

© Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ЛАКТОФЕРРИНА НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЙ И ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС РОГОВИЦЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТЕРМИЧЕСКОМ ОЖОГЕ

И.В. Кирсанова, А.В. Колесников, А.В. Шулькин, Ю.В. Абаленихина, П.Д. Ерохина, Е.Н. Якушева*

Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова,
390026 Рязань, ул. Высоковольная, 9; *эл. почта: kirsanova-iv@inbox.ru

На кроликах-самцах породы Советская Шиншилла изучены особенности свободнорадикального и цитокинового статуса роговицы при её термическом ожоге и возможности его коррекции с помощью лактоферрина. Развитие термического ожога роговицы сопровождается развитием окислительного стресса (повышением уровня ТБК-реактивных продуктов и карбонильных производных белков, снижением активности ферментов СОД и GPx) и выраженной воспалительной реакцией с повышением уровня TNF-1 α , IL-10, TGF-1 β . Применение лактоферрина оказывало выраженный терапевтический эффект, который проявлялся ускорением заживления, профилактикой развития осложнений (перфораций роговицы), снижением выраженности окислительного стресса, повышением концентраций TNF-1 α (на ранних сроках), IL-10 (на поздних сроках), TGF-1 β (на протяжении всего эксперимента). При этом, к концу регенерации было выявлено более грубое, относительно контрольной группы, помутнение роговицы, что может быть связано с повышенным уровнем противовоспалительных цитокинов, особенно TGF-1 β .

Ключевые слова: термический ожог роговицы; окислительный стресс; цитокины; лактоферрин

DOI: 10.18097/PBMC20247003168

ВВЕДЕНИЕ

Роговица является важной частью оптической системы глаза, на которую приходится 80% его преломляющей способности. Патологические изменения в роговице приводят к нарушению её прозрачности и снижению остроты зрения [1], поэтому совершенствование подходов к терапии повреждений роговицы является важной медицинской и социальной проблемой.

Современные исследования всё большее внимание уделяют изучению свободнорадикального и иммунологического статуса роговицы как одного из ключевых биохимических процессов, участвующих в патогенезе развития повреждений роговицы [2].

Показано, что от выраженности окислительного стресса и баланса провоспалительных и противовоспалительных цитокинов во многих случаях зависит исход заболевания [3]. Например, чрезмерное повышение провоспалительных цитокинов и активация свободнорадикальных процессов могут приводить к развитию перфорации роговицы, и наоборот, слабое повышение провоспалительных цитокинов и активных форм кислорода (АФК) может приводить к хронизации процесса и чрезмерному развитию соединительной ткани при инфекционных язвах роговицы [4–6].

Свободнорадикальный и иммунологический статус роговицы при термических ожогах роговицы на данный момент практически не изучены. Влияние коррекции данных нарушений на течение данного патологического процесса также до сих пор не оценено. В качестве вещества для коррекции свободнорадикальных и иммунологических нарушений роговицы обращает на себя внимание лактоферрин.

Лактоферрин вырабатывается и секретируется эпителиальными клетками слизистой оболочки и нейтрофилами человека. Он содержится в слюне, молоке, слезе и секретируется различными органами, включая молочную железу, матку, почки и мозг [7].

В ряде исследований были доказаны его противовирусные и противовоспалительные свойства, а также способность ускорять заживление ран кожи. В то же время у лактоферрина обнаружены и антиоксидантные свойства, которые обусловлены его способностью связывать железо, блокируя развитие реакций Фентона и Хабер-Вайса [8].

Ранее нами было показано, что лактоферрин является эффективным средством для лечения гнойной язвы роговицы, которое снижало выраженность окислительного стресса, улучшало клиническое течение, снижало процент развития осложнений [9].

Цель настоящего исследования — изучить особенности свободнорадикального и цитокинового статуса роговицы при термическом ожоге и возможности их коррекции с помощью лактоферрина.

МЕТОДИКА

Исследование выполнено на 45 кроликах-самцах породы Советская Шиншилла массой 3000–3500 г, в возрасте 9–12 месяцев. Кролики содержались в конвенциональном виварии Рязанского государственного медицинского университета (РязГМУ) в индивидуальных клетках.

Животные были рандомизированы в следующие экспериментальные серии:

Первая серия — интактные животные (норма) — кролики без моделирования патологии и экспериментальных воздействий (3 кролика, 6 глаз);

Вторая серия — контроль патологии — животные, у которых моделировали термический ожог роговицы и инстиллировали в конъюнктивальную полость физиологический раствор три раза в день (3 кролика, 6 глаз — на каждую временную точку);

Третья серия — коррекция свободнорадикальных и иммунологических нарушений с помощью лактоферрина — представлена животными, у которых моделировали термический ожог роговицы и инстиллировали в конъюнктивальную полость раствор лактоферрина в концентрации 0,5 мг/мл (3 кролика, 6 глаз — на каждую временную точку).

Животных выводили из эксперимента передозировкой золетила через 1 день, 3 дня, 5 дней, 7 дней, 14 дней, 21 день и 28 дней после моделирования ожога роговицы. Физиологический раствор и раствор лактоферрина применяли 3 раза в день в виде инстилляций по 1 капле в каждый глаз каждый день в течение 28 дней.

Моделирование термического ожога осуществляли следующим образом. На электрическую плитку, нагретую до 200°C на 2 мин ставили цилиндр из нержавеющей стали с диаметром основания 6 мм, радиус кривизны основания цилиндра — 9,0 мм. Контроль температуры цилиндра проводили пирометром. Перед термическим воздействием в конъюнктивальную полость закапывали 0,4% раствор оксибупрокаина ("Sentiss Pharma", Индия). Основание цилиндра, разогретого до 200°C, устанавливали на центральную область роговицы подопытных животных на 3 с. Непосредственно после термического воздействия всем кроликам проводили орошение роговицы и конъюнктивальной полости раствором натрия хлорида 0,9% комнатной температуры. После повторной инстилляции 0,4% раствора оксибупрокаина проводили скарификацию струпа роговицы в пределах обожжённой ткани. Все манипуляции проводили под визуальным контролем с использованием налобного бинокулярного офтальмоскопа Neitz Ю-α ("Neitz", Япония). Для оценки площади сформированного дефекта, роговицу окрашивали тест-полосками FluoStrips ("Contacare", Индия).

После эвтаназии животных проводили энуклеацию глазных яблок. Роговицу высекали с участком склеры в 1 мм от лимба, проводили измерение массы роговицы, её измельчение, добавляли фосфатный буфера в соотношении 1:10 по массе и готовили гомогенат с помощью гомогенизатора DIALX 900 ("Heidolph", Германия) при 26000 об/мин в течение 1 мин. Полученный гомогенат центрифугировали при 1800 g ("Eppendorf", Германия). В супернатанте определяли выраженность окислительного стресса с помощью оценки уровня малонового диальдегида (МДА), о котором судили, определяя продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП) [10], карбонильные производные белков [11], активность супероксиддисмутазы (СОД) [12], глутатионпероксидазы (GPx) [13].

Также анализировали выраженность иммунологических нарушений по уровню фактора

некроза опухолей (TNF-1α), интерлейкинов (IL) 4, 10, трансформирующего ростового фактора бета-1 (TGF-1β), которые анализировали методом ИФА с помощью коммерческих наборов "Cloud-Clone" (Китай). Полученные значения пересчитывали на мг белка, который определяли методом Брэдфорда с помощью коммерческого набора ("Thermo Fisher", США) [14].

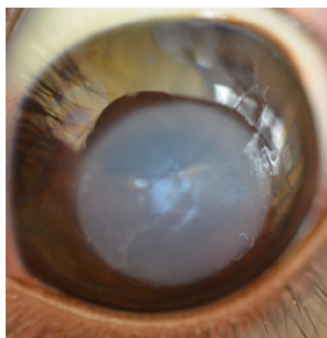
Математический анализ данных выполняли с помощью программы Statistica 10.0. Характер распределения данных оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Так как во всех случаях распределение данных было отличным от нормального, результаты представлены в виде медианы и нижнего и верхнего квартилей (ME (Q1; Q3)). Для оценки статистической значимости применяли непараметрические критерии: при сравнении более чем двух групп — критерий Крускала-Уоллиса, в дальнейшем попарные сравнения выполняли с помощью критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони; при сравнении двух групп — критерий Манна-Уитни U. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

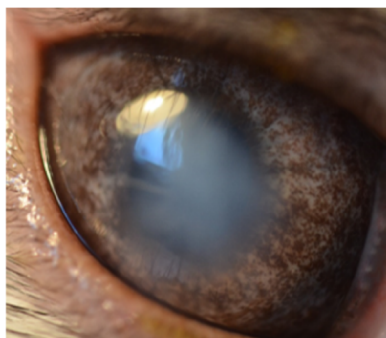
В контрольной группе (термический ожог и инстилляции физиологического раствора) с 1 по 5 сутки после нанесения ожогов роговицы в пределах обожжённой ткани роговица становилась более отёчной. Наблюдалась инфильтрация всей роговицы вокруг ожога, которая постепенно уменьшалась от периферии к центру. Прозрачность роговицы вне ожога восстанавливалась в период с 3 дня по 7 день. С 1 дня по 3 день развивалась смешанная инъекция бульбарной конъюнктивы, сохранявшаяся до 7–10 дней. Полная эпителизация дефекта в контрольной группе наблюдалась с 7 дня по 13 день. В ряде случаев, на 3–8 дни формировались участки изъязвления роговицы, завершавшиеся формированиями перфораций на 4 (1 глаз), 8 (3 глаза), 10 (1 глаз), 11 сутки (1 глаз). Животных с перфорациями роговицы выводили из эксперимента и не использовали в дальнейшем исследовании (рисунок).

При применении лактоферрина на фоне термического ожога роговицы были получены следующие результаты. С 1 по 4 день после нанесения ожогов роговицы в пределах обожжённой ткани роговица становилась более отёчной, место нанесения ожога тотально окрашивалось флуоресцеином. Отмечена инфильтрация всей роговицы вокруг ожога, которая постепенно уменьшалась, прозрачность роговицы вне ожога восстанавливалась со 2 дня по 4 день. Смешанная инъекция бульбарной конъюнктивы сохранялась в течение 5–7 дней. Полная эпителизация дефекта наблюдалась с 6 дня по 8 день. Перфораций на фоне лечения лактоферрином выявлено не было.

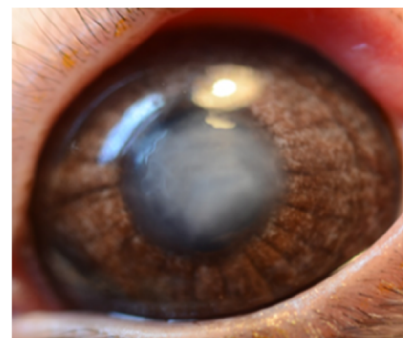
Местное применение раствора лактоферрина приводило к формированию более интенсивных, в сравнении с контрольной группой, помутнений роговицы на 28 день (рисунок).



Контроль 0 сутки



Контроль 28 сутки



Лактоферрин 28 сутки

Рисунок. Влияние лактоферрина на состояние роговицы глаза при термическом ожоге.

Моделирование термического ожога сопровождалось развитием окислительного стресса в роговице. Концентрация ТБК-РП повышалась с первых суток патологии, достигала максимума к 7 дню, на 120,1% ($p < 0,05$), превышая показатели нормы, а затем постепенно снижалась к 28 дню, не отличаясь от значений интактных животных. Содержание карбонильных производных белков также повышалось на 3 и 5 дни моделирования ожога, на 70,9% ($p < 0,05$) и 47,2% ($p < 0,05$) превосходя значения нормы (табл. 1).

Активность антиоксидантных ферментов в роговице наоборот уменьшалась. Активность СОД была снижена на протяжении всего эксперимента с минимальным значением на 7 день (на 41,3%; $p < 0,05$ ниже значений нормы), а активность GPx снижалась на 7–14 дни на 19,7% ($p < 0,05$) и 40,4% ($p < 0,05$) соответственно (табл. 1).

Уровень провоспалительного цитокина TNF-1 α увеличивался с первых суток развития патологии, достигал максимального значения на 7 день на 178,3% ($p < 0,05$), превышая показатели интактных животных, и сохранялся повышенным к 28 суткам эксперимента (табл. 2).

Содержание противовоспалительного цитокина IL-10 также увеличивалось с первого дня при моделировании патологии, достигало пика на 5 день, на 93,4% ($p < 0,05$), превышая значения нормы, и нормализовывалось к 28 дням. Уровень TGF-1 β также увеличивался при термическом ожоге на протяжении всего эксперимента, максимально превышая значения нормы на 5 день (на 77,8%, $p < 0,05$). Концентрация противовоспалительного цитокина IL-4 статистически значимо не изменялась на протяжении всего эксперимента (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о развитии окислительного стресса и воспаления при моделировании термического ожога роговицы, причём их максимальная выраженность совпадает со временем развития осложнений — перфораций роговицы.

Применение лактоферрина для коррекции свободнорадикальных и воспалительных нарушений приводило к следующим результатам.

Лактоферрин оказывал антиоксидантное действие, о чём свидетельствует снижение уровня ТБК-РП по сравнению с показателями контроля на 14 и 21 дни, карбонильных производных белков — на 14 и 28 дни (табл. 1). Лактоферрин также ускорял восстановление активности СОД (активность данного фермента снижалась только с 1 по 14 сутки, а далее достоверно от значений нормы не отличалась) и повышал активность GPx, которая превосходила значения контрольных животных на 14 и 21 дни эксперимента (табл. 1).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что лактоферрин оказывает антиоксидантное действие при экспериментальном термическом ожоге роговицы.

При изучении влияния лактоферрина на цитокиновый статус роговицы были получены следующие результаты. Уровень TNF-1 α также был достоверно выше показателей нормы на протяжении всего эксперимента, на 5 день превышая показатели контрольных животных на 33,6% ($p < 0,05$). Концентрация IL-10 на фоне применения лактоферрина на 1–7 дни была ниже значений контрольных животных, а с 14 по 28 дни их превышала. Также данный показатель превышал значения нормы с 5 дня по 28 день. Содержание TGF-1 β на фоне лечения лактоферрином превышало как значения нормы, так и показатели контроля на протяжении всего эксперимента (с 1 по 28 дни; табл. 2).

Таким образом, применение лактоферрина увеличивало уровень как про-, так и противовоспалительных цитокинов в роговице при развитии термического ожога.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе настоящего исследования были проанализированы развитие окислительного стресса и иммунологический статус роговицы при моделировании ожога роговицы и возможности их коррекции лактоферрином. Аналогичных исследований практически не проводилось, а основное внимание исследователей было обращено к химическим ожогам, хотя термический фактор является причиной ожогов глаз в 16% случаев [15].

Таблица 1. Влияние лактоферрина на свободнорадикальный статус роговицы при термическом ожоге (M(Q1-Q3))

Изучаемый показатель	Серия эксперимента	Норма	Сутки эксперимента						
			1	3	5	7	14	21	28
ТБК-реактивные продукты, нмоль/мг белка	контроль	2,29 (2,18-2,35)	4,37 (3,53-4,60)*	4,48 (4,22-4,97)*	4,97 (3,94-6,15)*	5,04 (4,64-5,45)*	3,32 (3,21-3,52)*	3,31 (3,11-3,34)*	2,31 (2,15-2,45)
	лактоферрин		3,69 (3,29-4,28)*	3,84 (3,26-4,20)*	4,02 (3,95-4,04)*	3,28 (3,05-3,62)*	2,46 (2,43-2,49) [#]	2,27 (2,14-2,45) [#]	2,11 (2,08-2,16)
Карбонилы, нмоль/мг белка	контроль	3,16 (2,93-3,20)	2,78 (2,705-2,987)	5,40 (5,310-5,680)*	4,65 (4,503-4,734)*	2,86 (2,810-2,970)	3,10 (2,970-3,230)	2,73 (2,410-2,860)	4,26 (3,990-4,390) [#]
	лактоферрин		2,68 (2,150-3,160)	3,64 (3,380-4,000)	4,30 (3,940-4,590)	3,59 (3,060-3,730)	2,49 (2,430-2,550) [#]	2,61 (2,448-2,843)	2,02 (1,950-2,140) [#]
СОД, ЕА/мг белка	контроль	3,12 (3,07-3,14)	2,84 (2,76-2,91)*	2,50 (2,37-2,54)*	2,05 (1,92-2,30)*	1,83 (1,70-1,92)*	2,08 (2,02-2,20)*	2,26 (2,21-2,27)*	2,81 (2,58-2,83)*
	лактоферрин		2,86 (2,80-2,90)*	1,94 (1,76-2,83)	2,08 (1,98-2,12)*	2,66 (2,56-2,74)	2,77 (2,67-2,83)	2,90 (2,77-3,05)	3,12 (3,07-3,13) [#]
GPRx, нмоль NADPH/мин×мг белка	контроль	19,36 (17,88-23,19)	20,935 (20,210-23,290)	19,72 (18,560-21,130)	17,65 (16,700-19,840)	15,55 (15,420-16,230)*	11,53 (11,390-11,785)*	16,30 (14,420-17,330)	19,11 (18,340-20,510)
	лактоферрин		22,83 (22,36-23,84)	22,01 (17,95-23,85)	18,82 (16,34-22,17)	17,32 (17,25-17,41)	18,44 (17,2-18,99) [#]	23,24 (21,92-23,76) [#]	23,61 (21,19-24,11)

Примечание. * $p < 0,05$ – статистически значимые различия с показателями нормы; # – статистически значимые различия с показателями контроля. За одну условную единицу активности (ЕА) принимали 50-процентное ингибирование аутоокисления кверцетина.

Таблица 2. Влияние лактоферрина на цитокинный статус роговицы при термическом ожоге (M(Q1-Q3))

Изучаемый показатель	Серия эксперимента	Норма	Сутки эксперимента						
			1	3	5	7	14	21	28
TNF-1 α , пг/мг белка	контроль	120,19 (109,36-123,73)	258,61 (246,010-264,165)*	303,06 (298,840-329,560)*	221,24 (211,570-232,560)*	334,51 (330,360-345,770)*	289,04 (282,215-291,080)*	312,51 (302,590-325,360)*	258,56 (251,000-266,710)*
	лактоферрин		255,53 (238,38-258,67)*	285,53 (271,07-299,95)*	295,63 (287,45-310,57) [#]	362,76 (345,93-368,91)*	273,32 (257,35-304,13)	270,07 (255,75-282,03)*	248,81 (233,48-250,45)*
IL-4, пг/мг белка	контроль	39,78 (36,65-41,09)	35,65 (34,40-36,69)	40,12 (37,80-41,11)	48,90 (48,40-49,35)	44,57 (43,53-45,18)	39,85 (37,64-41,90)	39,14 (37,41-42,29)	42,54 (40,32-43,73)
	лактоферрин		48,23 (47,93-50,81)	39,23 (38,52-40,89)	43,35 (42,76-44,25)	32,96 (31,29-34,23)	40,60 (39,11-41,15)	42,37 (42,14-42,98)	41,87 (41,56-43,88)
IL-10, пг/мг белка	контроль	6,21 (5,59-6,30)	9,15 (8,60-9,45)*	11,02 (10,55-11,23)*	12,01 (11,64-13,40)*	9,12 (8,64-9,75)*	8,99 (7,84-9,37)*	8,34 (7,87-8,68)*	8,15 (6,40-9,75)
	лактоферрин		7,34 (7,19-7,56)	6,00 (5,46-6,38) [#]	9,35 (8,13-10,39) [#]	8,02 (7,83-8,14) [#]	9,79 (9,10-10,30) [#]	10,94 (8,61-12,07) [#]	13,20 (12,00-13,46) [#]
TGF-1 β , пг/мг белка	контроль	34,57 (34,21-36,15)	47,19 (46,38-49,21)*	53,64 (52,62-54,97)*	61,47 (60,11-62,88)*	47,80 (46,85-48,57)*	45,13 (44,77-46,26)*	43,45 (42,66-46,11)*	42,50 (41,32-44,85)*
	лактоферрин		58,47 (57,59-59,83) [#]	79,77 (79,21-80,25) [#]	93,76 (88,31-99,03) [#]	94,87 (89,40-102,23) [#]	60,92 (52,71-63,65) [#]	61,09 (53,61-68,53) [#]	61,44 (58,98-63,64) [#]

Примечание. * $p < 0,05$ – статистически значимые различия с показателями нормы; # – статистически значимые различия с показателями контроля.

Роговица непрерывно подвергается воздействию кислорода, солнечного света, ультрафиолета, дыма и других токсичных загрязняющих веществ, что предрасполагает её к гиперпродукции свободных радикалов и развитию окислительного стресса с одной стороны [16], а другой — эволюционно обусловило выраженную систему антиоксидантной защиты. Например, роговица богата антиоксидантными ферментами, такими как СОД, каталаза, GPx и глутатионредуктаза, а также низкомолекулярными антиоксидантами — аскорбиновой кислотой, глутатионом, витамином Е, ферритином, которые участвуют в защите роговицы от свободных радикалов [17].

В ходе настоящего исследования было установлено, что развитие термического ожога роговицы сопровождалось развитием окислительного стресса, о чём свидетельствовало повышение уровня конечных продуктов окисления липидов — ТБК-ПИ и продуктов окислительного повреждения белков — их карбонильных производных. При этом также отмечено снижение активности ключевых ферментов антиоксидантной защиты СОД и GPx.

Развитие термического ожога роговицы сопровождалось и активацией воспалительной реакции — увеличивалась продукция провоспалительного цитокина TNF-1 α и противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGF-1 β .

Полученные в нашем исследовании результаты согласуются с результатами Базикова и соавт., которые также наблюдали повышение продукции TNF-1 α и IL-8 в течение 28 суток при развитии инфицированного щелочного ожога роговицы кролика [18].

TNF-1 α является одним из основных воспалительных цитокинов, который, с одной стороны, участвует в развитии резистентности к инфекционным агентам, с другой стороны, при гиперпродукции может вызывать развитие осложнений [19]. Показано, что АФК через инфламасомный путь индуцируют продукцию TNF-1 α повреждённым эпителием роговицы [20, 21]. TNF-1 α является одним из первых медиаторов, образующихся после окислительного стресса в месте химической травмы глаза.

IL-10 — противовоспалительный цитокин, который приводит к снижению продукции провоспалительных цитокинов, в том числе и TNF-1 α [22], а усиление продукции IL-10 ведёт к снижению противомикробной защиты и развитию септических осложнений [23].

TGF-1 β — полифункциональный цитокин, экспрессия которого связана с физиологическими процессами роста, дифференцировки, регенерации и стрессовой реакцией во многих типах клеток организма. TGF-1 β играет важную роль в регуляции работы иммунной системы. TGF-1 β блокирует активацию лимфоцитов и макрофагов [24].

Повышение уровня белков семейства TGF- β является одним из основных механизмов развития фиброза при многих заболеваниях [25].

В качестве терапевтического агента в настоящем исследовании был выбран лактоферрин. Его выбор

был обусловлен тем, что лактоферрин является эндогенным компонентом, составляя до 25% от общего количества белков слезы со средней концентрацией у здоровых людей около 1,42 мг/мл. Большая его часть секретируется основной слёзной железой [26]. С другой стороны, лактоферрин обладает выраженным антиоксидантным, противовирусным, противомикробным и противовоспалительным действием [7].

В ходе настоящего исследования было установлено, что лактоферрин оказывал выраженное терапевтическое действие, что проявлялось в ускорении заживления повреждения и профилактике развития осложнений — перфораций роговицы (в группе лечения не было зафиксировано развития ни одного случая перфораций).

При этом лактоферрин проявлял выраженное антиоксидантное действие — снижал уровень ТБК-реактивных продуктов и карбонильных производных белков, повышал активность антиоксидантных ферментов — СОД и GPx.

Считается, что основное антиоксидантное действие лактоферрина связано с его способностью связывать ионы железа и таким образом предотвращать развитие реакций Фентона и Хабера-Вайса [8].

Недавно было показано, что лактоферрин может также активировать экспрессию каталазы, GPx и СОД [27].

При изучении влияния лактоферрина на иммунологический статус роговицы на ранних сроках было обнаружено повышение уровня провоспалительного цитокина TNF-1 α и снижение содержания противовоспалительного цитокина IL-10, а на поздних сроках — повышение концентрации IL-10. Содержание TGF-1 β было повышено на протяжении всего эксперимента по сравнению с контролем.

В ряде исследований было показано, что лактоферрин также влияет на цитокиновую активность, либо повышая уровень противовоспалительных цитокинов, таких как IL-4 и IL-10, либо модулируя провоспалительные, такие как TNF-1 α , IL-1, IL-6 и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор [28].

Особенно стоит отметить, что в настоящем исследовании наряду с положительным действием лактоферрина на течение термического ожога к концу регенерации было выявлено более грубое, относительно контрольной группы, помутнение роговицы. Данные изменения могут быть связаны с повышенным уровнем противовоспалительных цитокинов, особенно, трансформирующего фактора роста. Известно, что TGF-1 β и другие факторы роста, чрезмерно стимулируют процесс заживления, способствующей стромальному фиброзу [29].

С другой стороны, показано, что лактоферрин ингибирует матриксные металлопротеазы MMP-9 и MMP-2 [30], которые необходимы для нормального протекания регенерации роговицы. Чесноковой и соавт. было установлено, что при термическом ожоге роговицы резкая активация трипсиноподобных протеаз в ней, направленная на очищение ожоговой

раны, происходит в период с 3 по 14 дни, после чего их активность снижается [31] и запускаются процессы репарации, в которых участвуют MMP-9 и MMP-2. Ингибирующее действие лактоферрина в этот период могло нарушить их протекание и также привести к формированию более грубого рубца.

Можно предположить, что для профилактики чрезмерного разрастания соединительной ткани можно ограничиться применением лактоферрина в течение первых 14 дней.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании было установлено, что развитие термического ожога роговицы сопровождается развитием окислительного стресса (повышением уровня ТБК-РП и карбонильных производных белков, снижением активности СОД и GPr), а также развитием выраженной воспалительной реакции — повышением уровня TNF-1 α , IL-10, TGF-1 β . Применение лактоферрина оказывает выраженный терапевтический эффект, что проявляется ускорением заживления, профилактикой развития осложнений (перфораций роговицы), снижением выраженности окислительного стресса, повышением концентраций TNF-1 α (на ранних сроках), IL-10 (на поздних сроках), TGF-1 β (на протяжении всего эксперимента). При этом, к концу регенерации наблюдалось более грубое, относительно контрольной группы помутнение роговицы, что может быть связано с повышенным уровнем противовоспалительных цитокинов, особенно, TGF-1 β .

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена из средств РязГМУ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Протокол работы был одобрен биоэтической комиссией РязГМУ (протокол №17 от 07.11.2018).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tangvarasittichai O., Tangvarasittichai S. (2018) Oxidative stress, ocular disease and diabetes retinopathy. *Curr. Pharm. Des.*, **24**(40), 4726–4741. DOI: 10.2174/1381612825666190115121531
2. Ong H.S., Riau A.K., Yam G.H.-F., Yusoff N.Z.B.M., Han E.J.Y., Goh T.-W., Lai R.C., Lim S.K., Mehta J.S. (2023) Mesenchymal stem cell exosomes as immunomodulatory therapy for corneal scarring. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**(8), 7456. DOI: 10.3390/ijms24087456
3. Fagoonee S., Saccu G., Bussolat B. (2023) Innovative stem cell-based strategies for corneal wound healing: A step forward. *Mol. Ther.*, **31**(8), 2307–2308. DOI: 10.1016/j.ymthe.2023.07.009
4. Park J.H., Kim M., Yim B., Park C.Y. (2021) Nitric oxide attenuated transforming growth factor- β induced myofibroblast differentiation of human keratocytes. *Sci. Rep.*, **11**(1), 8183. DOI: 10.1038/s41598-021-87791-x
5. Shahriary A., Sabzevari M., Jadidi K., Yazdani F., Aghamollae H. (2022) The role of inflammatory cytokines in neovascularization of chemical ocular injury. *Ocul. Immunol. Inflamm.*, **30**(5), 1149–1161. DOI: 10.1080/09273948.2020.1870148
6. Приходько В.А., Оковитый С.В. (2022) Возможности и перспективы антиоксидантной терапии в лечении заболеваний глаз. *Медицинский совет*, **16**(23), 263–273. [Prihodko V.A., Okovity S.V. (2022) Possibilities and prospects for antioxidant therapy in ocular diseases, *Meditsinskiy Sovet*, **16**(23), 263–273.] DOI: 10.21518/2079-701X-2022-16-23-263-273
7. Vagge A., Senni C., Bernabe F., Pellegrini M., Scorgia V., Traverso C.E., Giannaccare G. (2020) Therapeutic effects of lactoferrin in ocular diseases: from dry eye disease to infections. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(18), 6668. DOI: 10.3390/ijms21186668
8. Kruze M.L., Zimecki M., Actor J.K. (2017) Lactoferrin in a context of inflammation-induced pathology. *Front. Immunol.*, **8**, 1438. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01438
9. Колесников А.В., Немцова Е.Р., Шишкин М.М., Щулькин А.В., Баренина О.И., Кирсанова И.В. (2023) Влияние лактоферрина на течение экспериментальной гнойной язвы роговицы. *Офтальмология*, **20**(1), 128–135. [Kolesnikov A.V., Nemtsova E.R., Shishkin M.M., Shchul'kin A.V., Barenina O.I., Kirsanova I.V. (2023) Lactoferrin influence on the course of suppurative corneal ulcer. *Ophthalmology in Russia*, **20**(1), 128–135.] DOI: 10.18008/1816-5095-2023-1-128-135
10. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М. (1987) Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой. *Вопросы медицинской химии*, **33**(1), 118–122. [Gavrilov V.B., Gavrilova A.R., Mazhul L.M. (1987) Analysis of methods for the determination of lipid peroxidation products in blood serum using a test with thiobarbituric acid. *Voprosy Meditsinskoi Khimii*, **33**(1), 118–122.]
11. Weber D., Davies M.J., Grune T. (2015) Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions. *Redox Biology*, **5**, 367–380. DOI: 10.1016/j.redox.2015.06.005
12. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. (1990) Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. *Вопросы медицинской химии*, **36**(2), 88–91. [Kostiuk V.A., Potapovich A.I., Kovaleva Zh.V. (1990) A simple and sensitive method of determination of superoxide dismutase activity based on the reaction of quercetin oxidation. *Voprosy Meditsinskoi Khimii*, **36**(2), 88–91.]
13. Ланкин В.З., Гуревич С.М. (1976) Ингибирование перекисного окисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментативными системами (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза) при экспериментальном злокачественном росте. *Доклады Академии Наук СССР*, **226**(3), 705–708. [Lankin V.Z., Gurevich S.M. (1976) Inhibition of lipid peroxidation and detoxification of lipoperoxides by protective enzyme systems (superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase) during experimental neoplastic growth. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, **226**(3), 705–708.]

14. Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999
15. Raghu G., Berk M., Campochiaro P.A., Jaeschke H., Marenzi G., Richeldi L., Wen F.Q., Nicoletti F., Calverley P.M.A. (2021) The multifaceted therapeutic role of N-acetylcysteine (NAC) in disorders characterized by oxidative stress. *Curr. Neuropharmacol.*, **19**(8), 1202–1224. DOI: 10.2174/1570159X19666201230144109
16. Cabrera M.P., Chihuailaf R.H. (2011) Antioxidants and the integrity of ocular tissues. *Veterinary Medicine International*, **2011**, 905153. DOI: 10.4061/2011/905153
17. Acar U., Bayer A. (2016) Current concepts and management of severely traumatized tissues in the inner coatings (the anterior segment: anterior chamber structures, the iris, and the lens) of the globe: non-mechanical injuries. In: *Current Concepts and Management of Eye Injuries* (Sobaci G., ed.). Springer, London, pp. 65–73. DOI: 10.1007/978-1-4471-7302-1_5
18. Базиков И.А., Боташева В.С., Калинкина Н.И., Мальцев А.Н., Костюкова Н.Ю., Доменюк Д.А. (2017) Оценка эффективности применения офтальмологического ниосомального геля “Регенерин” в лечении химического ожога роговицы. *Саратовский научно-медицинский журнал*, **13**(2), 216–220. [Bazikov I.A., Batasheva V.S., Kalinkina N.I., Maltsev A.N., Kostyukova N.Yu., Domenyuk D.A. (2017) Effectiveness evaluation of application of the niosomal gel “Regenerin” in the treatment of chemical burns of cornea. *Saratov Journal of Medical Science*, **13**(2), 216–220.]
19. Zelová H., Hošek J. (2013) TNF- α signalling and inflammation: Interactions between old acquaintances. *Inflamm. Res.*, **62**(7), 641–651. DOI: 10.1007/s00011-013-0633-0
20. Zheng Q., Ren Y., Reinach P.S., She Y., Xiao B., Hua S., Qu J., Chen W. (2014) Reactive oxygen species activated NLRP3 inflammasomes prime environment-induced murine dry eye. *Exp. Eye Res.*, **125**, 1–8. DOI: 10.1016/j.exer.2014.05.001
21. Chen Y., Li M., Li B., Wang W., Lin A., Sheng M. (2013) Effect of reactive oxygen species generation in rabbit corneal epithelial cells on inflammatory and apoptotic signaling pathways in the presence of high osmotic pressure. *PLoS One*, **8**(8), e72900. DOI: 10.1371/journal.pone.0072900
22. Гурина О.П., Варламова О.Н., Мухитова Л.Ф. (2021) Интерлейкин-10. Биологическая роль и клиническое значение. *Университетский терапевтический вестник*, **2**(4), 66–74. [Gurina O.P., Varlamova O.N., Mukhitova L.F. (2020) Interleukin-10. Biological role and clinical significance. *University Therapeutic Journal*, **2**(4), 66–74.]
23. Иваненко И.Л., Гладили Г.П., Никитина В.В., Веретенников С.И. (2015) Роль цитокинов в патогенезе осложнений при ожоговой болезни. *Фундаментальные исследования*, **1**(4), 752–754. [Ivanenko I.L., Gladilin G.P., Nikitina V.V., Veretennikov S.I. (2015) The role of cytokines in the pathogenesis of complications in burn disease. *Fundamental Research*, **1**(4), 752–754.]
24. Филиппова А.Н., Виссарионов С.В., Хальчицкий С.Е., Согоян М.В. (2022) Трансформирующий фактор роста бета-1 (TGFB1) и развитие деформации позвоночника у детей с идиопатическим сколиозом. *Современные проблемы науки и образования*, **6**(1), 111. [Filippova A.N., Vissarionov S.V., Khalchitsky S.E., Sogoyan M.V. (2022) Transforming growth factor beta-1 (TGFB1) and the development of spinal deformity in children with idiopathic scoliosis. *Modern Problems of Science and Education*, **6**(1), 111.] DOI: 10.17513/spno.32186
25. Wynn T.A. (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.*, **214**(2), 199–210. DOI: 10.1002/path.2277
26. Rusciano D., Pezzino S., Olivieri M., Cristaldi M., Gagliano C., Lupo G., Anfuso C.D. (2018) Age-related dry eye lactoferrin and lactobionic acid. *Ophthalmic Res.*, **60**(2), 94–99. DOI: 10.1159/000489093
27. Pan Y., Liu Z., Wang Y., Zhang L., Chua N., Dai L., Chen J., Ho C.L. (2021) Evaluation of the anti-inflammatory and anti-oxidative effects of therapeutic human lactoferrin fragments. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **9**, 779018. DOI: 10.3389/fbioe.2021.779018
28. Actor J.K., Hwang S.A., Kruzel M.L. (2009) Lactoferrin as a natural immune modulator. *Curr. Pharm. Des.*, **15**(17), 1956–1973. DOI: 10.2174/138161209788453202
29. Dixon P., Ghosh T., Mondal K., Konar A., Chauhan A., Hazra S. (2018) Controlled delivery of pirfenidone through vitamin E-loaded contact lens ameliorates corneal inflammation. *Drug Deliv. Transl. Res.*, **8**(5), 1114–1126. DOI: 10.1007/s13346-018-0541-5
30. Pattamatta U., Willcox M., Stapleton F., Garrett Q. (2013) Bovine lactoferrin promotes corneal wound healing and suppresses IL-1 expression in alkali wounded mouse cornea. *Curr. Eye Res.*, **38**(11), 1110–1117. DOI: 10.3109/02713683.2013.811259
31. Чеснокова Н.Б., Бордюгова Г.Г., Багдаш С., Сосулина Н.Е. (1987) Динамика протеолитической и антипротеолитической активности при термическом ожоге роговицы. *Офтальмологический журнал*, **4**(1), 52–55. [Chesnokova N.B., Bordiugova G.G., Bagdash S., Sosulina N.E. (1987) Dynamics of proteolytic and antiproteolytic activity in corneal burns. *Oftalmologicheskii Zhurnal*, **4**(1), 52–55.]

Поступила в редакцию: 24. 03. 2024.
После доработки: 29. 04. 2024.
Принята к печати: 02. 05. 2024.

**THE EFFECT OF LACTOFERRIN ON THE FREE RADICAL AND CYTOKINE STATUS OF CORNEA
IN THE EXPERIMENTAL THERMAL BURN**

I.V. Kirsanova, A.V. Kolesnikov, A.V. Shchulkin, Yu.V. Abalenikhina, P.D. Erokhina, E.N. Yakusheva*

Ryazan State Medical University,
9 Vysokovolt'naya str., Ryazan, 390026 Russia; *e-mail: kirsanova-iv@inbox.ru

The free radical and cytokine statuses of the cornea during its thermal burn and the possibility of its correction by lactoferrin have been studied in Soviet Chinchilla rabbits. The development of a corneal thermal burn was accompanied by the development of oxidative stress (increased levels of TBA-reactive substances and carbonyl derivatives of proteins, decreased activity of SOD and GPx enzymes) and a pronounced inflammatory reaction with increased levels of TNF-1 α , IL-10, TGF-1 β . The use of lactoferrin had a pronounced therapeutic effect, which was manifested by accelerated healing, prevention of the development of complications (corneal perforations), a decrease in the severity of oxidative stress, an increase in the concentrations of TNF-1 α (in the early stages), IL-10 (in the later stages), TGF-1 β (throughout the experiment). At the same time, by the end of regeneration more severe corneal opacification was recognized compared to the control group. This may be associated with an increased level of anti-inflammatory cytokines, especially TGF-1 β .

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: corneal thermal burn; oxidative stress; cytokines; lactoferrin

Funding. The work was carried out using funds from Ryazan State Medical University.

Received: 24.03.2024; revised: 29.04.2024; accepted: 02.05.2024.