофического фактора (GDNF) в процессе регенерации нервных волокон роговицы. Для этого при помощи ИФА оценивалось количество NGF и GDNF в неповрежденном эпителии роговицы мышей, после чего полученные значения сравнивались с уровнем экспрессии данных факторов роста в эпителии в процессе его заживления. Так, количество NGF и GDNF в неповрежденном эпителии роговицы составило  $27,1 \pm 2,8$  пг/мг и  $53,4 \pm 3,1$  пг/мг, соответственно, в то время как в регенерирующем эпителии роговицы (на 2-е сутки после скарификации эпителия) количество NGF и GDNF было достоверно больше и составило  $50,4 \pm 3,3$  пг/мг и  $76,9 \pm 11,2$  пг/мг, соответственно. По окончании регенерации (на 7-е сутки после скарификации эпителия) количество данных факторов роста возвращалось на исходный уровень. Также субконъюнктивальное введение нейтрализующих NGF и GDNF антител здоровым мышам приводило к замедлению процесса регенерации скарифицированного роговичного эпителия. Введение рекомбинантных NGF и GDNF субконъюнктивально стимулировало процесс регенерации скарифицированного роговичного эпителия и способствовало более быстрому прорастанию нервных волокон. По мнению авторов исследования, NGF и GDNF ускоряют восстановление эпителия и нервных волокон в роговичной ткани после повреждения [43].

В эксперименте на обезьянах была показана способность GDNF стимулировать рост и восстановление нервных волокон в поврежденной роговице животного. Авторы исследования пришли к выводу о возможности глиального нейротрофического фактора стимулировать рост нервных волокон даже в сочетании с экспериментальным препаратом [93]. Также имеются данные о способности GDNF стимулировать миграцию роговичного эпителия в очаг повреждения [140]. Изучение функциональной роли нейротрофических факторов показало способность рекомбинантного NGF и GDNF активно стимулировать пролиферацию эпителиальных клеток роговицы [141].

Восстановление роговицы – сложный и длительный процесс, в котором участвуют различные типы клеток и биохимических веществ. Анализ процессов, происходящих в регенерирующем роговичном эпителии и строме, показывает значимость нервных волокон в этом процессе. Высвобождение большого числа факторов роста способствует восстановлению нервной сети роговицы и ускоряет процессы реэпителизации, что в конечном итоге приводит к более быстрому заживлению эпителиального и эпителиально-стромального повреждения [43].

#### **1.4. Восстановление нервных волокон при помощи контролируемых систем доставки факторов роста**

На современном этапе развития медицины перед учеными возникла необходимость разработки особых систем доставки лекарственных средств, которые бы обладали высокой терапевтической активностью и могли бы применяться в области регенеративной медицины [103].

Одним из наиболее перспективных биоразлагаемых материалов на сегодня считается фиброин шелка: скаффолды (биodeградируемые конструкции) на основе данного вещества природного происхождения способствуют миграции, пролиферации, дифференцировке клеток, что приводит к регенерации поврежденного органа или ткани [12; 119].

В ходе недавних исследований было показано, что добавление факторов роста к биоразлагаемым конструкциям на основе фиброина шелка способствовало восстановлению нервной проводимости и росту нервных волокон, что связывают со способностью фиброина шелка выступать в роли непрерывного и контролируемого источника факторов роста в результате пролонгированной биodeградации [57].

Также добавление факторов роста к носителям из фиброина шелка обладает и другими преимуществами, среди которых направленное управление регенерацией, создание оптимальных условий среды для восстановления нервных волокон и

защита встроенных факторов роста от воздействия ферментативной системы организма-хозяина [57; 74].

Покрытие биоматериалов факторами роста, способствующими восстановлению трофической функции нервных волокон и их регенерации, является широко применяемой стратегией при восстановлении нервной ткани [27].

В настоящее время исследуется возможность применения комбинации глиального нейротрофического фактора (GDNF) с носителями из фиброина шелка для восстановления поврежденных нейронов [118]. Так, добавление глиального нейротрофического фактора роста к многопросветным каналам оказывало стимулирующее влияние на прораствание аксонов на расстояние до 4 см, а также вызывало реиннервацию при повреждении периферического нерва и, как следствие, частичное восстановление функции по сравнению с каналами без глиального нейротрофического фактора роста [17].

В работе Uebersax L. и соавт. (2007) оценивалась возможность фиброина шелка, содержащего фактор роста нервов, выступать в качестве субстрата для восстановления нервного волокна. Полученные на основе фиброина шелка нервные каналы с загруженным NGF заготавливали из водных растворов фиброина шелка и NGF, соответственно, с последующей сушкой при различных условиях. В результате проведенного исследования было показано, что мембраны из фиброина шелка стимулировали адгезию и метаболическую активность клеточной линии PC12 и, в сочетании с фактором роста нервов (NGF), вызывали рост аксонов во время дифференцировки клеточной линии PC12. При этом различные условия обработки в процессе заготовки нервных каналов, содержащих NGF, не изменяли биологическую активность фактора роста нервов. По мнению авторов исследования, высвобождение активного NGF на протяжении 4 недель из пленок, заготовленных по различным протоколам, показало возможность использования биоразлагаемых материалов на основе фиброина шелка с включенным в состав

фактором роста нервов для восстановления дефектов периферических нервов [126].

Показана возможность сочетания различных факторов роста при использовании в биоинженерных конструкциях [102]. Так, в работе Madduri S. и соавт. (2010 г.) было показано, что искусственные нервные каналы на основе коллагена, содержащие глиальный нейротрофический фактор, способствовали удлинению аксонов, в то время как аналогичные нервные каналы, содержащие глиальный нейротрофический фактор и фактор роста нервов, стимулировали более активное удлинение аксонов и значительное ветвление нервных волокон. Проведенное исследование *in vivo* показали значительное улучшение отрастания аксонов в нервном дефекте 10 мм при использовании комбинации 40 нг GDNF и 40 нг NGF по сравнению с применением 80 нг отдельно GDNF [85]. Для усиления действия сочетания GDNF и NGF были предложены также биоинженерные конструкции на основе фибрина шелка, которые демонстрировали аналогичную способность к восстановлению повреждённых периферических нервных волокон [30].

Изучение влияния различных факторов роста на заживление повреждений роговицы способствует разработке новых подходов к лечению данных состояний [90]. В работе Omoto M. и соавт. (2017 г.) исследовалось влияние местного применения фактора роста гепатоцитов (HGF) на модель повреждения эпителиальных клеток роговицы мыши в эксперименте *in vivo*. По результатам проведенного исследования было установлено, что местное применение HGF способствует пролиферации эпителиальных клеток роговицы, о чем свидетельствовала более высокая экспрессия маркеров пролиферации Ki-67 и p63 у мышей, которым назначали местное применение фактора роста гепатоцитов. По мнению авторов работы, результаты экспериментального исследования *in vivo*, полученные на хорошо известной модели стерильного повреждения роговицы мыши, демонстрируют, что местное введение HGF подавляет воспаление глаза и значительно ускоряет восстановление эпителия роговицы [95].

Достижением последних лет является описание возможности применения фиброина шелка в качестве покровного материала для липосом, содержащих различные фармакологические препараты. Так, в исследовании Dong Y. и соавт. (2015 г.) впервые было предложено покрывать липосомы фиброином шелка для доставки ибупрофена в роговицу с контролируемым временем высвобождения данного препарата [44]. По мнению авторов исследования, фиброин шелка позволяет пролонгировать высвобождение различных биохимических веществ в очаг поражения роговицы по сравнению с классическими капельными формами, в том числе за счет высокой проникающей способности при отсутствии явлений цитотоксичности.

Таким образом, на сегодня показана возможность биodeградируемых материалов выступать в качестве носителей различных факторов роста и фармакологических препаратов. При этом уже описана роль факторов роста, содержащихся в амниотических мембранах, в процессе регенерации повреждений роговицы. В связи с вышеизложенным, успешно прошли клинические испытания и внедрены в клиническую практику глазные капли, основным компонентом которых является фактор роста нервов. Доказанная клиническая эффективность факторов роста в процессе заживления роговицы и известный механизм действия данных веществ представляют возможность для разработки новых способов доставки. Была показана способность фиброина шелка выступать в качестве подходящего биоразлагаемого материала для восстановления эпителиальных и эпителиально-стромальных повреждений роговицы. На сегодня показана возможность введения в состав биоразлагаемых конструкций на основе фиброина шелка факторов роста: в экспериментах была показана высокая терапевтическая эффективность подобных конструкций. Однако в литературе не описаны биоразлагаемые конструкции на основе фиброина шелка, содержащие глиальный нейротрофический фактор роста (GDNF), для контролируемой регенерации эпителиальных и эпителиально-стромальных повреждений роговицы, что представляет собой несомненный интерес для фундаментальной офтальмологии.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Дизайн исследования и общая характеристика материалов и методов

Данная работа заключалась в проведении серии экспериментальных исследований, соответствующих поставленным задачам.

На первом этапе работы изучалось влияние глиального нейротрофического фактора на процесс регенерации эпителиального и эпителиально-стромального повреждения роговицы в эксперименте на лабораторных животных.

На втором этапе исследования проводилась разработка и изучение характеристик полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка для доставки глиального нейротрофического фактора (GDNF) в зону эпителиального и эпителиально-стромального повреждения роговицы.

На третьем этапе работы в эксперименте *in vitro* на клеточной культуре кератоцитов проводилась оценка безопасности полученной биodeградируемой конструкции для клеточной популяции.

На четвертом этапе исследования в эксперименте *in vitro* на клеточной культуре кератоцитов изучалась эффективность полученной биodeградируемой конструкции. Экспериментальные исследования на тканях, выделенных из трупных человеческих глаз, проводились в соответствии с официально принятыми процедурами и специальным разрешением в рамках законодательства Российской Федерации.

На пятом, заключительном, этапе работы в эксперименте на лабораторных животных изучалась эффективность применения полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка для доставки глиального нейротрофического фактора (GDNF) в зону эпителиального и эпителиально-стромального повреждения роговицы, проводилось сопоставление данного способа доставки с инстилляциями GDNF в очаг повреждения.



### 2.1.1. Перечень использованного лабораторного оборудования, инструментария, расходного и экспериментального материалов

При проведении данного исследования применялось лабораторное оборудование, представленное в таблице 1; питательные среды и реактивы, представленные в таблице 2; лабораторная посуда, представленная в таблице 3; хирургический инструментарий, представленный в таблице 4; экспериментальный материал биологического происхождения, представленный в таблице 5.

Таблица 1 – Перечень лабораторного оборудования

Наименование	Фирма-производитель
Инвертированный световой фазово-контрастный микроскоп IX-81 с интегрированной цифровой фотокамерой XC-10	Olympus Corporation, Япония
Ламинарный бокс II класса безопасности MSC-Advantage	Termo Fisher Scientific, США
Фотощелевая лампа BX 900	Haag-Streit IM, Швейцария
Флуоресцентный микроскоп Olympus CX-4	Olympus Corporation, Япония
Лазерно-сканирующий инвертированный конфокальный микроскоп FluoView FV10i	Olympus Corporation, Япония
Спектрофотометр Genesis 10 UV	Spectronic Unicam, США
Сушилка K850	Quorum Technologies Ltd., Великобритания
Сушилка FD8580	IlShinBioBase Co. Ltd., Республика Корея
Установка магнетронного распыления материалов Quorum Q150R ES	Quorum Technologies, Великобритания
Сканирующий электронный микроскоп Tescan Vega 3	Tescan, Чехия
Сканирующий зондовый микроскоп с интегрированным ультрамикротомом Leica EM UC6NT	Leica Microsystems GmbH, Австрия
Алмазный нож Ultra AFM 35	Diatome, Швейцария
продолжение таблицы на странице 34	

продолжение таблицы № 1	
Поликремниевый кантилевер HA_HR	Tipsnano OÜ, Эстония
Машина для испытания конструкционных материалов И11М	КБ «Точприбор», Россия
Аспиратор	Biosan, Латвия
Термошейкер TS-100	Biosan, Латвия
Счетчик клеток Luna II	Logos Biosystems, Корея
Проточный цитофлуориметр CytoFLEX	Beckman Coulter Life Sciences, США
Бур алмазный Algerbrush II	Alger Equipment Co., США

Таблица 2 – Перечень питательных сред и реактивов

Наименование	Фирма-производитель
Клеточная линия Нек 293, полученная из эмбриональных почек человека	ФГБУ "НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова" Минздрава России, Россия
ExGen 500	Fermentas, США
Желатин	Merck & Co., Inc., США
Рекомбинантный глиальный нейротрофический фактор (GDNF)	Cloud-Clone Corp., USA
Кетамин	Московский эндокринный завод, Россия
Ксилазин	Interchemie Werken «de Adelaar» BV, Нидерланды
Коллагеназа II типа	Thermo fisher scientific, США
Офлоксацин	Синтез, Россия
Флуоресцеин	Sigma-Aldrich, США
Сыворотка животного происхождения	Jackson ImmunoResearch, США
Triton X-100	Sigma-Aldrich, США
Нити шелка	Моснитки, Россия
Раствор Версена	ПанЭко, Россия
Раствор Трипсин-Версена	ПанЭко, Россия
продолжение таблицы на странице 35	

продолжение таблицы № 2	
Аннексин V	Abcam, Великобритания
7AAD	
Кроличьи антитела GFRa1 к рецептору GDNF	
Кроличьи антитела к анти-апоптозному фактору Bcl2	
Кроличьи антитела к Вах	
Кроличьи антитела к ламинину	
Кроличьи антитела к $\alpha\beta 4$ -интегрину	
Мышиные антитела к металлопротеиназе MMP9	
Мышиные антитела к цитокератинам 5 и 18 типов	
Мышиные антитела к ERK1/2	Santa Cruz, США
Мышиные антитела к JNK1/2	
Мышиные антитела к фосфо-ERK1/2	
Мышиные антитела к фосфо-JNK1/2	
Антитела козы к TGF- $\beta$	
Антитела козы к TIMP1	
Антитела козы к c-Met	
Куриные антитела к Gap43	Acris Antibodies, Германия
Кроличьи антитела к Ki67	Novocastra, Великобритания
Набор реактивов GDNF Human ELISA Kit	Abcam, Великобритания
Фетальная бычья сыворотка	Thermo fisher scientific, США
Раствор GlutaMax	
Раствор антибиотиков-антимикотиков	
Краситель «Live and Dead»	Abcam, Великобритания
продолжение таблицы на странице 36	

продолжение таблицы № 2	
Раствор Cell Wash	BD, США
Фосфатно-солевой буфер	ПанЭко Россия
Флуоресцентный краситель Cy2	Jackson Immunoresearch, США
Флуоресцентный краситель Texas red	

Таблица 3 – Перечень использованной лабораторной посуды

Наименование	Фирма-производитель
Флакон культуральный 25 см <sup>2</sup> , стерильный	Corning Inc., США
Чашка Петри 100 мм	
Среда DMEM	Панэко, Россия
DMEM/F12	Sigma-Aldrich, США
Чашки Петри 35 мм	SPL, Корея
Пробирки центрифужные	
Пробирки типа Эппендорф	GenFollower, Китай

Таблица 4 – Перечень использованного хирургического инструментария

Наименование	Фирма-производитель
Трепан 1,5 мм	Surgistar Inc., США
Трепан 3 мм	
Трепан 16 мм	
Скальпель хирургический	Troge Medical GmbH, Германия
Подставка-держатель для глазного яблока	ООО ЭТП «МГ», Россия
Скарификационный нож	ООО «Титан серджикл», Россия
Пинцет анатомический	
Пинцет роговичный склеральный типа колибри по Жирарду	
Пинцет роговичный типа колибри по Трoutману-Барракеру	
Ножницы роговичные по Кастровьехо, правые, левые	

Таблица 5 – Перечень использованного экспериментального материала биологического происхождения

Наименование	Количество
Самцы мышей линии C57BL/6	82
Роговицы мышей линии C57BL/6	82
Биодеградируемые конструкции (пленки) на основе фиброина шелка	64
Трупные донорские роговицы глазного тканевого банка с морфо-функциональной характеристикой по С.А. Борзенку 1В	12
Трупные донорские роговицы глазного тканевого банка с морфо-функциональной характеристикой по С.А. Борзенку 1С	8

Характеристика использованного в данной работе трупного донорского материала глазного тканевого банка представлена в таблице 6.

Таблица 6 – Характеристика трупных донорских роговиц, полученных из глазного тканевого банка

Количество роговиц	20
Среднее время от момента смерти донора до ввода в эксперимент, ч	18 ( $\pm$ 4)
Средний возраст доноров, лет	55 ( $\pm$ 6)
Соотношение мужчин и женщин	10/10
Среднее время адреналиновой пробы, мин	10,5 ( $\pm$ 3,2)

## **2.2. Оценка влияния глиального нейротрофического фактора на процесс регенерации роговицы**

Первый этап работы состоял в проведении эксперимента *in vivo* на лабораторных животных для первичной оценки влияния глиального нейротрофического фактора на процесс регенерации эпителиального и эпителиально-стромального повреждения роговицы. Для этого половозрелым самцам мышей формировали стандартную модель эпителиального и эпителиально-стромального дефекта роговицы, затем – проводили инстилляцию предварительно заготовленной среды, содержащей глиальный нейротрофический фактор. После чего контролировались изменения площади эпителиального и эпителиально-стромального повреждения для определения интенсивности регенеративного процесса. По окончании эксперимента проводился иммуногистохимический анализ на специфические антитела, позволяющий провести детальную характеристику процесса регенерации.

### **2.2.1. Получение культуральной среды с глиальным нейротрофическим фактором**

В качестве экспериментального изучаемого препарата использовали кондиционированную среду, которую получали при культивировании клеток линии НЕК293 (Human Embryonic Kidney 293 cells), трансфицированных плазмидным вектором, содержащим модифицированный ген GDNF без пре- и про-последовательностей под цитомегаловирусным (CMV) промотором.

Клетки линии НЕК293 сразу после трансфекции с помощью реагента ExGen 500 (Fermentas, США) по протоколу фирмы-производителя, рассеивали в 25 см<sup>2</sup> флаконы (Costar, США) и инкубировали в течение 24 часов в среде DMEM (Панэко, Россия), при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>.

Затем кондиционированную экспериментальную среду отбирали из чашек, фильтровали через стерильный микропоровый (0,22 мкм) фильтр, замораживали и хранили при температуре -20 °С до начала эксперимента.

В качестве контрольного образца выступала кондиционированная среда после культивирования интактных клеток линии НЕК293.

### **2.2.2. Моделирование эпителиальных и эпителиально-стромальных дефектов роговицы**

Все эксперименты на животных были одобрены Комитетом по этике ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России. Для моделирования эпителиального дефекта животным (самцы мышей линии C57BL/6) под наркозом (внутрибрюшинная инъекция кетамина 100 мг/кг и ксилазина 5 мг/кг) в центре роговицы легким прижатием трепанов диаметром 1,5 (10 животных) и 2,5 мм (10 животных) наносилась метка, в пределах которой после окрашивания 0,01% раствором флуоресцеина (Sigma, США) удаляли эпителий с помощью скарификационного ножа.

Для моделирования эпителиально-стромального дефекта в центре роговицы трепаном 1,5 мм производился разрез, эпителий роговицы и базальную мембрану, включая переднюю часть стромы, удаляли с помощью алмазного бора Algerbrush II (Alger Equipment, США) (20 животных).

После создания экспериментальной модели 2 раза в сутки проводили инстилляцию каждому животному 0,3% раствора офлоксацина (Синтез, Россия) для предупреждения контаминации бактериальной микрофлорой. Кроме того, животным из экспериментальной (опытной) группы вносили по 1 капле среды, кондиционированной трансфицированными НЕК293 (расчетная доза GDNF – 0,01 мг в 1 капле), а животным из контрольной группы – по 1 капле среды инкубирования интактных клеток. Инстилляции указанными средами осуществляли каждые 3 часа в течение 24 и 48 часов при эпителиальном и

эпителиально-стромальном дефекте, соответственно, а затем каждые 6 часов в течение последующего наблюдения (3 недели в случае эпителиальных, 10 суток в случае эпителиально-стромальных дефектов).

В ходе эксперимента у животных в течение 1 суток после повреждения проводили анализ площади эпителиального дефекта роговицы. Для этого роговицу окрашивали флуоресцеином и фотографировали с помощью фотоцелевой лампы ВХ 900 (Haag-Streit IM, Швейцария). Область, окрашенную флуоресцеином, измеряли с использованием программного обеспечения ImageJ (Wayne Rasband/NIH, США). Учитывалось, что у мышей при наличии эпителиального дефекта в центре роговицы через две недели после повреждения спонтанно развиваются эрозии в другой области, в основном в назальном квадранте.

У животных с эпителиальным дефектом оценивали частоту формирования эрозий, наблюдая за состоянием роговицы в течение 3 недель. В случае эпителиально-стромального дефекта роговицы эрозии не развиваются, так как вследствие повреждения базальной мембраны активируется  $\alpha\beta4$ -интегрин, который стимулирует эпителиальную миграцию и формирование гемидесмосом, связывающих эпителиальные клетки с базальной мембраной. В связи с этим животных выводили из эксперимента на 5 сутки (10 животных) и на 10 сутки (10 животных), после чего проводили иммуногистохимическое исследование их роговиц.

### **2.2.3. Проведение иммуногистохимического исследования роговиц в ходе и по окончании процесса регенерации**

Роговицы с прилежащей склерой отделяли от глазного яблока и фиксировали в 4 % растворе формальдегида, приготовленном на физиологическом растворе с фосфатным буфером (PBS, pH 7,3), в течение 24 часов при температуре 4 °С. После пропитки в 30 % растворе сахарозы в PBS в течение 1 часа роговицы замораживали в криостате. Срезы толщиной 10 мкм размещали на предметных стеклах с полилизинным покрытием и высушивали при комнатной температуре в течение



24 часов. Срезы, окруженные гидрофобной полоской, 1 час инкубировали в 2 % растворе нормальной сыворотки крови осли (Jackson ImmunoResearch, США) в PBS с добавлением детергента Triton X-100 (Sigma, США) при комнатной температуре.

Затем срезы покрывали раствором первичных антител в том же растворителе в течение ночи при 4°C. После промывки в PBS срезы в течение 1 ч инкубировали в растворах ослиных антител к иммуноглобулинам животных-хозяев первичных антител, конъюгированных с флуоресцентными красителями Cy2 и Texas red.

Срезы покрывали глицерином и покровными стеклами и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus CX-41 с флуоресцентной насадкой и цифровой фотокамерой D5300 (Nikon, Япония).

Затем проводился анализ одинаково экспонированных цифровых микрофотографий и оценивался уровень экспрессии исследованных антигенов в эпидермальных и стромальных компонентах роговицы по 5-балльной шкале. Различия в интенсивности иммуногистохимической окраски между роговицами контрольной и опытной группы оценивали по средним баллам оценки. Достоверность различий определяли с помощью одностороннего критерия ANOVA, применяя программу GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., США).

В работе использовали кроличьи антитела к рецептору GDNF GFRa1, кроличьи антитела к анти-апоптозному фактору Bcl2 и его антагонисту Bax, мышинные антитела к металлопротеиназе MMP9 и цитокератинам 5 и 18 типов (Abcam, Великобритания), мышинные антитела к ERK1/2, JNK1/2, фосфо-ERK1/2 и фосфо-JNK1/2, козьи антитела к TGF- $\beta$ , TIMP1 и c-Met (Santa Cruz, США), а также кроличьи антитела к белковому маркеру пролиферации Ki67 (Novocastra, Великобритания).

Для подтверждения наличия базальной мембраны, производилось исследование с кроличьими антителами к ламинину и  $\alpha\beta$ 4-интегрину (Abcam, Великобритания).

Для оценки реиннервации срезы инкубировали с куриными антителами к GAP43 (Acris Antibodies, Германия).

### **2.3. Разработка и анализ биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка для доставки глиального нейротрофического фактора в область дефекта роговицы**

Данный этап работы заключался в получении и последующем изучении биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка как несущего матрикса для доставки глиального нейротрофического фактора в зону эпителиального и эпителиально-стромального повреждения роговицы. В связи с этим на данном этапе работы вначале была получена биodeградируемая конструкция на основе фиброина шелка. Затем полученная биodeградируемая конструкция и аналогичные конструкции, содержащие различные концентрации GDNF были исследованы в ходе: сканирующей электронной микроскопии, сканирующей зондовой нанотомографии, оценки механических качеств, скорости биodeградации и интенсивности высвобождения глиального нейротрофического фактора.

#### **2.3.1. Получение биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка**

Для изготовления биodeградируемых конструкций в качестве базисного сырья использовали фиброин шелка, выделенный из шелковых нитей тутового шелкопряда *Bombyx mori*. Навеску нитей шелка, предварительно разрезанных на фрагменты длиной не более 0,5 см (4-0, Моснитки, Россия), массой 1 г кипятили на водяной бане в течение 40 минут в водном растворе двууглекислого натрия с концентрацией 2,52 мг/мл для очистки от серицина и других примесей. Затем нити промывали 3600 мл дистиллированной воды. Далее нити трижды кипятили в бидистиллированной воде в течение 30 минут, промывая после каждого кипячения 3600 мл дистиллированной воды. Отмытые нити высушивали на воздухе.

Для получения водного раствора фиброина шелка получали водно-спиртовой раствор хлорида кальция из расчета 389 мг хлорида кальция, 388 мкл этанола и 544 мкл бидистиллированной воды на 1 мл раствора, в который вносили навеску

высушенных отмытых нитей фиброина шелка до конечной концентрации 130 мг/мл. Смесь нагревали на водяной бане при 40 °С в течение 4 часов до полного растворения фиброина шелка. Полученный раствор центрифугировали в течение 7 минут при 12100 g. Затем производили диализ раствора против бидистиллированной воды: проводилось 4 смены диализа по 30 минут. Раствор фиброина шелка, полученный после диализа, центрифугировали в течение 7 минут при 12100 g.

Концентрацию фиброина шелка в растворе определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм с помощью установки Genesis 10 UV (Spectronic Unicam, США), молярный коэффициент экстинкции принимали равным 473480 M<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>, что соответствует теоретически рассчитанному коэффициенту экстинкции по аминокислотной последовательности тяжелой цепи фиброина шелка (номер в базе данных UniProt: P05790).

Все виды биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка получали в виде пленок методом полива. Биodeградируемые конструкции получали из раствора, содержащего фиброин шелка и желатин, с общей концентрацией белка 20 мг/мл. Для получения рабочего раствора смешивали растворы фиброина шелка и желатина типа А (Merck, США) так, чтобы массовое соотношение фиброина и желатина в растворе составляло 3:2.

Для изготовления биodeградируемых конструкций (пленок), содержащих глиальный нейротрофический фактор, в раствор добавляли рекомбинантный глиальный нейротрофический фактор – GDNF (Cloud-Clone Corp. (CCC), USA) до требуемой концентрации. Использовали следующие концентрации глиального нейротрофического фактора: 50 нг/мл, 250 нг/мл, 500 нг/мл.

Для изготовления биodeградируемой конструкции в виде пленки диаметром 1 см<sup>2</sup> наносили 100 мкл раствора заданного состава на поверхность полированного тефлона и высушивали в течение двух суток при комнатной температуре. Полученные биodeградируемые конструкции отделяли от поверхности тефлона с помощью скальпеля.

На данном этапе исследования были сформированы следующие группы биodeградируемых конструкций:

- 1) Биodeградируемые конструкции на основе водного раствора фиброина шелка и желатина, содержащие 60 % фиброина шелка и 40 % желатина по массе, концентрация общего белка 20 мг/мл, без содержания GDNF;
- 2) Биodeградируемые конструкции на основе водного раствора фиброина шелка и желатина, содержащие 60 % фиброина шелка и 40 % желатина по массе с добавлением GDNF в концентрации 50 нг/мл, концентрация общего белка 20 мг/мл;
- 3) Биodeградируемые конструкции на основе водного раствора фиброина шелка и желатина, содержащие 60 % фиброина шелка и 40 % желатина по массе с добавлением GDNF в концентрации 250 нг/мл, концентрация общего белка 20 мг/мл;
- 4) Биodeградируемые конструкции на основе водного раствора фиброина шелка и желатина, содержащие 60 % фиброина шелка и 40 % желатина по массе с добавлением GDNF в концентрации 500 нг/мл, концентрация общего белка 20 мг/мл.

Данное исследование разрабатывалось и проводилось в Лаборатории бионанотехнологий при ФГБУ "НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова" Минздрава России под руководством заведующего лабораторией д.б.н., профессора Игоря Ивановича Агапова.

### **2.3.2. Сканирующая электронная микроскопия полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка**

Для проведения сканирующей электронной микроскопии образцы полученных биodeградируемых конструкций фиксировали этанолом, содержащим 2,5% глутарового альдегида, в течение 4 часов при температуре 4 °С в темноте, после чего промывали 96 % этанолом и инкубировали в ацетоне 30 мин. Образцы подвергали сушке при критической температуре (31 °С, 72,8 кг/см<sup>2</sup>) в устройстве Quorum K850 (Quorum Technologies, Великобритания).

На высушенные образцы наносили слой золота толщиной 10 нм в атмосфере аргона при ионном токе 20 мА и давлении 1 мбар с помощью установки для

нанесения покрытий с роторным насосом Q150R ES (Quorum Technologies, Великобритания).

Образцы анализировали на сканирующем электронном микроскопе Tescan Vega 3 (Tescan, Чехия), рабочее напряжение 10 кВ. Визуализацию выполняли с помощью программного обеспечения VegaTC (Tescan, Чехия).

### **2.3.3. Сканирующая зондовая нанотомография полученных биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка**

Образцы биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка, содержащие глиальный нейротрофический фактор в различных концентрациях (50 нг/мл; 250 нг/мл; 500 нг/мл), и контрольные образцы без глиального нейротрофического фактора фиксировали 2,5% раствором этанол-глутарового альдегида в течение 2 часов при температуре 4 °С в темноте и промывали 96 % этанолом.

Образцы инкубировали в пропиленоксиде дважды по 10 мин и переносили в смесь 1:1 эпоксидной среды и пропиленоксида, затем в смесь в соотношении 2:1. После этого образцы инкубировали в эпоксидной среде в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем производили заливку образцов в эпоксидную среду, после чего образцы инкубировали при температуре 45 °С в течение 24 часов, а затем в течение 48 часов при температуре 60 °С.

Исследование внутренней структуры полученных биodeградируемых конструкций проводили с помощью специализированной системы СЗНТ (сканирующей зондовой нанотомографии), включающей сканирующий зондовый микроскоп (СЗМ) и интегрированный ультрамикротом Leica EM UC6NT (Leica Microsystems GmbH, Австрия). Данный комбинированный компьютеризированный приборный комплекс позволяет проводить измерения наноструктуры поверхности объектов в ходе сканирующей зондовой микроскопии сразу после последовательных ультратонких срезов образца на ультрамикротоме.

Срезы образцов толщиной 70 нм выполняли с помощью алмазного ножа Diatome UltraAFM 35 (Diatome, Швейцария). Измерения топографии поверхности секционных граней в ходе сканирующей зондовой микроскопии биodeградируемых конструкций проводились в полуконтактном режиме с использованием кремниевых кантилеверов HA\_HR (Tipsnano OÜ, Эстония) с резонансной частотой 230 кГц и радиусом кривизны острия не более 10 нм. Сканы площадью  $4,0 \times 4,0$  мкм с разрешением  $1024 \times 1024$  пикселей были получены из поперечных сечений каждого образца с частотой сканирования 0,8 Гц.

Данное исследование проводилось на базе Лаборатории бионанотехнологий при ФГБУ "НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова" Минздрава России под руководством доктора биологических наук Антона Евгеньевича Ефимова.

#### **2.3.4. Оценка механических свойств полученных биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка**

Измерения механических свойств полученных биodeградируемых конструкций проводились на испытательной машине И11М (КБ «Точприбор», Россия). Образцы полученных биodeградируемых конструкций в сухом состоянии размером  $35 \times 10 \times 0,02$  мм растягивали и измеряли прочность на растяжение и оценивали упругость данного материала для восстановления роговицы.

Предварительная нагрузка и скорость испытания были равны 0,05 Н и 50 мм/мин, соответственно. Построение тестовых кривых и обработка данных проводилась с использованием программы И11М х.х.131 (КБ Точприбор, Россия).

#### **2.3.5. Оценка скорости биodeградации полученных конструкций на основе фиброина шелка**

Для изучения скорости биodeградации полученные конструкции на основе фиброина шелка средней массой 0,003 г инкубировали в 1,5 мл фосфатно-солевого буфера (рН = 7,4) в течение 7 суток при температуре 37 °С. Контрольные точки эксперимента были установлены на 2, 3, 5 и 7-е сутки.

В каждой контрольной точке эксперимента отбиралось по три образца каждой изучаемой биodeградируемой конструкции, которые затем отмывали от фосфатно-солевого буфера центрифугированием в дистиллированной воде. После чего замораживали осадки при температуре  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Собранные образцы лиофилизировали с помощью сушилки IIShinBioBase FD8580 (IIShinBioBase Co. Ltd., Южная Корея) и взвешивали для построения кривых биodeградации.

### **2.3.6. Оценка интенсивности высвобождения глиального нейротрофического фактора из полученных биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка**

Оценку интенсивности высвобождения глиального нейротрофического фактора из полученных биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка измеряли в эксперименте *in vitro* с помощью твердофазного иммуноферментного анализа GDNF Human ELISA Kit (Abcam, Великобритания).

Образцы биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка, содержащие глиальный нейротрофический фактор в концентрации 50 нг/мл, 250 нг/мл и 500 нг/мл, и не содержащие глиальный нейротрофический фактор ( $n = 4$ ), помещали в пробирку, содержащую фосфатно-солевой буфер (1 мл PBS, pH 7,4), после чего инкубировали при температуре  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  до 7 дней.

В заранее определенные контрольные точки эксперимента (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 день) забирали растворы PBS, после чего добавляли такой же объем свежего раствора PBS. Затем образцы замораживали при температуре  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  до проведения иммуноферментного анализа.

Совокупное количество высвобожденного глиального нейротрофического фактора рассчитывалось на основании определяемых объемов данного фактора в каждой контрольной точке эксперимента.

Для проведения твердофазного иммуноферментного анализа использовалось антитело, специфичное к глиальному нейротрофическому фактору человека, нанесенное на 96-луночный планшет.

Стандарты готовили непосредственно перед использованием в соответствии с инструкциями компании-производителя. Образцы, значения которых оказывались выше самого высокого стандарта, были дополнительно разбавлены в 100 раз в специальных буферах для разбавления образцов, также поставляемых в наборе компании-производителя.

Стандарты и образцы переносили при помощи лабораторной пипетки в лунки. Затем лунки промывали и добавляли биотинилированные антитела против глиального нейротрофического фактора человека.

Затем в лунках выполняли промывание несвязавшегося биотинилированного антитела, после чего пипеткой вносили конъюгированный с пероксидазой хрена стрептавидин. Лунки повторно промывали и добавляли раствор субстрата ТМБ (тетраметилбензидин), в результате чего окрашивание развивалось пропорционально количеству связанного глиального нейротрофического фактора. Добавление стоп-раствора изменяло цвет в лунках с синего на желтый. Интенсивность окраски измеряли на 450 нм. Поглощение измеряли при 450 нм в полуавтоматическом ИФА-анализаторе для микропланшетов.

Стандартные кривые были построены с использованием известного количества глиального нейротрофического фактора, разбавители использовались в качестве контролей. Стандартные кривые для глиального нейротрофического фактора представляли собой линейные графики зависимости поглощения от концентрации. Линейные графики использовали для определения концентрации глиального нейротрофического фактора в исследуемых образцах. Все эксперименты проводились в трехкратной повторности.

Полученные в ходе твердофазного иммуноферментного анализа данные о количестве глиального нейротрофического фактора в каждой контрольной точке помогают также регулировать интенсивность его высвобождения.



## **2.4. Оценка безопасности полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка в ходе культивирования совместно с кератоцитами роговицы человека**

Данный этап исследования заключался в выделении клеточной культуры кератоцитов из трупных донорских роговиц Глазного тканевого банка и последующего клеточного культивирования кератоцитов роговицы человека с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка, содержащими глиальный нейротрофический фактор в концентрациях 50 нг/мл; 250 нг/мл; 500 нг/мл, а также без глиального нейротрофического фактора. Безопасность предлагаемых биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка, содержащих глиальный нейротрофический фактор, оценивалась в данном разделе исследования при помощи иммуноцитохимического анализа «Live and Dead».

### **2.4.1. Выделение кератоцитов из трупных донорских роговиц**

В работе использовали клетки, выделенные из стромальной части роговицы человека – кератоциты. Для получения первичной культуры кератоцитов использовались трупные роговицы, непригодные для трансплантации в клинику, полученные из Глазного банка ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургии глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. Экспериментальные исследования на тканях, выделенных из постмортальных человеческих глаз, проводились в соответствии с официально принятыми процедурами и специальным разрешением в рамках законодательства Российской Федерации. На основании лицензии Федеральной государственной службы по надзору за Здравоохранением № 99-01-005317 от 30.04.2008 и № ФС-99-01-008251 от 18.02.2013 Глазной тканевой банк ФГАУ «НМИЦ «МНТК «МГ» получает трупные человеческие глаза из танатологических отделений Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента Здравоохранения города Москвы. Лицензия позволяет использовать

ткани, выделенные из трупных человеческих глаз для целей трансплантации и научных исследований.

Весь донорский материал, используемый в данном исследовании, проходил обязательную проверку на опасные инфекции. До экспериментальной части работы допускались роговицы от доноров, сыворотка крови которых не содержала вирус иммунодефицита человека 1 и 2 типов, гепатит В, гепатит С, а также сифилис.

Полученные трупные донорские роговицы фиксировали в искусственной передней камере, ориентировали клетками заднего эпителия вверх, используя шпатель-скребок, Десцеметову мембрану с клетками заднего эпителия отделяли по линии Швальбе. Оставшуюся без заднего эпителия и Десцеметовой мембраны строму использовали для получения первичной культуры кератоцитов.

Первичная культура кератоцитов была получена по оригинальной методике выделения, используемой в Центре фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургии глаза» им. С.Н. Федорова» Минздрава России. Данная методика включает в себя кратковременную ферментативную дезагрегацию фрагментов роговицы. Для этого кусочки переносили в коническую пробирку типа Эппендорф и добавляли 1 мл раствора DMEM/F12 (Sigma, США) и коллагеназы II типа (Thermo fisher scientific, США) в концентрации 10 мг/мл, пробирку помещали в термошейкер (Biosan, Латвия), используя следующие параметры: 100 g, t + 37 °C в течение 20 мин.

Полученные фрагменты переносили в чашки Петри (35 мм) (SPL, Корея) для дальнейшего культивирования.

#### **2.4.2. Культивирование кератоцитов стромы роговицы человека с полученными биodeградируемыми конструкциями**

Использовалась полная питательная среда для культивирования кератоцитов: DMEM/F12 (Sigma, США) с добавлением 5% - фетальной бычьей сыворотки (Thermo fisher scientific, США), 1% - раствора GlutaMax (Thermo fisher scientific, США), 1% - раствора антибиотиков (Thermo fisher scientific, США).

Культивирование полученных в ходе исследования кератоцитов проводили при стандартных условиях:  $t+37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Полную смену культуральной среды проводили каждые 3-ое суток, визуальный контроль роста клеток осуществляли, используя инвертированный световой фазово-контрастный микроскоп Olympus IX-81 (Olympus, Япония), представленный на рисунке 1.

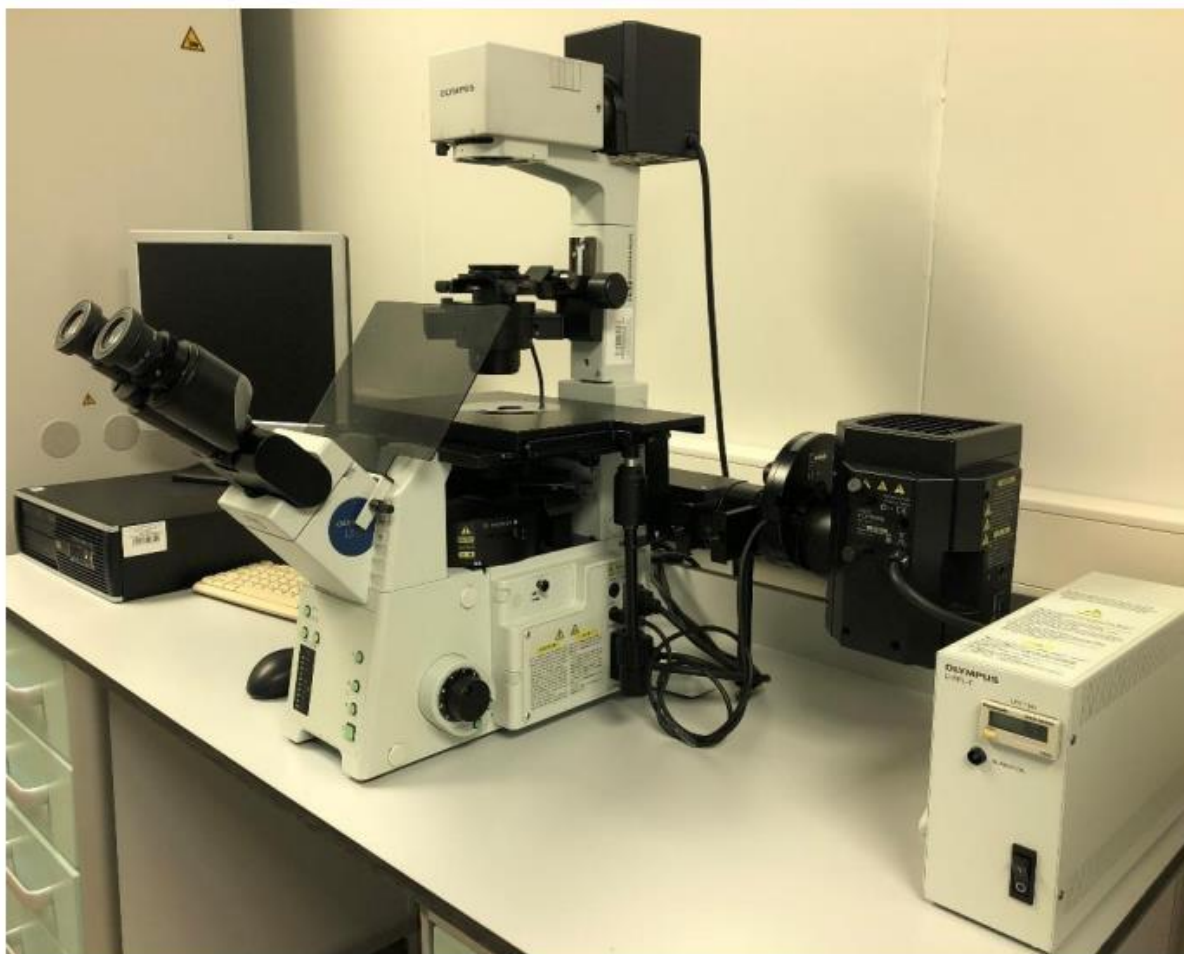


Рисунок 1 – Инвертированный световой фазово-контрастный микроскоп IX81с интегрированной цифровой фотокамерой XC10 (Olympus, Япония)

При достижении 80%-конфлуэнтности клетки пассировали. Для этого чашки Петри промывались 3-х кратно раствором Версена (ПанЭко, Россия), далее добавляли 0,25% раствор Трипсин-Версена 1:1 (ПанЭко, Россия) и инкубировали при  $t+37^{\circ}\text{C}$  в течение 10 минут. Полученную суспензию клеток собирали в 15 мл центрифужные пробирки (SPL, Корея), центрифугировали при 160 g, 5 мин,  $t+37^{\circ}\text{C}$ .

Супернатант удаляли, используя аспиратор (Biosan, Латвия), осадок ресуспендировали в соответствующей полной ростовой среде, проводили подсчет клеток в автоматическом счетчике клеток Luna II (Logos Biosystems, Корея) и переносили в культуральные флаконы 25 см<sup>2</sup> (SPL, Корея) с добавлением 5 мл полной питательной среды. На всех этапах работы проводили оценку жизнеспособности полученных клеточных культур, используя флуоресцентный краситель «Live and Dead» (Abcam, Великобритания). Данный краситель представляет собой коммерческий набор, содержащий в своем составе два флуоресцентных красителя: живые клетки окрашиваются в зеленый цвет (Ex. 494; Em. 515), мертвые клетки окрашиваются в красный цвет (Ex. 528; Em. 617).

Полученные культуры кератоцитов были разделены на блоки: во 2, 3 и 4 блоках при культивировании кератоцитов использовали биodeградируемые конструкции на основе фиброина шелка, содержащие глиальный нейротрофический фактор в концентрациях 50 нг/мл, 250 нг/мл и 500 нг/мл соответственно; в 1 блоке культивирование кератоцитов проводилось без биodeградируемых конструкций и без глиального нейротрофического фактора (контроль); в 5 блоке – с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка, без содержания глиального нейротрофического фактора.

В процессе культивирования на 3, 5 и 9 сутки проводили анализ жизнеспособности клеточных культур.

Для оценки жизнеспособности культуры клеток на этапах пассирования отбирали пробу  $1 \times 10^5$  клеток. Полученную суспензию клеток переносили в пробирки для проточного цитофлуориметра, центрифугировали 160 g, 5 мин, супернатант удаляли и добавляли 1 мл раствора Cell Wash (BD, USA). Далее повторно центрифугировали при 160 g, 5 мин, полученный осадок ресуспендировали в 100 мкл раствора фосфатного-солевого буфера (ПанЭко, Россия) с 1x концентрацией раствора «Live and Dead» и инкубировали при комнатной температуре 10 минут в темноте.

Анализ осуществляли, используя проточный цитофлуориметр Cyto Flex (Beckman Coulter Life Sciences, США).

### **2.4.3. Оценка жизнеспособности полученных клеточных культур кератоцитов после культивирования с биodeградируемыми конструкциями, содержащими глиальный нейротрофический фактор**

Для определения влияния полученных на предыдущих этапах работы биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка, содержащих глиальный нейротрофический фактор, и биodeградируемых конструкций без глиального нейротрофического фактора на культуру кератоцитов использовали Аннексин V и 7AAD (Abscam, Великобритания).

Для этого к клеточной суспензии в концентрации  $1 \times 10^5$  клеток/мл (Abscam, Великобритания) и инкубировали 10 мин при комнатной температуре в темноте. Материал анализировали на проточном цитофлуориметре Cyto Flex (Beckman Coulter Life Sciences, США) на 3, 7, 9 сутки культивирования.

При подсчете учитывался процент живых клеток (аннексин V- 7AAD-), уровень апоптоза (аннексин V+ 7AAD-), количество мертвых клеток (аннексин V+ 7AAD+) и уровень некроза (аннексин V- 7AAD+). Все образцы анализировали в трех повторах, рассчитывая среднее значение.

### **2.5. Оценка эффективности полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка в эксперименте *in vitro***

На данном этапе исследования для определения эффективности полученной биodeградируемой конструкции проводили оценку пролиферативной активности клеточных культур кератоцитов при их культивировании совместно с биodeградируемыми конструкциями. В качестве первого метода оценки использовался подсчет клеток с применением автоматизированных систем. Также на данном этапе работы проводилось иммуногистохимическое исследование для обнаружения в исследуемых образцах характерных маркеров пролиферации с

использованием инвертированного лазерного сканирующего конфокального микроскопа и программного обеспечения.

### **2.5.1. Оценка пролиферативной активности клеточных культур кератоцитов при культивировании совместно с биodeградируемыми конструкциями на основе фибрина шелка**

Визуальный контроль роста кератоцитов осуществляли, используя инвертированный световой фазово-контрастный микроскоп Olympus IX-81 (Olympus Corporation, Япония).

Для оценки пролиферативной активности кератоцитов, клетки ферментативно снимали с 4-х лунок каждой группы на 3, 5 и 9 сутки, центрифугировали и проводили подсчет клеток в автоматическом счетчике клеток Luna II (Logos Biosystems, Республика Корея), представленный на рисунке 2.



Рисунок 2 – Автоматический счетчик клеток Luna II (Logos biosystems, Республика Корея)

### **2.5.2. Иммуноцитохимическое исследование клеточных культур кератоцитов при культивировании совместно с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка**

На данном этапе работы проводилось иммуноцитохимическое исследование для оценки пролиферативной активности кератоцитов после культивирования совместно с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка, содержащими глиальный нейротрофический фактор и без глиального нейротрофического фактора.

Для определения пролиферативной активности, а именно изучения активации ядерного белка Ki-67 в клеточной культуре кератоцитов совместно с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка, содержащими глиальный нейротрофический фактор и без него, использовали специальные 4-х луночные слайд-флаконы, в каждую лунку которого добавляли суспензию клеток и соответствующую биodeградируемую конструкцию или оставляли без нее, в концентрации  $5 \times 10^3$  с добавлением 0,8 мл соответствующей полной питательной среды.

Из каждой группы исследования каждый день выводилось по 1 слайд-флакону для определения изменения динамики активации Ki-67 в клетках. Культивирование проводили в течение 7 суток при стандартных условиях.

Протокол проведения иммуноцитологического анализа включал в себя стандартные этапы: фиксацию материала, пермобилизацию клеток, окраску первичными антителами, окраску вторично-меченными антителами, контрастирование клеточного ядра, заключение исследуемого препарата под покровное стекло.

Подготовленные образцы хранились при  $t + 4$  °C не более 2-х дней с момента окраски до момента анализа. Исследование производили на инвертированном лазерно-сканирующем конфокальном микроскопе FV10i (Olympus Corp., Япония), представленном на рисунке 3.

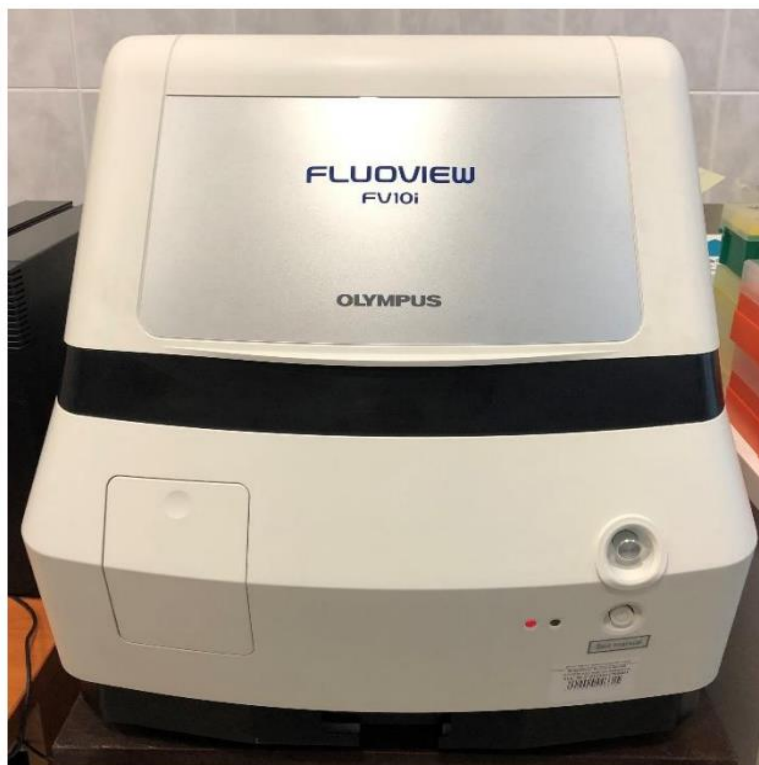


Рисунок 3 – Лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Fluoview FV10i (Olympus Corporation, Япония)

Полученные снимки анализировали, используя программное обеспечение «CellProfiler», которое позволяет выделять необходимые для анализа клеточные компоненты, а именно ядро и рассчитать соотношение клеток, экспрессирующих белок, используя встроенные инструменты программного обеспечения.

## **2.6. Оценка эффективности применения полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка для доставки глиального нейротрофического фактора в зону дефекта роговицы в эксперименте *in vitro***

Заключительный этап исследования заключался в проведении эксперимента на лабораторных мышах. Вначале лабораторным животным формировали стандартизированную модель эпителиально-стромального повреждения



роговицы. После формирования повреждения на роговицы животных накладывали полученные биodeградируемые конструкции на основе фиброина шелка, содержащие глиальный нейротрофический фактор. На момент окончания эксперимента проводили заключительную оценку состояния роговичной поверхности, после чего животных выводили из эксперимента для проведения иммуногистохимического исследования роговичной ткани. Проведение данного этапа исследования было необходимо для изучения влияния глиального нейротрофического фактора, доставляемого в биodeградируемых конструкциях, на процессы регенерации роговицы *in vivo*.

### **2.6.1. Формирование эпителиального дефекта роговиц мышей с последующим применением полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка**

Работу проводили на половозрелых самцах мышей линии C57BL/6J с экспериментальной моделью эпителиально-стромального повреждения роговицы. Все эксперименты на животных были одобрены Комитетом по этике ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России и проведены в соответствии с Заявлением Ассоциации по исследованиям в области зрения и офтальмологии (ARVO) по использованию животных в исследованиях офтальмологии и зрения (Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research).

Для проведения экспериментального исследования были сформированы следующие группы лабораторных животных:

Группа №1 (7 животных / 7 глаз) – эпителиально-стромальное повреждение роговицы + биodeградируемые конструкции на основе водного раствора фиброина шелка и желатина, содержащие 60% фиброина шелка и 40% желатина по массе, с добавлением глиального нейротрофического фактора до концентрации 50 нг/мл, общая концентрация белка – 20 мг/мл;

Группа №2 (7 животных / 7 глаз) – эпителиально-стромальное повреждение роговицы + биodeградируемые конструкции на основе водного раствора фиброина шелка и желатина, содержащие 60% фиброина шелка и 40% желатина по массе, с добавлением глиального нейротрофического фактора до концентрации 250 нг/мл, общая концентрация белка – 20 мг/мл;

Группа №3 (7 животных / 7 глаз) – эпителиально-стромальное повреждение роговицы + биodeградируемые конструкции на основе водного раствора фиброина шелка и желатина, содержащие 60% фиброина шелка и 40% желатина по массе, с добавлением глиального нейротрофического фактора до концентрации 500 нг/мл, общая концентрация белка – 20 мг/мл;

Группа №4 (7 животных / 7 глаз) – эпителиально-стромальное повреждение роговицы + биodeградируемые конструкции на основе водного раствора фиброина шелка и желатина, содержащие 60% фиброина шелка и 40% желатина по массе, общая концентрация белка – 20 мг/мл, без добавления глиального нейротрофического фактора;

Группа №5 (7 животных / 7 глаз) – эпителиально-стромальное повреждение роговицы + инстилляцией водного раствора глиального нейротрофического фактора в концентрации 500 нг/мл. Концентрацию 500 нг/мл глиального нейротрофического фактора выбрали как максимальную, используемую в биodeградируемых конструкциях, чтобы сравнить эффективность применения глиального нейротрофического фактора в виде инстилляций с применением биodeградируемых конструкций с глиальным нейротрофическим фактором в той же концентрации за то же количество дней наблюдения. В глаза опытной группы вносили по 1 капле раствора (0,04 мл) (расчетная доза глиального нейротрофического фактора 20 нг в 1 капле) 5 раз в день (через каждые 3 часа с 9:00 до 21:00);

Группа №6 (7 животных / 7 глаз) – контрольная группа с эпителиально-стромальным повреждением роговицы.

Моделирование эпителиально-стромального повреждения животным производили под наркозом (внутрибрюшинная инъекция кетамина 100 мг/кг и ксилазина 5 мг/кг). Под микроскопом к центральной области роговицы прижимали трепан диаметром 3 мм с последующим его аккуратным поворотом, чтобы пройти в строму. Затем эпителий роговицы и базальную мембрану, включая переднюю часть стромы, удаляли с помощью алмазного бора Algerbrush II (Alger Equipment, США).

После промывания роговицы стерильным физиологическим раствором, накладывали биodeградируемую конструкцию из фиброина шелка, содержащую глиальный нейротрофический фактор в различных концентрациях (50 нг/мл; 250 нг/мл; 500 нг/мл) или биodeградируемую конструкцию из фиброина шелка без содержания глиального нейротрофического фактора в соответствующих экспериментальных группах животных (группы №: 1, 2, 3, 4) и проводили частичную блефарорафию.

В группе №5 после моделирования эпителиально-стромального повреждения животным проводили инстилляцию раствора глиального нейротрофического фактора в концентрации 500 нг/мл.

В контрольной группе (группа №6) животных после моделирования эпителиально-стромального повреждения лечение не проводилось. Далее 3 раза в сутки проводили инстилляцию 1 капли 0,3% раствора офлоксацина (флоксала) (Синтез, Россия) как в опытных, так и в контрольной группах.

В ходе эксперимента у животных на 1, 3 и 5 сутки после повреждения проводили анализ площади эпителиального дефекта роговицы для оценки регенерации эпителия. Для этого роговицу окрашивали флуоресцеином и фотографировали с помощью фотоцелевой лампы ВХ 900, Haag-Streit IM (Швейцария). Область, окрашенную флуоресцеином, измеряли с использованием программного обеспечения ImageJ. Животных выводили из эксперимента на 5 сутки, после чего проводили иммуногистохимическое исследование роговичного материала.

## **2.6.2. Иммуногистохимическое исследование роговиц мышей после применения полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка**

Для проведения иммуногистохимического исследования роговицы с прилежащей склерой отделяли от глазного яблока и фиксировали в 4% растворе формальдегида, приготовленном на физиологическом растворе с фосфатным буфером (PBS, pH 7,4), в течение 24 часов при температуре 4°C.

После пропитки в течение 1 часа в 30% растворе сахарозы в фосфатно-солевом буфере роговицы были заморожены в криостате. Срезы толщиной 10 мкм размещались на предметных стеклах со специальным полилизинным покрытием. После чего проводилась сушка при комнатной температуре в течение 24 часов. Срезы, которые были окружены гидрофобной полоской, в течение 1 часа инкубировались в 2% растворе нормальной сыворотки крови осла (Jackson ImmunoResearch, США) в фосфатно-солевом буфере с добавлением детергента Triton X-100 (Sigma, США) при комнатной температуре. Затем сформированные срезы, согласно стандартной технологии, покрывали раствором первичных антител в том же растворителе в течение ночи при 4 °C.

Затем проводилась промывка в фосфатно-солевом буфере, после чего в течение 1 часа срезы инкубировали в растворах ослиных антител к иммуноглобулинам первичных антител животных-хозяев, которые были конъюгированы с флуоресцентными красителями Cy2 / Texas red (Jackson Immunoresearch, США). Срезы покрывали глицерином и покровными стеклами, после чего анализировали при помощи инвертированного микроскопа Olympus CX-41 с флуоресцентной насадкой и фотокамерой Nikon-D5300 (Nikon, Япония).

Затем был проведен анализ одинаково экспонированных цифровых микрофотографий и оценивались уровни экспрессии исследованных антигенов в стромальных и эпителиальных фрагментах роговицы по 5-ти балльной шкале.

Отличия в интенсивности иммуногистохимического окрашивания между контрольной и опытными группами роговицам оценивались по средним баллам оценки. Достоверность различий определяли при помощи одностороннего критерия ANOVA, используя программу GraphPad-Prism (GraphPad Software, Inc., США). На данном этапе работы применяли кроличьи антитела к антиапоптозному фактору Bcl2 и его антагонисту Bax (Abcam, Великобритания), а также кроличьи антитела к фосфо-ERK1/2 и фосфо-JNK1/2 (Thermo-Fisher Scientific, США), и кроличьи антитела к маркеру пролиферации Ki67 (Novocastra, Великобритания). Для оценки реиннервации срезы инкубировались с куриными антителами к GAP43 (Acris Antibodies, Германия).

## **2.7. Статистические методы исследования**

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программного обеспечения Graph Pad Software Prisma 7 (GraphPad Software, Inc., США). Оценка достоверности различий между двумя независимыми группами проводилась с использованием t-критерия Стьюдента.

Различия считались статистически значимыми при коэффициенте достоверности  $p < 0,05$ . Различия между опытными и контрольными роговицами оценивали по средним баллам оценки. Достоверность различий оценивали с помощью одностороннего критерия ANOVA, с использованием программы GraphPad – Prism (GraphPad Software, Inc. США).

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для разработки способа восстановления дефектов роговицы при помощи биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка, согласно первой задаче работы, проводили серию экспериментальных исследований. Вначале в эксперименте на мышах был изучен процесс регенерации дефектов роговицы под воздействием инстилляций кондиционированной среды, полученной при культивировании клеток с геном GDNF. Затем, согласно последующим задачам исследования и основываясь на полученных результатах из первого этапа работы, была проведена серия экспериментов *in vitro* и *in vivo* для оптимизации способа доставки GDNF в очаг повреждения. Для этого проводили анализ безопасности и эффективности полученной биodeградируемой конструкции для клеточной культуры кератоцитов роговицы. На заключительном этапе работы в эксперименте была показана эффективность применения полученной биodeградируемой конструкции для доставки GDNF в очаг роговичного дефекта и высокая терапевтическая активность данной конструкции.

#### **3.1. Результаты изучения влияния глиального нейротрофического фактора на процесс регенерации дефектов роговицы**

Для проведения данного этапа работы половозрелым самцам мышей линии C57BL/6J формировали стандартную модель эпителиального и эпителиально-стромального повреждений роговицы, после чего проводили инстилляцию кондиционированной среды, полученной в результате культивирования клеток HEK293, содержащих конструкцию с геном GDNF без пре- и пропоследовательностей. Была проведена оценка площади эпителиального дефекта роговицы, частоты формирования эрозий роговицы на фоне эпителиального дефекта, после чего проводили иммуногистохимический анализ роговиц, для которого использовали следующие антитела: к цитокератину 5/18,

c-Met, коллагену IV типа, фосфо-ERK1/2, фосфо-JNK1/2, Ki67, Bcl2, GAP43, TIMP-1, TGF- $\beta$ , Вах и MMP9.

### 3.1.1. Макроскопическая характеристика моделированных дефектов роговицы в ходе и по окончании процесса регенерации

В результате проведенной макроскопической оценки роговиц мышей опытной группы с эпителиальным дефектом диаметром 1,5 мм было установлено, что через 6, 12, 21 час его размер составлял, соответственно, 62 %, 30 % и 5 % от исходного, при этом в контрольной группе после формирования эпителиального дефекта 1,5 мм диаметром через 6, 12, 21 час его размер составил, соответственно, 70 %, 55 %, 25 % от исходного.

При макроскопической оценке эпителиального дефекта на 1 сутки в опытной группе отмечалась полная эпителизация роговицы, в то время как в контрольной группе сохранялся остаточный эпителиальный дефект, размеры которого составили 6 % от исходного. Макроскопическая характеристика дефектов роговицы (1,5 мм) в опытной и контрольной группах представлена на рисунке 4.

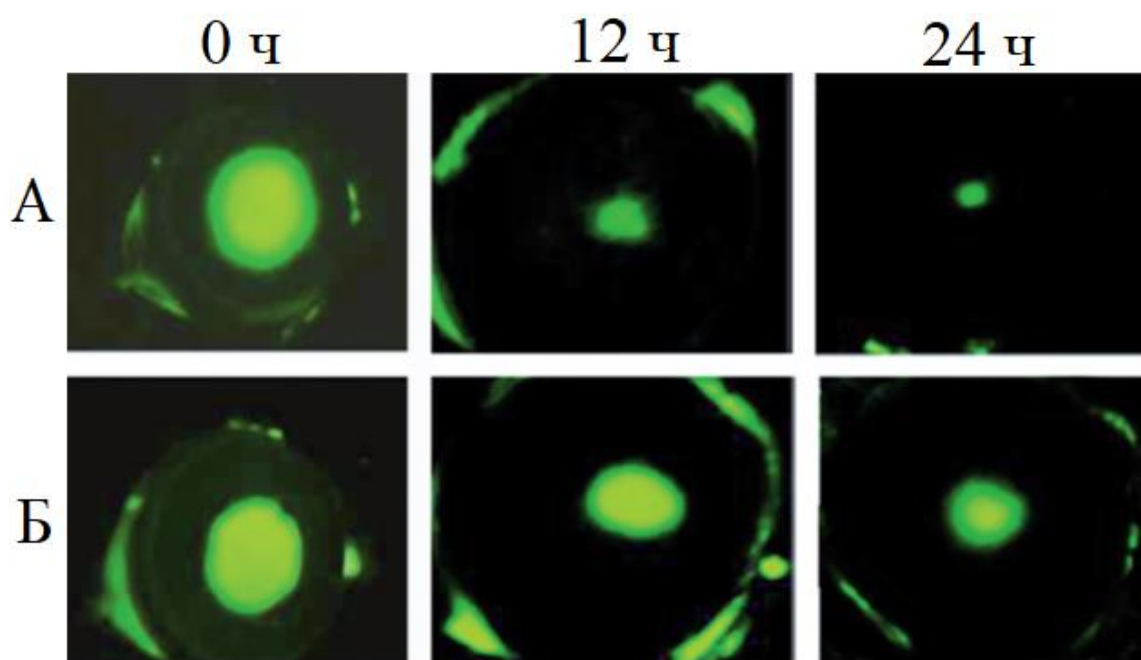


Рисунок 4 – Макроскопическое изображение эпителиальных дефектов 1,5 мм опытной (А) и контрольной (Б) групп на начало эксперимента и через 12 и 24 часа

При макроскопической оценке эпителиального дефекта диаметром 2,5 мм было установлено, что размер дефекта в опытной группе спустя 6, 12, 21 час составил, соответственно, 81 %, 50 % и 18 % от исходного размера, при этом в контрольной группе через 6, 12, 21 час после формирования эпителиального дефекта диаметром 2,5 мм его размеры составляли, соответственно, 90%, 70 %, 42% от исходного диаметра.

В результате измерения эпителиального дефекта диаметром 2,5 мм на 1 сутки в опытной группе сохранялся остаточный эпителиальный дефект размером 8 % от исходного, в то время как в контрольной группе сохранялся значительный эпителиальный дефект роговицы, размером 25 % от исходного диаметра. Макроскопическая характеристика дефектов роговицы (2,5 мм) в опытной и контрольной группах представлена на рисунке 5.

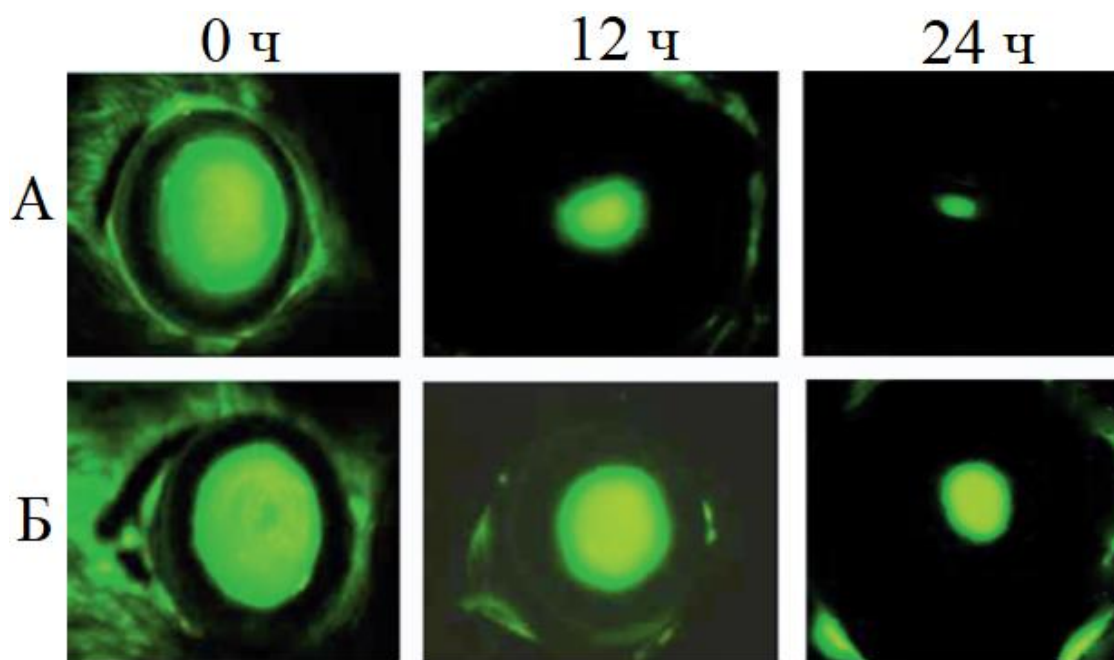


Рисунок 5 – Макроскопическое изображение эпителиальных дефектов 2,5 мм опытной (А) и контрольной (Б) групп на начало эксперимента и через 12 и 24 часа

Также было установлено, что эрозии роговицы в опытной группе после дезэпителизации диаметром 1,5 мм и 2,5 мм формировались, соответственно, в 30 % и 35 % случаев, в контрольной группе – в 80 % и 85 % случаев, соответственно.



### 3.1.2. Иммуногистохимическое исследование роговиц в ходе и по окончании процесса регенерации

В результате проведенного иммуногистохимического исследования роговиц после формирования эпителиально-стромального повреждения в базальном слое эпителия лимбальной зоны в опытной и контрольной группах была установлена положительная реакция с антителами к GFRa1, что подтвердило наличие GDNF-рецепторов в образцах обеих групп.

Установлено, что интенсивность реакции с антителами к общим ERK1/2 и JNK1/2 не отличалась между группами. В опытной группе реакция с антителами к фосфо-ERK1/2 (p-ERK1/2) протекала интенсивнее в эпителии, в то время как реакция к фосфо-JNK1/2 (p-JNK1/2) протекала интенсивнее в строме роговиц на 5-е и 10-е сутки после повреждения. Результаты иммуногистохимического исследования представлены на рисунке 6.

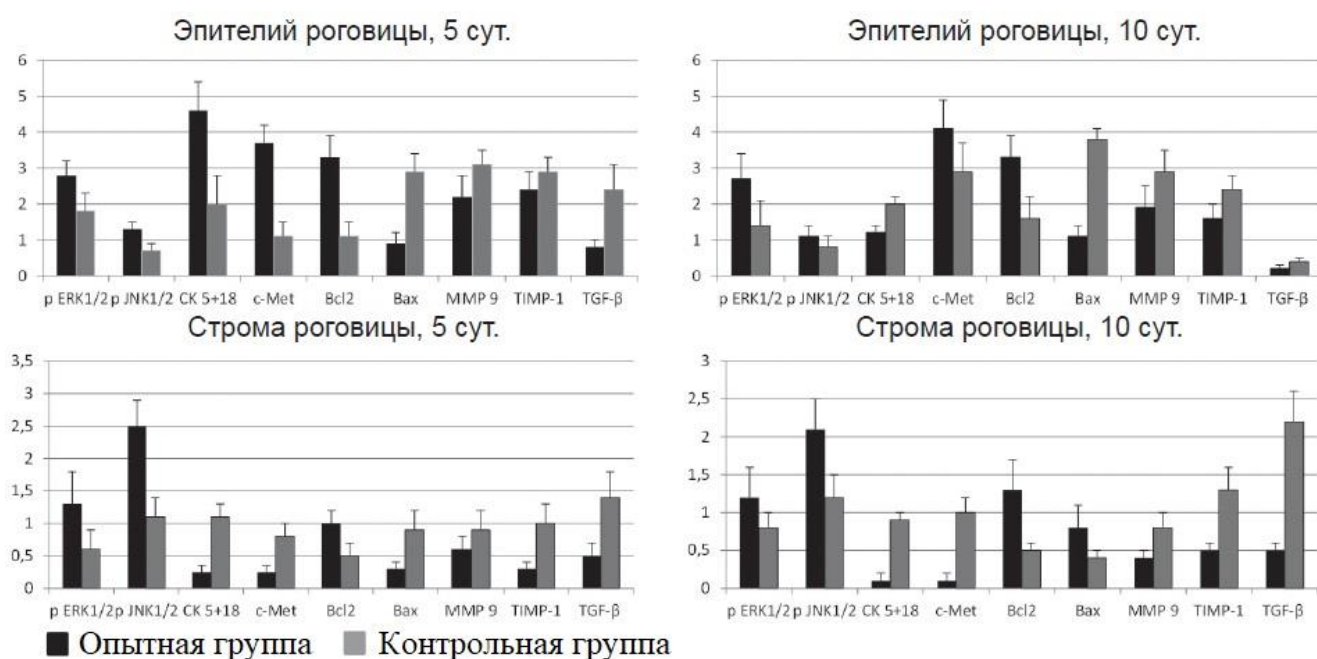


Рисунок 6 – Результаты балльной оценки интенсивности иммуногистохимической реакции эпителия и стромы роговицы опытной и контрольной групп на 5-е и 10-е сутки после повреждения с антителами к p-ERK1/2, p-JNK1/2, цитокератинам 5 и 18 типов, c-Met, Bcl2, Bax, MMP9, TIMP-1 и TGF-β

Полученные данные свидетельствуют о повышении пролиферативной активности эпителиоцитов и кератоцитов через MAP-киназный каскад сигнальных путей. Пролиферативная активность эпителиальных клеток и кератоцитов в опытной группе подтверждалась выраженной реакцией на 5-е и 10-е сутки с антителами к Ki67. Так, на 5-е сутки в опытной группе  $14,9 \pm 2,3$  % клеток стромы и  $5,2 \pm 2,0$  % клеток эпителия были Ki67-иммунопозитивными. В контрольной группе Ki67-иммунопозитивными оказались  $4,7 \pm 1,4$  % клеток стромы и  $1,0 \pm 0,4$  % клеток эпителия. На 10-е сутки в опытной группе  $6,5 \pm 2,1$  % клеток стромы и  $2,2 \pm 0,3$  % клеток эпителия оставались Ki67-иммунопозитивными, в то время как в контрольной группе Ki67-иммунопозитивными были  $1,6 \pm 0,4$  % клеток стромы, Ki67-иммунопозитивные клетки эпителия не определялись. Были обнаружены статистически значимые отличия между группами ( $p < 0,05$ ).

В опытной группе на сроке наблюдения в 5 суток установлена более выраженная реакция с антителами к цитокератинам 5 и 18 типов во всех слоях сформированного эпителия по сравнению с контрольной группой (рисунок 7).

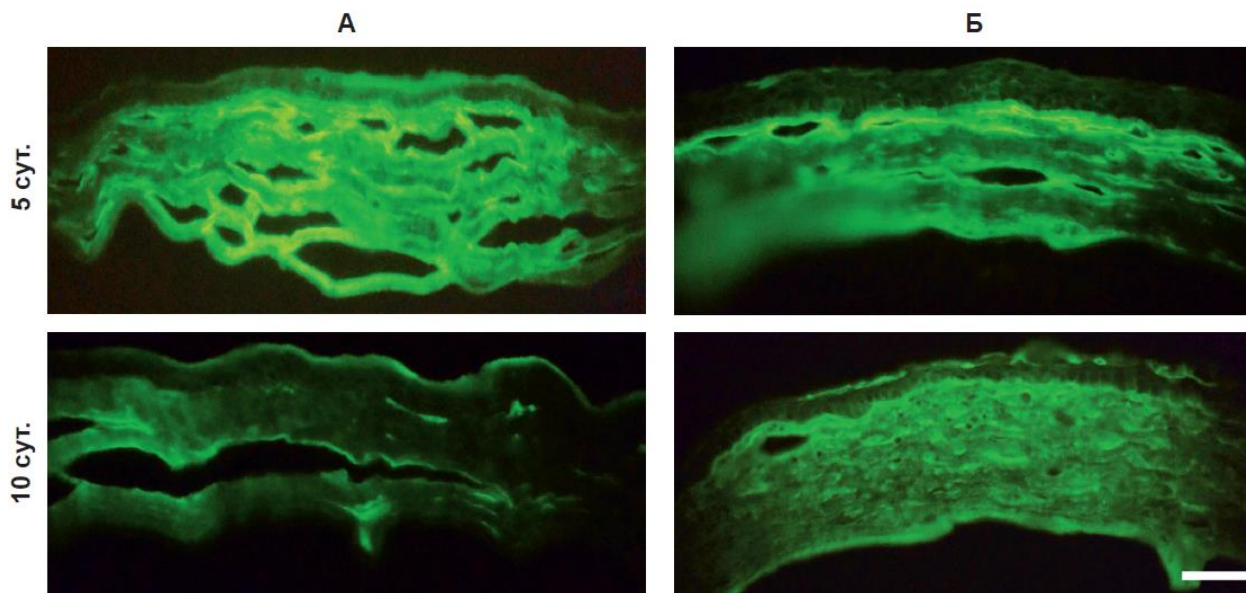


Рисунок 7 – Иммунофлуоресцентное исследование. Экспрессия цитокератинов 5 и 18 типов в роговице опытной (А) и контрольной (Б) групп на 5 и 10 сутки после эпителиально-стромального повреждения.

Масштабный отрезок – 50 мкм

Выраженная реакция клеток эпителия с антителами к цитокератинам 5 и 18 в опытной группе типов характеризует его функциональную зрелость и физиологический характер эпителизации. При этом в контрольной группе аналогичная реакция протекала неравномерно позитивно, отображением чего является неравномерный процесс эпителизации. Позитивная реакция в базальной мембране и поверхностных слоях стромы может быть обусловлена активной эпителиальной миграцией с формированием содержащих эпителиальные клетки полостей. На 10-е сутки в опытной группе, в отличие от контрольной группы, наблюдалась полная эпителизация.

На 5-е сутки в области базальной мембраны опытной группы определялась равномерная позитивная реакция с антителами к коллагену IV типа, способствующего адгезии эпителиальных клеток. При этом в контрольной группе данная реакция протекала неравномерно.

Также на 5-е сутки в эпителии опытной группы, по сравнению с контрольной группой, наблюдалась более интенсивная позитивная реакция с антителами к с-Met-рецептору фактора роста гепатоцитов (рисунок 8).

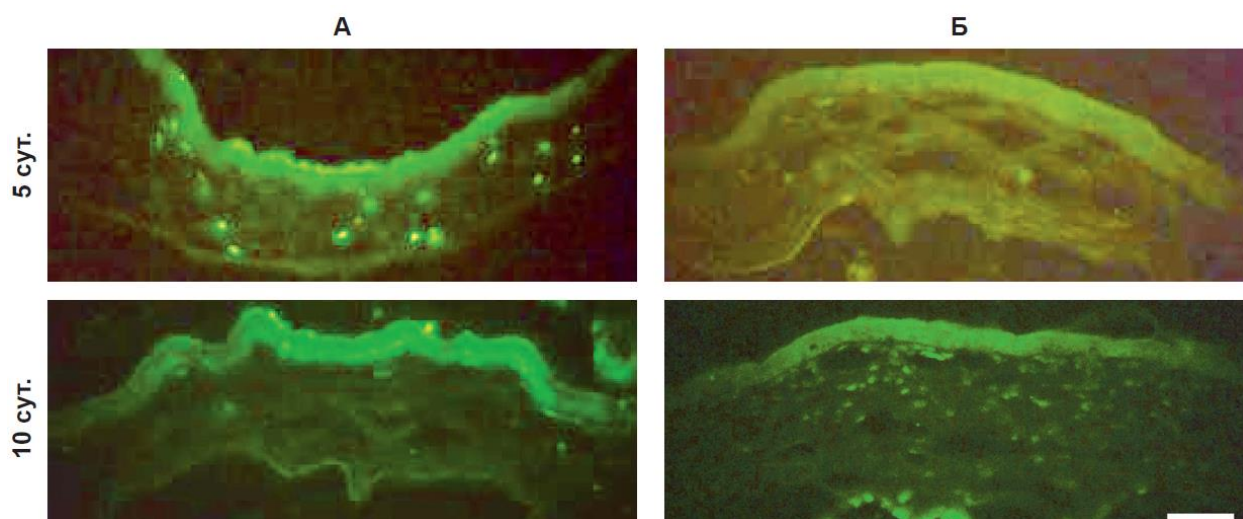


Рисунок 8 – Иммунофлуоресцентное исследование.

Экспрессия с-Met в роговице опытной (А) и контрольной (Б) групп на 5 и 10 сутки после эпителиально-стромального повреждения.

Масштабный отрезок – 50 мкм

Позитивная реакция к с-Met-рецептору в строме роговицы контрольной группы на 5-е и 10-е сутки может свидетельствовать о процессе активации эпителиальной миграции в строму и её ремоделировании. Механизм связывания фактора роста гепатоцитов (HGF) с с-Met-рецептором в очаге повреждения роговицы приводит к активации MAP-киназного (ERK1/2) и фосфатидилинозитол-3-киназного (PI3K/AKT) путей в результате чего реализуется антиапоптотический механизм действия и активируются процессы пролиферации и миграции эпителиальных клеток.

В эпителии роговиц опытной группы на 5-е и 10-е сутки с момента формирования дефекта роговицы реакция с антителами к Vcl2 была протекала интенсивнее, чем в контрольной группе (рисунок 9). При этом реакция с антителами к Вах в эпителии роговиц контрольной группы в те же сроки наблюдения протекала интенсивнее, чем в опытной группе (рисунок 10).

Высокий уровень антиапоптозных маркеров в опытной группе и проапоптозных маркеров в контрольной – может свидетельствовать об антиапоптотическом эффекте GDNF.

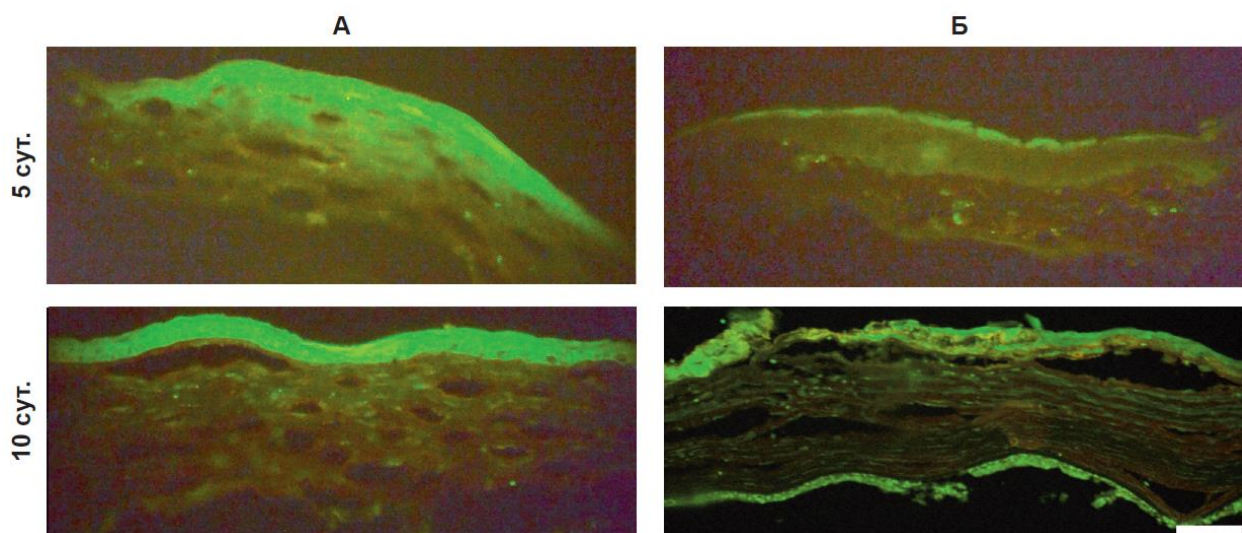


Рисунок 9 – Иммунофлуоресцентное исследование.

Экспрессия Vcl2 в роговице опытной (А) и контрольной (Б) групп на 5 и 10 сутки после эпителиально-стромального повреждения.

Масштабный отрезок – 50 мкм

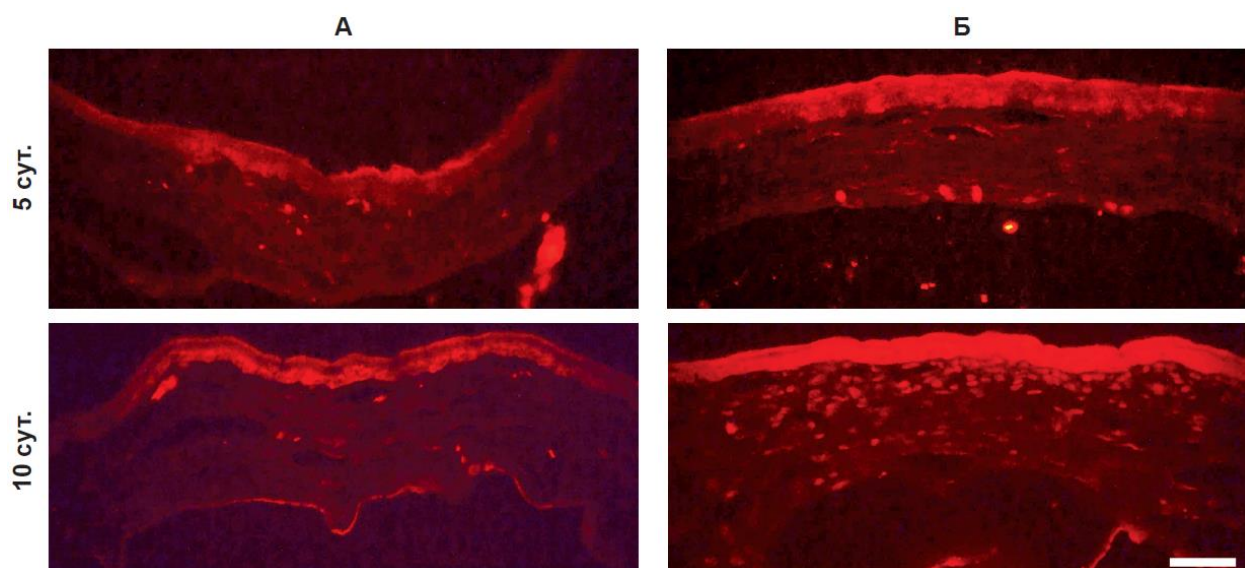


Рисунок 10 – Иммунофлуоресцентное исследование.  
 Экспрессия Вах в роговице опытной (А) и контрольной (Б) групп  
 на 5 и 10 сутки после эпителиально-стромального повреждения.

Масштабный отрезок – 50 мкм

На сроке наблюдения 5 и 10 суток с момента повреждения роговицы реакция с антителами к матриксной ММР9 протекала интенсивнее в эпителии роговиц контрольной группы. Подобная реакция характеризует процессы разрушения базальной мембраны эпителия, деградации  $\alpha\beta 4$ -интегрина, что затрудняет адгезию и миграцию эпителиальных клеток (рисунок 11).

В контрольной группе также наблюдалась более выраженная реакция с антителами к ингибитору металлопротеиназ ТИМР-1 в эпителии, базальной мембране и прилежащих слоях стромы на сроке наблюдения 10 суток с момента повреждения роговиц. Избыток ТИМР-1 в контрольной группе может свидетельствовать об аномальном накоплении матрикса и активации процессов, связанных с фиброзом. На 5-е и 10-е сутки с момента формирования эпителиального дефекта роговиц в опытной группе была выявлена слабая реакция с антителами к TGF- $\beta$  и значительно более интенсивная – в роговицах контрольной группы, что также объясняется более выраженными процессами фиброобразования в роговицах контрольной группы.

Количество GAP43-иммунопозитивных нервных волокон в строме на 10-е сутки с момента формирования дефекта было значительно больше в роговицах опытной группы, по сравнению с контрольной группой:  $1150 \pm 336$  и  $376 \pm 156$  волокон в  $1 \text{ мм}^2$  среза, соответственно. Между группами были обнаружены статистически значимые отличия в интенсивности реакции на GAP43 ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, значительно большее количество GAP43-иммунопозитивных нервных волокон в строме роговиц опытной группы является признаком значительно более активного процесса формирования стромального нервного сплетения под влиянием GDNF по сравнению с роговицами контрольной группы к 10-м суткам наблюдения (рисунок 11).

Результаты данного этапа опубликованы в работе: Гаврилова, Н.А. Влияние модифицированного глиального нейротрофического фактора (GDNF) на регенерацию эпителиального и эпителиально-стромального дефектов роговицы в эксперименте / Н.А. Гаврилова, А.В. Ревещин, С.А. Борзенко, М.Б. Агаммедов [и др.] // Гены и клетки. – 2016. – т. 11. – № 3. – С. 54-62.

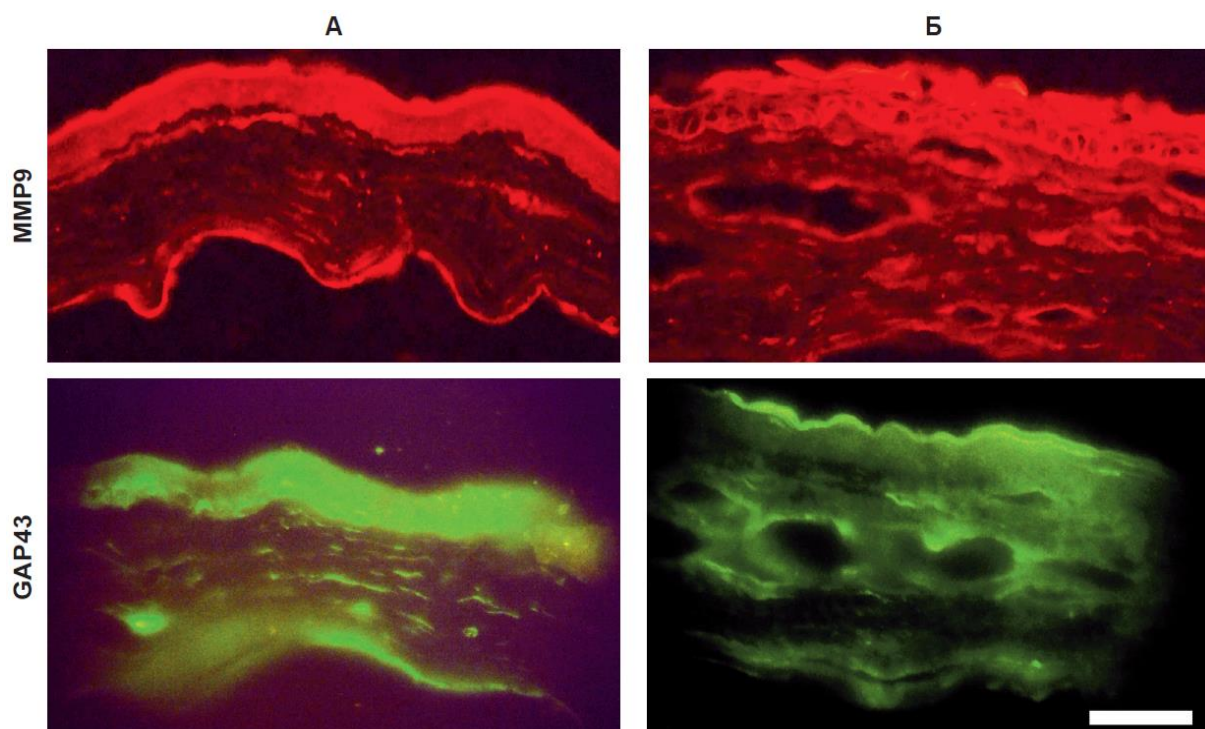


Рисунок 11 – Иммунофлуоресцентное исследование.

Экспрессия MMP9 (красный) и GAP43 (зеленый) в роговице опытной (А) и контрольной (Б) групп на 10-е сутки. Масштабный отрезок – 50 мкм

### **3.2. Результаты разработки и анализа биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка для доставки глиального нейротрофического фактора в область дефекта роговицы**

На данном этапе была получена и изучена конструкция на основе фиброина шелка, которую возможно использовать для доставки глиального нейротрофического фактора в зону эпителиального и эпителиально-стромального повреждения роговицы. Проведенные на данном этапе работы исследования включали световую микроскопию, сканирующую электронную микроскопию, сканирующую зондовую нанотомографию, а также изучение механических свойств полученных биodeградируемых конструкций.

#### **3.2.1. Результаты получения биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка**

Данное исследование выполнялось в Лаборатории бионанотехнологий при ФГБУ "НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова" Минздрава России под руководством заведующего лабораторией д.б.н., профессора Игоря Ивановича Агапова.

Были получены 4 вида матриц – биodeградируемых конструкций в виде пленок. Все биodeградируемые конструкции были созданы на основе фиброина шелка и желатина: 3 вида полученных биodeградируемых конструкций содержали глиальный нейротрофический фактор (GDNF) в разных концентрациях – 50 нг/мл, 250 нг/мл и 500 нг/мл. Оставшийся вид – не содержал GDNF.

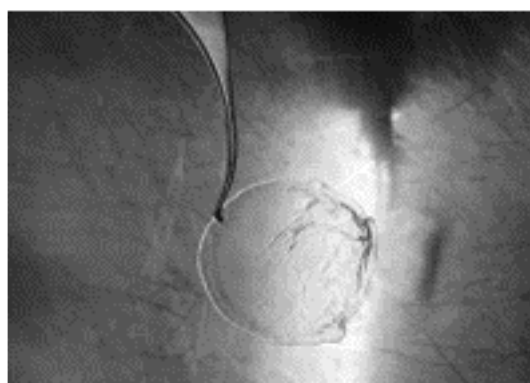


Рисунок 12 – Общий вид используемой биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка

### 3.2.2. Результаты сканирующей электронной микроскопии полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка

В результате проведенной сканирующей электронной микроскопии полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка была изучена её ультраструктура и рельеф поверхности. Было установлено, что все полученные биodeградируемые конструкции (пленки) имели характерный для данных образований нанорельеф, что проявлялось в виде шероховатостей их поверхности при отсутствии пор. Толщина полученных конструкций была равномерной на всем протяжении оцениваемого участка и составила 45-50 мкм. Изображения полученных биodeградируемых конструкций, полученные при помощи сканирующей конфокальной микроскопии, представлены на рисунке 13.

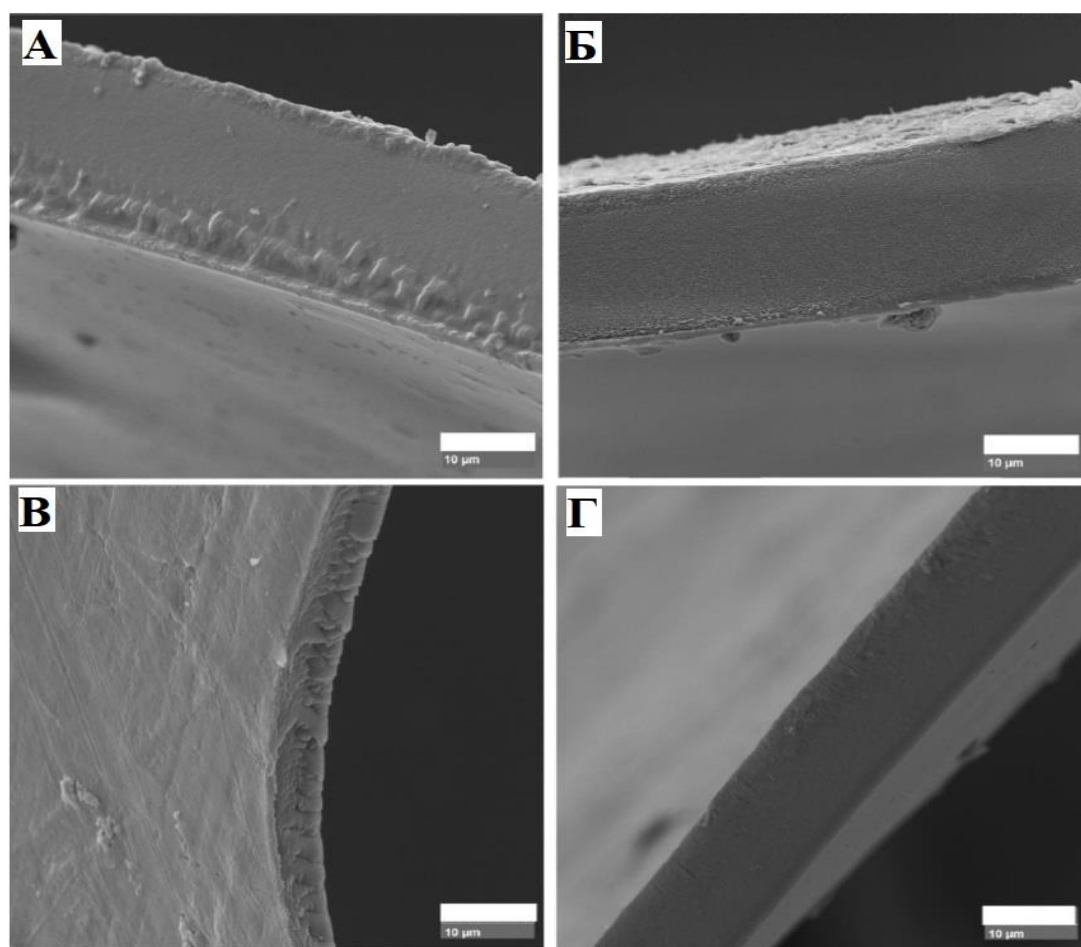


Рисунок 13 – Сканирующая электронная микроскопия.

Поперечные сечения полученных биodeградируемых конструкций с концентрациями GDNF: А – 0 нг/мл; Б – 50 нг/мл; В – 250 нг/мл; Г – 500 нг/мл



### 3.2.3. Результаты сканирующей зондовой нанотомографии полученных биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка

Данное исследование проводилось на базе Лаборатории бионанотехнологий при ФГБУ "НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова" Минздрава России под руководством доктора биологических наук Антона Евгеньевича Ефимова.

В результате проведенного исследования внутренней структуры полученных биodeградируемых конструкций методом сканирующей зондовой нанотомографии с высоким разрешением было установлено, что все биodeградируемые конструкции имеют одинаковую структуру из плотно упакованных глобул фиброина с размерами в диапазоне от 15 до 30 нм. Усредненные ( $n = 5$ ) количественные параметры измерения каждой биodeградируемой конструкции представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Количественные характеристики наноструктуры биodeградируемых конструкций, полученные в результате измерений поперечных сечений на сканирующем зондовом микроскопе

Исследуемые характеристики	Концентрация глиального нейротрофического фактора в биodeградируемой конструкции, нг/мл			
	0	50	250	500
Высота	$43,19 \pm 4,5$	$45,9 \pm 4,5$	$64,7 \pm 5,3$	$53,3 \pm 5,1$
Средняя шероховатость ( $R_a$ ), нм	$3,69 \pm 0,14$	$3,72 \pm 0,14$	$4,96 \pm 0,26$	$4,76 \pm 0,27$
Среднеквадратичное значение высоты (RMS), нм	$4,66 \pm 0,12$	$4,63 \pm 0,11$	$6,37 \pm 0,37$	$5,98 \pm 0,32$
Средняя плотность глобул ( $1/\mu\text{км}^2$ )	$512,2 \pm 22,8$	$524,4 \pm 26,2$	$352,8 \pm 21,4$	$408,2 \pm 22,6$
Средний диаметр глобулы, нм	$19,3 \pm 2,7$	$19,6 \pm 2,5$	$26,4 \pm 2,9$	$24,1 \pm 2,8$

В результате проведенного анализа полученных данных установлено, что все параметры, включая изменение высоты от пика к пику, среднюю шероховатость ( $R_a$ ) и среднеквадратичное отклонение значений распределения высот (RMS), а также диаметры и плотности глобул (взяты как количество глобул, обнаруженных на квадратный микрон) контрольной биodeградируемой конструкции без добавления GDNF очень похожи на структуру биodeградируемой конструкции с концентрацией GDNF 50 нг/мл. В то же время для биodeградируемых конструкций с концентрациями GDNF 250 нг/мл и 500 нг/мл параметры среднего диаметра глобул и средней шероховатости/среднеквадратичного значения высоты оказались выше, но средняя плотность глобул – ниже по сравнению с контрольным образцом. Полученные в ходе сканирующей зондовой нанотомографии изображения внутренней структуры биodeградируемых конструкций с различными концентрациями GDNF представлены на рисунке 14, соответствующие топографические профили – на рисунке 15.

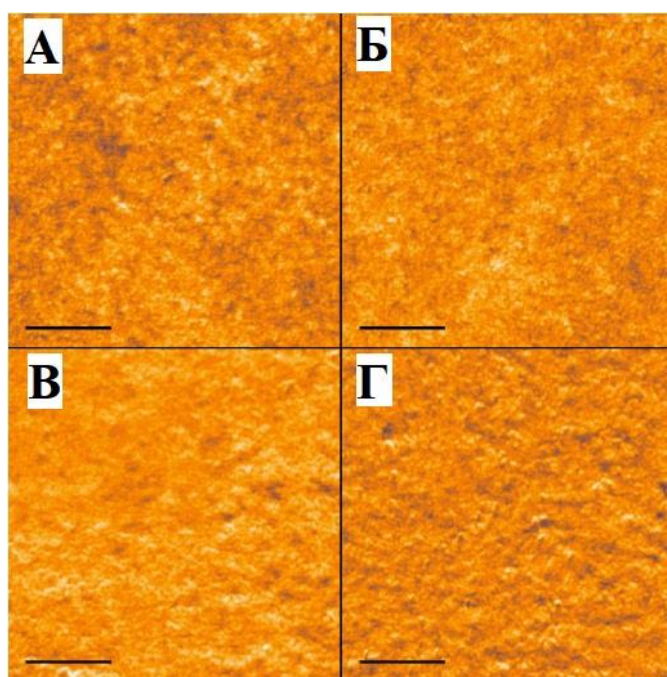


Рисунок 14 – Сканирующая зондовая нанотомография.

Внутренняя структура поперечных сечений полученных биodeградируемых конструкций после ультрамикротомии ( $4,0 \times 4,0$  мкм каждая, изменение высоты – 40 нм) с концентрациями глиального нейротрофического фактора: А – 0 нг/мл, Б – 50 нг/мл, В – 250 нг/мл, Г – 500 нг/мл. Масштабный отрезок 1 мкм

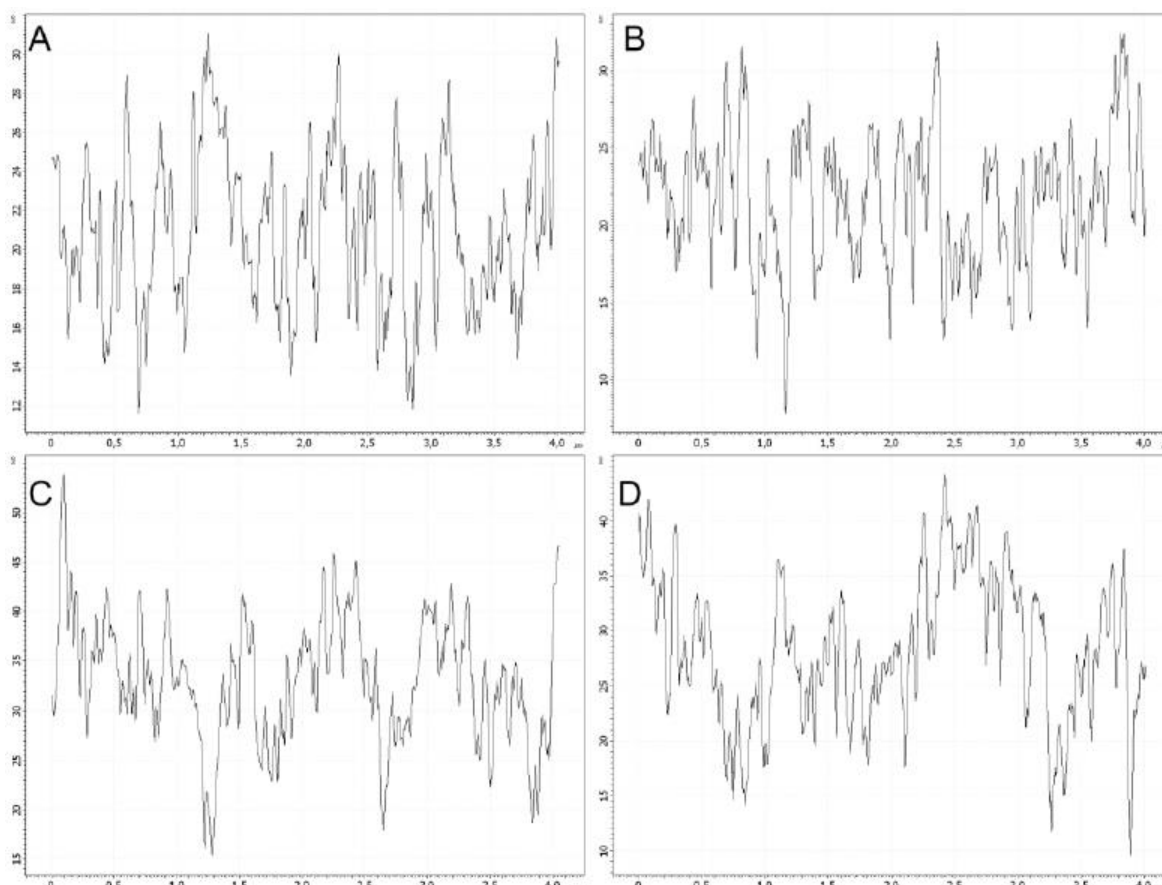


Рисунок 15 – Сканирующая зондовая микроскопия.

Топографические профили поверхностей срезов биodeградируемых конструкций после ультрамикротомии (длина профиля 4,0 x 4,0 мкм каждая), с концентрациями глиального нейротрофического фактора:

A – 0 нг/мл; B – 50 нг/мл; C – 250 нг/мл; D – 500 нг/мл

### 3.2.4. Результаты оценки механических свойств полученных биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка

В данном разделе исследования была проведена оценка механических свойств полученных биodeградируемых конструкций. В результате проведенных измерений не было обнаружено статистически значимых отличий между биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка с концентрациями глиального нейротрофического фактора 0 нг/мл, 50 нг/мл, 250 нг/мл, 500 нг/мл.

Было установлено, что средний предел прочности на растяжение у полученных биodeградируемых конструкций составляет 25-50 МПа, упругость – 3-8 %. Полученные характеристики механических свойств представлены на рисунке 16.

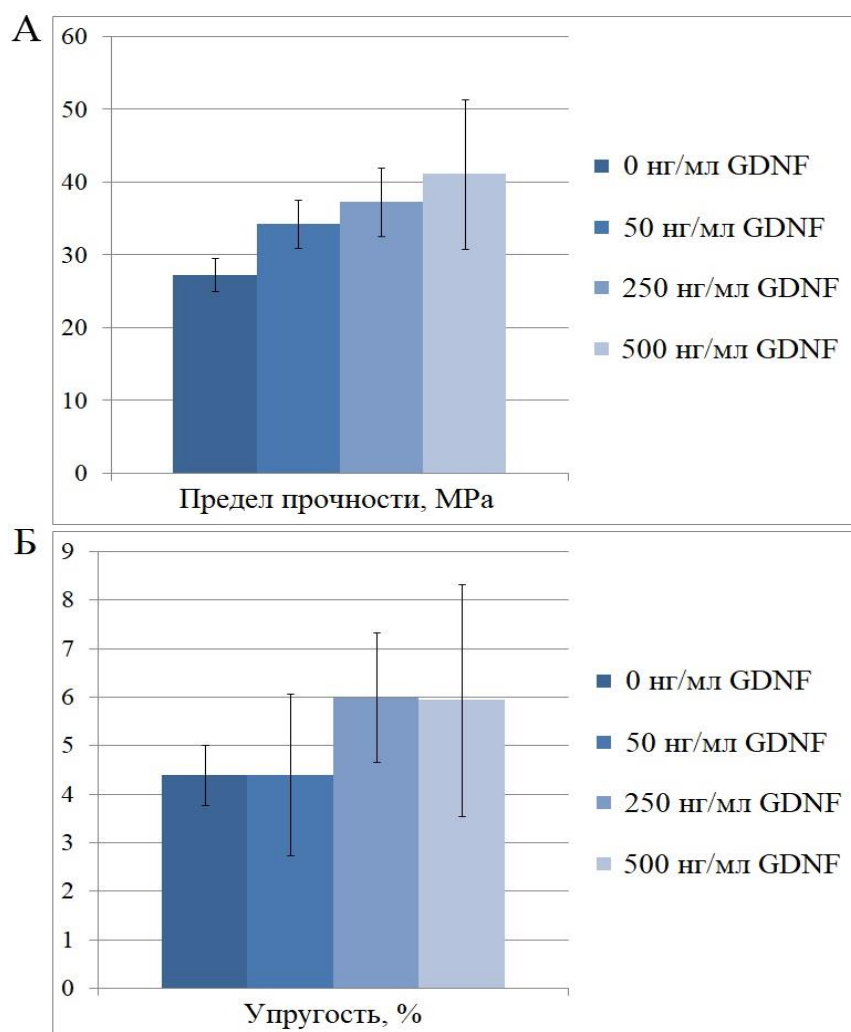


Рисунок 16 – Механические свойства каркасов.

А – предел прочности при растяжении, МПа; Б – упругость, %

### 3.2.5. Результаты оценки скорости биodeградации полученных конструкций на основе фиброина шелка

В данном разделе исследования была проведена оценка скорости биodeградации полученных конструкций на основе фиброина шелка. В результате проведенного анализа процесса деградации конструкций в эксперименте *in vitro* было установлено, что биodeградируемые конструкции разлагаются в фосфатно-

солевом буфере через 7 дней. Пример изменения массы сухого вещества биodeградируемой конструкции, содержащей глиальный нейротрофический фактор в концентрации 250 нг/мл, представлен на рисунке 17.

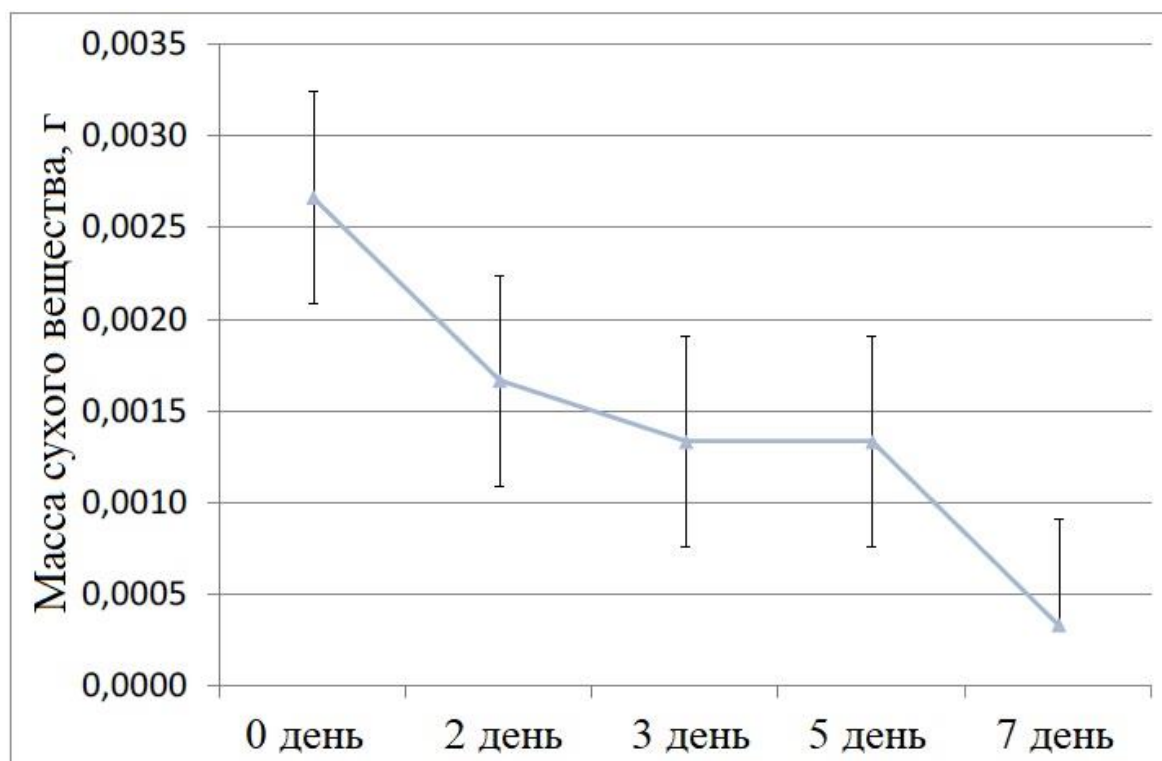


Рисунок 17 – Динамика изменения массы сухого вещества биodeградируемой конструкции, содержащей глиальный нейротрофический фактор в концентрации 250 нг/мл, в фосфатно-солевом буфере в течение 7 дней

Наблюдался аналогичный характер деградации также в образцах биodeградируемых конструкций без глиального нейротрофического фактора, а также с глиальным нейротрофическим фактором в концентрациях 50 нг/мл и 500 нг/мл.

В результате проведенного анализа полученных данных было установлено, что процесс деградации был устойчивым и характеризовался постепенным набуханием биodeградируемых конструкций с последующим дроблением и растворением фрагментов исследуемых биodeградируемой конструкции на основе фибрина шелка.

### 3.2.6. Результаты оценки интенсивности высвобождения глиального нейротрофического фактора из полученных биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка

В данном разделе исследования была проведена оценка интенсивности и характера высвобождения глиального нейротрофического фактора из полученных биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка, содержащих указанный фактор в концентрациях 50 нг/мл, 250 нг/мл и 500 нг/мл, и находящихся в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) в течение 7 дней. Оценку высвобождения глиального нейротрофического фактора проводили в течение 7 дней, чтобы соответствовать продолжительности экспериментальной части данного исследования (рисунок 18).

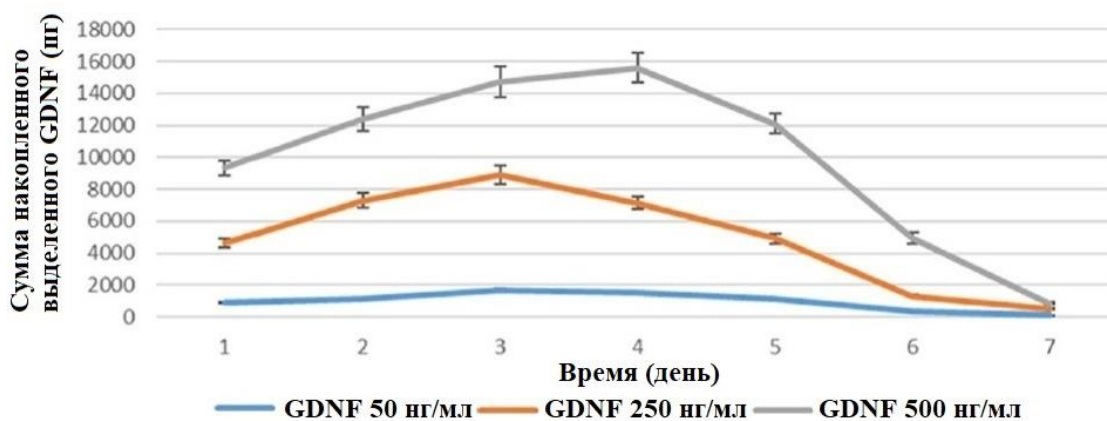


Рисунок 18 – Динамика и характер высвобождения глиального нейротрофического фактора из полученных биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка

Результаты ежедневной оценки количества высвобожденного глиального нейротрофического фактора из полученных биodeградируемых конструкций в течение 7 суток эксперимента представлены на рисунке 19. Общее количество глиального нейротрофического фактора, высвобожденного из биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка, на 7-е сутки составило  $90,4 \pm 4 \%$  в группе,

содержащей 50 нг/мл GDNF,  $92,92 \pm 6 \%$  в группе, содержащей 250 нг/мл GDNF и  $92,75 \pm 6 \%$  в группе, содержащей 500 нг/мл GDNF.

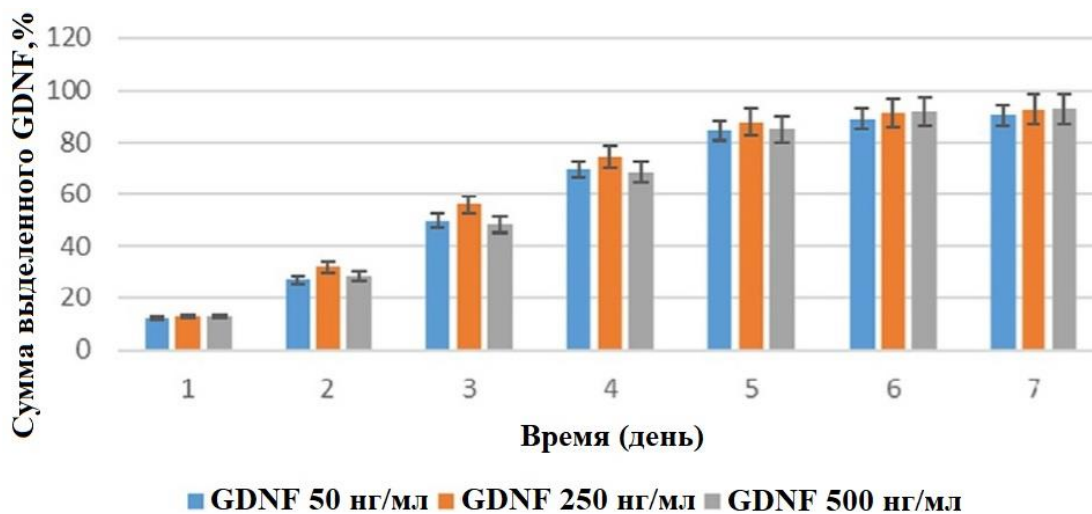


Рисунок 19 – Динамика высвобождения и накопления глиального нейротрофического фактора в процессе биodeградации полученных конструкций

Результаты данного этапа исследования опубликованы в работе: Gavrilova, N.A. The effect of biodegradable silk fibroin-based scaffolds containing glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) on the corneal regeneration process / N.A. Gavrilova, S.A. Borzenok, A.V. Revishchin, M.B. Agammedov [et al] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – т. 185 – С. 264-276.

### **3.3. Результаты оценки безопасности полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка в ходе культивирования совместно с кератоцитами роговицы человека**

На данном этапе работы в эксперименте *in vitro* оценивалось влияние полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка на кератоциты в процессе совместного культивирования. Для этого вначале из трупных донорских роговиц были получены клеточные культуры кератоцитов. Фенотип полученных клеточных культур подтверждался в ходе иммуноцитохимического анализа. Жизнеспособность клеточных культур

кератоцитов оценивалась с использованием флуоресцентного красителя «Live and Dead». Полученные кератоциты разделялись на блоки: во 2, 3 и 4 блоках при культивировании кератоцитов использовали биodeградируемые конструкции на основе фиброина шелка, содержащие GDNF в концентрации 50 нг/мл, 250 нг/мл и 500 нг/мл соответственно; в 1 блоке культивирование кератоцитов проводилось без биodeградируемых конструкций и без GDNF (контроль); в 5 блоке – с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка, без содержания GDNF. В процессе культивирования на 3, 5 и 9 сутки проводили анализ жизнеспособности клеточных культур.

### **3.3.1. Результаты выделения и культивирования кератоцитов роговицы человека**

На данном этапе работы из трупных донорских роговиц были получены кератоциты, которые затем были культивированы и использовались на последующих этапах. Морфология полученных клеточных культур представлена на рисунке 20.

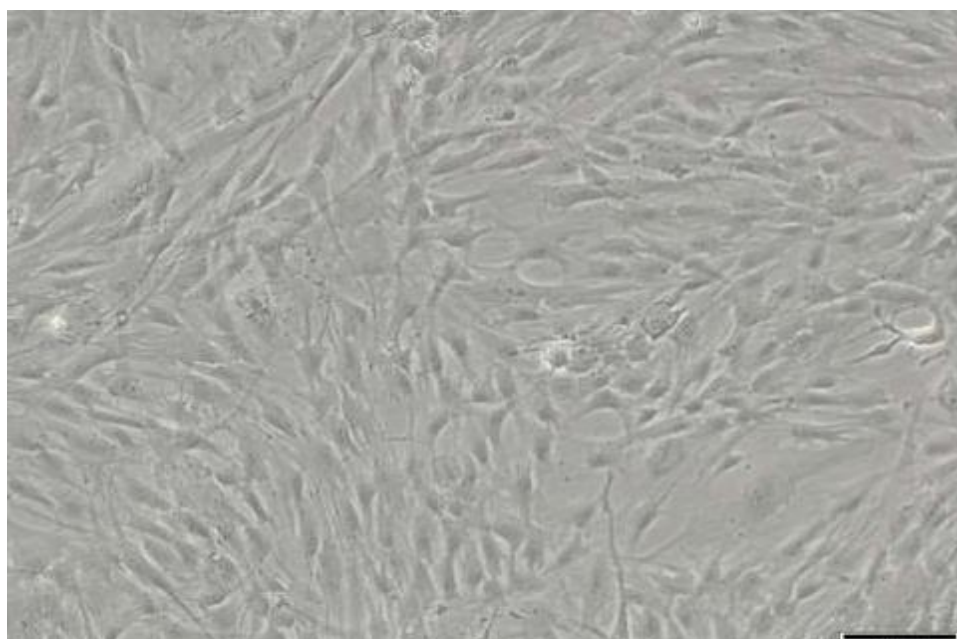


Рисунок 20 – Морфология клеточной культуры кератоцитов.

Световая фазово-контрастная микроскопия ув. 100х



### 3.3.2. Культивирование кератоцитов с полученной биodeградируемой конструкцией на основе фиброина шелка, содержащей глиальный нейротрофический фактор

На данном этапе исследования полученные из трупных донорских роговиц кератоциты были культивированы совместно с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка.

Морфология полученных клеточных культур (блок №1) на сроках наблюдения 3, 5 и 9 сутки представлена на рисунке 21.

Морфология кератоцитов на 3, 5 и 9 сутки культивирования с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка, содержащими рекомбинантный глиальный нейротрофический фактор в концентрациях 50 нг/мл (блок №2), 250 нг/мл (блок №3) и 500 нг/мл (блок №4) представлена на рисунке 22.

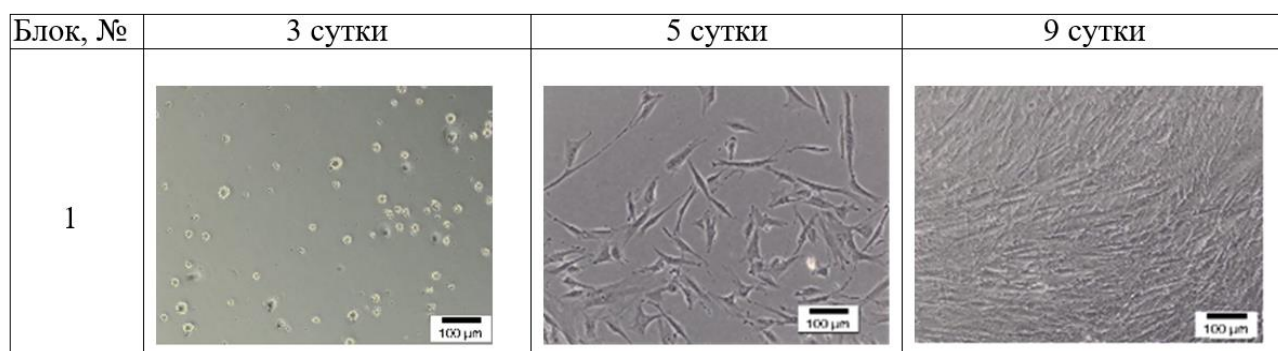


Рисунок 21 – Морфология клеточных культур кератоцитов (блок №1) на сроках наблюдения 3, 5 и 9 сутки

Результаты данного этапа исследования опубликованы в работе: Gavrilova, N.A. The effect of biodegradable silk fibroin-based scaffolds containing glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) on the corneal regeneration process / N.A. Gavrilova, S.A. Borzenok, A.V. Revishchin, M.B. Agammedov [et al] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – т. 185 – С. 264-276.

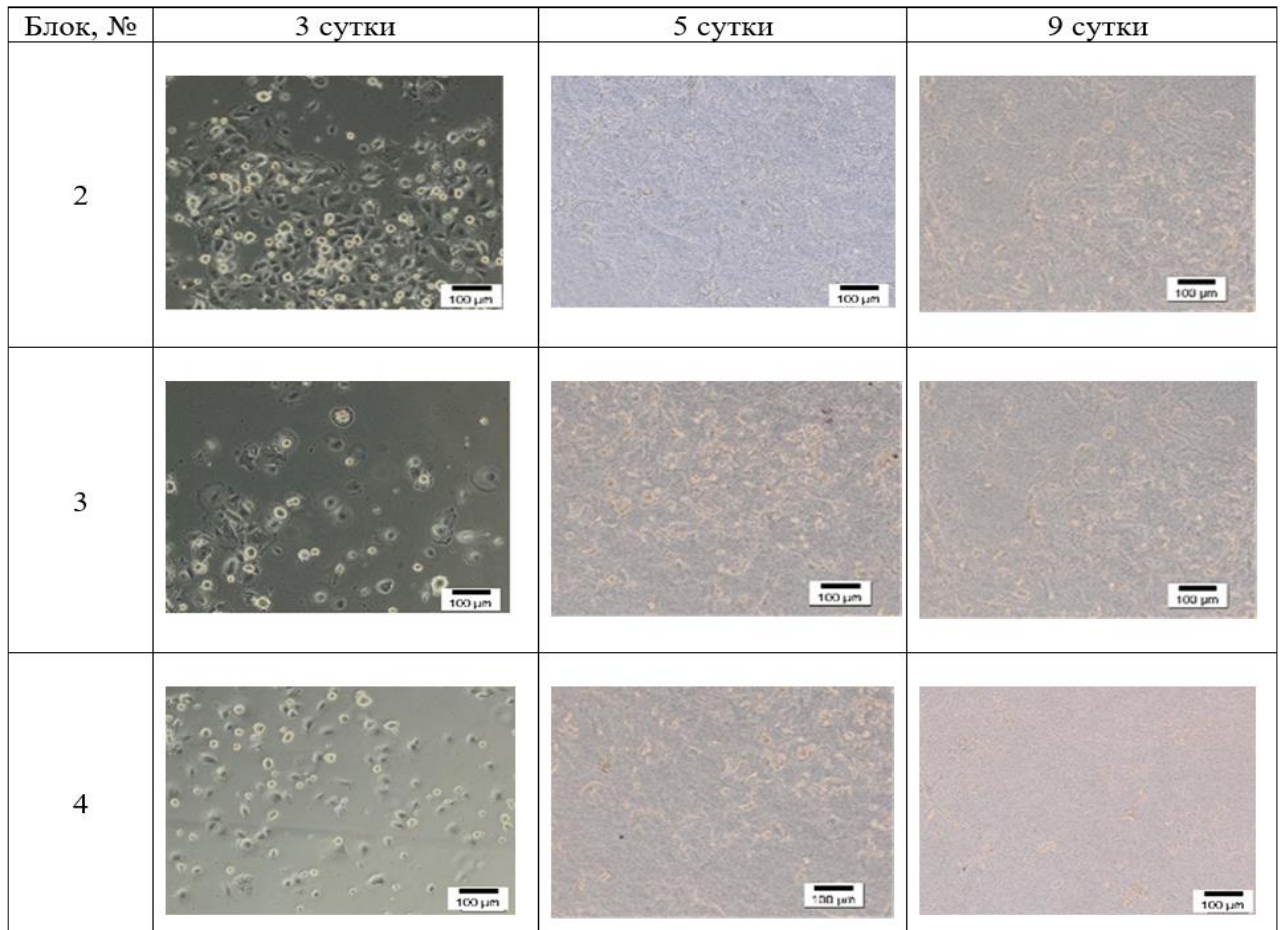


Рисунок 22 – Морфология клеточных культур кератоцитов (блоки №2, №3, №4) на сроках наблюдения 3, 5 и 9 сутки

Морфология кератоцитов на 3, 5 и 9 сутки культивирования с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка без содержания глиального нейротрофического фактора (блок №5) представлена на рисунке 23.

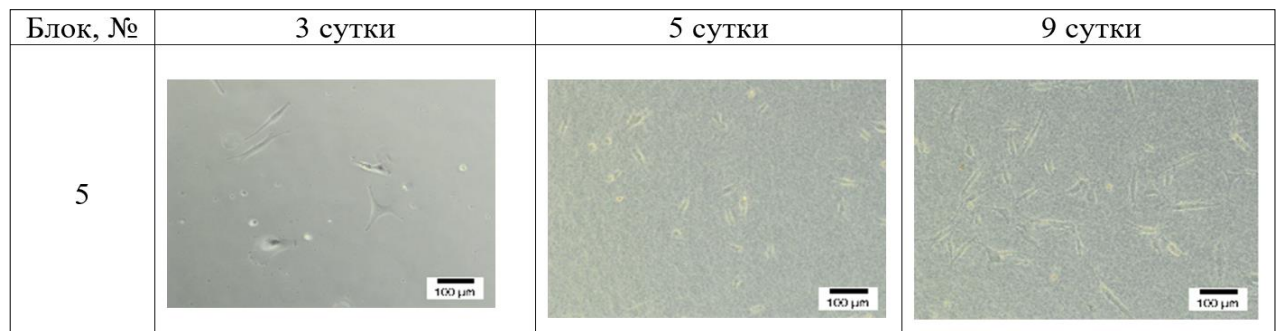


Рисунок 23 – Морфология клеточных культур кератоцитов (блок №5) на сроках наблюдения 3, 5 и 9 сутки

### 3.3.3. Результаты оценки жизнеспособности полученных клеточных культур кератоцитов после совместного культивирования с биodeградируемыми конструкциями, содержащими глиальный нейротрофический фактор

Конъюгированный с флуоресцентным красителем аннексин V использовался в качестве маркера для обнаружения клеток на стадии апоптоза. Витальный краситель 7-амино-актиномицин (7-AAD) использовался для идентификации необратимо поврежденных клеток. Мембраны жизнеспособных и неповрежденных клеток не проницаемы для 7-AAD, тогда как мембраны мертвых и поврежденных клеток для 7-AAD проницаемы.

В результате оценки жизнеспособности кератоцитов на 3, 5 и 9 сутки при культивировании без биodeградируемых конструкций, с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка с глиальным нейротрофическим фактором в различных концентрациях и биodeградируемых конструкций без глиального нейротрофического фактора достоверных различий выявлено не было, большинство клеток (90,38 - 97,89%) оставалось жизнеспособными.

Результаты оценки жизнеспособности клеток при культивировании на 3 и 5 сутки представлены в таблице 8, на 9-е сутки – в таблице 9.

Таблица 8 – Жизнеспособность клеток на 3 и 5 сутки

	3 сутки				5 сутки			
	AnV– 7AAD– Живые клетки	AnV+ 7AAD– Апоптоз	AnV+ 7AAD+ Мертвые Клетки	AnV– 7AAD+ Некроз	AnV– 7AAD– Живые клетки	AnV+ 7AAD– Апоптоз	AnV+ 7AAD+ Мертвые клетки	AnV– 7AAD+ Некроз
<b>Контроль</b>	96,5% ± 1,9	3% ± 0,1	0,5% ± 0,06	0%	97,89% ±2,1	2% ± 0,2	0,11% ±0,01	0%
<b>Пленка GDNF 50 нг/мл</b>	95,6% ± 1,8	4% ± 0,1	0,4 % ± 0,05	0%	94,9% ±1,7	4,7% ± 0,2	0,4% ±0,02	0%
<b>Пленка GDNF 250 нг/мл</b>	95,2% ± 1,5	4,8% ± 0,3	0%	0%	94,5% ±1,9	4,5 % ± 0,1	1% ±0,05	0%

продолжение таблицы на странице 84

продолжение таблицы 8								
<b>Пленка GDNF 500 нг/мл</b>	92,4% ± 1,6	7 % ± 0,2	0,6% ± 0,05	0%	93,7% ± 2,1	5% ± 0,5	1,3% ± 0,1	0%
<b>Пленка без GDNF</b>	90,38% ± 2,5	9% ± 0,5	0,62% ± 0,06	0%	97% ± 2,5	3% ± 0,6	0%	0%

Таблица 9 – Жизнеспособность клеток на 9 сутки

	9 сутки			
	AnV– 7AAD– Живые клетки	AnV+ 7AAD– Апоптоз	AnV+ 7AAD+ Мертвые клетки	AnV– 7AAD+ Некроз
<b>Контроль</b>	94% ± 2,4	4% ± 0,1	2% ± 0,1	0%
<b>Пленка GDNF 50 нг/мл</b>	96% ± 2,5	3% ± 0,3	1% ± 0,1	0%
<b>Пленка GDNF 250 нг/мл</b>	95% ± 2,7	4% ± 0,2	1% ± 0,1	0%
<b>Пленка GDNF 500 нг/мл</b>	92% ± 2,3	6% ± 0,7	2% ± 0,2	0%
<b>Пленка без GDNF</b>	95% ± 2,0	5% ± 0,3	0%	0%

### 3.4. Результаты оценки эффективности полученной биodeградируемой конструкции в эксперименте *in vitro*

В данном разделе исследования в эксперименте *in vitro* оценивалась эффективность биodeградируемых конструкций, содержащих глиальный нейротрофический фактор. Для этого полученные клеточные культуры кератоцитов культивировались совместно с биodeградируемыми конструкциями, содержащими различные концентрации глиального нейротрофического фактора, после чего проводилась оценка пролиферативной активности при помощи автоматизированного счетчика клеток.

Результаты данного этапа исследования опубликованы в работах: Gavrilova, N.A. The effect of biodegradable silk fibroin-based scaffolds containing glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) on the corneal regeneration process / N.A. Gavrilova, S.A. Borzenok, A.V. Revishchin, M.B. Agammedov [et al] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – т. 185 – С. 264-276; Агаммедов, М.Б.

Оценка пролиферативной активности кератоцитов после культивирования совместно с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка. / М.Б. Агаммедов, Д.С. Островский, М.Х. Хубецова [и др.] // Патогенез. – 2023. т. 21 – № 1. – С. 75-78.

### **3.4.1. Пролиферативная активность клеточных культур кератоцитов при культивировании совместно с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка**

Для оценки пролиферативной активности кератоцитов в блоках 1-5 на 3, 7 и 9 сутки клеточного культивирования проводили подсчет клеток в автоматизированном счетчике клеток.

На 1 и 3 сутки культивирования кератоцитов без биodeградируемых конструкций, совместно с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина, содержащими глиальный нейротрофический фактор в различной концентрации и без него, их пролиферативная активность не отличалась ( $p > 0,05$ ).

На 5 сутки пролиферативная активность кератоцитов при использовании биodeградируемых конструкций, содержащих глиальный нейротрофический фактор в концентрации 250 нг/мл и 500 нг/мл, была больше, чем при использовании биodeградируемых конструкций с глиальным нейротрофическим фактором в концентрации 50 нг/мл в 1,5 и 1,6 раза, соответственно, и больше, чем при культивировании без биodeградируемых конструкций в 1,7 и 1,8 раза, соответственно; самая низкая пролиферативная активность кератоцитов наблюдалась при использовании биodeградируемых конструкций без глиального нейротрофического фактора.

На 9 сутки культивирования наиболее высокая пролиферативная активность клеточных культур кератоцитов также наблюдалась в присутствии биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка, содержащих глиальный нейротрофический фактор в концентрации 250 нг/мл и

500 нг/мл. Динамика изменения количества клеток представлена на рисунке 24. Количество кератоцитов на 1, 3, 5 и 9 сутки культивирования с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка с различными концентрациями глиального нейротрофического фактора представлено в таблице 10.

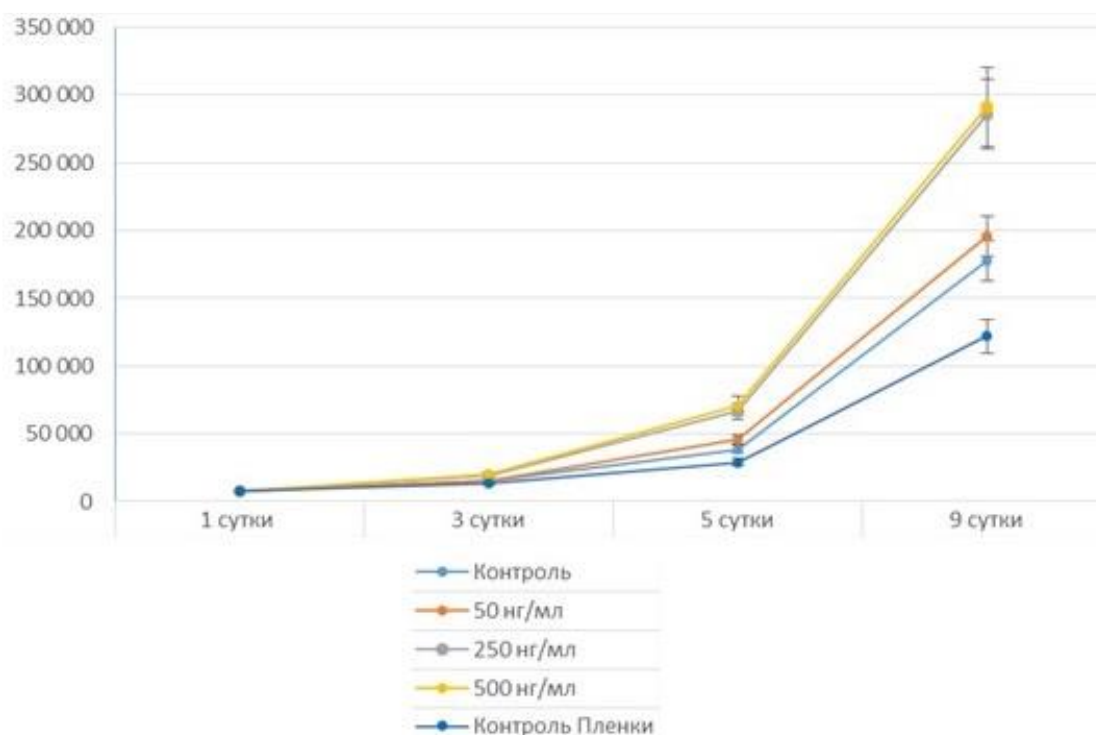


Рисунок 24 – Пролиферативная активность кератоцитов при культивировании с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка, содержащими глиальный нейротрофический фактор в указанных концентрациях

Таблица 10 – Количество кератоцитов при культивировании с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка, содержащими глиальный нейротрофический фактор в различных концентрациях

	1 сутки	3 сутки	5 сутки	9 сутки
Контроль	7500	14850±283,805	38610±519,262	177606±19943,91
50 нг/мл	7500	15720±284,086	45588±461,672	196030±21529,4
250 нг/мл	7500	19000±241,514	66500±548,821	285950±30551,02
500 нг/мл	7500	19600±260,064	71000±564,269	291100±32747,9
Контроль Пленки	7500	13200±272,213	29040±825,126	121960±6962,42

За время культивирования отмечалась постепенная биодegradация фиброиновых биодegradируемых конструкций, что способствовало миграции клеток внутрь биодegradируемой конструкции.

### **3.4.2. Результаты иммуноцитохимического исследования пролиферативной активности клеточных культур кератоцитов после культивирования совместно с полученными биодegradируемыми конструкциями**

Результаты исследования активности белка Ki-67 в клеточной культуре кератоцитов в блоках 1-5 на 1, 3, 5 и 9 сутки представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Процентное соотношение активации белка Ki-67 на 1, 3, 5 и 9 сутки культивирования с биодegradируемыми конструкциями на основе фиброина шелка, содержащими различные концентрации глиального нейротрофического фактора

	<b>1 сутки</b>	<b>3 сутки</b>	<b>5 сутки</b>	<b>9 сутки</b>
Контроль	21% +/- 1,6%	32% +/- 3,2%	36% +/- 4,2%	43% +/- 6,3%
50 нг/мл GDNF	23% +/- 1,8%	35% +/- 3,6%	48% +/- 5,2%	51% +/- 5,8%
250 нг/мл GDNF	22% +/- 1,9%	37% +/- 3,3%	68% +/- 4,6%	83% +/- 6,2%
500 нг/мл GDNF	21% +/- 1,6%	39% +/- 3,1%	65% +/- 4,8%	86% +/- 7,2%
Контроль пленки	22% +/- 1,7%	33% +/- 3,3%	39% +/- 3,5%	44% +/- 6,2%

На 1 и 3 сутки активность белка Ki-67 в культуре кератоцитов была статистически не значима ( $p > 0,05$ ).

На 5 сутки наибольшая активность белка Ki-67 в культуре кератоцитов была определена при использовании биодegradируемых конструкций, содержащих глиальный нейротрофический фактор в концентрации 250 нг/мл и 500 нг/мл; самая

низкая активность белка Ki-67 в культуре кератоцитов наблюдалась при использовании биodeградируемых конструкций без глиального нейротрофического фактора.

На 9 сутки культивирования наиболее высокая активность белка Ki-67 в культуре кератоцитов также наблюдалась в присутствии биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка, содержащих глиальный нейротрофический фактор в концентрации 250 нг/мл и 500 нг/мл.

### **3.5. Результаты оценки эффективности применения полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка для доставки глиального нейротрофического фактора в зону дефекта роговицы в эксперименте *in vivo***

Заключительный этап работы проводили на половозрелых самцах мышей линии C57BL/6J с экспериментальной моделью эпителиально-стромального повреждения роговицы.

В эксперименте изучалось влияние биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка, содержащих глиальный нейротрофический фактор в различных концентрациях на динамику заживления сформированного эпителиально-стромального повреждения роговицы.

Для этого животные были разделены на 6 групп. После эпителиально-стромального повреждения роговицы в 1, 2 и 3 группах использовали биodeградируемые конструкции на основе фиброина шелка, содержащие глиальный нейротрофический фактор в концентрации 50 нг/мл, 250 нг/мл и 500 нг/мл, соответственно.

В 4-й группе применялись биodeградируемые конструкции на основе фиброина шелка, без содержания глиального нейротрофического фактора. В 5-й группе использовался раствор глиального нейротрофического фактора в концентрации 500 нг/мл. Группа 6 являлась контрольной.



Проведен анализ площади эпителиального дефекта роговицы и иммуногистохимическое исследование с использованием антител к Bcl2, Вах, фосфоERK1/2 и фосфо-JNK1/2, а также к Ki67 и GAP43.

### **3.5.1. Оценка площади эпителиального дефекта роговиц мышей на фоне применения полученной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка**

Площадь эпителиального дефекта роговицы при биомикроскопическом исследовании на 3 и 5 сутки наблюдения во всех опытных группах животных была достоверно меньше, чем в контрольной группе.

На 3 сутки площадь эпителиального дефекта во 2 группе составляла 27%, в 3 и 5 группах – 29%, в 1 и 4 группах – 40% и 42%, соответственно. На 5 сутки площадь эпителиального дефекта во 2 группе составляла 3%, в 3 группе – 4%, в 5 группе – 10%, в 1 группе – 13%, в 4 группе – 18%. Также на 5 сутки наблюдалась полная биodeградация полученных конструкций на основе фиброина шелка.

Биомикроскопическая характеристика сформированных эпителиально-стромальных дефектов роговицы и изменение площади данного дефекта в опытных группах на всех сроках наблюдения представлена на рисунке 25. Динамика изменения площади эпителиального дефекта роговицы мышей на всех сроках наблюдения представлена на рисунке 26.

Результаты оценки площади эпителиально-стромального дефекта роговиц мышей опытных и контрольной групп на всех сроках наблюдения представлены в таблице 12.

Результаты данного этапа исследования опубликованы в работе: Агаммедов, М.Б. Патогенетические особенности восстановления повреждений роговицы при помощи биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка / М.Б. Агаммедов, Д.С. Островский, В.П. Соболев [и др.] // Патогенез. – 2022. – т. 20 – № 4. – С. 63-68.

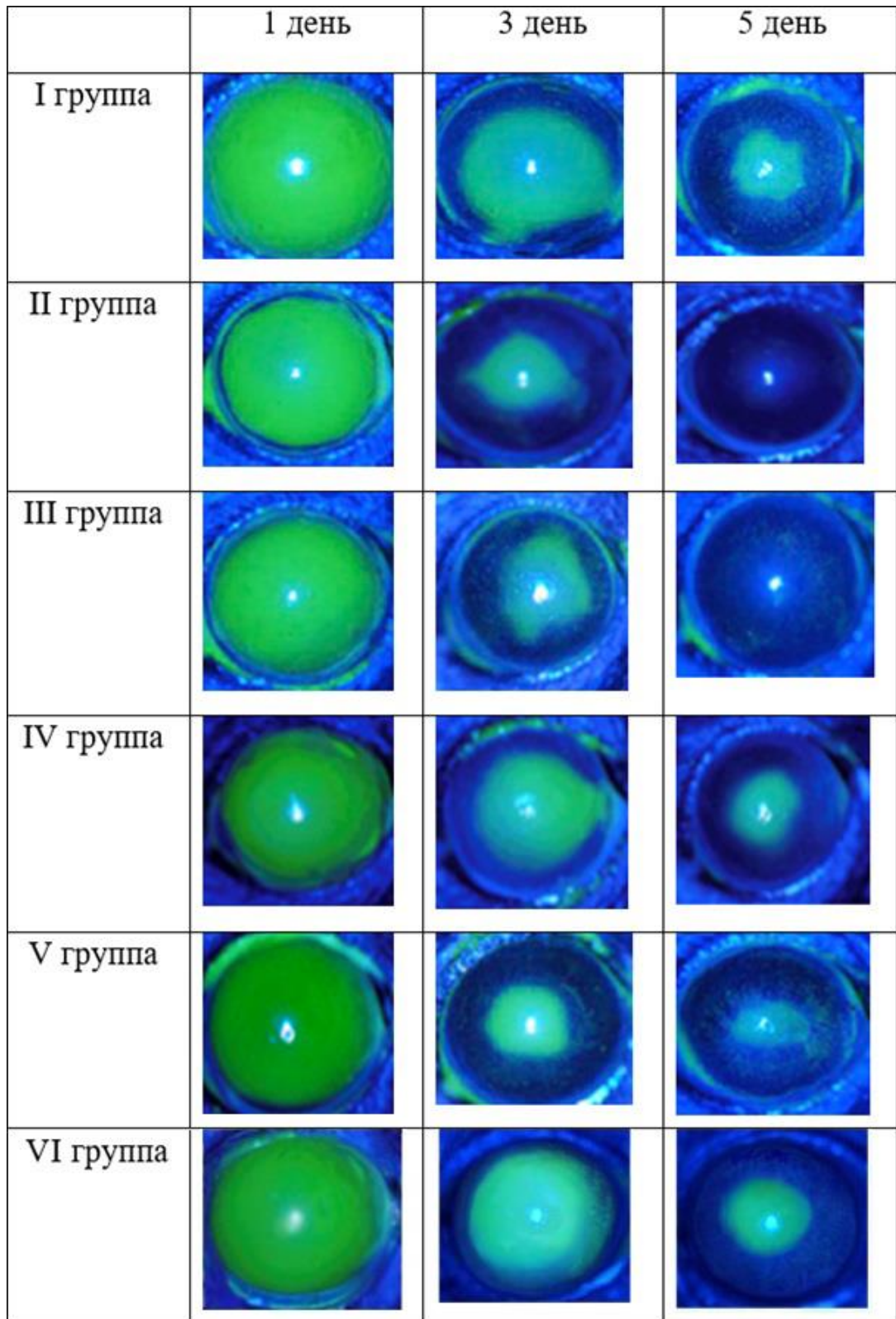


Рисунок 25 – Площадь эпителиального дефекта роговицы в опытных группах (I-V) на 1, 3, 5 сутки после формирования эпителиального дефекта.

*Биомикроскопическое исследование, флуоресцеиновая проба*

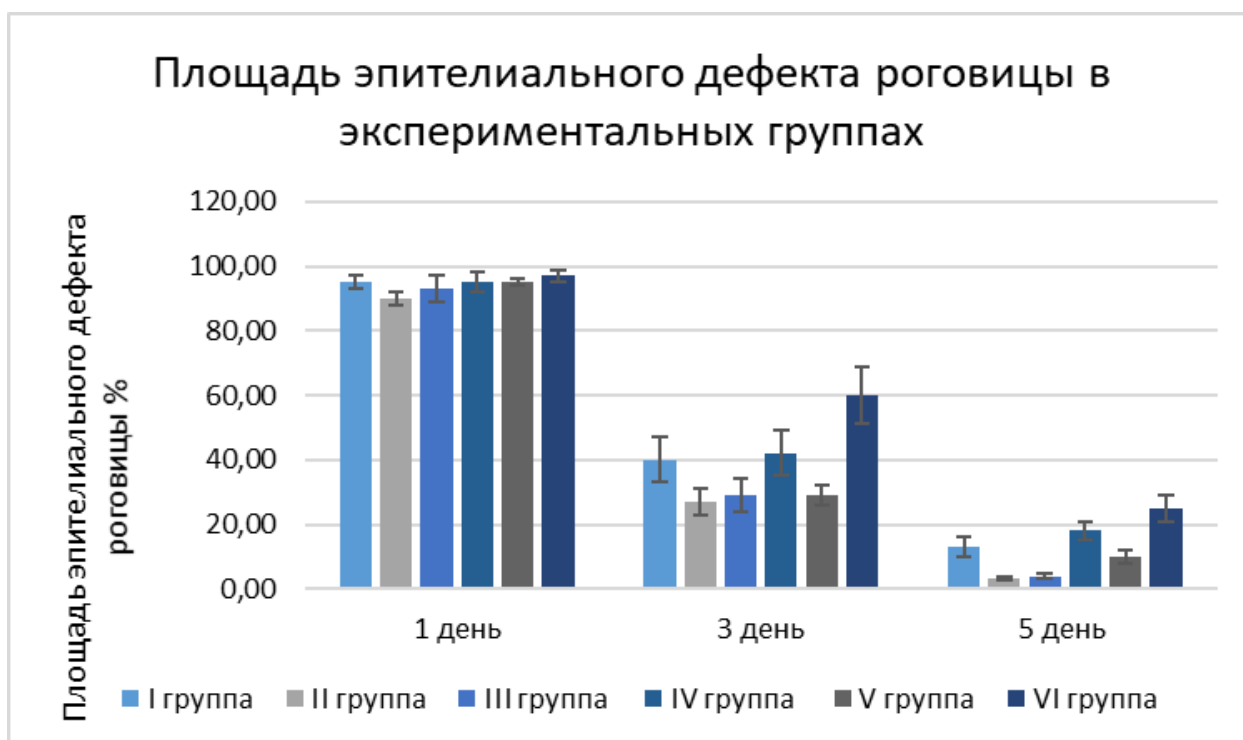


Рисунок 26 – Динамика изменения площади эпителиального дефекта роговицы в опытных и контрольной группах на 1, 3 и 5 день с момента формирования дефекта роговицы

Таблица 12 – Результаты измерения площади эпителиального дефекта, % от изначальной площади

	<b>I группа</b>	<b>II группа</b>	<b>III группа</b>	<b>IV группа</b>	<b>V группа</b>	<b>VI группа</b>
<b>1 день</b>	95	90	93	95	95	97
<b>3 день</b>	40	27	29	42	29	60
<b>5 день</b>	13	3	4	18	10	25

К окончанию эксперимента (5 сутки) наиболее активное восстановление эпителиального слоя роговицы наблюдалось при использовании биodeградируемых конструкций, содержащих глиальный нейротрофический фактор в концентрации 250 нг/мл и 500 нг/мл: площадь эпителиального дефекта во 2 и 3 группах достоверно отличалась от контрольной группы ( $p < 0,05$ ).

### 3.5.2. Результаты иммуногистохимического исследования роговиц мышей после применения полученной биodeградируемой конструкции на основе фибрина шелка

В результате проведенного иммуногистохимического исследования роговиц было установлено, что интенсивность реакции с антителами к фосфо-ERK1/2 в эпителии и строме роговиц опытных групп животных 1, 2, 3, 5 была выше по сравнению с группой 4 и контрольной группой.

Интенсивность реакции с антителами к фосфо-JNK1/2 также оказалась выше в эпителии и строме роговиц 1, 2, 3 и 5 групп животных и была выше, чем в 4 группе и в контроле.

Интенсивность реакции с антителами к фосфо-ERK1/2 и фосфо-JNK1/2 представлена на рисунке 27 и 28, соответственно.

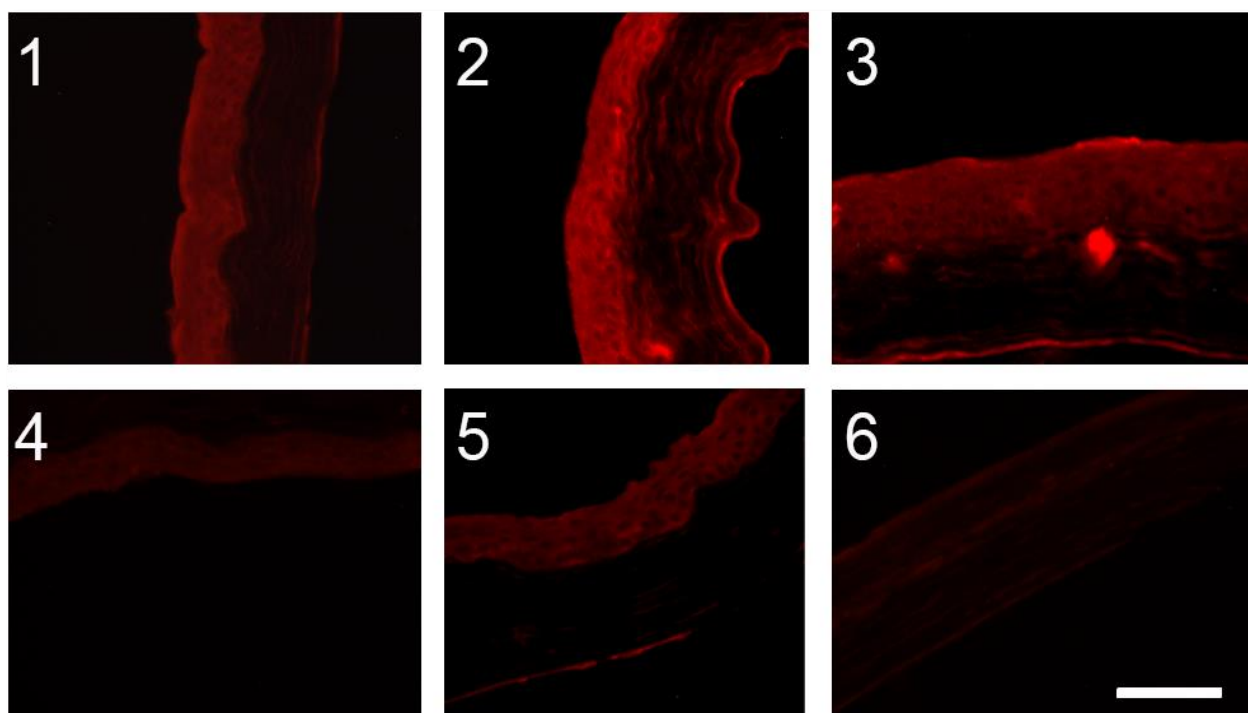


Рисунок 27 – Иммунофлуоресцентное исследование.

Экспрессия фосфо-ERK1/2 в роговицах опытных и контрольной групп (1-6) на 5-е сутки после эпителиально-стромального повреждения

Масштабный отрезок – 50 мкм

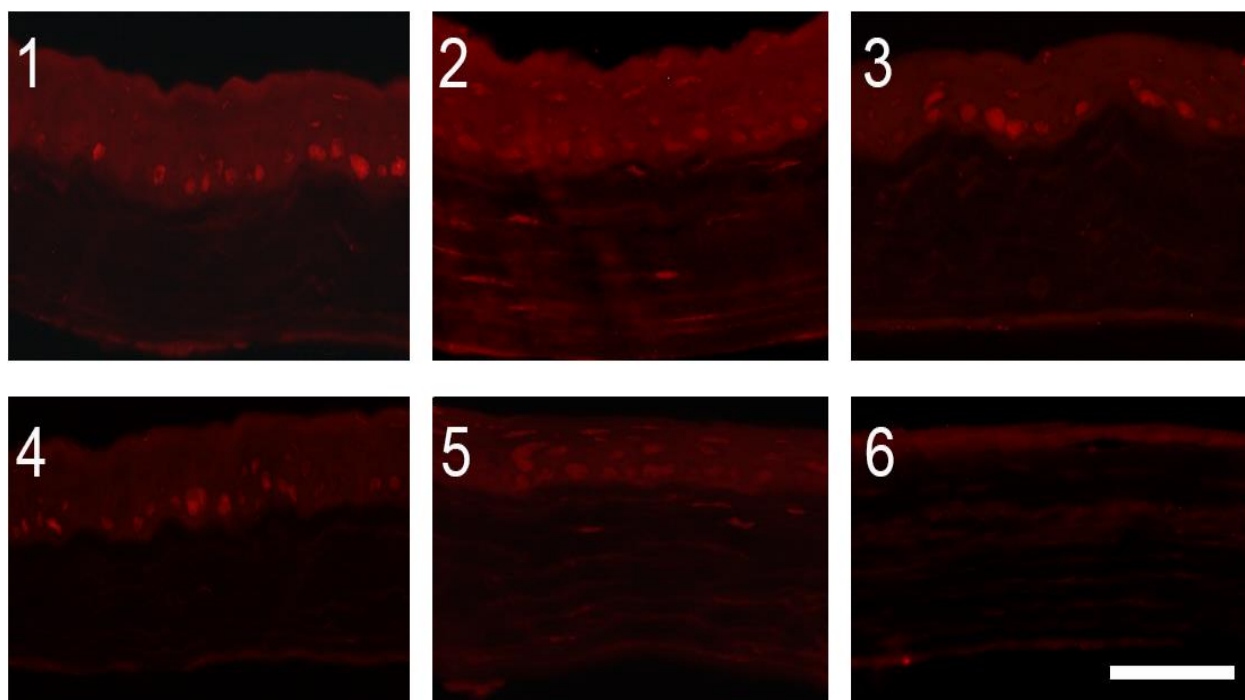


Рисунок 28 – Иммунофлуоресцентное исследование.

Экспрессия фосфо-JNK1/2 в роговицах опытных и контрольной групп (1-6)  
на 5-е сутки после эпителиально-стромального повреждения

Масштабный отрезок – 50 мкм

Интенсивность реакции с антителами к фосфо-ERK1/2 была более выраженной в эпителии роговиц опытных и контрольной групп. В то же время интенсивность реакции с антителами к фосфо-JNK1/2 во всех группах протекала активнее в строме исследуемых роговиц.

При анализе полученных изображений установлено, что интенсивность реакции с антителами к фосфо-ERK1/2 и фосфо-JNK1/2 во 2 и 3 группах была выше, чем в остальных группах.

В результате оценки интенсивности реакции с антителами к Vcl2 показано, что в эпителиальном слое роговиц 1, 2, 3 и 5 групп реакция протекала активнее, по сравнению с 4 и контрольной группами. Интенсивность реакций с антителами к Vcl2 в ходе иммуногистохимического исследования роговиц опытной и контрольной групп представлена на рисунке 29.

В результате изучения интенсивности реакции с антителами к Вах в эпителии роговиц было обнаружено, что реакция протекала активнее в эпителиальном слое контрольной группы. Интенсивность экспрессии Вах в ходе иммуногистохимического исследования роговиц опытной и контрольной групп представлена на рисунке 30.

Наличие высоких уровней антиапоптозных маркеров в 1, 2, 3 и 5 опытных группах, более низкого уровня в опытной группе 4 и наличие высокого уровня проапоптозных маркеров в контрольной группе может свидетельствовать о выраженном антиапоптотическом эффекте глиального нейротрофического фактора, как при инстилляции его в форме раствора, так и при его использовании в составе биodeградируемых конструкций из фиброина шелка.

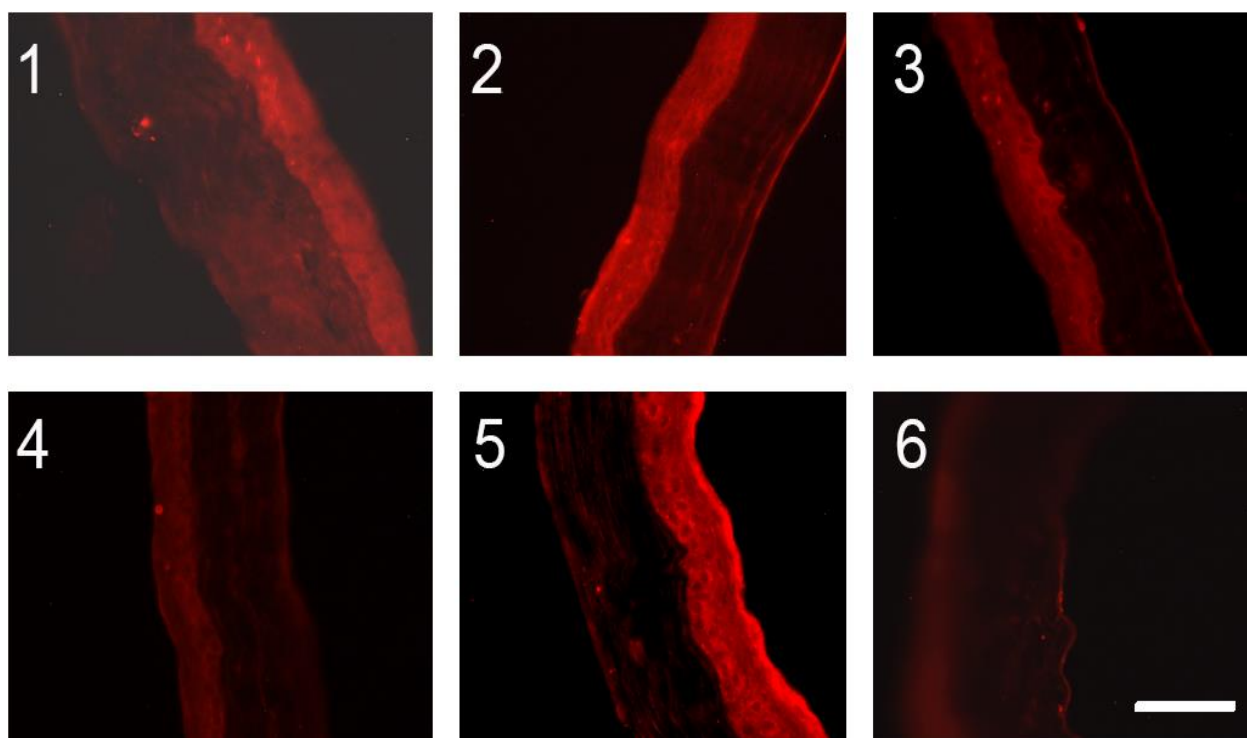


Рисунок 29 – Иммунофлуоресцентное исследование.

Экспрессия Bcl2 в роговицах опытных и контрольной групп (1-6)  
на 5-е сутки после эпителиально-стромального повреждения

Масштабный отрезок – 50 мкм

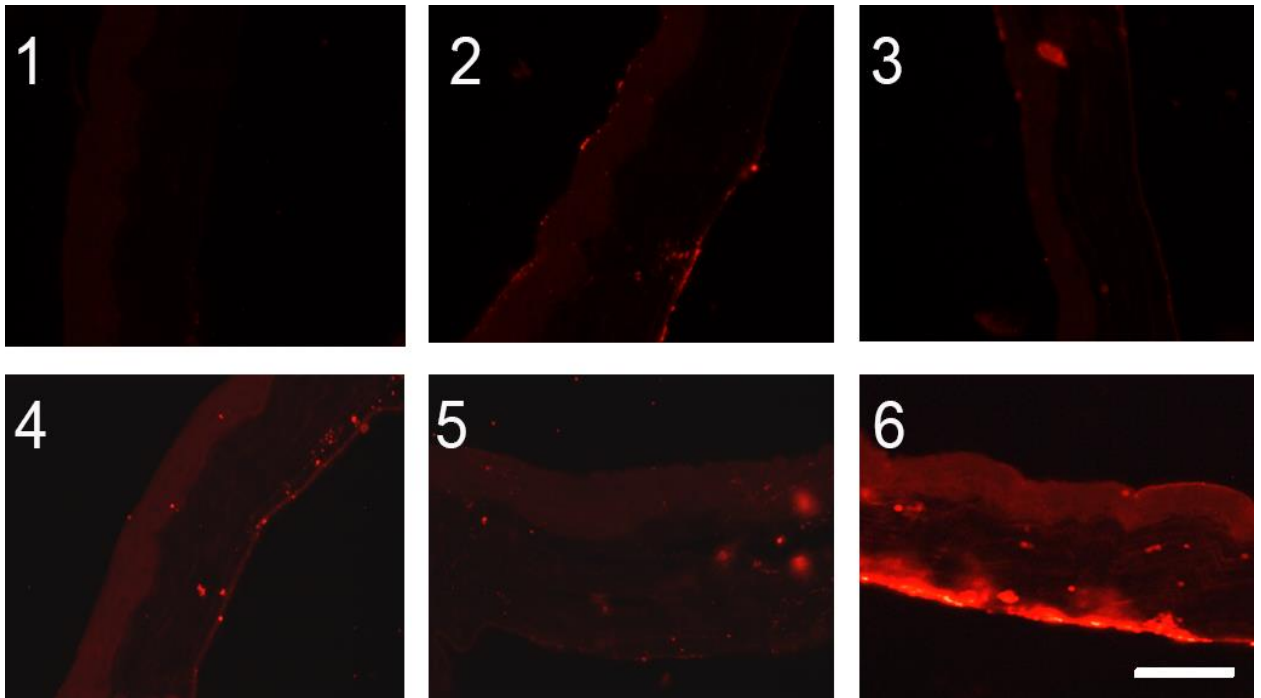


Рисунок 30 – Иммунофлуоресцентное исследование.

Экспрессия Вах в роговицах опытных и контрольной групп (1-6) на 5-е сутки после эпителиально-стромального повреждения

Масштабный отрезок – 50 мкм

В результате проведенного статистического анализа полученных в ходе иммуногистохимического исследования данных было установлено, что различия в реакции эпителия и стромы роговицы с антителами к к pERK1/2, pJNK1/2, Bcl2 и Вах между группами 1-3, 5 и контролем были достоверно значимыми ( $p < 0,05$ , кроме 4-й группы).

Результаты балльной оценки интенсивности иммуногистохимической реакции эпителия и стромы роговицы с антителами к pERK1/2, pJNK1/2, Bcl2 и Вах после эпителиально-стромального повреждения в опытных и контрольной группах приведены на рисунке 31.

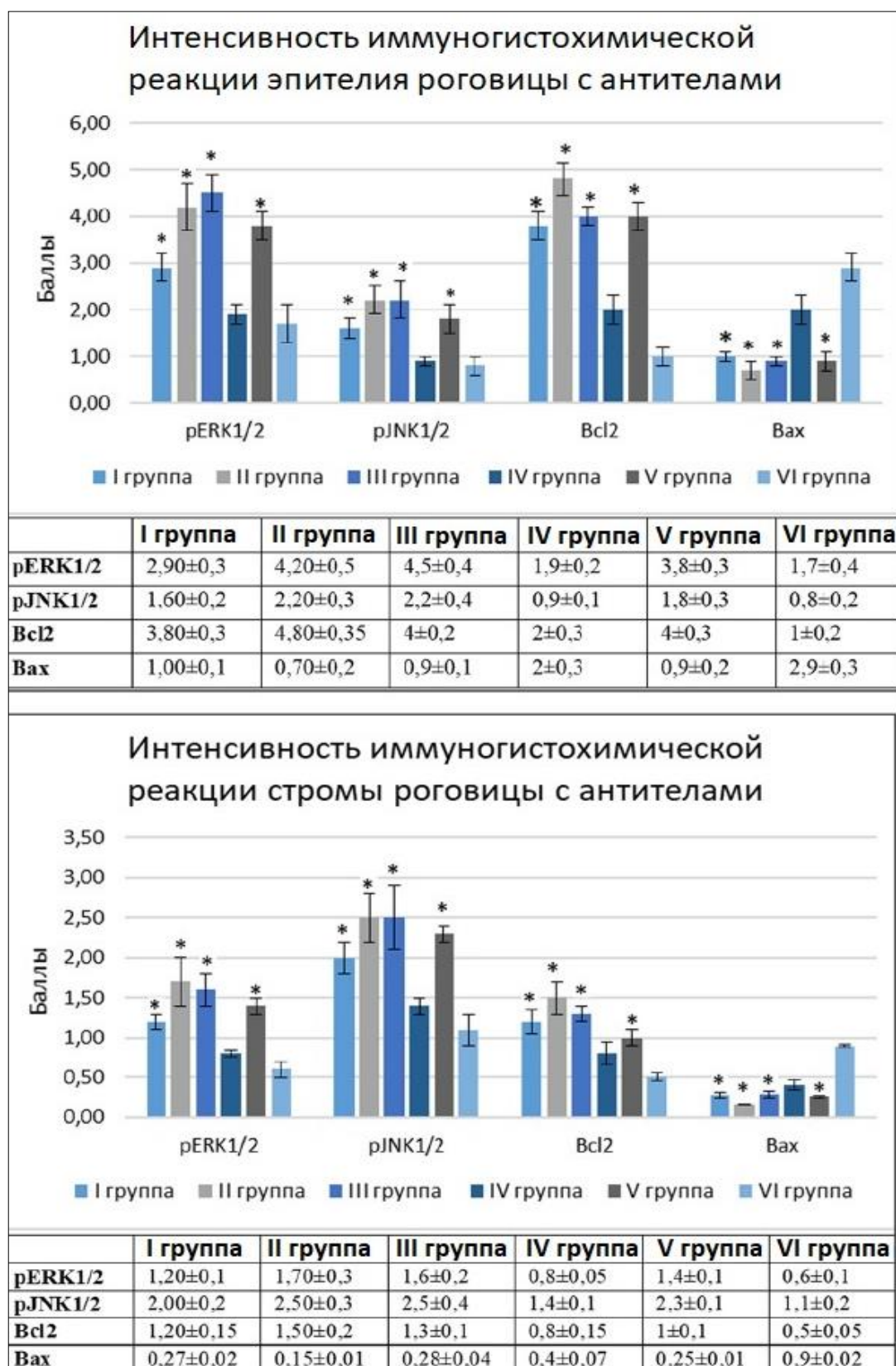


Рисунок 31 – Результаты оценки интенсивности иммуногистохимической реакции эпителия и стромы роговицы с антителами к pERK1/2, p JNK1/2, Bcl2 и Bax после эпителиально-стромального повреждения в опытных и контрольной группах (\* p < 0,05)



Пролиферативная активность эпителиальных клеток и кератоцитов оценивалась в ходе иммуногистохимического исследования с антителами к Ki67. В результате проведённого анализа было установлено, что Ki67-иммунопозитивными в 1 группе были  $9,0 \pm 2,3$  % клеток стромы и  $3,2 \pm 1,0$  % клеток эпителия; во 2 группе –  $15,9 \pm 2,3$  % клеток стромы и  $5,9 \pm 2,0$  % клеток эпителия, в 3 группе –  $16 \pm 2,1$  % клеток стромы и  $5,3 \pm 2,0$  % клеток эпителия; в 4 группе –  $5,5 \pm 1,4$  % клеток стромы и  $2,0 \pm 0,9$  % клеток эпителия; в 5 группе –  $11,6 \pm 2,1$  % клеток стромы и  $4,0 \pm 2,0$  % клеток эпителия; в 6 группе (контроль) –  $4,7 \pm 1,4$  % и  $1,0 \pm 0,4$  %, соответственно. Различия между опытными группами и контролем, за исключением 4 группы, были статистически достоверны ( $p < 0,05$ ).

В результате оценки количества GAP43-иммунопозитивных нервных волокон в ходе иммуногистохимического исследования было установлено, что GDNF в составе полученных биodeградируемых конструкций стимулировал образование нервных волокон, что приводило к восстановлению стромального нервного сплетения: выявлено достоверно большее количество GAP43-иммунопозитивных нервных волокон в строме роговиц опытных групп 1-3 и 5, чем в 4-й группе и в контроле. В 1-й группе количество GAP43-иммунопозитивных нервных волокон в строме роговиц составило  $623 \pm 65$  волокон на  $1 \text{ мм}^2$  среза, во 2-й группе –  $1050 \pm 121$  волокон на  $1 \text{ мм}^2$  среза, в 3-й группе –  $975 \pm 35$  волокон на  $1 \text{ мм}^2$  среза, в 4-й группе –  $295 \pm 47$  волокон на  $1 \text{ мм}^2$  среза, в 5-й группе –  $895 \pm 74$  волокон на  $1 \text{ мм}^2$  среза, в 6-й группе (контроль) –  $276 \pm 56$  волокон на  $1 \text{ мм}^2$  среза.

Интенсивность экспрессии GAP43-иммунопозитивных нервных волокон в ходе иммуногистохимического исследования роговиц опытной и контрольной групп представлена на рисунке 32.

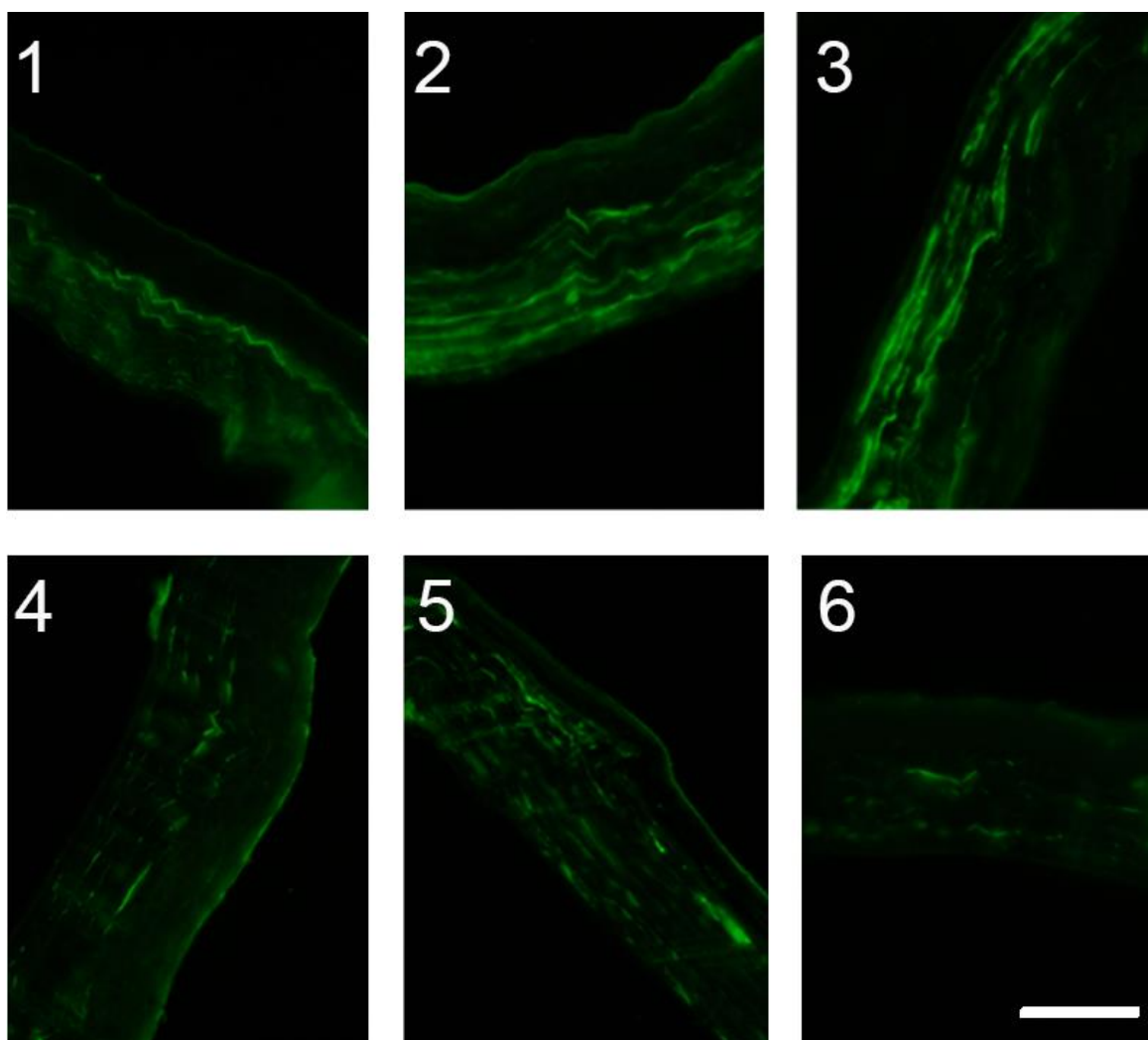


Рисунок 32 – Иммунофлуоресцентное исследование.

Экспрессия GAP43 в роговицах опытных (1-5) и контрольной (6) групп на 5 сутки после эпителиально-стромального повреждения

Масштабный отрезок – 50 мкм

Таким образом, при статистическом анализе полученных данных о количестве GAP43-иммунопозитивных нервных волокон было установлено, что различия между опытными группами 1-3 и 5 с контролем были достоверно значимыми ( $p < 0,05$ ), кроме группы 4. Данное наблюдение свидетельствует об увеличении интенсивности процесса формирования стромальных нервных сплетений под влиянием глиального нейротрофического фактора как при инстилляции данного фактора в виде раствора, так и в составе полученных биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прозрачность роговицы имеет решающее значение для зрения. Травма или заболевания, которые вызывают необратимую потерю прозрачности роговицы, приводят к снижению зрения или слепоте. В связи с этим успешное восстановление поврежденной поверхности роговицы является актуальной проблемой регенеративной медицины.

Нейротрофические факторы поддерживают равновесие между клеточной пролиферацией и дифференцировкой, обеспечивая целостность роговичной поверхности. В роговице обнаружены паттерны экспрессии нейротрофических факторов и их рецепторов в нормальных и поврежденных условиях [33; 39; 141].

Согласно современной концепции принято считать, что нейротрофические факторы, такие как фактор роста нервов – NGF (Nerve growth factor), глиальный нейротрофический фактор – GDNF и цилиарный нейротрофический фактор – CNTF (Ciliary neurotrophic factor), стимулируют пролиферацию, миграцию и иммунопротекторную функцию эпителиальных клеток роговицы через их рецепторы в эпителии роговицы [24; 26; 34; 67; 98,144]. Также хорошо известно, что эпителий роговицы экспрессирует множество нейротрофических факторов, среди которых глиальный нейротрофический фактор, играющий важнейшую роль в регенерации нервных волокон роговицы [33; 43].

В данной работе на основании проведенных исследований было впервые продемонстрировано, что глиальный нейротрофический фактор способствует регенерации интрастромального и субэпителиального нервных сплетений роговицы после их повреждения.

Таким образом, глиальный нейротрофический фактор не только поддерживает целостность поверхности роговицы и способствует заживлению эпителиального дефекта роговицы, но также играют важнейшую роль в содействии регенерации роговичных нервов после повреждения.

Однако, в результате нестабильности глиального нейротрофического фактора имеются известные ограничения его применения, в связи с чем в данной работе в качестве основного материала для стабилизации GDNF и для контроля его доставки впервые использовались биodeградируемые конструкции из фиброина шелка. Данная концепция базируется на известных качествах фиброина шелка, который обладает высокой биологической совместимостью, низкой иммуногенностью, заданной скоростью биodeградации, а также способствует миграции, пролиферации и дифференцировки клеток, обеспечивая регенерацию поврежденной роговицы [28; 72; 79; 120]. Также фиброин шелка не только широко используется в различных областях медицины для лечения множества патологий, но и рассматривается современными исследователями как подходящий базисный материал для создания искусственного аналога роговицы. Таким образом, в данном исследовании, впервые были созданы биodeградируемые конструкции на основе фиброина шелка, содержащие глиальный нейротрофический фактор.

Согласно поставленным задачам в данном исследовании проводилась разносторонняя оценка полученных биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка. При этом современные тенденции изучения подобных материалов естественного происхождения сводятся к необходимости проведения сканирующей зондовой нанотомографии. Данный метод оценки материала заключается в объединении ультрамикротомии с анализом наноструктуры получаемой после среза поверхности, что делает возможным проводить СЗМ-измерения поверхности не перемещая образец, непосредственно после формирования среза в работе ультрамикротомы. Данный метод зарекомендовал себя как высокоточный и надежный способ измерений материалов на основе фиброина шелка за счет практически полного отсутствия артефактов на поверхности блока, которые неизбежно присутствуют при механических воздействиях. Проведение ультрамикротомии в свою очередь позволяет формировать срезы от 20 нм, и при дальнейшей работе дает возможность получать до 10 последовательных изображений в час. Таким образом, использованный в данном исследовании метод сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ)

позволяет визуализировать трехмерные структуры и, соответственно, проводить качественную оценку трехмерной морфологии изучаемых биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка.

Для оценки структуры поверхности полученных биodeградируемых конструкций применялась сканирующая электронная микроскопия. Данный метод является эффективной современной методикой получения изображений с высоким разрешением образцов биологического и искусственного происхождения. При этом данный метод в настоящее время широко применяется для изучения роговичной ткани, а также материалов природного, либо синтетического происхождения, которые могут быть использованы в качестве подходящего аналога роговичной ткани. К основным преимуществам данного метода относят его высокую разрешающую способность, а также глубину резкости, которая значительно превосходит световую микроскопию. Таким образом, проведенная сканирующая электронная микроскопия предложенной биodeградируемой конструкции на основе фиброина шелка сформировала представление о её ультраструктуре и рельефе поверхности. В результате проведенной сканирующей электронной микроскопии было установлено, что все полученные биodeградируемые конструкции (пленки) обладали характерным для изделий из фиброина шелка нанорельефом, о чем свидетельствует наличие характерных шероховатостей поверхности изучаемых биodeградируемых конструкций при отсутствии пор.

Использование встроенного программного обеспечения в сканирующем электронном микроскопе позволило получить достоверные данные о толщине полученных биodeградируемых конструкций, которая была равномерной на всем протяжении и для всех образцов на оцениваемом участке находилась в диапазоне 45-50 мкм.

Оценку физических параметров полученных биodeградируемых конструкций проводили при помощи установки для испытания конструкционных материалов И11М. Образцы предложенных биodeградируемых конструкций

размером  $35 \times 10 \times 0,02$  мм подвергали измерениям прочностных характеристик на растяжение, а также оценивали упругость данного материала для восстановления дефектов роговицы. В настоящее время новые разновидности биоинженерных конструкций должны проходить обязательную оценку физических параметров, что особенно важно при восстановлении роговицы, поскольку материалы, применяемые в данной области, должны обладать способностью проводить и преломлять свет, иметь достаточную прочность и при этом не оказывать сенсibiliзирующей реакции на иммунную систему организма хозяина.

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что все полученные на предыдущих этапах биоразлагаемые конструкции имели сходную прочность и упругость. Было установлено, что добавление глиального нейротрофического фактора в состав биodeградируемых конструкций не оказывает значимого влияния на физические характеристики данного материала и позволяет получить эффективный способ доставки данного активного вещества в зону эпителиального и эпителиально-стромального повреждения.

В следующем разделе исследования полученных биodeградируемых конструкций изучалась их способность высвобождать биоактивные вещества в процессе биodeградации. Для этого вначале была проведена оценка скорости биodeградации. Само по себе наличие способности биodeградации у материала сопряжено с некоторыми ключевыми моментами. Так, материал не должен являться источником токсических продуктов при взаимодействии с тканями и биологическими жидкостями, а также обладать контролируемой скоростью резорбции внутри организма и способностью к биodeградации [1; 2; 3; 7; 51]. В настоящем исследовании в качестве основного материала для биоинженерных конструкций был выбран фиброин шелка, который является одним из наиболее изученных материалов и сочетает в себе необходимые физические и химические качества. Так, в результате проведенного анализа было показано, что все предложенные биodeградируемые конструкции на основе фиброина шелка, независимо от наличия глиального нейротрофического фактора разлагаются в

фосфатно-солевом буфере в течение 7 дней, что является подходящим сроком для восстановления поврежденного роговичного эпителия.

В следующем разделе исследования была проведена оценка интенсивности высвобождения глиального нейротрофического фактора из полученных биodeградируемых конструкций. При этом оценка проводилась в течение 7 дней для соответствия остальным контрольным точкам исследования. Для оценки интенсивности высвобождения глиального нейротрофического фактора из полученных биodeградируемых конструкций проводился эксперимент *in vitro* с проведением твердофазного иммуноферментного анализа.

В исследовании использовали готовые стандартизированные наборы фирмы-производителя GDNF Human ELISA Kit (Abcam, Великобритания), которые широко используются в подобных работах. В данном разделе исследования ежедневно на протяжении 7 дней регистрировались полученные данные: в каждой контрольной точке фиксировался выход глиального нейротрофического фактора из биodeградируемых конструкций, после чего к окончанию эксперимента были сформированы наглядные графические изображения. На основании анализа полученных данных было установлено, что общее количество глиального нейротрофического фактора, высвобожденного из биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка, на 7-е сутки составило от 90,4 % в группе, содержащей 50 нг/мл глиального нейротрофического фактора, до 92,92 % в группе, содержащей 250 нг/мл глиального нейротрофического фактора. Полученные данные наглядно демонстрируют способность биodeградируемых конструкций из фиброина шелка к постепенному высвобождению биоактивных веществ, в том числе глиального нейротрофического фактора.

Дальнейшая задача данного исследования заключалась в изучении влияния разработанных биodeградируемых конструкций, содержащих глиальный нейротрофический фактор на процессы регенерации роговицы в эксперименте. Результаты, полученные в ходе проделанной работы, свидетельствуют о биосовместимости полученных конструкций из фиброина шелка с глиальным

нейротрофическим фактором и кератоцитами, что говорит о возможности их применения в качестве биоматериала для стабилизации глиального нейротрофического фактора и создания биоконструкций для восстановления дефектов роговицы.

В результате сравнительного анализа пролиферативной активности кератоцитов при культивировании без биodeградируемых конструкций, с биodeградируемыми конструкциями из фиброина шелка как без глиального нейротрофического фактора, так и с глиальным нейротрофическим фактором в различных концентрациях было установлено, что наиболее активная пролиферация кератоцитов наблюдается при их культивировании с биodeградируемыми конструкциями, содержащими глиальный нейротрофический фактор в концентрации 250 нг/мл и 500 нг/мл. В результате сравнительного анализа жизнеспособности кератоцитов статистически значимых различий между исследуемыми блоками выявлено не было. Полученные результаты подтверждают данные исследований, проведенных на клеточных культурах, в которых было установлено, что глиальный нейротрофический фактор усиливает пролиферацию стромальных кератоцитов [141], а культивирование кератоцитов на фиброине шелка приводит к увеличению количества клеток, что свидетельствует о нетоксичности и биосовместимости данного материала [11].

Во втором разделе на экспериментальной модели эпителиально-стромального дефекта роговицы было показано, что процесс эпителизации в более ранние сроки (3-и сутки) эффективно стимулируют как биodeградируемые конструкции из фиброина шелка, содержащие глиальный нейротрофический фактор в концентрации 250 нг/мл и 500 нг/мл, так и раствор глиального нейротрофического фактора в концентрации 500 нг/мл; менее активная эпителизация наблюдалась при использовании биodeградируемых конструкций, содержащих глиальный нейротрофический фактор в концентрации 50 нг/мл, и при использовании биodeградируемых конструкций, не содержащих глиальный нейротрофический фактор, однако интенсивность эпителизации в этих двух



группах (1 и 4 группа) была выше, чем в контроле ( $p < 0,05$ ) (эпителиальный дефект меньше, чем в контроле на 20%). В более поздние сроки (5 сутки) наиболее активный процесс эпителизации роговицы наблюдается при использовании биodeградируемых конструкций, содержащих глиальный нейротрофический фактор в концентрации 250 нг/мл и 500 нг/мл; менее активный - при использовании раствора глиального нейротрофического фактора (в 2,8 раза), а также биodeградируемых конструкций, содержащих глиальный нейротрофический фактор в концентрации 50 нг/мл (в 3,7 раза), и биodeградируемых конструкций, не содержащих глиальный нейротрофический фактор (в 5 раз).

Таким образом по результатам проведенного экспериментального исследования было впервые установлено, что применение глиального нейротрофического фактора (в концентрации 250 нг/мл и 500 нг/мл) в биodeградируемых конструкциях и раствора глиального нейротрофического фактора (в концентрации 500 нг/мл) приводит к более активному процессу эпителизации роговицы, по сравнению с использованием биodeградируемых конструкций без глиального нейротрофического фактора.

Полученные результаты подтверждают исследования *in vivo* на моделях эпителиального дефекта у животных, в которых глиальный нейротрофический фактор также способствовал более быстрому процессу регенерации роговицы [33; 43]. Менее активный процесс эпителизации при использовании биodeградируемых конструкций с концентрацией глиального нейротрофического фактора 50 нг/мл, чем при использовании раствора глиального нейротрофического фактора связан, по всей видимости, с низкой концентрацией и недостаточностью концентрации данного фактора к 4-5 суткам.

Также стоит отметить, что по сравнению с контролем, биodeградируемые конструкции без глиального нейротрофического фактора также были связаны с более активным процессом эпителизации. Данное наблюдение согласуется с результатами исследований, проведенными в экспериментах *in vitro*, в которых было показано, что фиброин шелка увеличивает миграцию эпителиальных клеток

роговицы, адгезию и пролиферацию, а применение растворимого производного фиброина (Silk-Derived Protein (SDP)) стимулирует заживление эпителиального дефекта роговицы у кроликов [14; 15].

Таким образом, на основании данных литературы и полученных данных в ходе проведенного исследования можно предположить, что совместные эффекты от применения глиального нейротрофического фактора (в концентрациях 250 нг/мл и 500 нг/мл) и фиброина шелка в виде биodeградируемой конструкции, позволяет получить более активную эпителизацию роговицы у экспериментальных животных в этих группах.

В результате иммуногистохимического исследования было показано, что именно глиальный нейротрофический фактор, как в растворе, так и в биodeградируемых конструкциях на основе фиброина шелка стимулирует пролиферативную активность эпителиальных клеток и кератоцитов через MAP-киназный каскад сигнальных путей за счет фосфорилирования ERK1/2 в эпителии и JNK1/2 в строме, поскольку интенсивность реакции с антителами к фосфо-ERK1/2 и к фосфо-JNK1/2 в эпителии и строме роговицы при применении биodeградируемых конструкций без глиального нейротрофического фактора находится на уровне контроля.

Полученные результаты подтверждают данные исследований, проведенных на клеточных культурах, в которых было показано, что глиальный нейротрофический фактор через MAP-киназный каскад сигнальных путей стимулирует пролиферативную активность эпителиальных клеток и кератоцитов [54; 140; 141]. Установленная в настоящем исследовании выраженная позитивная реакция с антителами к Ki67 в ходе иммуногистохимического исследования являлась подтверждением данной пролиферативной активности эпителиальных клеток и кератоцитов. Также в результате проведенных исследований было показано, что биodeградируемые конструкции на основе фиброина шелка, содержащие глиальный нейротрофический фактор в концентрациях 250 нг/мл и 500 нг/мл, наиболее эффективно стимулируют эпителизацию и способствуют

восстановлению стромы роговицы через MAP-киназный каскад сигнальных путей за счет активного фосфорилирования ERK1/2 в эпителии и умеренного фосфорилирования JNK1/2 в строме.

По современным представлениям умеренное фосфорилирование JNK1/2 в строме роговицы может быть связано с ингибирующим действием глиального нейротрофического фактора на экспрессию TGF- $\beta$  и снижением активности TGF- $\beta$ 1 – индуцируемого фосфорилирования JNK (при повреждении роговицы экспрессия TGF- $\beta$ 1 увеличивается) [31; 32; 116].

Биодеградируемые конструкции с содержанием глиального нейротрофического фактора в концентрации 50 нг/мл менее значительно стимулируют пролиферативную активность эпителиальных клеток и кератоцитов через MAP-киназный каскад, чем раствор глиального нейротрофического фактора, что связано, по всей видимости, с его низкой концентрацией, особенно на 4-5 сутки.

Полученные результаты подтверждают данные биомикроскопического исследования. Глиальный нейротрофический фактор и биодеградируемые конструкции на основе фиброина шелка, содержащие глиальный нейротрофический фактор, особенно в концентрациях 250 нг/мл и 500 нг/мл, обладают выраженным антиапоптотическим действием, о чем свидетельствует повышение уровня антиапоптотического фактора Bcl2 и снижение уровня проапоптотического фактора Bax. Данные результаты согласуются с работами, в которых продемонстрировано, что для процессов физиологического обновления эпителия роговицы и для его регенерации при повреждении необходимо наличие баланса между этими факторами необходимо в роговице [106].

Результат исследования GAP43 иммунопозитивных структур также показал, что при эпителиально-стромальном дефекте роговицы именно глиальный нейротрофический фактор, как в растворе, так и в биодеградируемых конструкциях на основе фиброина шелка (особенно эффективно в концентрации 250 нг/мл и 500 нг/мл) стимулирует восстановление стромального нервного сплетения, так

как при применении биodeградируемых конструкций без глиального нейротрофического фактора количество GAP43-иммунопозитивных нервных волокон соответствовало контрольной группе. Полученные результаты подтверждаются данными исследований, проведенных в экспериментах *in vivo*, согласно которым глиальный нейротрофический фактор играет важную роль в регенерации роговичного нервного сплетения за счет стимуляции восстановления нервных волокон [33; 43].

Таким образом, более высокая эффективность (увеличение пролиферативной клеточной активности, выраженные антиапоптотические свойства, активное восстановление стромального нервного сплетения) биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка, содержащих глиальный нейротрофический фактор, в отличие от раствора глиального нейротрофического фактора, может быть обусловлена совместным воздействием активного вещества и материала биodeградируемой конструкции на роговицу, а также более постоянной эффективной концентрацией активного вещества в очаге повреждения.

## ВЫВОДЫ

1. На основании проведенного иммуногистохимического исследования в эксперименте показана способность глиального нейротрофического фактора стимулировать процессы клеточной пролиферации и регенерации в эпителиальных и эпителиально-стромальных дефектах роговицы диаметром 1,5 и 2,5 мм.
2. В эксперименте *in vitro* получены и проанализированы биodeградируемые конструкции на основе фиброина шелка, содержащие различные концентрации глиального нейротрофического фактора (50, 250, 500 нг/мл): высвобождение глиального нейротрофического фактора наблюдалось во всех опытных образцах и прекращалось по окончании процесса биodeградации (на 7-е сутки).
3. В эксперименте *in vitro* показана безопасность полученных биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка, содержащих глиальный нейротрофический фактор (50, 250, 500 нг/мл), для кератоцитов роговицы человека: большинство клеток (90,38 - 97,89 %) оставалось жизнеспособными к окончанию эксперимента (на 9-е сутки).
4. В эксперименте *in vitro* изучена эффективность полученных биodeградируемых конструкций: на 5 сутки пролиферативная активность кератоцитов при культивировании с биodeградируемыми конструкциями, содержащими глиальный нейротрофический фактор в концентрации 250 нг/мл и 500 нг/мл, была выше, чем при культивировании без биodeградируемых конструкций в 1,7 и 1,8 раза, соответственно.
5. В эксперименте *in vivo* на лабораторных животных показана эффективность применения биodeградируемых конструкций, содержащих глиальный нейротрофический фактор в концентрации 50, 250, 500 нг/мл: интенсивность регенерации эпителия роговицы на 3 и 5 сутки наблюдения во всех опытных группах была достоверно выше, чем в контрольной группе без глиального нейротрофического фактора.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные биodeградируемые конструкции на основе фиброина шелка, содержащие глиальный нейротрофический фактор в различных концентрациях (50, 250, 500 нг/мл) оказывают выраженное активирующее влияние на пролиферативные процессы и могут использоваться для стимулирования регенерации эпителиального и эпителиально-стромального повреждения роговицы.
2. Добавление глиального нейротрофического фактора в состав биodeградируемых конструкций не оказывает влияния на их физические характеристики при этом позволяет доставлять указанный фактор в очаг повреждения роговицы до момента окончания процесса биodeградации (на 7-е сутки от начала эксперимента).
3. Применение глиального нейротрофического фактора в виде инстилляций приводит к увеличению числа GAP-43-иммунопозитивных нервных волокон в строме роговицы, в результате чего в опытной группе наблюдаются процессы более активного формирования стромального нервного сплетения в поврежденной роговице по сравнению с контрольной группой, не получающей инстилляций глиального нейротрофического фактора.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ТЕРМИНОВ**

ВИЧ	Вирус иммунодефицита человека
ИФА	Иммуноферментный анализ
СЗМ	Сканирующая зондовая микроскопия
СЗНТ	Сканирующая зондовая нанотомография
BDNF	Нейротрофический фактор головного мозга
CMV	Цитомегаловирус
CNTF	Цилиарный нейротрофический фактор
EGF	Эпидермальный фактор роста
GDNF	Глиальный нейротрофический фактор
HGF	Фактор роста гепатоцитов
NGF	Фактор роста нервов
PLGA	Полилактическая кислота
RGD	Аргинилглициласпарагиновая кислота
SDS	Лаурилсульфат натрия
TGF- $\beta$	Трансформирующий фактор роста-бета

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Агаммедов, М.Б. Оценка пролиферативной активности кератоцитов после культивирования совместно с биodeградируемыми конструкциями на основе фиброина шелка. / М.Б. Агаммедов, Д.С. Островский, М.Х. Хубецова [и др.] // Патогенез. – 2023. т. 21 – № 1. – С. 75-78.
2. Агаммедов, М.Б. Патогенетические особенности восстановления повреждений роговицы при помощи биodeградируемых конструкций на основе фиброина шелка / М.Б. Агаммедов, Д.С. Островский, В.П. Соболев [и др.] // Патогенез. – 2022. – т. 20 – № 4. – С. 63-68.
3. Агапова, О.И. Биodeградируемые изделия на основе фиброина шелка для тканевой инженерии и регенеративной медицины / О.И. Агапова, И.И. Агапов // М.: ТЕХНОСФЕРА, 2018. – 162 с.
4. Борзенко, С.А. Алгоритм заготовки трупных роговиц человека для трансплантации / С.А. Борзенко, Б.Э. Малюгин, Н.А. Гаврилова [и др.] // М.: ГБОУ ВПО МГМСУ МЗ РФ, 2016. – 20 с.
5. Борзенко, С.А. Медико-технологические и методологические основы эффективной деятельности глазных тканевых банков России в обеспечении операций по сквозной трансплантации роговицы: дисс. ... докт. мед наук: 14.01.07 / Сергей Анатольевич Борзенко. – М., 2008. – 308 с.
6. Борзенко, С.А. Скрининг гемотрансмиссивных инфекций у посмертных доноров роговицы в Глазном тканевом банке НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» / С.А. Борзенко, М.Ю. Герасимов, Х.Д. Тонаева [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – т. 22. – № 1. – С. 50-54.
7. Гаврилова, Н.А. Влияние модифицированного глиального нейротрофического фактора (GDNF) на регенерацию эпителиального и эпителиально-стромального дефектов роговицы в эксперименте / Н.А. Гаврилова, А.В. Ревущин, С.А. Борзенко, М.Б. Агаммедов [и др.] // Гены и клетки. – 2016. – т. 11. – № 3. – С. 54-62.



8. Деев, Л.А. Заболевания роговой оболочки глазного яблока: учебнометодическое пособие / Л.А. Деев, Н.С. Ярцева. – Смоленск, 2006. – 57 с.
9. Копаева, В.Г. Глазные болезни / Под ред. проф. В.Г. Копаевой. - М.: Издательство «Офтальмология», 2018. – 495 с.
10. Малюгин, Б.Э. Клеточная хирургия при дисфункции стволовых клеток лимба. Б.Э. Малюгин, М.Ю. Герасимов, С.А. Борзенко [и др.] // Офтальмохирургия. – 2019. – № 1. – С. 77-86.
11. Островский, Д.С. Разработка способов конструирования искусственной роговицы на основе 3D клеточных сфероидов и полимерных материалов: дисс. ... канд. биол. наук: 14.03.03, 14.01.24 / Островский Дмитрий Сергеевич. – М., 2018. - 145 с.
12. Сафонова, Л.А. Пленки на основе фиброина шелка для заживления полнослойной раны кожи у крыс / Л.А. Сафонова, М.М. Боброва, О.И. Агапова [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2016. – Т. 18. – № 3. – С. 80-83.
13. Abbenante, G. Protease inhibitors in the clinic / G. Abbenante, D.P. Fairlie // Med Chem. – 2005. – Vol. 1 – P. 71-104.
14. Abdel-Naby, W. Silk-derived protein enhances corneal epithelial migration, adhesion, and proliferation / W. Abdel-Naby, B. Cole, A. Liu, [et al.] // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2017. – Vol. 58 – № 3. – P. 1425-1433.
15. Abdel-Naby, W. Treatment with solubilized silk-derived protein (SDP) enhances rabbit corneal epithelial wound healing / W. Abdel-Naby, B. Cole, A. Liu [et al.] // PLoS One. – 2017. – Vol. 12. – № 11. – e0188154.
16. Al-Aqaba, M.A. Architecture and distribution of human corneal nerves / M.A. Al-Aqaba, U. Fares, H. Suleman [et al.] // Br. J. Ophthalmol. – 2010. – Vol. 94. – № 6. – P. 784-789.
17. Alsmadi, N.Z. Glial-derived growth factor and pleiotrophin synergistically promote axonal regeneration in critical nerve injuries / N.Z. Alsmadi, G.S. Bendale, A. Kanneganti [et al.] // Acta Biomater. – 2018. Vol. 78. – P. 165-177.

18. Armitage, W.J. The first successful full-thickness corneal transplant: a commentary on Eduard Zirm's landmark paper of 1906 / W.J. Armitage, A.B. Tullo, D.F. Larkin. [et al.] // *Br. J. Ophthalmol.* – 2006. – Vol. 90. – № 10 – P. 1222-1223.
19. Asensio Ruiz, M.A. The Effect of Sterilization on the Characteristics of Silk Fibroin Nanoparticles / M.A. Asensio Ruiz, M.G. Fuster, T. Martínez Martínez [et al.] // *Polymers (Basel)*. – 2022. – Vol. 14. – № 3. – P. 498.
20. Bains, K.K. Recovering vision in corneal epithelial stem cell deficient eyes / K.K. Bains, H. Fukuoka, G.M. Hammond [et al.] // *Cont. Lens. Anterior Eye*. – 2019. – Vol. 42 – № 4. – P. 350-358.
21. Barrientez, B. Corneal injury: Clinical and molecular aspects / B. Barrientez, S.E. Nicholas, A. Whelchel [et al.] // *Exp Eye Res*. – 2019. – № 186:107709.
22. Beckingsale, P. Penetrating keratoplasty: outcomes from a corneal unit compared to national data. / P. Beckingsale, I. Mavrikakis, N. Al-Yousuf [et al.] // *Br. J. Ophthalmol.* – 2006. – Vol. 90. – № 6. – P. 728-731.
23. Beuerman, R.W. Sensory denervation of the rabbit cornea affects epithelial properties / R.W. Beuerman, B. Schimmelpfennig // *Exp. Neurol.* – 1980. – Vol. 69. – № 1. – P. 196-201.
24. Bian, F. An immunoprotective privilege of corneal epithelial stem cells against Th17 inflammatory stress by producing glial cell-derived neurotrophic factor / F. Bian, H. Qi, P. Ma [et al.] // *Stem Cells*. – 2010. – № 28. – P. 2172–2181.
25. Biazar, E. Oriented nanofibrous silk as a natural scaffold for ocular epithelial regeneration / E. Biazar, A. Baradaran-Rafii, S. Heidari-keshel [et al.] // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* – 2015. – Vol. 26. – № 16. – P.1139-1151.
26. Blanco-Mezquita, T. Nerve growth factor promotes corneal epithelial migration by enhancing expression of matrix metalloprotease-9 / T. Blanco-Mezquita, C. Martinez-Garcia, R. Proenca [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2013. – Vol. 54. – P. 3880–3890.
27. Boni, R. Current and novel polymeric biomaterials for neural tissue engineering / R. Boni, A. Ali, A. Shavandi [et al.] // *J. Biomed. Sci.* – 2018. – Vol. 25. – № 1. – P. 90.

28. Bray, L.J. Human corneal epithelial equivalents constructed on Bombyx mori silk fibroin membranes / L.J. Bray, K.A. George, S.L. Ainscough [et al.] // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32. – P. 5086–5091.
29. Burton, M.J. Prevention, treatment and rehabilitation / M.J. Burton // *Community Eye Health*. – 2009. – Vol. 22. – № 71. – P. 33-35.
30. Catrina, S. Nerve conduit scaffolds for discrete delivery of two neurotrophic factors / S. Catrina, B. Gander, S. Madduri // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2013. – Vol. 85. – № 1. – P. 139-142.
31. Chang, Y. JNK1/2 siRNA inhibits transforming-growth factor-beta1-induced connective tissue growth factor expression and fibrotic function in THSFs / Y. Chang, X.Y. Wu // *Mol. Cell. Biochem.* – 2010. – Vol. 335. – P. 83-89.
32. Chang, Y. The role of c-Jun N-terminal kinases 1/2 in transforming growth factor beta (1)-induced expression of connective tissue growth factor and scar formation in the cornea / Y. Chang, X.Y. Wu // *J. Intern. Med.* – 2009. – Vol. 37. – P. 727-736.
33. Chaudhary, S. Neurotrophins and nerve regeneration-associated genes are expressed in the cornea after lamellar flap surgery / S. Chaudhary, A. Namavari, L. Yco [et al.] // *Cornea*. – 2012. – Vol. 31. – P. 1460-1467.
34. Chen, J. Ciliary neurotrophic factor promotes the migration of corneal epithelial stem/progenitor cells by up-regulation of MMPs through the phosphorylation of Akt / J. Chen, P. Chen, L.J. Backman [et al.] // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 25870.
35. Chen, J. Study on biocompatibility of complexes of collagen-chitosan-sodium hyaluronate and cornea / J. Chen, Q. Li, J. Xu, [et al.] // *Artif. Organs*. – 2005. – Vol. 29. – P. 104-113.
36. Chen, Z. Biomaterials for corneal bioengineering / T. Chirila, Z. Barnard, Zainuddin [et al.] // *Biomed. Mater.* – 2018. – Vol. 13. – № 3 – P. 032002.
37. Chirila, T. Bombyx mori silk fibroin membranes as potential substrata for epithelial constructs used in the management of ocular surface disorders / Chirila T. // *Tissue Eng. Part A*. – 2008. – Vol. 14 № 7. P. 1203-1211.

38. Chirila, T. Evaluation of silk sericin as a biomaterial: in vitro growth of human corneal limbal epithelial cells on Bombyx mori sericin membranes / T. Chirila, S. Suzuki, L.J. Bray [et al.] // Prog. Biomater. – 2013. – Vol. 2. – № 1. P.14.
39. Chung, E.S. Expression of neurotrophic factors and their receptors in keratoconic cornea / E.S. Chung, K.H. Lee, M. Kim [et al.] // Curr. Eye Res. – 2013. – Vol. 38. – P. 743-750.
40. Courtman, D.W. Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction / D.W. Courtman, C.A. Pereira, V. Kashef [et al.] // J. Biomed Mater Res. – 1994. – Vol. 28. – № 6. P. 655-666.
41. Cui, R. Chitosan Promoted the Corneal Epithelial Wound Healing via Activation of ERK Pathway / R. Cui, Q. Lu, Y. Teng [et al.] // Curr. Eye Res. – 2017. Vol. 42. – № 1. – P. 21-27.
42. Das, G. Sericin based nanoformulations: a comprehensive review on molecular mechanisms of interaction with organisms to biological applications / G. Das, H.S. Shin, E.V.R. Campos [et al.] // J. Nanobiotechnology. – 2021. – Vol. 19. – № 1. – P. 30.
43. Di, G. Corneal epithelium-derived neurotrophic factors promote nerve regeneration / G. Di, X. Qi, X. Zhao [et al.] // Invest. Ophthalmol Vis. Sci. – 2017. – Vol. 58. – № 11. – P. 4695-4702.
44. Dong, Y. Fabrication and characterization of silk fibroin-coated liposomes for ocular drug delivery / Y. Dong, P. Dong, D. Huang [et al.] // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2015. – Vol. 91. – P. 82-90.
45. Drexler, J.W. Dehydrothermal crosslinking of electrospun collagen / J.W. Drexler, H.M. Powell // Tissue Eng. Part C Methods. – 2011. Vol. 17. – № 1. – P. 9-17.
46. Feizi, S. Central and peripheral corneal thickness measurement in normal and keratoconic eyes using three corneal pachymeters / S. Feizi, M.R. Jafarinasab, F. Karimian [et al.] // J. Ophthalmic Vis. Res. – 2014. – Vol. 9 – № 3. – P.296-304.
47. Fernández-Pérez, J. Decellularization and recellularization of cornea: Progress towards a donor alternative / J. Fernández-Pérez, M. Ahearne. // Methods. – Vol. 2020. – Vol. 171. – P. 86-96.

48. Frick, K.D. Economic impact of visual impairment and blindness in the United States / K.D. Frick, E.W. Gower, J.H. Kempen [et al.] // *Arch. Ophthalmol.* – 2007. – Vol. 125. – № 4. – P. 544-550.
49. Gain, P. Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking / P. Gain, R. Jullienne, Z. He [et al.] // *JAMA Ophthalmol.* – 2016. – Vol. 134. – № 2. – P. 167-173.
50. Gao, X. Preparation and properties of a chitosan-based carrier of corneal endothelial cells / X. Gao, W. Liu, B. Han [et al.] // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2008. – Vol. 19. – № 12. – P. 3611-3619.
51. Gavrilova, N.A. The effect of biodegradable silk fibroin-based scaffolds containing glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) on the corneal regeneration process / N.A. Gavrilova, S.A. Borzenok, A.V. Revishchin, M.B. Agammedov [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2021. – т. 185 – С. 264-276.
52. Gupta, N. Burden of corneal blindness in India / N. Gupta, R. Tandon, S.K. Gupta [et al.] // *Indian J. Community Med.* – 2013. – Vol. 38. – № 4. – P. 198-206.
53. Halberstadt, M. The outcome of corneal grafting in patients with stromal keratitis of herpetic and non-herpetic origin / M. Halberstadt, M. Machens, K.A. Gahlenbek, [et al.] // *Br. J. Ophthalmol.* – 2002. – Vol. 86. – № 6. – P. 646-652.
54. Hanke, M. Use of GDNF for treating corneal defects / M. Hanke, F. Kruse, M. Paulista [et al.] // US patent 20030166537A1. – 2003 Sept. 4.
55. Hashemi, H. The Prevalence and Risk Factors for Keratoconus: A Systematic Review and Meta-Analysis / H. Hashemi, S. Heydarian, E. Hooshmand [et al.] // *Cornea.* – 2020. – Vol. 39. – № 2. – P. 263-270.
56. Holland, C. The biomedical use of silk: past, present, future / C. Holland, K. Numata, J. Rnjak-Kovacina [et al.] // *Adv. Healthc. Mater.* – 2019. – Vol. 8. – № 1. – P. e1800465.
57. Hopkins, A.M. Silk Hydrogels as Soft Substrates for Neural Tissue Engineering / A.M. Hopkins, L. De Laporte, F. Tortelli [et al.] // *Adv. Funct. Mater.* – 2013. – Vol. 23. – P. 5140-5149.

58. Hori, K. Controlled-release of epidermal growth factor from cationized gelatin hydrogel enhances corneal epithelial wound healing / K. Hori, C. Sotozono, J. Hamuro [et al.] // *J. Control. Release.* – 2007. – Vol. 118. – № 2. – P. 169-176.
59. Hu, V.H. Epidemiology and control of trachoma: systematic review / V.H. Hu, E.M. Harding-Esch, M.J. Burton [et al.] // *Trop. Med. Int. Health.* – 2010. – Vol. 15. – № 6. – P.673-691.
60. Jewell, M. The development of SERI® Surgical Scaffold, an engineered biological scaffold / M. Jewell, W. Daunch, B. Bengtson, [et al.] // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2015. – Vol. 1358. – P. 44-55.
61. Jiao, Z. In vivo characterizations of the immune properties of sericin: an ancient material with emerging value in biomedical applications / Z. Jiao, Y. Song, Y. Jin [et al.] // *Macromol Biosci.* – 2017. – Vol. 17. – № 12. – P.10.
62. Karkhaneh, A. Novel materials to enhance corneal epithelial cell migration on keratoprosthesis / A. Karkhaneh, H. Mirzadeh, A. Ghaffariyeh [et al.] // *Br. J. Ophthalmol.* – 2011. – Vol. 95. – № 3. – P. 405-409.
63. Kaye, S. Herpes simplex keratitis / S. Kaye, A. Choudhary // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2006. – Vol. 25. – № 4. – P.355-380.
64. Ke, Q. Carrier-free epithelial cell sheets prepared by enzymatic degradation of collagen gel / Q. Ke, X. Wang, Q. Gao [et al.] // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2011. – Vol. 5. – № 2. P.138-145.
65. Kong, B. Tissue-engineered cornea constructed with compressed collagen and laser-perforated electrospun mat / B. Kong, W. Sun, G. Chen [et al.] // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 970.
66. Lakshman, N. Growth factor regulation of corneal keratocyte mechanical phenotypes in 3-D collagen matrices / N. Lakshman, W.M. Petroll // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2012. – Vol. 53. – № 3. – P. 1077-1086.
67. Lambiase, A. Capsaicin-induced corneal sensory denervation and healing impairment are reversed by NGF treatment / A. Lambiase, L. Aloe, F. Mantelli [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.* – 2012. – Vol. 53. – P. 8280-8287.

68. Lambiase, A. Nerve growth factor therapy for corneal disease / A. Lambiase, M. Sacchetti, S. Bonini // *Curr. Opin. Ophthalmol.* – 2012. – Vol. 23. – № 4 – P. 296-302.
69. Lambiase, A. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers / A. Lambiase, P. Rama, S. Bonini [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 1998. – Vol. 338. – № 17. – P. 1174-1180.
70. Lamm, V. Corneal blindness and xenotransplantation / V. Lamm, H. Hara, A. Mammen [et al.] // *Xenotransplantation.* – 2014. – Vol. 21. – № 2. – P. 99-114.
71. Lawrence, B.D. Bioactive silk protein biomaterial systems for optical devices / B.D. Lawrence, M. Cronin-Golomb, I. Georgakoudi [et al.] // *Biomacromolecules.* – 2008. – Vol. 9. – № 4. – P. 1214-1220.
72. Lawrence, B.D. Silk film biomaterials for cornea tissue engineering / B.D. Lawrence, J.K. Marchant, M.A. Pindrus [et al.] // *Biomaterials.* – 2009. – Vol. 30. – P.1299–1308.
73. Levis, H.J. Plastic compressed collagen as a novel carrier for expanded human corneal endothelial cells for transplantation / H.J. Levis, G.S. Peh, K.P. Toh [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – № 11. – P. e50993.
74. Li, R. Growth factors-based therapeutic strategies and their underlying signaling mechanisms for peripheral nerve regeneration / R. Li, D.H. Li, H.Y. Zhang [et al.] // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2020. – Vol. 41. – № 10. – P. 1289-1300.
75. Li, W. Fabrication and characterization of chitosan-collagen crosslinked membranes for corneal tissue engineering / W. Li, Y. Long, Y. Liu, et al. [et al.] // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* – 2014. – Vol. 25. – № 17. – P. 1962-1972.
76. Liang, Y. Tissue-engineered membrane based on chitosan for repair of mechanically damaged corneal epithelium / Y. Liang, W. Xu, B. Han [et al.] // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2014. – Vol. 25. – № 9. – P. 2163-2171.
77. Liao, J. Effects of decellularization on the mechanical and structural properties of the porcine aortic valve leaflet / J. Liao, E.M. Joyce, M.S. Sacks // *Biomaterials.* – 2008. – Vol. 29. – № 8. – P. 1065-1074.

78. Liu, D. Collagen and gelatin / D. Liu, M. Nikoo, G. Boran [et al.] // *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 527-557.
79. Liu, J. Silk fibroin as a biomaterial substrate for corneal epithelial cell sheet generation / J. Liu, B.D. Lawrence, A. Liu [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2012. – Vol. 53. – № 7. – P. 4130-4138.
80. Liu, L. Immunological responses in mice to full-thickness corneal grafts engineered from porcine collagen / L. Liu, L. Kuffová, M. Griffith [et al.] // *Biomaterials.* – 2007. – Vol. 28. – № 26. – P. 3807-3814.
81. Liu, Y. Crosslinked collagen-gelatin-hyaluronic acid biomimetic film for cornea tissue engineering applications / Y. Liu, L. Ren, Y. Wang // *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* – 2013. – Vol. 33. – № 1. – P. 196-201.
82. Ljubimov, A.V. Progress in corneal wound healing. / A.V. Ljubimov, M. Saghizadeh // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2015. – Vol. 49. – P. 17-45.
83. Lovett, M.L. Silk hydrogels for sustained ocular delivery of anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) therapeutics / M.L. Lovett, X. Wang, T. Yucel [et al.] // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2015. – Vol. 95(Pt B). – P. 271-278.
84. Madden, P.W. Silk fibroin safety in the eye: a review that highlights a concern / P.W. Madden, I. Klyubin, M.J. Ahearne // *B.M.J. Open Ophthalmology.* – 2020. – Vol. 5. – P. e000510.
85. Madduri, S. Collagen nerve conduits releasing the neurotrophic factors GDNF and NGF / S. Madduri, K. Feldman, T. Tervoort [et al.] // *J. Control. Release.* – 2010. – Vol. 143. – № 2. – P. 168-174.
86. Maitz, M.F. Biocompatibility assessment of silk nanoparticles: hemocompatibility and internalization by human blood cells / M.F. Maitz, C. Sperling, T. Wongpinyochit [et al.] // *Nanomedicine.* – 2017. – Vol. 13. – № 8. – P. 2633-2642.
87. Mastropasqua, L. Understanding the Pathogenesis of Neurotrophic Keratitis: The Role of Corneal Nerves / L. Mastropasqua, G. Massaro-Giordano, M. Nubile [et al.] // *J. Cell. Physiol.* – 2017. – Vol. 232. – № 4. – P. 717-724.



88. McIntosh Ambrose, W. Collagen Vitrigel membranes for the in vitro reconstruction of separate corneal epithelial, stromal, and endothelial cell layers / W. McIntosh Ambrose, A. Salahuddin, S. So [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* – 2009. – Vol. 90. – № 2. – P. 818-831.
89. Miyagi, H. The role of hepatocyte growth factor in corneal wound healing / H. Miyagi, S.M. Thomasy, P. Russell [et al.] // *Exp. Eye Res.* – 2018. – Vol. 166. – P. 49-55.
90. Mobaraki, M. Corneal repair and regeneration: current concepts and future directions / M. Mobaraki, R. Abbasi, S. Omidian Vandchali [et al.] // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2019. – Vol. 7. – P. 135.
91. Müller, L.J. Corneal nerves: structure, contents and function / L.J. Müller, C.F. Marfurt, F. Kruse [et al.] // *Exp. Eye Res.* – 2003. – Vol. 77. – № 2. – P. 253.
92. Nagai, N. Instillation of sericin enhances corneal wound healing through the ERK pathway in rat febrided corneal epithelium / N. Nagai, Y. Fukuoka, M. Ishii [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19. – № 4. – P. 1123.
93. Nakajima, E. FK962 induces neurite outgrowth in cultured monkey trigeminal ganglion cells / E. Nakajima, R.D. Walkup, T.R. Shearer [et al.] // *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2017. – Vol. 255. – № 1. – P. 107-112.
94. Oliva, M.S. Turning the tide of corneal blindness / M.S. Oliva, T. Schottman, M. Gulati. // *Indian J. Ophthalmol.* – 2012. – Vol. 60. – № 5. – P. 423-427.
95. Omoto, M. Hepatocyte growth factor suppresses inflammation and promotes epithelium repair in corneal injury / M. Omoto, K. Suri, A. Amouzegar [et al.] // *Mol. Ther.* – 2017. – Vol. 25. – № 8. – P. 1881-1888.
96. Parissi, M. Corneal Nerve Regeneration After Collagen Cross-Linking Treatment of Keratoconus: A 5-Year Longitudinal Study / M. Parissi, S. Randjelovic, E. Poletti [et al.] // *JAMA Ophthalmol.* – 2016. – Vol. 134. – № 1. – P. 70-78.
97. Poliseti, N. A decellularized human corneal scaffold for anterior corneal surface reconstruction / N. Poliseti, A. Schmid, U. Schlötzer-Schrehardt [et al.] // *Sci. Rep.* – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 2992.

98. Qi, H. Glial cell-derived neurotrophic factor gene delivery enhances survival of human corneal epithelium in culture and the overexpression of GDNF in bioengineered constructs / H. Qi, H.D. Shine, D.Q. Li [et al.] // *Exp. Eye Res.* – 2008. – Vol. 87. – № 6. – P. 580-586.
99. Qian, Y. The preosteoblast response of electrospinning PLGA/PCL nanofibers: effects of biomimetic architecture and collagen I / Y. Qian, H. Chen, Y. Xu [et al.] // *Int. J. Nanomedicine.* – 2016. – Vol. 11. – P. 4157-4171.
100. Rafat, M. PEG-stabilized carbodiimide crosslinked collagen-chitosan hydrogels for corneal tissue engineering / M. Rafat, F. Li, P. Fagerholm [et al.] // *Biomaterials.* – 2008. – Vol. 29. – № 29. – P. 3960-3972.
101. Raghunathan, V. Influence of extracellular matrix proteins and substratum topography on corneal epithelial cell alignment and migration / V. Raghunathan, C. McKee, W. Cheung [et al.] // *Tissue Eng. Part. A.* – 2013. – Vol. 19. – № 15-16. – P. 1713-1722.
102. Ramburrun, P. A review of bioactive release from nerve conduits as a neurotherapeutic strategy for neuronal growth in peripheral nerve injury / P. Ramburrun, P. Kumar, Y.E. Choonara [et al.] // *Biomed. Res. Int.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 132350.
103. Rezaei, F. Dual drug delivery system based on pH-sensitive silk fibroin/alginate nanoparticles entrapped in PNIPAM hydrogel for treating severe infected burn wound / F. Rezaei, S. Damoogh, R.L. Reis [et al.] // *Biofabrication.* – 2020. – Vol. 13. – № 1. – P. 015005.
104. Ricci, F. Persistent epithelial defect after penetrating keratoplasty caused by adenoviral infectious keratitis / F. Ricci, F. Missiroli, M. Ciotti [et al.] // *New Microbiol.* – 2010. – Vol. 33. – № 2. – P. 171-174.
105. Rnjak-Kovacina, J. The effect of sterilization on silk fibroin biomaterial properties / J. Rnjak-Kovacina, T.M. DesRochers, K.A. Burke [et al.] // *Macromol. Biosci.* – 2015. – Vol. 15. – № 6. – P.861-874.

106. Robertson, D.M. Bcl-2 and Bax regulation of corneal homeostasis in genetically altered mice / D.M. Robertson, P.M. Ladage, N. Yamamoto [et al.] // *Eye Contact Lens*. – 2006. – Vol. 32. – № 1. – P. 3-7.
107. Rose, J.B. Gelatin-based materials in ocular tissue engineering / Rose JB, Pacelli S, Haj AJE, [et al.] // *Materials (Basel)*. – 2014. – Vol. 7. – № 4. – P. 3106-3135.
108. Rubino, P. Anterior segment findings in vitamin A deficiency: a case series / P. Rubino, P. Mora, N. Ungaro [et al.] // *Case Rep. Ophthalmol. Med*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 181267.
109. Sacchetti, M. Diagnosis and management of neurotrophic keratitis / M. Sacchetti, A. Lambiase // *Clin. Ophthalmol*. – 2014. – Vol. 8. – P.571-579.
110. Sacchetti, M. Neurotrophic factors and corneal nerve regeneration / M. Sacchetti, A. Lambiase // *Neural Regen. Res*. – 2017. – Vol. 12. – № 8. – P. 1220-1224.
111. Saghizadeh, M. Concise review: stem cells for corneal wound healing / M. Saghizadeh, A.A. Kramerov, C.N. Svendsen [et al.] // *Stem Cells*. – 2017. – Vol. 35. – № 10. – P. 2105-2114.
112. Schmiedova, I. Using of amniotic membrane derivatives for the treatment of chronic wounds / I. Schmiedova, A. Dembickaja, L. Kiselakova [et al.] // *Membranes (Basel)*. – 2021. – Vol. 11. – № 12. – P. 941.
113. Schultz, G. Growth factors and ocular wound healing / G. Schultz, P.T. Khaw, K. Oxford [et al.] // *Eye (Lond)*. – 1994. – Vol. 8 (Pt 2). – P. 184-187.
114. Shaheen, B.S. Corneal nerves in health and disease / B.S. Shaheen, M. Bakir, S. Jain // *Surv. Ophthalmol*. – 2014. – Vol. 59. – № 3. – P. 263-285.
115. Sheha, H. Update on cenegermin eye drops in the treatment of neurotrophic keratitis / H. Sheha, S. Tighe, O. Hashem [et al.] // *Clin. Ophthalmol*. – 2019. – Vol. 13. – P. 1973-1980.
116. Shi, L. Activation of JNK signaling mediates connective tissue growth factor expression and scar formation in corneal wound healing / L. Shi, Y. Chang, Y. Yang [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7. – № 2. – P. e32128.

117. Singh, R. Corneal transplantation in the modern era / Singh R, Gupta N, Vanathi M, [et al.] // *Indian J. Med. Res.* – 2019. – Vol. 150. – № 1. – P. 7-22.
118. Subbiah, R. Materials science and design principles of growth factor delivery systems in tissue engineering and regenerative medicine / R. Subbiah, R.E. Guldberg // *Adv. Healthc. Mater.* – 2019. – Vol. 8. – № 1. – P. e1801000.
119. Sun, W. Silk fibroin as a functional biomaterial for tissue engineering / W. Sun, D.A. Gregory, M.A. Tomeh [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22. – № 3. – P. 1499.
120. Suzuki, S. Treatment of silk fibroin with poly(ethylene glycol) for the enhancement of corneal epithelial cell growth / S. Suzuki, R.A. Dawson, T.V. Chirila [et al.] // *J. Funct. Biomater.* – 2015. – Vol. 6. – № 2. – P. 345-366.
121. Tanito, M. Protective effects of soft acrylic yellow filter against blue light-induced retinal damage in rats / M. Tanito, S. Kaidzu, R.E. Anderson // *Exp. Eye Res.* – 2006. – Vol. 83. – № 6. – P. 1493-1504.
122. Taylor, H.R. The economic impact and cost of visual impairment in Australia / H.R. Taylor, M.L. Pezzullo, J.E. Keeffe // *Br. J. Ophthalmol.* – 2006. – Vol. 90. – № 3. – P. 272-275.
123. Thomas, P.A. Infectious keratitis / P.A. Thomas, P. Geraldine // *Curr. Opin. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 20. – № 2. – P. 129-141.
124. Thurston, M. Socio-emotional effects of the transition from sight to blindness / M. Thurston, A. Thurston, J. McLeod // *British Journal of Visual Impairment.* – 2010. – Vol. 28. – № 2. – P. 90-112.
125. Tran, S.H. A review of the emerging role of silk for the treatment of the eye / S.H. Tran, C.G. Wilson, F.P. Seib // *Pharm. Res.* – 2018. – Vol. 35. – № 12. – P. 248.
126. Uebersax, L. Silk fibroin matrices for the controlled release of nerve growth factor (NGF) / L. Uebersax, M. Mattotti, M. Papaloizos [et al.] // *Biomaterials.* – 2007. – Vol. 28. – № 30. – P. 4449-4460.
127. Vazirani, J. Keratoconus: current perspectives / J. Vazirani, S. Basu // *Clin. Ophthalmol.* – 2013. – Vol. 7. – P. 2019-2030.

128. Vázquez, N. Silk fibroin films for corneal endothelial regeneration: transplant in a rabbit descemet membrane endothelial keratoplasty / N. Vázquez, C.A. Rodríguez-Barrientos, S.D. Aznar-Cervantes [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2017. – Vol. 58. – № 9. – P. :3357-3365.
129. Walkden, A. Amniotic Membrane Transplantation in Ophthalmology: An Updated Perspective / A. Walkden // *Clin. Ophthalmol.* – 2020. – Vol. 14. – P. 2057-2072.
130. Wan, S. Epithelial defects after penetrating keratoplasty in infectious keratitis: An analysis of characteristics and risk factors / Wan S, Cheng J, Dong Y, [et al.] // *PLoS One.* – 2018. – Vol. 13. – № 11. – P. e0208163.
131. Wang, L. Epidermal growth factor (EGF)-induced corneal epithelial wound healing through nuclear factor  $\kappa$ B subtype-regulated CCCTC binding factor (CTCF) activation / L. Wang, X. Wu, T. Shi [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 288. – № 34. – P. 24363-24371.
132. Wang, Y. Differences in cytocompatibility between collagen, gelatin and keratin / Y. Wang, W. Zhang, J. Yuan [et al.] // *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* – 2016. – Vol. 59. – P. 30-34.
133. Williams, A.M. Awareness and attitudes toward corneal donation: challenges and opportunities / A.M. Williams, K.W. Muir // *Clin. Ophthalmol.* – 2018. – Vol. 12. – P. 1049-1059.
134. Wilson, S.L. Corneal Decellularization: A Method of Recycling Unsuitable Donor Tissue for Clinical Translation? / S.L. Wilson, L.E. Sidney, S.E. Dunphy, [et al.] // *Curr. Eye Res.* – 2016. – Vol. 41. – № 6. – P. 769-782.
135. Wright, H.R. Trachoma / H.R. Wright, A. Turner, H.R. Taylor. // *Lancet.* – 2008. – Vol. 371. – № 9628. – P. 1945-1954.
136. Wu, Z. The use of phospholipase A(2) to prepare acellular porcine corneal stroma as a tissue engineering scaffold / Z. Wu, Y. Zhou, N. Li [et al.] // *Biomaterials.* – 2009. – Vol. 30. – № 21. – P. 3513-3522.
137. Xiao, X. Therapeutic effects of epidermal growth factor on benzalkonium chloride-induced dry eye in a mouse model / X. Xiao, H. He, Z. Lin, [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2012. – Vol. 53. – № 1. – P. 191-197.

138. Xu, Y.G. Development of a rabbit corneal equivalent using an acellular corneal matrix of a porcine substrate / Xu YG, Xu YS, Huang C [et al.] // *Mol. Vis.* – 2008. – Vol. 14. – P. 2180-2189.
139. Yeh, L.K. The phenotype of bovine corneal epithelial cells on chitosan membrane / L.K. Yeh, Y.H. Chen, C.S. Chiu [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res. A.* – 2009. – Vol. 90. – № 1. – P. 18-26.
140. You, L. Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF)-induced migration and signal transduction in corneal epithelial cells / L. You, S. Ebner, F.E. Kruse // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2001. – Vol. 42. – № 11. – P. 2496-2504.
141. You, L. Neurotrophic factors in the human cornea / L. You, F.E. Kruse, H.E. Völcker // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2000. – Vol. 41. – № 3. – P. 692-702.
142. Zander, E. Observations on the innervation of the cornea / E. Zander, G. Weddell // *J. Anat.* – 1951. – Vol. 85. – № 1. – P. 68-99.
143. Zaoming, W. Partial characterization of the silk allergens in mulberry silk extract / W. Zaoming, R. Codina, E. Fernández-Caldas [et al.] // *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* – 1996. – Vol. 6. – № 4. – P. 237-241.
144. Zhou, Q. Ciliary neurotrophic factor promotes the activation of corneal epithelial stem/progenitor cells and accelerates corneal epithelial wound healing / Q. Zhou, P. Chen, G. Di, [et al.] // *Stem Cells.* – 2015. – Vol. 33. – P. 1566–1576.