

**Федеральное агентство по здравоохранению и социальному
развитию
Государственное образовательное учреждение
Высшего профессионального образования
«Российский государственный медицинский университет»
Н.И. Пирогова.**

04.2.01 0 55577 -

На правах рукописи

ДЖАМБИНОВА НАТАЛЬЯ СЕМЕНОВНА

**ПРИМЕНЕНИЕ ЦИТОКИНОТЕРАПИИ В КОМПЛЕКСНОМ
ЛЕЧЕНИИ ВИРУСНЫХ И ТРАВМАТИЧЕСКИХ КЕРАТИТОВ
У ДЕТЕЙ**

14.01.07 - Глазные болезни

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

**Научные руководители:
доктор медицинских наук, профессор
Гусева Марина Раульевна,
доктор медицинских наук, профессор
Ганковская Людмила Викторовна**

Москва-2010 год.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВГЧ – вирус герпеса человека

ВПГ-1 – вирус простого герпеса 1 типа

ВГД – внутриглазное давление

ВЭБ - вирус Эпштейна-Барр

ГИ – герпетическая инфекция

КСФ – колониестимулирующий фактор

ИЛ-1 – интерлейкин

ИНФ - интерферон

ОФГ – офтальмогерпес

ПМП – противомикробные пептиды

ЦМВ – цитомегаловирус

ФНО α – фактор некроза опухоли α

ХК - хемокины

НВД – человеческий β -дефенсин

НК-клетки – натуральные киллеры

РАМР - pathogen-associated molecular patterns – патоген-ассоциированные молекулярные образцы

TLR – Toll-подобные (like) рецепторы

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ -----	2
ВВЕДЕНИЕ -----	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ -----	14
1.1. Этиология, патогенез, клиническая характеристика и лечение офтальмогерпеса у детей -----	14
1.2 Травматические поражения глаз -----	23
1.3 Система врожденного иммунитета тканей глаза -----	26
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1 Экспериментальные исследования -----	46
2.1.1. Характеристика экспериментальных животных -----	46
2.1.2. Методика создания экспериментальной стандартной модели дефекта роговицы -----	47
2.1.3. Гистологическое исследование -----	49
2.2. Определение экспрессии генов сигнального рецептора TLR9 и противомикробного пептида HBD-2 в конъюнктиве и роговице у детей методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени -----	50
2.3 Клинические исследования -----	53
2.3.1. Клиническая характеристика нозологических групп -----	53
2.3.2. Методы офтальмологических исследований -----	58
2.4. Статистический метод -----	60
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	
3.1 Влияние цитокинотерапии и кератопротекции на репаративную регенерацию роговицы после нанесения экспериментального дефекта роговицы -----	61
3.2. Гистологические данные эффективности цитокинотерапии и кератопротекции на регенерацию роговицы -----	65
3.3. Анализ экспрессии генов TLR9 и HBD-2 у здоровых детей и больных герпетическим кератитом -----	71

3.4. Результаты применения Суперлимфа и Аппликолла при герпетическом кератите	77
3.5. Результаты применения Суперлимфа и Аппликолла при травматическом кератите	82
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	87
ВЫВОДЫ	93
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	95
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	96
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	98

ВВЕДЕНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ

Воспалительные заболевания переднего отрезка глаз являются серьезной медико-социальной проблемой, составляя более 40% всех амбулаторных больных. Чаще всего поражение обусловлено вирусом простого герпеса. В структуре офтальмогерпеса преобладают поражения роговицы - кератиты [4, 8, 39, 41, 84, 177].

Рецидивирующий офтальмогерпес часто является основной причиной прогрессирующего ухудшения зрения. Обострение воспалительного процесса возникает после первой атаки в 25 - 33% случаев, а после второй – в 43-50%[197].

Среди детей герпетический кератит составляет 70-80% от числа всех воспалительных заболеваний роговицы. Офтальмогерпес у детей из-за широкой распространенности, склонности к рецидивам, трудностей в лечении и нередко тяжелых последствий представляет собой серьезную проблему. По данным многих авторов [63, 83, 84, 89] после перенесенного офтальмогерпеса у большинства детей снижается зрение в связи с формированием до 50% случаев астигматизма и амблиопии.

Удельный вес кератитов в структуре общей детской глазной заболеваемости составляет 0,2%, ко всем детским заболеваниям 0,04%. в г. Москва. В глазном стационаре Морозовской детской городской клинической больницы - до 15 % ко всем больным.

Другой частой причиной воспалительной патологии роговицы у детей является травма глазного яблока различного характера, сопровождающаяся повреждением роговицы в виде эрозий, ранений различной глубины, вплоть до проникающих ранений [16, 27, 28, 72, 85, 87, 107, 108, 110].

Повреждения глаз в детском возрасте составляют до 50% всей детской патологии и являются наиболее частой причиной слабости зрения и слепоты [1, 3, 11, 27, 31, 72].

Это вызвано тем, что при травмах и воспалительной патологии в области дефекта роговицы в связи с недостаточной дифференцировкой коллагена у детей младшего возраста в отличие от взрослых резорбция и замещение коллагена роговицы происходит в длительные сроки, приводя к образованию соединительной ткани. Лечебные мероприятия всегда носят комплексный характер и предполагают назначение этиотропного, противовоспалительного, симптоматического лечения.

В связи с незрелостью тканей глазного яблока у детей и несовершенством его местной врожденной иммунологической защиты лечение патологии роговицы всегда должно быть дополнено назначением иммуностропных препаратов.

Поиск и разработка новых препаратов, эффективных при рецидивирующем течении заболевания, является актуальной и важной медико-социальной задачей. Перспективным направлением в этой области является цитокиноterapia [19, 44, 45, 48, 49, 74].

В последние годы появились данные о важной роли врожденного иммунитета в защите органа зрения от различных патогенов. Решающую роль в активации врожденного иммунитета играют Toll-подобные рецепторы, которые экспрессируются на различных клетках организма (моноцитах, дендритных клетках, эпителии и др.) и эффекторные молекулы - дефенсины, локализованные в нейтрофильных гранулоцитах и клетках эпителия слизистых оболочек [59, 60, 61, 169, 187, 240].

Доказано, что TLRs экспрессируются в роговице, конъюнктиве и сетчатке глаза [242]. Особую значимость при герпесвирусной инфекции представляет TLR9, который участвует в распознавании метилированных CpG-повторов ДНК вируса ВПГ-1 [202, 242]. Взаимодействие TLR9 с лигандом приводит к активации MyD88-зависимого и MyD88-независимого сигнальных путей, к транслокации транскрипционных факторов NF- κ B и IRF в ядро и последующей экспрессии провоспалительных цитокинов,

противомикробных пептидов (ПМП), интерферонов 1 типа, играющих важную роль в противовирусной защите тканей глаза [242, 245].

При инфицировании вирусом простого герпеса путем слияния оболочки вириона и цитоплазматической мембраны клетки, либо за счет реализации механизма рецепторного эндоцитоза, происходит проникновение вирусных частиц в клетки слизистых оболочек, и нуклеокапсид вируса оказывается в цитоплазме клеток [212].

Дефенсины - пептиды, обладающие выраженной антимикробной и противовирусной активностью, важный компонент фагоцитарной защиты организма. Дефенсины нарушают дыхание и рост микроорганизмов и грибков, повышают проницаемость капилляров, что способствует миграции нейтрофилов в ткань [171, 179, 187, 188, 189, 227]. Среди противомикробных пептидов особый интерес представляет HBD-2, который экспрессируется эпителиальными клетками роговицы при активации TLRs, а также под действием цитокинов и компонентов бактерий и вирусов [187].

Имеются единичные работы о функции Toll-подобных рецепторов и противомикробных пептидов при воспалительных заболеваниях глаз у взрослых, у детей не изучена роль TLR9 и HBD-2 [202, 257] Поэтому исследование показателей врожденного иммунитета в тканях глаза позволит усовершенствовать методы лечения и прогнозировать течение воспалительных заболеваний роговицы.

Особую значимость при герпесвирусной инфекции представляет Toll-подобный рецептор 9 (TLR9), который участвует в распознавании ДНК вируса простого герпеса 1 типа и способствует экспрессии провоспалительных цитокинов и противомикробных пептидов (HBD-2), интерферонов 1 типа, играющих важную роль в противовирусной защите тканей глаза.

Таким образом, избыточная экспрессия провоспалительного TLR9 может усугубить воспалительный процесс и привести к развитию осложнений с одной стороны, с другой стороны в результате сложных

иммунологических каскадных реакций происходит усиление выработки противомикробных пептидов и интерферонов.

В этом аспекте для клиницистов важным является своевременное выяснение роли экспрессии распознающих рецепторов системы врожденного иммунитета Toll-подобных рецепторов и противомикробных пептидов, что способствует разработке, на основе полученных данных, новых подходов к терапии кератитов [60].

В связи с этим в нашей работе был применен иммуностропный препарат Суперлимф, активирующий механизмы врожденного иммунитета и представляющий собой комплекс природных иммунопептидов, которые состоят из противомикробных белков и цитокинов [52, 54, 55].

В настоящее время продемонстрировано прямое антибактериальное действие комплекса природных цитокинов (Суперлимфа) на стафилококки (*St.aureus*), стрептококки (*Strep. haem.*), *E.coli*. Суперлимф угнетает репродукцию вируса герпеса 1 и 2 типа, вызывая лизис оболочки вириона [57, 61].

Ранее комплекс природных цитокинов применяли в эксперименте и в клинической практике при лечении проникающих ранений роговицы, ожогах роговицы, после антиглаукоматозной операции, экстракции катаракты, кератитах и увеитах у взрослых [20, 24, 25, 34, 73, 103, 123, 124, 143, 167], а также при лечении хронического тонзиллита и гипертрофии миндалин у детей [122].

Программа клинических исследований и отчет о проведении клинических испытаний препарата Суперлимф (регистрационный номер 000516/01-2001, лицензия № 42/176/2002 центр ООО «Иммунохел») в комплексном лечении вирусных и травматических кератитов у детей рассмотрены и одобрены на заседаниях Этического комитета РГМУ (протокол №66).

Для пролонгированного действия препарата Суперлимф мы впервые использовали кератопротектор Аппликолл (регистрационный номер ФСР 2009/05861, протокол Этического комитета РГМУ №89).

В литературе имеются сообщения о близких аналогах Апликолл, которые применялись в лечении воспалительных заболеваний роговицы только у взрослых [5, 65, 117]

Кератопротектор Апликолл разработан ООО «МакМеди» и представляет собой сухую полупрозрачную пленку полусферической формы из коллагена, который активирует репаративные процессы и способствует коррекции рубцово-фиброзного процесса при воспалении и заживлении ран роговицы.

Учитывая многофакторное действие данных препаратов, которые избирательно действуют на регенеративные процессы в роговице, нами был разработан комплексный метод, сочетающий применение стимуляторов репарации, таких как цитокины и коллаген.

Цель работы.

Цель работы: оценить эффективность комплексного лечения кератитов вирусной и травматической этиологии у детей с использованием цитокинотерапии и кератопротекции.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние топической иммунотерапии препарата Суперлимф в комплексном лечении совместно с применением коллагенового кератопротектора Апликолл на регуляцию репаративных процессов в роговице при травматическом ее дефекте в эксперименте на кроликах.
2. Определить уровень экспрессии генов врожденного иммунитета (сигнального рецептора TLR9, противомикробного пептида HBD-2, обеспечивающих противовирусную и антибактериальную защиту)

в мазках с конъюнктивы и роговицы у здоровых детей и при герпетическом кератите.

3. Оценить клиническую эффективность применения иммуностропного препарата Суперлимф в комплексном лечении герпетических кератитов с учетом показателей врожденного иммунитета.
4. Оценить лечебный эффект применения комплекса противомикробных иммунопептидов и его совместного использования с коллагеновым кератопротектором в комплексном лечении герпетических и травматических кератитов у детей.
5. Разработать показания и метод применения цитокинотерапии и кератопротекции при комплексном лечении герпетического и травматического кератита у детей

Научная новизна

1. Впервые изучена экспрессия генов сигнального рецептора TLR9 и противомикробного пептида HBD-2 в конъюнктиве и роговице у детей.
2. При герпетическом кератите уровень экспрессии генов TLR9 в конъюнктиве и роговице значительно возрастает, что может приводить к увеличению выработки провоспалительных цитокинов и возникновению осложнений течения воспалительных заболеваний роговицы.
3. Впервые в эксперименте на кроликах и в клинике разработан новый подход к лечению воспалительной патологии роговицы у детей, основанный на применении форсированных инстилляций иммуностропного препарата Суперлимф и совместно с кератопротектором Аппликолл.
4. Исследование молекул врожденного иммунитета позволило обосновать и доказать эффективность применения комплекса

природных иммунопептидов в комплексной терапии герпетического кератита у детей.

Практическая значимость.

Разработана схема комплексного лечения, основанная на применении в виде форсированных инстилляций иммуностропного препарата Суперлимф и кератопротектора Аппликолл совместно с Суперлимфом в комплексном лечении герпетического и травматического кератита у детей.

Внедрен новый метод лабораторной диагностики - определение уровня экспрессии генов сигнального рецептора TLR9 и противомикробного пептида HBD-2 в конъюнктиве и роговице у здоровых детей и при герпетическом кератите для контроля за течением воспалительного процесса и эффективности лечения.

Установлены показания для применения в комплексной терапии герпетических и травматических кератитов у детей иммуностропного препарата Суперлимф и при необходимости кератопротектора Аппликолл, позволяющих снизить уровень осложнений и добиться большего функционального эффекта.

Основные положения выносимые на защиту.

1. Результаты морфологических исследований роговицы кролика показали, что цитокиноterapia оказывает стимулирующее влияние на заживление поврежденной роговицы кролика, а совместное использование с кератопротекцией способствует формированию более нежного рубца, близкого по структуре к здоровой роговице.
2. В конъюнктиве и роговице здоровых детей выявлена экспрессия сигнального рецептора TLR 9 и противомикробного пептида HBD -2,

регулирующих противовирусную и антибактериальную защиту тканей глаза.

3. При воспалительной реакции наблюдалась гиперэкспрессия генов TLR9 в клетках эпителия конъюнктивы и роговицы в 20 раз, вызванная вирусной инфекцией, тогда как уровень противомикробных пептидов HBD-2 достоверно не изменялся.
4. Использование препарата цитокинов Суперлимф и его совместное применение с кератопротектором Апликолл при герпетических и травматических кератитах у детей способствует более быстрому купированию воспалительного процесса, снижению осложнений и достижению высоких функциональных исходов.

Внедрение результатов работы в практику

Метод комплексного лечения герпетических и травматических кератитов у детей с применением иммуностропного препарата Суперлимф и его совместное применение с кератопротектором Апликолл применяется в работе 7-го и 12-го глазных отделений Морозовской детской клинической городской больницы и глазном отделении Российской детской клинической больницы г.Москвы.

Апробация результатов исследования

Основные положения диссертационной работы были представлены и обсуждены на:

- Научно-практической конференции кафедры офтальмологии педиатрического факультета РГМУ (Москва, март, 2007г.);
- Юбилейной конференции Поражения органа зрения (Санкт-Петербург, сентябрь, 2008г.);

- V международной научно-практической конференции «Пролиферативный синдром в офтальмологии» (Москва, ноябрь, 2008г.);
- Городской конференции детских офтальмологов (Москва, февраль, 2009 г.)

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ. Из них 4 в центральной печати.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 123 страницах машинописного текста, иллюстрирована 10 таблицами, 25 рисунками. Состоит из введения, обзора литературы, глав собственных исследований, заключения, выводов, списка использованной литературы (167 - отечественных, 90 - иностранных).

Глава 1.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.2. Этиология, патогенез, клиническая характеристика и лечение офтальмогерпеса у детей.

Герпесвирусная инфекция (ГИ) представляет собой широко распространенную группу антропонозных инфекционных заболеваний, характеризующихся выраженной персистенцией вируса и его пожизненным пребыванием в организме человека, полиморфизмом клинического течения [4, 7]. Многообразие клинических проявлений болезни, морфологических особенностей возбудителя, возможность передачи практически всеми известными путями позволили Европейскому региональному бюро ВОЗ отнести герпесвирусную инфекцию к разряду самых распространенных инфекций [201].

Многочисленными исследованиями установлено, что вирусом простого герпеса (ВПГ) инфицировано 65-90% населения планеты. Достижения лабораторной и, в первую очередь, молекулярной диагностики повысили вероятность выявления данной инфекции и свидетельствуют о неуклонном росте количества инфицированных среди взрослого и детского населения. Герпесвирусы вызывают в основном скрытые формы болезни (латентные или персистирующие), что сформировало неверное представление о невысоком уровне заболеваемости герпетической инфекцией [2, 7, 12].

По данным сероэпидемиологических исследований, антитела к вирусам простого герпеса выявляются у 70-100% населения [30].

Широкий тканевый тропизм, способность к персистенции и латенции в организме инфицированного человека являются уникальными биологическими свойствами всех герпесвирусов. Персистенция представляет собой способность вирусов непрерывно или циклично размножаться (реплицироваться) в инфицированных клетках тропных тканей, что создает

постоянную угрозу развития инфекционного процесса. Латенция герпесвирусов – это пожизненное сохранение вирусов в морфологически и иммунохимически видоизмененной форме в нервных клетках регионарных ганглиев [35].

Таким образом, рецидивирующая герпесвирусная инфекция любой локализации должна рассматриваться лечащим врачом как маркер иммунодефицитного состояния, что влечет за собой соответствующее обследование и увеличение объема проводимой терапии, включающей фазу иммунореабилитации[42].

Герпетическая инфекция – это группа инфекционных заболеваний, вызываемых вирусами семейства *Herpesviridae* – герпесвирусов (от греч. *herpes* – ползучая болезнь), включающего три подсемейства: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae*, *Gammaherpesvirinae*. Вирусы подразделяют в зависимости от типа клеток, вовлекаемых в инфекционный процесс, и персистенции у естественных хозяев.

Альфа-герпесвирусы характеризуются коротким циклом репродукции в клеточных культурах и оказывают выраженный цитопатический эффект. Эти вирусы обычно персистируют в центральной нервной системе, поддерживая латентную инфекцию, которая может проявляться периодическими обострениями. В большинстве случаев они являются причиной кожно-слизистых форм заболевания, а также поражений дыхательных путей. К ним относятся вирус простого герпеса, вирус ложного бешенства.

Бета-герпесвирусы характеризуются строго выраженной патогенностью для одного вида хозяев, часто вызывают генерализованные формы у новорожденных детей и у взрослых при иммунодефицитных состояниях. К ним относятся цитомегаловирус человека и цитомегаловирус мыши.

Гамма-герпесвирусы характеризуются тропизмом к В- и Т-лимфоцитам, в которых они длительно персистируют. Они нередко являются причиной

тяжелых, смертельных лимфом и лейкозий при наличии дополнительных факторов – экзогенных, генетических, у больных со смешанными инфекциями и др. К ним относятся вирус Эпштейна Барр и вирус герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6), обладающий онкогенным эффектом [79].

В последнее десятилетие на первое место среди воспалительных болезней роговицы вышли вирусные заболевания, преимущественно герпесвирусной или аденовирусной этиологии [92, 93]. По данным Ю.Ф. Майчука (2001) с вирусом простого герпеса связано 66,6% всех случаев патологии роговицы, 55,1% – язвенных ее поражений и более 60% – роговичной слепоты. На сегодняшний день герпетические кератиты (ГК) широко распространены из-за склонности к рецидивам (в 50-80% случаев), трудностей в лечении и нередко тяжелых последствий. Частота рецидивов герпетических кератитов на протяжении 2 лет после первой атаки инфекции составляет от 25 до 33%, после второй – от 43 до 50% [39]. Следует отметить, что каждый последующий рецидив протекает тяжелее, чаще приводит к образованию помутнений роговицы и в конечном итоге требует проведения кератопластики. Рецидивирующий герпес роговицы – заболевание, ставшее в странах умеренного пояса одной из ведущих причин инвалидизирующих помутнений роговицы. По данным А.А. Каспарова, герпетическая инфекция явилась причиной кератопластики при деструктивных процессах роговицы в 68,1% случаев.

Как было указано выше, в структуре офтальмогерпеса преобладают поражения роговицы (кератиты). Герпетический кератит составляет среди взрослых 20-57%, среди детей – 70-80% от числа всех воспалительных заболеваний роговицы. В нашей стране ежегодно регистрируется 300-500 тыс. случаев офтальмогерпеса. По данным специалистов отделения реконструктивной хирургии глаза НИИ глазных болезней РАМН, более 35% больных, поступивших в отделение в течение 10 последних лет для кератопластики, имели поражения герпетической этиологии. Согласно анализу, проведенному в Московском НИИ глазных болезней им.

Гельмгольца, герпетический кератит выявлен у 66,6% от общего числа больных с роговичной патологией. В США ежегодно фиксируется около 500 тыс. случаев ГК. Результаты исследований, проведенных в 1985-1987 гг. в офтальмологической клинике Бристоля (Англия), показали, что на 863 тыс. населения ежегодно регистрировалось 120 случаев первичного герпетического кератита, что соответствует частоте его встречаемости приблизительно 1:8000 [248]

Рецидивы герпетического кератита возникают в 25% случаев после первого проявления инфекции и в 75% – после повторных атак. Они обусловлены реактивацией персистирующего вируса или реинфекцией экзогенным вирусом герпеса [17, 80].

Патогенез. Офтальмогерпес определяется свойствами вируса и специфическими иммунными реакциями макроорганизма, возникающими в ответ на внедрение ВПГ. Вирус поражает ткани глаза при несостоятельности местных защитных механизмов, таких как продукция секреторных антител клетками субэпителиальной лимфоидной ткани, местная продукция интерферона, сенсibilизированные лимфоциты.

Попадая в ткани глаза экзогенным (через эпителий), нейrogenным или гематогенным путем, ВПГ активно размножается в клетках эпителия роговицы, что приводит к их некрозу и слущиванию вследствие цитопатических и дистрофических процессов. При поверхностных кератитах (в основном поражение эпителия роговицы) на этом этапе прекращается дальнейшее размножение вируса. Дефект роговичной ткани эпителизируется, вирус переходит в персистирующее состояние, при котором он может находиться не только в тройничном узле, но и в самой роговице [39]. Актуальность проблемы герпетического кератита в практической офтальмологии связана с рецидивирующим течением болезни, нередко приводящим к снижению зрения, вплоть до слепоты. Герпетический кератит может осложняться сопутствующей инфекцией, метаболическими поражениями тканей глаз, повышением внутриглазного давления и

развитием катаракты. Заболевания, вызываемые другими вирусами семейства, имеют нозологическую самостоятельность. В патогенезе рецидивирующей герпесной инфекции ведущую роль играют нарушения в системе иммунитета, которые при ВПГ носят неоднородный характер и требуют дифференцированного подхода к их коррекции [81,].

Патогенез глубоких форм ГК (с вовлечением стромы роговицы) неоднозначен. С одной стороны, ВПГ обладает прямым повреждающим действием на клетки, вызывая их гибель с последующим развитием воспалительных реакций. С другой стороны, ряд авторов указывают на способность ВПГ к антигенной мимикрии с возникновением перекрестно реагирующих антигенов, ответственных за запуск аутоиммунных реакций в роговице. Вирус, персистирующий в тканях глаза, может активизироваться под влиянием стрессовых факторов, травм, инсоляций, общих вирусных инфекций, переохлаждении, нарушений гормонального статуса [39, 165, 173, 185].

Первичный и постпервичный герпес

Заражение вирусом простого герпеса происходит, как правило, в возрасте 6 мес. - 3 лет (3-8 % от числа всех герпетических кератитов). К 5 годам уже примерно у 60% детей имеются герпеснейтрализующие антитела в крови, а в возрасте старше 15 лет герпесом инфицировано 90% людей, и почти все взрослое население является носителем вируса герпеса [29, 30]

Клинические проявления герпеса роговицы многообразны. Наиболее распространенными формами являются везикулярная, древовидная, метагерпетическая и дисковидная. Большие диагностические трудности вызывают менее характерные для герпеса, реже встречающиеся формы – интерстициальный кератит, краевой инфильтрат, герпетическая язва роговицы, рецидивирующая эрозия роговицы и атипичные герпетические кератиты.

К отличительным особенностям герпетических кератитов у детей относят возможность развития первичных поражений, которые возникают на фоне отсутствия специфических антител к герпесу.

Диагноз первичного поражения глаз при герпетическом кератите ставят на основании анамнестических данных с учетом клиники заболевания (наличие герпетического поражения век, конъюнктивит, васкуляризация роговицы), отсутствия герпеснейтрализующих антител в крови детей в первую неделю заболевания, динамики внутрикожных проб с герпетическим полиантигеном [83, 84].

При изучении первичных поражений глаз установлено, что они характеризуются более тяжелым течением, частым развитием метагерпетического кератита (50,4%), обильной васкуляризацией роговицы (60%), вовлечением в процесс конъюнктивы (70%) и переднего отдела сосудистого тракта (69%), сопутствующими кожными высыпаниями герпеса (41%). Как правило, заболевание протекало длительно, торпидно, до 3 мес. [83].

Постпервичные герпетические кератиты характеризуются слабой выраженностью роговичного синдрома, менее выраженным раздражением глаза, преимущественно поверхностными формами поражения роговицы, относительно легким течением с более редким вовлечением в процесс переднего отдела сосудистого тракта, чем при первичном герпетическом кератите [30, 63].

Иммунология офтальмогерпеса.

При инфицировании организма ВПГ защитную роль играют специфические и неспецифические гуморальные и клеточные факторы иммунитета, связанные с участием антител, макрофагов, лимфоцитов, интерферона [7, 155, 160, 162].

Известно, что при первичном и рецидивирующем герпесе наблюдается последовательный синтез IgM, IgG, IgA [31]. Эти три класса

иммуноглобулинов принимают активное участие в защитной реакции при герпесе и других инфекциях глаза. Их уровень в слезной жидкости в остром периоде офтальмогерпеса повышается, что связано с местным синтезом секреторных иммуноглобулинов и пропотеванием антител из сыворотки. Установлен дефицит IgA в слезной жидкости у больных с часто рецидивирующим и тяжелым течением герпетического кератита, а также после местного и системного лечения кортикостероидами. Повышение уровня IgA в слезной жидкости у больных отмечено при курсовом лечении противогерпетической вакциной, при местном использовании иммунного гамма-глобулина и аутокрови [141, 145].

Реакции клеточного иммунитета определяются клеточными элементами: Т-киллерами, Т-эффекторами гиперчувствительности замедленного типа, макрофагами, полиморфно-ядерными лейкоцитами, обычно в кооперации с гуморальными факторами иммунитета, и направлены против инфицированных клеток и вируса. Факторы клеточного иммунитета (лимфокины) выделяются иммунными Т-лимфоцитами (бластами) и инфицированными клетками. Функция факторов клеточного иммунитета связана с подавлением репродукции вируса, со стимуляцией бласттрансформации лимфоцитов, миграцией и удержанием макрофагов, лимфоцитов в очаге воспаления и др. Кроме того, факторы клеточного иммунитета вызывают лизис инфицированных клеток и способствуют высвобождению внутриклеточного вируса для последующей нейтрализации антителами, а также влияют на соседние нормальные клетки, предупреждая их инфицирование. Последние функции выполняет интерферон, который препятствует распространению вирусной инфекции на соседние здоровые клетки [39, 144, 252, 256].

Методы выделения вируса.

Для выделения вируса в клинической практике используют соскобы с конъюнктивы и роговицы, слезную жидкость, материал, полученный при кератопластике, а также порции внутриглазной жидкости.

Ранее для выделения ВПГ использовали различные структуры клеток: почек и эпителия роговицы кролика, человеческой почки, человеческой аденокарциномы (штамм HeLa), диплоидные фибробласты человека и хомяка, куриные фибробласты и т.д.[39]

Внесенный в культуру ткани вирус после размножения обеспечивает цитопатический эффект в течение 1-4 дней в зависимости от концентрации ВПГ. Последующая идентификация вируса и его антигенного типа (ВПГ-1 и ВПГ-2) может быть проведена в однослойной клеточной структуре с помощью стандартных противогерпетических иммунных сывороток.

Лабораторная диагностика на современном этапе включает: цитологический метод в сочетании с методом флюоресцирующих антител-МФА, культивирование вируса на хорионалантоисной оболочке куриных эмбрионов, клеток VERO, выявление специфических антител к ВПГ (IgA, IgM, IgG) и антигена методом иммуноферментного анализа (ИФА), наиболее чувствительна и специфична - полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Диагностическое и прогностическое значение имеет биохимический анализ слезной жидкости.

При герпетическом кератите нарушается структура роговицы, богатой гликозаминогликанами и гликозидами [133]. Известно, что повышение активности лизосомальных гликозидаз в слезной жидкости детей связано с лабильностью мембран. Активация лизосомальных гликозидаз в слезной жидкости детей при герпетическом кератите свидетельствует о разрушении гликозидсодержащих соединений роговицы, имеющих большое значение для поддержания ее функциональной активности и прозрачности.

Определение активности лизосомальных гликозидаз в слезной жидкости у детей при герпетическом кератите позволяет прогнозировать

рецидив заболевания и может служить критерием излеченности детей. Отсутствие нормализации активности β -гликозидазы, α -маннозидазы, β -глюкуронидазы в слезной жидкости детей дает возможность прогнозировать рецидив герпетического кератита и скорректировать терапию [88, 133].

Лечение офтальмогерпеса:

Исследованиями ряда авторов доказана высокая терапевтическая эффективность ацикловира при лечении всех форм герпетических кератитов и прежде всего – стромальных [91, 97, 223, 244].

Ранее применяли видарабин (аденин арабинозид Ара-А), идоксуридин (офтан-иду), трифтортимидин, фоскарнет, бонафтон, флореналь, теброфен, оксолин, дезоксирибонуклеазу [39, 88].

С целью нормализации иммунной защиты организма от герпетической инфекции как на клеточном, так и гуморальном уровнях используется иммунотерапия. Широко используются лейкоцитарный альфа-интерферон, интерлок, реаферон, берофор, фрон, полудан, пирогенал, локферон [38, 43, 77, 111, 164].

Иммунокорректирующая терапия включает левамизол, тималин, Т-активин, рибомунил, ликопид [90, 92, 93, 95].

Доказана эффективность ингибиторов ферментов протеолиза: контрикал, гордокс (Полупин Г.С. и соавт., 1983; 1991; Кот О.А. 1990).

Рыкун В.С., 1988; Марковская Э.К., 1991 в комплексном лечении герпетического кератита применяли антиоксиданты: альфа-токоферол (витамин Е), эмоксипин 1%.

Широкое применение для лечения герпетического кератита получили зовиракс, валтрекс [96], а также апилак [114] и субалин [126].

В последние годы в клинической практике как противовирусное средство применяется лекарственный препарат - актипол (0,007% раствор пара-аминобензойной кислоты). Его действие связано с интерферон – продуцирующей активностью [6, 118].

Попытки создать стабильные капли интерферона предпринимались учеными на протяжении многих лет. Офтальмоферон – первые стабильные глазные капли, содержащие человеческий интерферон альфа – 2b [98, 100].

Большое внимание уделяется лечению герпетического кератита лазером [13].

Для реконструкции поверхности переднего отрезка используют консервированную амниотическую мембрану [40, 192, 207, 222].

В начале 60-х годов начались исследования по разработке противогерпетической вакцины Шумбладзе А.К., Маевская Т.М. (1966) создали первую отечественную экспериментальную вакцину для противорецидивной терапии.

Культуральная инактивированная вакцина выпускается с 1982 г. в Одессе, в настоящее время в С. – Петербурге (НИИ вакцин и сывороток) и в Москве – «Вита герпевак» (фирма Вита-фарм). Вакцина представляет собой выращенный на культуре клеток куриного эмбриона и инактивированный формалином ВПГ-1 и ВПГ-2. Показана двум группам риска: 1) больным с наличием частых обострений ГК (1 раз в год и более), 2) больным, перенесшим кератопластику [18, 39, 40].

Экспериментальные работы Баринского И.Ф. показали способность полиоксидония повышать иммуногенность герпесвирусных вакцин против ВПГ-1, ВПГ-2 и цитомегаловирусной инфекции [9].

Несмотря на широкий спектр фармакологических препаратов репаративного действия, до сих пор остается актуальным поиск новых средств, улучшающих регенерацию роговицы [17, 102, 184, 190, 235].

1.2 Травматические поражения глаз.

Повреждения глаз в детском возрасте составляет до 50% ко всем больным [1, 11, 32, 62, 129, 148]. По данным глазного стационара Морозовской детской городской клинической больницы г.Москвы у 80%

больных с травмой повреждена роговица в той или иной степени, которая может осложниться травматическим кератитом [22, 27, 86, 149, 150, 229].

По данным большинства авторов (Боброва Н.Ф., 2003, Дадамухамедова Ш.М., 2003) бытовая и школьная травма преобладают над другими причинами повреждения. Повреждения глаз чаще встречаются у мальчиков, чем у девочек. По данным разных авторов, среди травм органа зрения у детей, тупая травма глаза занимает лидирующее положение, составляя от 50% до 64,7% [86, 98, 99]. Механические ранения составляют от 15 до 37% в структуре патологии органа зрения. Контузии глаза и непроникающие ранения роговицы с внедрением или без инородного тела встречаются до 70% всех случаев, имея наиболее тяжелые последствия [26, 36, 37, 109, 125, 151].

В мире не менее 40 млн. больных с бельмами нуждаются в операции пересадки роговицы. В 33-40% случаев формирование бельма и инвалидность по зрению вызваны воспалительными заболеваниями и травмами роговицы [25, 104, 115, 154]. Объясняется это тем, что роговица, как наружная оболочка подвержена воздействию физических, механических, а нередко химических факторов внешней среды.

Затяжной характер воспалений переднего отрезка глаза, осложнения после травм, трудности в лечении, заставляют искать новые комплексные методы воздействия на него [25, 71, 72, 94, 99, 225, 228].

Травматические кератиты развиваются при непроникающих травмах роговицы, контузиях глаза, внедрении в роговицу инородного тела, после поверхностных химических и термических ожогов, при воздействии ультрафиолетовых лучей и лучистой энергии, а также при ношении контактных линз [26, 36, 69, 152]. Травматизации также способствует синдром «сухого глаза» [14]. При поверхностном повреждении эпителия появляется эрозия, сопровождающаяся ощущением сильной боли в глазу, слезотечением, блефароспазмом. Лечение эрозии роговицы направлено на улучшение трофики и ускорению эпителизации [33, 101, 105, 106, 140, 191].

С целью профилактики развития инфекции используют в основном антибактериальные препараты широкого спектра действия, обладающие низкой токсичностью к тканям глаза и не ослабляющие процессы репаративной регенерации. В виде инстилляций используют фуциталмик, левомицетин, гентамицин, тобрамицин, ципромед, флоксал, окацин. Нередко находят применение антисептики: витабакт, цинк-борные капли, мирамистин-капли. В виде мазей применяются тетрациклиновая, эритромициновая, тобрамициновая, а также флоксал и колбиоцин [61, 68, 69, 84, 83, 85, 178].

Однако среди побочных эффектов антибиотикотерапии можно отметить аллергические, токсические действия, их резистентность к микроорганизмам, а также уменьшение количества слоев эпителия [92].

Появились работы о применении оксида азота при травматических повреждениях роговицы, который обладает сосудорасширяющим, антиагрегатным, антитромбогенным, антимикробным действием [26, 70, 188].

Созданы различные препараты, улучшающие регенерацию: это препараты на основе гиалурона [166], коллагена [5,59, 139] и гемодеривата из телячьей крови депротенинизированного [76].

В.И. Морозов, А.А. Яковлев, (2001); E.G Olsen, M. Davanger (1984) утверждают, что применение стероидных препаратов замедляет процессы регенерации. Хотя, в литературе есть указания об их успешном применении в заживлении роговицы [160, 178].

Новыми направлениями в лечении патологии роговицы являются лечение стволовыми клетками, трансплантация эквивалента соединительной ткани, лечение роговичными эндотелиальными клетками (Chandrasekher G. et al., 2002; Di Iorio E. et al., 2005; Hsiao CH, et al., 2005).

Широкое распространение получил метод лечения ультразвуком, за счет стимулирующего действия на регенерацию тканей [115]. В связи с недостаточной эффективностью изолированного ультразвукового

воздействия применяются сочетанные методы: фоно-, фоноэлектро- и суперфоноэлектрофорез лекарственных препаратов [112, 113, 127, 128].

Инфразвуковая терапия, впервые применена на кафедре глазных болезней РГМУ профессором Сидоренко Е.И., (1978-2006). Дальнейшие разработки по применению инфразвуковой терапии в лечении заболеваний роговицы выполнены Тумасяном А.Р. (1997), Филатовым В.В. (1995, 2004), Раднаевой Д.Ц. (2007) [78, 116, 117, 147].

В последнее время применяются мягкие контактные линзы при лечении различных повреждений роговицы [75].

Несмотря на разнообразие консервативных методов лечения герпетических и травматических кератитов у детей, проблема формирования глубокого помутнения роговицы остается актуальной. Требуется дальнейшего поиска и разработки новых, эффективных методов лечения, влияющих на разные этапы заживления, способствующих восстановлению зрительных функций, ускоряющих заживление роговицы с формированием более нежного помутнения. В этом плане представляет большой интерес цитокиноterapia и кератопротекция.

1.3 Система врожденного иммунитета тканей глаза

Одной из основных причин широкого распространения заболеваний, вызываемых различными микроорганизмами (вирусами, бактериями, грибами), являются ограниченные возможности иммунной системы человека к своевременному распознаванию и уничтожению этиологического агента инфекции, приспособившегося в процессе эволюции успешно избегать действия факторов иммунной защиты [116, 119].

Иммунная защита организма против различных патогенов осуществляется в результате скоординированной работы врожденной и адаптивной систем иммунитета [193, 198].

Механизмы врожденного иммунитета представляют собой первую филогенетически более древнюю линию защиты организма от различных

патогенов. Врожденный иммунитет обеспечивает элиминацию патогенов и предотвращение инфекции на ранних этапах, когда механизмы адаптивного иммунитета еще отсутствуют [185].

Распознающими рецепторами врожденной иммунной системы являются эволюционно консервированные Toll-подобные (like) рецепторы (TLR). Рецепторы этого семейства экспрессируются моноцитами, макрофагами, NK клетками, незрелыми дендритными клетками, клетками эпителия, эндотелия млекопитающих [52, 153]. Toll-подобные рецепторы распознают связанные с патогенными образы молекул (паттерны), которые присутствуют на инфекционных агентах, но, как правило, отсутствуют у хозяина. Факторы врожденного иммунитета не изменяются в процессе жизни организма, контролируются генами зародышевой линии и передаются по наследству [190, 205].

В 1989 г. Карл Джановой предположил, что на поверхности клеток человека расположены генетически запрограммированные образраспознающие рецепторы, которые узнают молекулярные структуры, наиболее часто повторяющиеся на поверхности микроорганизмов [175, 213, 226, 236]. Наиболее изучено семейство сигнальных белков – Toll-подобные рецепторы (TLR, Toll-like receptors), названные так по аналогии с Toll-рецепторами, которые впервые были обнаружены в 1992 г. у плодовой мушки (*Drosophila melanogaster*). Toll-белок участвует в эмбриональном развитии дрозофилы, а именно регулирует дорзовентральную полярность насекомого. Спустя четыре года было замечено, что дрозофилы, мутантные по этому рецептору, гибнут от грибковой инфекции, но устойчивы к другим инфекциям. Это было первым указанием на то, что Toll-белки первыми оповещают (Toll в переводе с английского – «звонить») иммунную систему о появлении патогена. Вскоре у дрозофилы были обнаружены Toll-рецепторы, отвечающие за резистентность к другим микроорганизмам [187]. Стало ясно, что эти рецепторы принимают участие в защите организма от инфекций [186, 196].

У млекопитающих выявлено как минимум 13 TLR, они экспрессируются не только на клетках врожденного иммунитета (дендритные клетки, нейтрофилы, моноциты, макрофаги), но и на многих других клетках организма – эндотелиальных, эпителиальных, кардиомиоцитах, гепатоцитах и др. [174, 190].

Все известные TLRs представляют собой одноцепочечные трансмембранные полипептиды со сходным строением. Внеклеточная N-концевая область аминокислотной последовательности имеет от 19 до 25 тандемных повторяющихся участков с повышенным содержанием лейцина, различающихся по длине TLR и ответственных за связывание PAMP [214]

Взаимодействие TLRs с их лигандами инициирует активацию сигнальных путей (рис. 1), в результате происходит экспрессия генов провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли (ФНО α), интерлейкины (ИЛ) 1,6 и 12, интерфероны I типа (ИНФ α , β), а также хемокинов. Продукты этих генов регулируют реакции врожденного иммунитета и направляют развитие адаптивного иммунного ответа. Характер и интенсивность ответа, опосредуемого TLRs, определяются несколькими компонентами, составляющими систему TLRs. Система TLRs включает лиганды TLRs, сами рецепторы (гены, кодирующие TLR, м-РНК, белок), молекулы, осуществляющие трансдукцию сигнала, - адаптерные белки, а также эффекторные молекулы, которые вырабатываются в результате активации TLR и опосредуют их в дальнейшие эффекты [194].

Широкий спектр лигандов TLRs и представленность этих рецепторов на многих клетках способствуют вовлечению TLRs в патогенез многих заболеваний. Дефекты в системе TLRs, такие как нарушения распознавания лигандов, экспрессии TLRs, трансдукции сигнала, выработки эффекторных молекул, а также полиморфизм генов TLRs могут приводить к развитию тяжелых инфекционных заболеваний (сепсис, менингит), аутоиммунных заболеваний, атеросклероза, аллергопатологии [152, 193]. Дефекты молекул,

участвующих в трансдукции сигнала от TLRs, лежат в основе повышенной чувствительности к инфекциям.

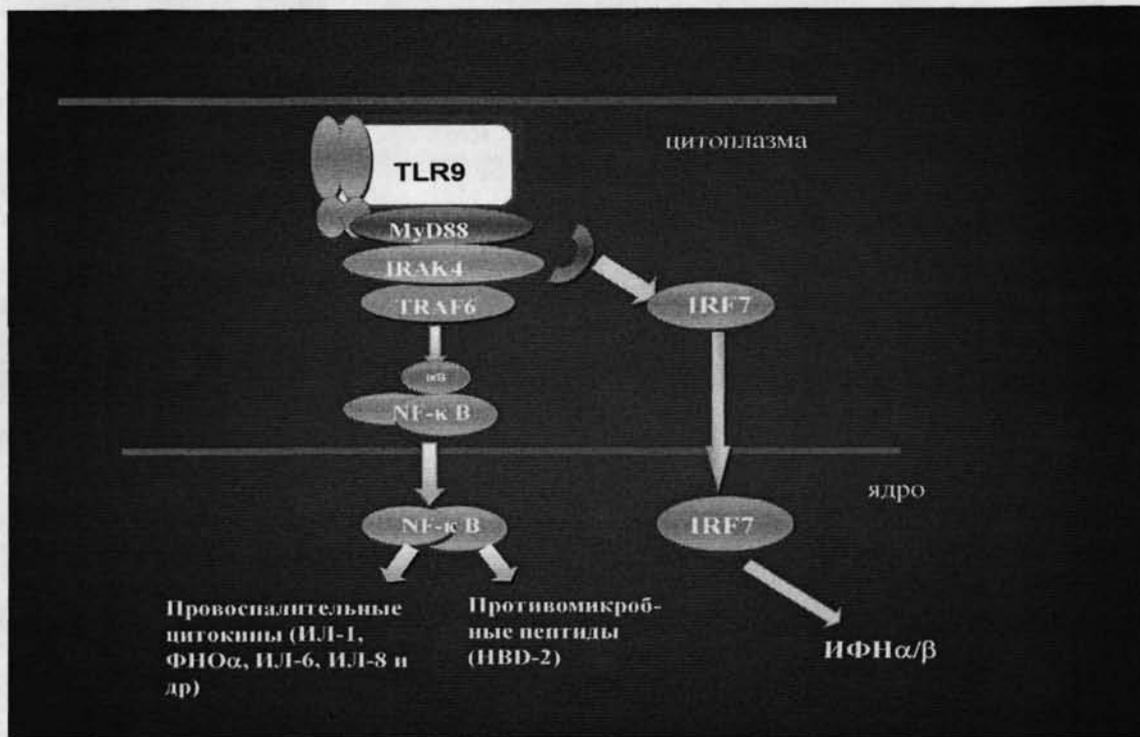


Рис. 1. Схема врожденного иммунного ответа на внедрение патогенных микроорганизмов.

Проникая в эпителиальный слой, патогенные микроорганизмы присоединяются к TLRs и активируют их. Клетки эпителия начинают продуцировать хемокины, которые привлекают к этому месту клетки врожденного иммунитета – нейтрофилы и макрофаги. Они фагоцитируют вторгшиеся микробы. Если микроорганизмов много, они активируют TLRs на клетках врожденного иммунитета. С одной стороны, это усиливает фагоцитоз микроорганизмов. С другой – дендритные клетки передают переработанный микробный антиген Т-лимфоцитам, которые продуцируют набор цитокинов. В результате развивается адаптивный иммунный ответ клеточного типа с участием цитокинов [181].

По химическому составу TLRs представляют собой трансмембранные гликопротеиды, характеризующиеся повторами, обогащенными лейцином. Подобные структуры пространственно образуют форму подковы, которая, как полагают, формируется с учетом молекулярных форм, ассоциированных с патогеном. Это обеспечивает специфическое соединение каждого вида TLR с определенным типом молекул, присутствующих у большой группы микроорганизмов, но отсутствующих в организме хозяина. Специфичность присоединения, видимо, определяется третичной структурой этих молекул [214].

TLRs обнаружены на многих клетках организма и в первую очередь на тех, которые отвечают за врожденный иммунитет: макрофагах, дендритных клетках, эозинофилах, тучных клетках, нормальных киллерах. Найдены они также на Т- и В-лимфоцитах [172].

Наружная часть TLRs, которая имеет вид подковы, специфически соединяется с молекулярной структурой, характерной для определенного типа микроорганизмов. Другая часть молекулы при этом претерпевает изменения, ведущие к активации одного из путей передачи сигнала с периферии клетки к ядру. Далее в результате активации ядерных факторов начинается транскрипция РНК с последующим синтезом белков. Клетка активируется – в ней происходит активный синтез разнообразных цитокинов [173].

Спустя сто лет после открытия в организме факторов врожденного иммунитета оказалось, что все их реакции, которые развиваются в ответ на внедрение в организм патогенного микроорганизма, являются высокоспецифичными. Но в отличие от адаптивного иммунитета, где специфичность проявляется к каждому из миллионов возможных антигенов, в арсенале врожденного иммунитета ограниченное число рецепторов, специфичных для консервативных микробных структур, присущих всему классу патогенов. Например, липополисахарид, который связывается с

TLR4, есть у всех грамотрицательных бактерий. Еще одно важное отличие реакций врожденного иммунитета в том, что они развиваются быстро – в течение одного-двух часов, а для адаптивных реакций требуется свыше двух суток. Это легко объясняется: зрелые клетки естественного иммунитета уже присутствуют в организме, а для размножения и созревания специфических лимфоидных клеток адаптивного иммунитета требуется время [199].

Но самым неожиданным было обнаружение TLR на делящихся клетках эпителия (в основном кожного) и эндотелия [174, 199]. Ведь ранее считалось, что эпителиальные покровы тела представляют собой не более чем механический барьер на пути инфекции – в этом смысле их сравнивали даже с панцирем черепахи. Из этого следует, что, проникая через слизистую оболочку или кожу, инфекционный агент сразу же сталкивается с мощным специфическим ответом врожденной иммунной системы, которая, мгновенно распознав тип внедрившегося агрессора, быстро разворачивает действия по его уничтожению либо самостоятельно, либо привлекая адаптивный иммунитет. Получается, что образраспознающие рецепторы дирижируют оркестром не только врожденного иммунитета, но и адаптивного [170].

Первым на внедрение патогенного микроорганизма в организм реагирует именно врожденный иммунитет. Происходит это следующим образом. Патогенный микроорганизм входит в слизистую оболочку. Ее эпителиальные клетки с помощью TLR узнают и идентифицируют его – определяют, к какому классу патогенов он относится (грамотрицательным или грамположительным бактериям, грибам, вирусам и т.п.). В результате эпителиальные клетки соответствующим образом активируются и начинают синтезировать множество молекул, в том числе сигнальные молекулы – хемокины (цитокины, которые стимулируют движение других клеток к месту, где они образуются). Они обеспечивают привлечение к этому месту различных клеток иммунной системы – макрофагов, нейтрофилов, базофилов, эозинофилов и тучных клеток, которые также активируются веществами вторгшегося патогена. В результате организуется

воспалительный микроочаг, который быстро справляется с внедрившимся патогеном [161, 175, 180,]. Все это постоянно происходит в организме, и мы того даже не замечаем, так как клинических проявлений, которые мы воспринимаем как болезнь, не возникает.

Таким образом, TLR руководят реакциями не только врожденного иммунитета, но и адаптивного, т.е. определяют не только начало и характер иммунного ответа на появление в организме чужеродного, но и тип иммунного ответа [186].

Крайне важно еще одно свойство TLR, находящихся в эпителиальных клетках слизистых оболочек и делящихся клеток кожи, а именно – специфическая направленная регуляция микрофлоры. В нашем организме присутствует огромное количество микроорганизмов разных классов – вирусов в клетках различных тканей и органов, микробов и грибов на слизистых оболочках и в коже. Часть из них становится нормальной и постоянной микрофлорой, и к ней формируется толерантность организма – иммунные реакции не развиваются. Эта микрофлора приносит организму большую пользу: синтезирует необходимые для организма витамины, регулирует перистальтику кишечника и т.д. Механизм образования такой толерантности до сих пор не выяснен [183, 243, 249].

Ясно, что сдвиги в составе TLR и нарушения их регуляторной функции могут стать причиной самых разных патологий. Так, снижение активности TLR сказывается на микробном биоценозе. И тогда условно-патогенная микрофлора становится постоянной микрофлорой организма, что приводит к атипичным формам воспалительных процессов, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами, которые при нормальном состоянии TLR не развиваются. Повышенная активность TLR, напротив, связана с развитием аллергических и аутоиммунных заболеваний. Вполне вероятно также, что патологические состояния в организме, вызванные пониженной активностью одних TLR, могут приводить к повышению активности других с развитием соответствующих недугов [1, 209].

Toll-подобные рецепторы в тканях глаза.

Song с соавторами показал, что Toll-подобные рецепторы врожденного иммунитета в большом количестве представлены на клетках глаза (табл. 1).

Экспрессия TLR4 и его корцептора CD 14 была определена в различных клетках глаза: в эпителиальных клетках роговицы, роговичных стромальных фибробластах, в антигенпрезентирующих клетках сосудистой оболочки и в пигментных клетках сетчатки. М-РНК TLR2 экспрессируется в эпителиальных клетках конъюнктивы и роговицы.

Wu X.Y. с соавторами показал, что экспрессия TLR4 в эпителиальных клетках роговицы была минимальной, в то время как наблюдалась интенсивная экспрессия TLR1, 2, 3, 5, 6, 9. В процессе исследования были получены данные о том, что индивидуальные особенности каждого человека влияют на экспрессию TLRs [257].

Таблица 1

Экспрессия TLRs в клетках глаза

Ткани глаза	Тип клеток	Экспрессия TLRs
Роговица	Эпителий роговицы	TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10
Конъюнктивa	Эпителий конъюнктивы	TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 9
Склера	Пучки коллагеновых волокон	TLR4
Сосудистая оболочка глаза	Стромальные антигенпрезентирующие клетки	TLR4
Сетчатка	Пигментный эпителий сетчатки	TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10

Таким образом, в клетках роговицы, конъюнктивы, пигментном эпителии сетчатки экспрессируются различные Toll-подобные рецепторы, обеспечивающие распознавание широкого спектра патогенов.

При инфицировании клетки герпес вирусом 1-го и 2-го типа происходит экспрессия интерферона α (IFN α), который считается основным на данный момент в борьбе с вирусом [212]

Разработаны клинически доступные методы оценки системы TLR рецепторов, пригодные для различных областей клинической медицины, в том числе для офтальмологии: 1. Оценка генов и сигнальных молекул (полимеразная цепная реакция и ее различные модификации). 2. Оценка экспрессии TLR на клетках (проточная цитометрия, иммуногистохимия и другие). 3. Оценка эффекторной функции клеток, опосредованной через TLR (выработка провоспалительных медиаторов, включая цитокины, хемокины, и другие в культуре клеток *in vitro* в ответ на стимуляцию соответствующими лигандами) [132, 135, 146, 214].

Система цитокинов.

Активация TLR на клетках системы врожденного иммунитета ведет к экспрессии большого количества генов хемокинов и противовоспалительных цитокинов, в частности, ИЛ-1,2,6,8,12, ФНО, ГМ-КСФ, ИФН γ [56, 66, 221].

Цитокины - класс растворимых пептидных медиаторов иммунной системы, необходимых для ее развития, функционирования и взаимодействия с другими системами организма [47, 51, 64, 120, 157, 206].

Более 100 цитокинов объединены в группы, основные из которых составляют интерлейкины (ИЛ), интерфероны (ИФ), колониестимулирующие факторы (КСФ), факторы некроза опухоли (ФНО), хемокины (ХК) и др [46, 121, 130, 156, 224].

Цитокины – семейство белковых медиаторов гликопротеиновой природы, осуществляющих реакции как врожденного, так и приобретенного иммунитета. Одни и те же цитокины могут быть продуктами различных клеточных типов. Действие цитокинов обычно многообразно: одни оказывают действие на синтез других. Обычно цитокины синтезируются в

ответ на воспалительный или антигенный стимул и действуют локально, взаимодействуя с высокоаффинными рецепторами на клетках-мишенях [51, 53, 131, 158, 219].

Будучи регуляторными молекулами, цитокины играют важную роль в осуществлении реакций врожденного и адаптивного иммунитета, обеспечивают взаимосвязь их взаимосвязь, контролируют гемопоэз, воспаление, заживление ран, ангиогенез и многие другие процессы [82].

Цитокины, продуцируемые клетками иммунной системы называются иммуоцитокинами [53, 136, 210].

Имуоцитокины – класс растворимых белковых медиаторов иммунной системы, необходимых для ее развития, функционирования и взаимодействия с другими системами организма.

Цитокины – это, как правило, гликозилированные полипептидные молекулы молекулярной массы менее 25 кД.

Цитокины вырабатываются клетками иммунной системы и некоторыми клетками в ответ на активирующий стимул и участвуют в иммунных и воспалительных реакциях, регулируя силу и продолжительность [55, 159].

Секреция цитокинов – кор откий по времени процесс. Цитокины не сохраняются как преформированные молекулы, а их синтез начинается всегда с транскрипции генов.

В большинстве случаев цитокины продуцируются и действуют на клетки-мишени, находящиеся в непосредственной близости. Основное их место действия – межклеточный синапс.

В настоящее время существует несколько различных классификаций цитокинов, учитывающих их строение, функциональную активность, происхождение, тип цитокиновых рецепторов. Традиционно, исходя из биологических эффектов, принято выделять следующие группы цитокинов: интерлейкины, интерфероны, факторы некроза опухоли, хемокины, гемопоэтины, факторы роста [251, 255].

В ответ на воздействие различных патогенов включаются механизмы врожденного иммунитета. Развивается воспаление, направленное на ликвидацию повреждения. Цитокины играют в нем важную координирующую роль. В зависимости от воздействия на воспалительный процесс цитокины подразделяются на две группы: провоспалительные (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО α) и противовоспалительные цитокины (ИЛ-4, ИЛ-10, ТФР β) [53, 64, 137, 138, 142].

Таким образом, можно сделать заключение, что основную массу провоспалительных цитокинов, вырабатываемых в организме, составляют те, которые освобождаются клетками с участием системы TLR. При этом важную роль могут играть не только клетки иммунной системы, но и клетки, участвующие в локальном воспалительном процессе. Например, это могут быть эпителиальные клетки конъюнктивы, роговицы и других тканей глаза. TLR-3, TLR-9 рецепторы обнаружены в пигментных эпителиальных клетках сетчатки [58, 114, 182]. Широкое распределение TLR дает основание для заключения, что эпителиальные клетки увеального тракта выполняют не только барьерную функцию, но и играют активную роль в регуляции воспалительного и иммунного ответов на многочисленные факторы окружающей среды, в частности на вирус простого герпеса. Именно, ДНК вируса герпеса простого типа 1 иммунный комплекс IgG человека с вирусом вызывают выработку интерлейкина 6 из инфицированных клеток роговицы через TLR [66, 119].

Противомикробные пептиды.

Связывание патогенов с TLR инициирует секрецию противомикробных пептидов (ПМП). В течение последнего десятилетия активно изучаются биология, структура и функции этого нового класса регуляторных молекул [67, 187, 200].

Противомикробные пептиды представляют собой обширную группу катионных белков, способных поражать многие вирусы, бактерии, грибы и простейших [168, 203, 201, 211].

Обеспечивая «мгновенный иммунитет», противомикробные пептиды являются, с одной стороны, естественными эндогенными антибиотиками, с другой – сигнальными молекулами, вовлеченными в процессы активации клеток иммунной системы и репарации тканей [165, 176, 195, 233]

У млекопитающих наиболее подробно охарактеризованы два семейства противомикробных пептидов: дефенсины и кателицидины.

Дефенсины получили свое название от англ. «defence» - защита. Это название отражает способность обеспечивать защиту организма от патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [217, 220].

Особенностью первичной структуры дефенсинов является наличие шести остатков цистеина, участвующих в образовании трех внутримолекулярных дисульфидных мостиков, делающих их устойчивыми к действию протеиназ и стабилизирующих вторичную структуру пептидной молекулы [237].

Дефенсины млекопитающих синтезируются миелоидными клетками костного мозга или эпителиальными клетками слизистых в виде препептидов. После микробной инвазии происходит протеолитический процессинг предшественников до функционально зрелых пептидов [239, 246].

В зависимости от расположения дисульфидных связей все дефенсины делятся на три группы: α -дефенсины, β -дефенсины и θ -дефенсины [238].

У человека известно шесть α -дефенсинов: четыре из них, обозначаемых как HNP1-4 – человеческие нейтрофильные пептиды – присутствуют в гранулах нейтрофилов, а дефенсины HD-5 и HD-6 экспрессированы в эпителиальных клетках кишечного и репродуктивного трактов [218].

β -дефенсины содержат до 45 аминокислот, среди которых преобладают лизиновые остатки, и отличаются от α -дефенсинов

формированием внутримолекулярных дисульфидных мостиков между другими цистеинами [215, 216].

У человека обнаружено четыре β -дефенсина – HBD 1-4 (человеческий β – дефенсин 1-4) [192, 208, 218].

θ -дефенсины – кольцевые пептиды, идентифицированные у резусамакак [167].

Все α -дефенсины экспрессированы в гранулах лейкоцитарных клеток и в пенетовских клетках тонкой кишки, в то время как β -дефенсины синтезируются эпителиальными клетками желудочно-кишечного тракта, дыхательных и мочеполовых путей и не накапливаются в гранулах [170, 241].

Таким образом, α -дефенсины являются важными медиаторами, вовлеченными в системные иммунные механизмы, а β – дефенсины более важны для процессов, протекающих в слизистых [230, 232].

Выраженная экспрессия ПМП эпителиальными клетками слизистых объясняется, по-видимому, необходимостью их защиты от постоянного воздействия факторов окружающей среды, микрофлоры и патогенных микроорганизмов [210].

В большинстве случаев экспрессия дефенсинов в различных тканях активируется через TLR [227].

Активация TLR2 бактериальным липопропротеидом или липохоевой кислотой на эпителиальных клетках респираторного тракта индуцирует выработку HBD-2 [231].

Рецепторы TLR2 и TLR4, стимулированные пептидогликаном или ЛПС, соответственно индуцируют экспрессию HBD2 эпителиальными клетками слизистой кишечника [249].

Агонисты TLR3 активируют экспрессию HBD1 и HBD2 эпителиальными клетками мочеполовой системы, HBD-2 и HBD-3 – эпителиальными клетками дыхательных путей.

Бактериальная ДНК и синтетический CpG-олигонуклеотид стимулируют HBD-2 эпителиальными клетками дыхательных путей через активацию TLR9 [231].

Противомикробные пептиды в глазу.

На данный момент учеными установлена экспрессия противомикробных пептидов в различных органах и тканях. Так например, известно, что α -дефенсины экспрессируются нейтрофилами и клетками Паннета в кишечнике, в то время как экспрессия β -дефенсинов была выявлена в эпителиальных клетках организма [218, 253].

β -дефенсины в основном продуцируются под действием цитокинов или же бактериальных или вирусных компонентов. При этом известно 6 основных видов β -дефенсинов (HBD1 - HBD-6), HBD-1 присутствует на эпителиальных клетках роговицы постоянно, в то время как HBD-2 и HBD-3 начинают экспрессировать под действием цитокинов и компонентов бактерий и вирусов [236, 253].

После открытия и изучения HBD4, была установлена его экспрессия в ответ на бактериальные компонент, попавшие в клетки [254].

Экспрессия HBD - 5 и HBD - 6 была обнаружена пока только в эпидермисе, но изучения этих полимикробных пептидов продолжаются.

Haynes RJ с соавторами анализировал в своих исследованиях экспрессию β -дефенсинов. Благодаря его работе стало известно, что HBD-1 и HBD-2 экспрессируются не только в роговице, но и в конъюнктиве глаза. При этом только HBD-2 способен экспрессироваться под действием цитокинов и бактериальных антигенов [197, 250].

Ling C. Huang с соавторами в 2007 году показали так же, что в конъюнктиве и роговице глаза происходит экспрессия HBD-3 и LL-37, единственного кателицидина у человека.

В настоящее время ведутся работы, направленные на изучение экспрессии β -дефенсинов в других структурах глаза. Но пока нет подтвержденных данных. Суммированы известные данные по экспрессии дефенсинов в тканях глаза человека (табл.2).

Таблица 2.

Экспрессия дефенсинов в тканях глаза

Ткани глаза	Тип клеток	Дефенсины
Роговица	Эпителий роговицы	HBD-1 HBD-2 HBD-3
Конъюнктивa	Конъюнктивa	HBD-1 HBD-2 HBD-3
Склера	пучки коллагеновых волокон	Нет данных
Сосудистая оболочка глазного яблока	Стромальные антиген-презентирующие клетки (APCs)	Нет данных
Сетчатка	ретиальный пигментный эпителий	Нет данных

Учитывая многочисленные данные о роли TLR, HBD2 и цитокинов в патогенезе многих заболеваний глаза, наиболее оптимальным для лечения целого ряда патологий глаза является метод локальной иммунокоррекции и более конкретно топической цитокинотерапии. Первоначально был разработан и внедрен в практику метод, основанный на локальном применении аутологичных цитокинов, вырабатываемых мононуклеарными

клетками периферической крови конкретного больного, получившего название аутолимфокиноотерапия».

Позже на кафедре иммунологии профессором Л.В. Ковальчуком и профессором Л.В. Ганковской был разработан и внедрен в клиническую практику лечебный препарат Суперлимф.

Препарат представляет собой комплекс полипептидов, состоящий из противомикробных белков и цитокинов, активирующих механизмы врожденного иммунитета и функцию фибробластов (рис.2).

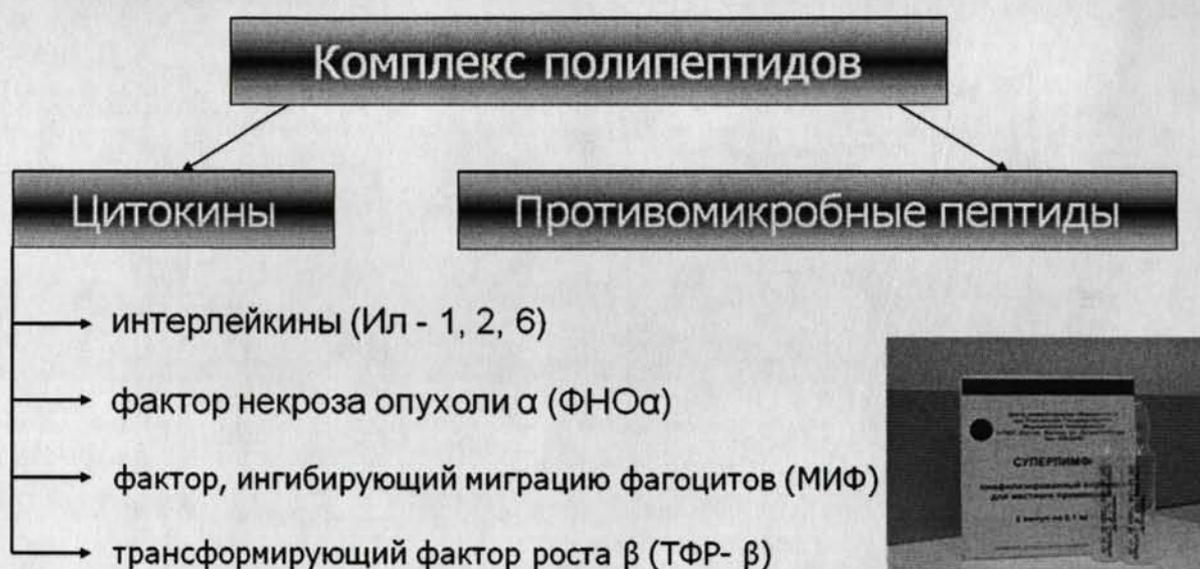


Рис. 2. Препарат «Суперлимф».

Механизм действия препарата

Основной механизм действия препарата связан с активацией клеток фагоцитарного ряда, фибробластов и усилением взаимодействий между этими клеточными элементами. Препарат стимулирует фагоцитоз макрофагов и нейтрофилов, выработку ими активных форм кислорода и азота, продукцию клетками собственных цитокинов, регулирует их миграцию, активирует противоопухолевую цитотоксичность и способствует

гибели внутриклеточных паразитов. В то же время «Суперлимф» регулирует функциональную активность фибробластов, синтез ими коллагена и гликозаминогликанов (рис.3) [56, 58].

Кроме того, под влиянием экзогенных цитокинов происходит изменение собственного цитокинового фона тканей, что индуцирует приток в очаг в основном мононуклеарных фагоцитов, в связи с чем воспалительная реакция приобретает локальный и менее выраженный характер. Усиление функциональной активности макрофагов способствует более быстрой резорбции продуктов распада и усилению репаративных процессов с полным восстановлением дефекта без образования грубых рубцов [50, 204].

Доказано прямое антибактериальное действие препарата (противостафилококковое), а также опосредованное – через активацию выхода лизосомальных ферментов, в частности катепсина Д из лизосом лейкоцитов.

Противовирусное действие «Суперлимфа» обусловлено как прямым действием цитокинов ФНО и ИЛ-1, входящих в его состав, так и опосредованным через активацию цитотоксических клеток-эффекторов (макрофагов, натуральных киллеров и др.).

Механизм действия «Суперлимфа»



Рис. 3. Механизм действия препарата «Суперлимф».

Широко применяется в медицине коллаген, в частности в офтальмологии, благодаря его многочисленным положительным свойствам, особенно существованию тесной генетической связи с многими структурными элементами тканей и органов, в том числе глаза (Федоров С.Н. с соавт. 1984, Свирин А.В., Милованова З.П., Истранов Л.П. 1987, Мошетьова Л.К., Исмаилов З.С. 1990, Багров С.Н., Ронкина Т.И. 1991). Отсутствие токсичности, утилизации в организме, его способность стимулировать репаративные процессы, совместимость с разными лекарственными веществами и его роль как пролонгатора их действия дают возможность его широкого использования (Истранова Л.П., Сычеников И.А. 1984, Львов К.М. 1989, Unterman S. 1988, Baziuk M. 1992).

Кератопротектор Аппликолл (рис.4) разработан ООО «МакМеди» - представляет собой сухую полупрозрачную пленку полусферической формы из коллагена соединительной ткани сельскохозяйственных животных и предназначен для аппликации на роговицу с целью оптимизации процесса регенерации повреждения эпителия и стромы роговицы. Понятие оптимизации в данном случае включает в себя более быстрое и прозрачное заживление роговицы, а также возможность пролонгирования действия глазных лекарственных средств при сочетанной терапии.

Механизм действия кератопротектора Аппликолл заключается в том, что он обеспечивает защиту роговицы от внешних воздействий, постепенно растворяется с выделением коллагена, препятствует быстрому вымыванию инстиллированных лекарственных средств, активирует репаративные процессы, ускоряет процесс восстановления оптических свойств роговицы.

Для пролонгированного действия комплекса природных цитокинов (Суперлимфа) нами был впервые использован кератопротектор Аппликолл для лечения герпетического и травматического кератита у детей.

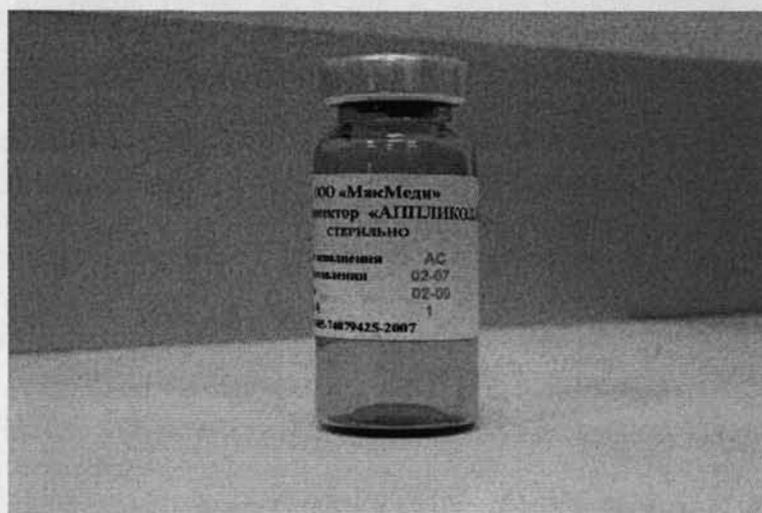


Рис. 4. Кератопротектор Аппликолл.

Разноречивость суждений относительно применения разнообразных лекарственных средств терапии осложнений герпетического и травматического кератита у детей, явилось стимулом к поиску наиболее подходящих лекарственных средств, оказывающих выраженный положительный эффект при минимальных побочных проявлениях. Тесная взаимосвязь патогенетических механизмов осложнений побудило к исследованию комбинированного воздействия препаратов разных фармакологических групп на течение патологии у данной категории больных.

Таким образом, разработка комплексного метода, сочетающего цитокинотерапию Суперлимфом и кератопротекцию Апликоллом при лечении древовидного герпетического и травматического кератитов у детей, позволит предупредить глубокие функциональные нарушения и значительно снизить процент осложнений.

В свою очередь, исследование роли врожденного иммунитета в тканях глаза позволит наряду с разработкой новых диагностических технологий усовершенствовать методы лечения и прогнозировать течение воспалительных заболеваний роговицы.

Глава 2. Материалы и методы.

Работа состоит из экспериментальной и клинической части.

2.1. Экспериментальные исследования.

2.1.1. Характеристика экспериментальных животных

Экспериментальные исследования проведены на 18 кроликах (36 глаз) породы шиншилла весом 3,0-3,2 кг. Как экспериментальные (12 кроликов), так и контрольные животные (6 кроликов) содержались в соответствии с санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) в условиях вивария ЦНИЛ РГМУ. Животные получали одинаковый рацион питания стандартными полнорационными комбикормами и содержались в одинаковых условиях вивария по одному в типовых клетках (Т-4). В до- и послеоперационном периоде не предполагалось особых условий ухода и содержания. Эксперимент проводился в течение 15 дней.

Животных разделили на 3 группы: в первой группе (6 кроликов, 12 глаз) проводили форсированные инстилляциии препаратом «Суперлимф» (по 1 капле через каждые 5 минут) одновременно с аппликациями кератопротектора «Апликолл», во второй группе (6 кроликов, 12 глаз) проводили форсированные инстилляциии препаратом «Суперлимф» (по 1 капле через каждые 5 минут в течение 1 часа), в третьей группе (6 кроликов, 12 глаз) применяли традиционный метод лечения капли левомецетина 0,25%, тетрациклиновая мазь 1%, солкосерил глазной гель.

До и после лечения, а также во время наблюдения в течение 15 дней за ответной реакцией глаз животных на воздействие цитокинотерапии и кератопротекции проводили исследование в проходящем свете, фокальное освещение, биомикроскопию, флюоресцеиновый тест, прямую и обратную офтальмоскопию.

Результаты исследования регистрировали зарисовками и цветной фотографией структур глазного яблока. Исследования соматического и

Стандартная экспериментальная модель дефекта роговицы проводилась по методике, разработанной Е.И. Сидоренко, В.В. Филатовым (1987).

Все манипуляции с кроликами проводили под внутримышечной анестезией из расчета 0,3 мл раствора ксилазина (рометара) (5 мг/ кг веса). Кроме того, использовали эпibuльбарно 0,4 % раствор инокаина. Кролика фиксировали в специальном станке после анестезии. В оба глаза однократно инстиллировали 0,4% раствор инокаина и раствор фурацилина 1:5000. Третье веко на обоих глазах удаляли. Оперируемый глаз накрывали стерильной марлевой салфеткой, повторно инстиллировали раствор фурацилина 1:5000. В глаз устанавливали векорасширитель. В конъюнктивальную полость закапывали раствор инокаина 0,4% - трехкратно. Во время операции кролики вели себя спокойно, что ее проведение не требовало помощи ассистента. Глаз фиксировали пинцетом за конъюнктиву у лимба. Трепаном для пересадки роговицы диаметром 5 мм над поверхностью выкраивали диск на $\frac{1}{4}$ толщины роговицы; затем этот диск отсепаровывали с помощью копьевидного или круглого ножа и удаляли. Образовывался стандартный по площади и глубине дефект роговицы (рис. 5).

В течение выполнения всех манипуляций болезненных ощущений животные не испытывали.

Лечение дефекта роговицы начинали на следующий день после создания экспериментальной модели. При сравнительной оценке эффективности проведенного лечения учитывали сроки начала и завершения эпителизации, уменьшение выраженности перифокального отека роговицы, отделяемого из конъюнктивальной полости и воспалительного процесса.

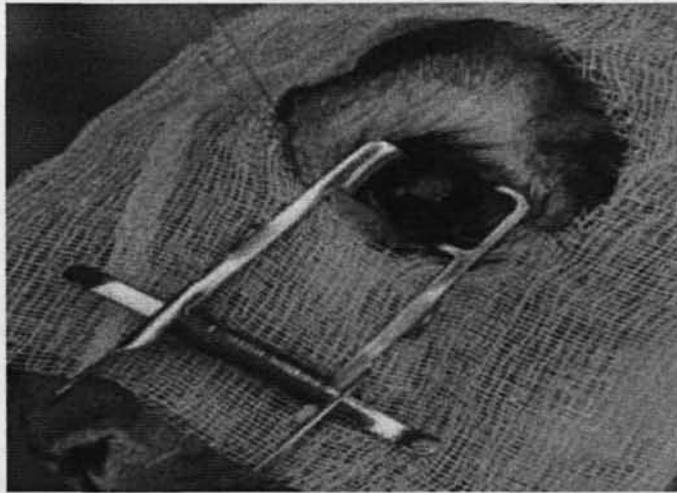


Рис. 5. Экспериментальный дефект роговицы.

Для гистологических исследований кроликов выводили из эксперимента на 7-е и 15-е сутки методом воздушной эмболии. Глаза энуклеировали.

Готовили парафиновые срезы роговицы, окрашивали гематоксилин-эозином по Ван-Гизону.

2.1.3. Гистологическое исследование

Исследования были проведены на кафедре гистологии НИИ Глазных болезней РАМН совместно с ведущим научным сотрудником к.м.н. Федоровым А.А.

Гистологические исследования проводили на 36 энуклеированных глазах, разделенных на три группы.

I группа – 6 кроликов (12) глаз: после применения форсированных инстилляций препарата Суперлимф

II группа – 6 кроликов (12 глаз) - после применения форсированных инстилляций препарата Суперлимф совместно с кератопротектором Аппликолл.

III группа – 6 кроликов (12 глаз) - контрольная группа после лечения традиционным способом (раствор левомецетина 0,25%, тетрациклиновая глазная мазь 1%, солкосерил глазной гель).

Энуклеированные глаза фиксировали в 10% нейтральном формалине. Через 24 часа из целого глаза готовили центральную колодку, проходящую через центр диска зрительного нерва, которую в дальнейшем заливали в парафин и готовили срезы (толщиной 5-8 мкм). Депарафинированные срезы окрашивали гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону.

Для изучения методом полутонких срезов интересующие нас образцы тканей глаза размерами 2x2 мм помещались в холодный фиксирующий 2,5% раствор глутаральдегида на буфере Миллонинга (pH=7,3) в течение трёх часов. Через 3 часа отмытые в буфере образцы дофиксировались в 1% растворе осмиевой кислоты (OsO₄) 1 час. После обезвоживания в батарее спиртов возрастающей концентрации препараты заключались в смесь эпоксидных смол (эпон-аралдит). Полутонкие серийные срезы толщиной (0,5-1-2 мкм) получали на ультратоме «Ultratome IV» («LKB» Швеция). Окрашивали метиленовым синим. Парафиновые и полутонкие срезы исследовали на световом «Фотомикроскопе-III» («Opton», ФРГ).

2.2. Определение экспрессии генов Toll – подобного рецептора TLR9 и противомикробного пептида HBD-2 в конъюнктиве и роговице у детей методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Исследования были проведены на кафедре иммунологии РГМУ (заведующий кафедрой академик РАЕН, д.м.н., профессор Л.В.Ковальчук) и в лаборатории диагностики вирусных инфекций ГУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова РАМН» (директор академик РАМН, д.б.н., профессор В.В.Зверев) совместно с ведущим научным сотрудником лаборатории диагностики вирусных инфекций к.м.н. Ганковской О.А.

Выделение РНК из клеток.

Комплект реагентов «РИБО-сорб» предназначен для выделения РНК/ДНК из клинического материала. Выделение проводилось строго в

соответствии с протоколом. Отбирали лизирующий раствор и раствор для отмывки №1 из набора, хранящиеся в холодильнике при $T=2-8^{\circ}\text{C}$, в расчете: лизирующий раствор - 400 мкл на пробу, раствор для отмывки №1- 400 мкл на пробу. Необходимое количество помещали в твердотельный термостат при $T=60-65^{\circ}\text{C}$ (Термостат «Термит», ДНК-Технология, Россия) на 5-6 минут для твердой фазы буфера. Затем в каждую пробу вносили по 400 мкл лизирующего буфера и центрифугировали 1 минуту при 10 тыс. об/мин. После чего добавляли 20 мкл сорбента, ресуспензировали и центрифугировали 30 сек. при 10 тыс об/мин. Сливали надосадочную жидкость, а к осадку добавляли 400 мкл раствора для отмывки №1. Центрифугировали 30 сек. при 10 тыс об/мин. Надосадочную жидкость удаляли и к осадку добавляли 500 мкл раствора для отмывки №3, тщательно пипетировали и центрифугировали 30 сек. при 10 тыс об/мин. После центрифугирования жидкость удаляли (отмывку повторяли 2 раза). К осадку добавляли 400 мкл раствора для отмывки №4, ресуспензировали и центрифугировали 30 сек при 10 тыс об/мин. Надосадочную жидкость полностью удаляли. Помещали пробирки на 5-10 мин в твердотельный термостат при $T=60-65^{\circ}\text{C}$ (Термостат «Термит», ДНК-Технология, Россия) с открытыми крышками для просушки сорбента. После этого в пробы вносили 50 мкл РНК-содержащего буфера , ресуспензировали и снова помещали в твердотельный термостат при $T=60-65^{\circ}\text{C}$ на 2-3 мин. Ресуспензировали и центрифугировали 1 мин при 10 тыс об/мин. Надосадочную жидкость, содержащую очищенные РНК и ДНК собирали в отдельные эппендорфы и замораживали в холодильнике для последующих экспериментов при -70°C .

Реакция обратной транскрипции

Реакцию обратной транскрипции проводили для синтеза кДНК на матрице мРНК генов TLR9, HBD-2 и β -актина для последующего определения числа копий с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Праймеры для последовательностей TLR9, HBD-2 были подобраны с помощью программы Vector NTI 8.0 и синтезированы фирмой Синтол, Россия.

Реакцию обратной транскрипции в присутствии M – *mulv* reverse transcriptase 0,1 мкл (Сибэнзим, Россия) проводили по классической схеме (Херрингтон С., Макги Дж., Молекулярная клиническая диагностика. Методы. М, Мир, 1999) с модификациями (Ганковская О.А., Бахарева И.В., Ганковская Л.В., Сомова О.Ю., Зверев В.В.) [21].

Пробирки с пробами и праймерами к инкубировали в твердотельном термостате при $t=75^{\circ}\text{C}$ (Термостат «Термит», ДНК-Технология, Россия) 3 минуты, затем добавляли 21 мкл реакционную смесь с ферментом. После чего пробирки помещали в амплификатор («Термит», ДНК-Технология, Россия) на 1 час при 37°C 1 час, после чего проводили инактивацию фермента при 94°C . Полученную в ходе реакции кДНК хранили при температуре -70°C .

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

В работе была использована модификация полимеразной цепной реакции, позволяющая определить кинетику реакции и на основе полученной информации судить о наличии и исходном количестве ДНК-мишени в образце. Метод получил название полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Реакционную смесь готовили из реактивов «Набора для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I» с TaqMan зондами и «Набора для определения β -актина человека» (Синтол, Россия), согласно рекомендациям фирмы-производителя.

После приготовления реакционных смесей пробирки помещали в амплификатор для ПЦР-РВ АНК-32 (Институт Аналитического Приборостроения РАН, РФ), позволяющий анализировать образцы ДНК/РНК в динамическом диапазоне от 1 до 10^9 копий и одновременно детектировать 4 флуоресцентных красителя (FAM/SYBR Green, ROX, R6G, CY5), с заданной программой с числом циклов 35-40:

50°C - 5 минуты

95°C - 2 минуты

64°C- 50 секунд

95°C - 20 секунд

Обработка полученных результатов проводилась с помощью программного обеспечения прибора АНК-32. Калибровочные прямые, используемые для определения количества копий кДНК были построены с применением контрольных образцов, синтезированных на фирме Синтол, РФ. Количественный уровень кДНК исследуемых генов был получен относительно уровня экспрессии гена β -актина человека (10^6 копий).

2.3. Клинические исследования

Клинические исследования проводили на базе кафедры офтальмологии педиатрического факультета ГОУ ВПО РГМУ в Морозовской детской городской клинической больницы и Российской детской клинической больницы г. Москвы (зав.каф. член-корр. РАМН, д.м.н., профессор Е.И. Сидоренко).

2.3.1. Клиническая характеристика нозологических групп.

Под нашим наблюдением находились 142 пациента (142 глаза) с герпетическим и травматическим кератитом, в возрасте от 1 года до 14 лет. В зависимости от проводимого комплексного лечения пациентов разделили на две основных и контрольную группу (табл. 4).

Таблица 4

Распределение пациентов на группы в зависимости от нозологии.

Нозология \ Группы	1-я основная Суперлимф+ Апликолл		2-я основная Суперлимф		Контрольная		Итого	
	Герпетический Кератит	19	13,4%	28	19,7%	25	17,6%	72
Травматический Кератит	18	12,7%	27	19%	25	17,6%	70	49,3%
Всего больных	37	26,1%	55	38,7%	50	35,2%	142	100%

С герпетическим кератитом в первой основной группе наблюдали 19 детей, из них мальчиков - 8 (42,1%) и девочек – 11 (57,9%) , во второй основной группе - 28 детей, из них мальчиков - 12 (42,8%), девочек 16 (57,2%).

С травматическим кератитом в первой основной группе наблюдали 18 детей, среди них мальчиков - 10 (52,9%) и девочек - 8 (37,1%), во второй основной группе – 27 детей, среди них мальчиков - 16 (59,2%) и девочек – 11 (40,8%) .

В контрольной группе с герпетическим кератитом наблюдали 25 детей, мальчиков – 10 (40%), девочек 15 (60%), с травматическим кератитом – 25 детей, мальчиков – 14 (56%), девочек – 11 (44%) .

Наибольшее число пациентов с герпетическим кератитом приходится на девочек 42, (рис 6.), а с травматическим кератитом – на мальчиков 40 (рис.7)



Рис. 6. Распределение пациентов с герпетическим кератитом по полу.



Рис. 7. Распределение пациентов с травматическим кератитом по полу

Определение количественной экспрессии генов Toll-подобного рецептора (TLR9) и противомикробного пептида (HBD2) эпителиальными клетками роговицы и конъюнктивы проводили у 16 здоровых детей и 24 пациентов с герпетическим кератитом до и после лечения.

Для определения нормы уровня генов HBD2 и TLR9 исследовали мазки с конъюнктивы и роговицы здоровых детей.

У детей с герпетическим кератитом стерильной ватной палочкой брали мазок с конъюнктивы и роговицы двукратно: до лечения и через 7 дней после лечения.

Пациентов с герпетическим кератитом разделили на 2 группы:

1 группа (12 детей) – в комплексном лечении которых применяли форсированные инстилляциии препарата Суперлимф и традиционное лечение.

2 группа (12 детей) – применяли только традиционное лечение.

В исследуемых группах изучали: данные анамнеза, фиксировали жалобы, осуществляли тщательное клиническое наблюдение. Всем пациенткам проводили комплексное клиничко–лабораторное обследование (клинический анализ крови и мочи, определение группы крови на TORCH-инфекции, биохимический анализ крови). Учитывали наличие аллергических реакций на введение медикаментозных средств. На каждого пациента заводили индивидуальную карту (схема 1).

Индивидуальная карта пациента

Ф.И.О. _____

Возраст _____ Пол _____

Адрес _____ Телефон _____

Диагноз _____

Жалобы _____

Anamnesis vitae _____

Anamnesis morbi _____

VIS OD = с sph - cyl - ах (по таблицам)

VIS OS = с sph - cyl - ах (по таблицам)

Очки: OD = sph - cyl - ах OS = sph - cyl - ах

Авторефрактометрия: OD = sph - cyl - ах

OS = sph - cyl - ах

Скиаскопия: при циклоплегии (Тропикамид, Мидриацил 0,5%; 1%)

Dev _____

Движения глазных яблок _____

Конвергенция _____

OU - Положение век _____

Конъюнктивa век и глазного яблока _____

Отделяемое _____

Роговица _____

Передняя камера _____

Зрачок _____

Реакция зрачка на свет _____

Хрусталик _____

Стекловидное тело _____

Глазное дно _____

Лечение _____

2.3.2. Методы офтальмологических исследований.

Клиническое обследование включало визометрию, авторефрактометрию, скиаскопию, биомикроскопию, офтальмоскопию, ЭФИ, тонометрию.

Визометрия. Остроту зрения определяли по общепринятой методике с оптимальной коррекцией аметропии для получения максимальной остроты зрения по таблице Сивцева-Головина и Орловой, а также по проекционным оптотипам фирмы Richert XCEL AP 250.

Авторефрактометрия. Определение рефракции также проводили с помощью компьютерного авторефрактометра фирмы Canon RK - F 1.

Скиаскопия. Показатели рефракции определяли при помощи скиаскопических линеек.

Биомикроскопия переднего отрезка глаза проводилась с использованием щелевых ламп фирмы Richert XCEL 255 по известным методикам [163]. Для осмотра применялись диффузное, прямое фокальное освещение, исследование в проходящем свете. Изучалось состояние век, конъюнктивы. Особое внимание уделялось детальному осмотру различных слоев роговицы. Диагностика поражений роговицы подкреплялась ее окрашиванием в синем свете после инстилляций 2% раствора флюоресцеина-натрия. Для выявления сопутствующей патологии оценивалось состояние глубжележащих структур глаза.

Офтальмоскопия. Исследование глазного дна проводилось методами прямой и обратной офтальмоскопии. Прямая офтальмоскопия выполнялась с помощью электрического офтальмоскопа «Welch Allyn» (США). Оценивалось состояние диска зрительного нерва, сосудов, макулярная область и периферия глазного дна.

При оценке результатов лечения у детей раннего возраста основными показателями служили характер анатомических исходов и состояние морфологических структур глаза, при необходимости данные

электрофизиологических исследований (регистрация зрительных вызванных потенциалов, электроретинография), тонометрия.

Определение уровня экспрессии генов сигнального рецептора TLR-9 и противомикробного пептида HBD-2 в конъюнктиве и роговице у здоровых детей и с герпетическим кератитом методом ПЦР в режиме реального времени.

Всем пациентам в соответствии с выраженностью патологического процесса проводили традиционное лечение, которое включало противовирусную (интерферон, полудан, офтальмоферон, зовиракс), антибактериальную (левомецетин 0,25%, тобрекс, тетрациклиновая мазь 1%, колбиоцин), противовоспалительную (наклоф, диклоф), сосудокрепляющую (аскорутин, дицинон), десенсебилизирующую (супрастин, тавегил, фенкарол, кларготил), эпителизирующую терапию (солкосерил, актовегин, корнерегель).

Дополнительно в 1-ой основной группе проводили форсированные инстиллянии препаратом «Суперлимф» (по 1 капле через каждые 5 минут в течение 1 часа 1 раз в день) совместно с аппликациями кератопротектора Аппликолл, во 2-ой опытной группе применяли форсированные инстиллянии препарата «Супер мф» (по 1 капле через каждые 5 минут в течение 1 часа 1 раз в день), в контрольной группе применяли только традиционный метод лечения.

В качестве основных критериев эффективности лечения оценивали степень отека роговицы, наличие перикорнеальной инъекции конъюнктивы, слизистого отделяемого, площади прокрашивания дефекта роговицы флюоресцеином, чувствительности роговицы, восстановление остроты зрения, степень помутнения роговицы ($p < 0,05$).

2.4. Статистическая обработка результатов клинического исследования.

Статистическая обработка результатов иммунологического исследования.

Статистический анализ полученных данных производился с помощью программы Excel Word.

Средние значения определяли по формуле:

$$X_{\text{ср}} = \frac{\sum X}{n}$$

Стандартное отклонение вычисляли по формуле:

$$S = \frac{\sqrt{\sum (X - X_{\text{ср}})^2}}{n-1}$$

В связи с малым объемом выборки и разным числом наблюдений в каждой из групп для оценки статистической достоверности различий экспрессии генов в исследуемых группах использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (Гланц С., Медико-биологическая статистика, М., Практика, 1999).

Статистическую обработку клинического материала производили на персональном компьютере с использованием статистического пакета программ Primer of Biostatistics Version 4.03 by Stanton A. Glantz. Для сравнения групп данных использовали параметрический критерий Стьюдента и степень вероятности (p). Различия между сравниваемыми величинами считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Глава 3. Результаты собственных экспериментальных исследований.

3.1 Влияние цитокинотерапии и кератопротекции на репаративную регенерацию роговицы после нанесения экспериментального дефекта роговицы.

Экспериментальные исследования были проведены на 18 кроликах (36 глаз).

Во всех случаях, после образования стандартной модели дефекта роговицы, экспериментальные кролики в клетках вели себя активно, хорошо принимали пищу. Общее состояние кроликов оставалось неизменным. Ежедневный контроль скорости регенерации эрозий проводили с помощью флюоресцеина и фотодокументации. Качество заживления проверяли с помощью гистологического контроля на 7-е и 15-е сутки.

В первые сутки эксперимента, мы не обнаружили разницы в клинической картине глаза между контрольной и опытной группами.

На вторые сутки постепенно нарастала воспалительная реакция глаза: усилилась инъекция конъюнктивы, появилось обильное слизистое отделяемое, отек роговицы, размеры эрозии оставались на том же уровне во всех группах (5мм).

На третьи сутки в первой и во второй опытной группах отмечали умеренную перикорнеальную инъекцию глазного яблока, уменьшилось слизистое отделяемое, сокращался диаметр эпителиального дефекта роговицы кролика. В контрольной группе воспалительная реакция имела более выраженный характер (рис.8).

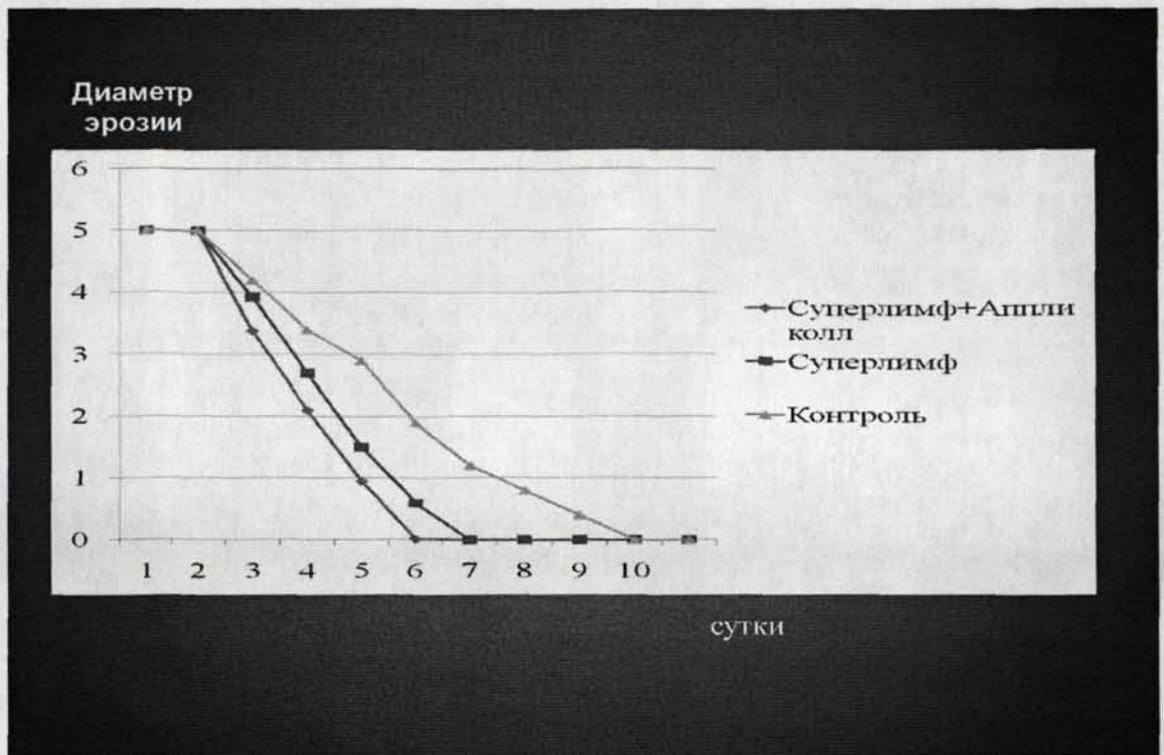


Рис. 8. Динамика эпителизации травматического дефекта в эксперименте

На четвертые сутки в первой опытной группе наблюдали выраженную положительную динамику (рис.9), исчезновение слизистого отделяемого ($4,2 \pm 0,4$ сутки), купирование отека роговицы ($4,1 \pm 0,3$ сутки), исчезновение перикорнеальной инъекции глазного яблока ($4,3 \pm 0,4$ сутки), что произошло на сутки быстрее, чем во второй опытной группе (рис.10), и на 2,5 суток – в контрольной, $p < 0.05$ (рис.11).



Рис. 9. Глаз кролика на 4-е сутки эксперимента. Первая опытная группа (Суперлимф+ Аппликолл)



Рис. 10. Глаз кролика на 4-е сутки эксперимента. Вторая опытная группа (Суперлимф).



Рис. 11. Глаз кролика на 4-е сутки эксперимента. Контрольная группа (традиционное лечение).

Экспериментальные исследования показали, что под влиянием препарата Суперлимф совместно с кератопротектором Апликолл сокращались сроки заживления и эпителизации поверхностного дефекта роговицы кролика по сравнению с терапией Суперлимфом и традиционным лечением.

Купирование отека роговицы кролика, отсутствие слизистого отделяемого и исчезновение перикорнеальной инъекции в первой опытной группе (Суперлимф +Апликолл) на 4-е сутки, во второй опытной группе (Суперлимф) наблюдали в среднем на 5-е сутки, в контрольной (Контроль) на 7-е сутки (табл.5).

Таблица 5

Эффективность применения терапии Суперлимфом и совместно с кератопротектором Апликолл при лечении травматического поверхностного дефекта роговицы

Критерии	Группа		
	1-я Суперлимф+Апликолл, Дни	2-я Суперлимф, дни	Контрольная, Дни
Отсутствие слизистого отделяемого	3,8±0,4	4,8±0,3	6,8±0,4
Купирование отека роговицы	4,2±0,3	4,9±0,5	7,1±0,3
Исчезновение перикорнеальной инъекции	4,1±0,2	5,1±0,3	7,2±0,2
Полная эпителизация	6,1±0,4	7,4±0,5	10,4±0,5

3.2 Гистологические данные эффективности цитокинотерапии на регенерацию роговицы.

Гистологическое исследование роговицы кроликов на 7-е сутки:

полное замещение эпителиального дефекта отмечалось лишь в первой опытной группе, где одновременно выполняли инстилляцию Суперлимфа с аппликациями кератопротектора Апликолл. Сформированный пласт эпителия представлен 2-3 рядами клеток без признаков послойной дифференцировки. Наряду с участками плотного эпителиально-стромального сращения встречаются места более слабой адгезии (рис. 12).

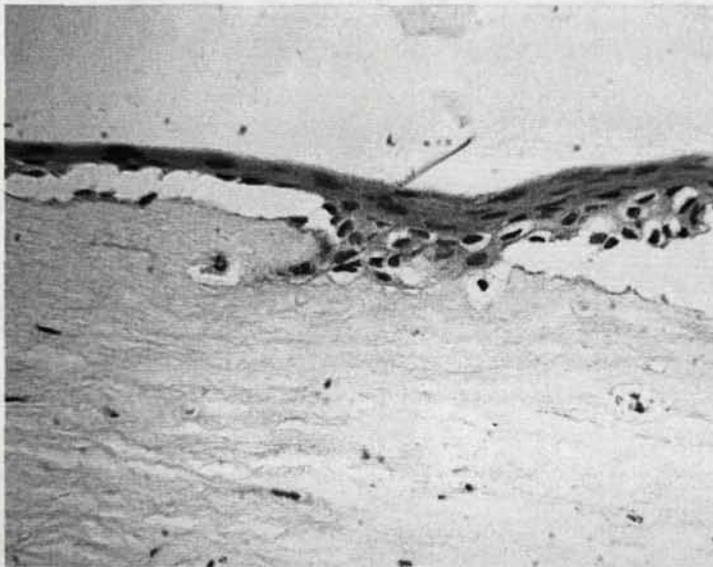


Рис. 12 . 7 день после операции - реэпителизация в I группе. Парафиновые срезы. Окраска гематоксилин-эозином. Ув -x250.

Во второй опытной группе, где использовали Суперлимф, растущий эпителиальный слой также состоял из 2 слоев клеток, недостаточно плотно прилежащих друг к другу, но с хорошей адгезией базального слоя к подлежащей строме (рис. 13).

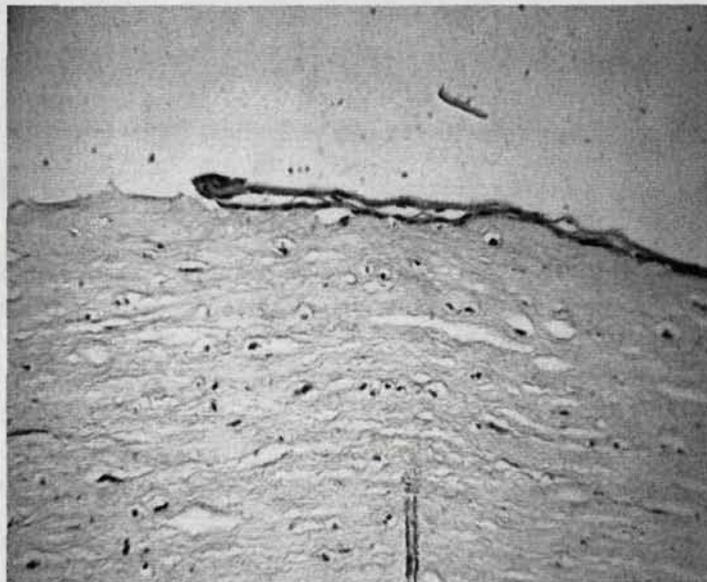


Рис. 13. 7 день после операции. Пограничный край растущего эпителия в группе 2. Парафиновые срезы. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. - x125.

В третьей группе, леченной по стандартной схеме, эпителиальный пласт из 1-2 слоев занимал сравнительно меньшую площадь послеоперационного дефекта. В этой же группе в деэпителизированной поверхностной строме была отмечена более выраженная воспалительная реакция в виде лейкоцитарной инфильтрации на фоне умеренной неоваскуляризации. Сама строма роговицы выглядела отечной с нечеткими межпластинчатыми границами (рис. 14).

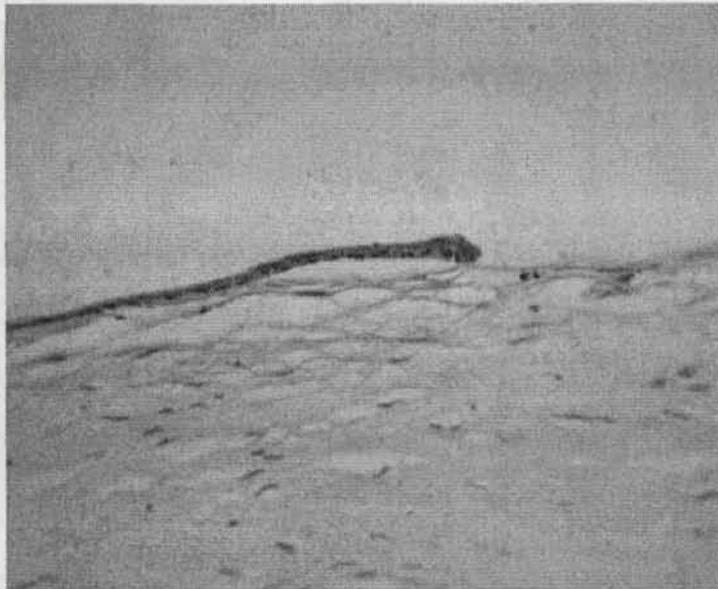


Рис. 14. 7 день после операции. Пограничный край растущего эпителия в контрольной группе. Парафиновые срезы. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. - х200.

Гистологическая картина на 15-е сутки показала, что в первой опытной группе произошла полная реэпителизация с дифференцировкой 4-5 слоев на всем протяжении. В подлежащей строме не было признаков воспаления, нарушения архитектоники коллагеновых пластин (рис. 15).

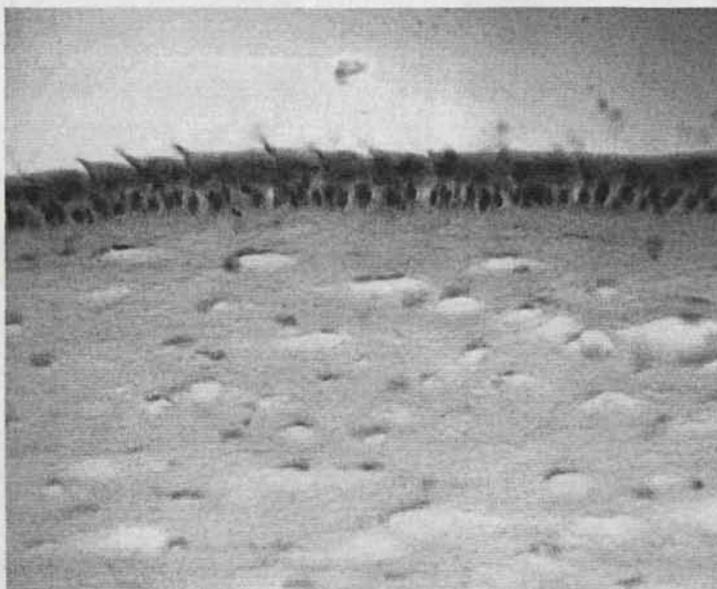


Рис. 15. 15 день после операции. Различная степень дифференцировки эпителия в зоне нанесенного дефекта в зависимости от метода лечения в I группе. Парафиновые срезы. Окраска гематоксилин-эозином. Ув.х250.

Во второй опытной группе, после форсированных инстилляций «Суперлимфа», также наступила полная реэпителизация, эпителий имел равномерную толщину и завершённую послойную дифференцировку клеток. Обращали на себя внимание участки перинуклеарного отека в базальном слое эпителия, что могло отражать состояние трансцеллюлярного транспорта жидкости (рис. 16).

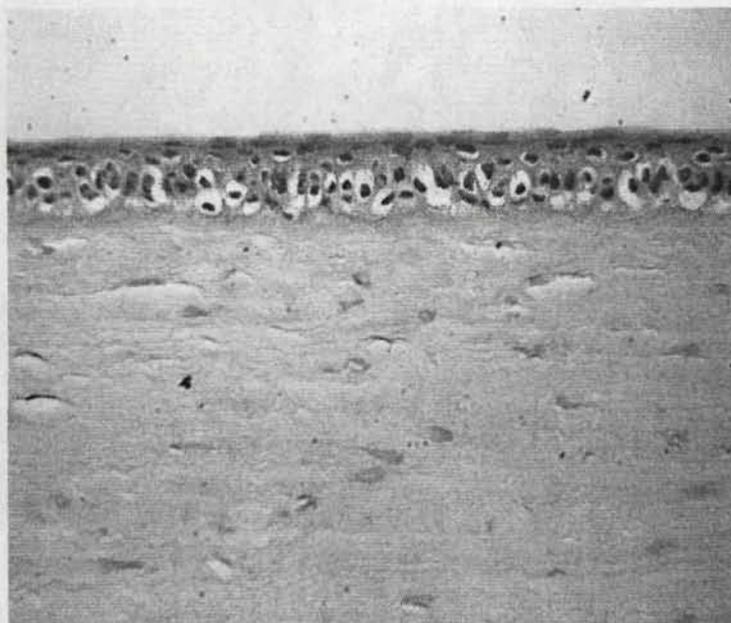


Рис. 16. 15 день после операции. Различная степень дифференцировки эпителия в зоне нанесенного дефекта в зависимости от метода лечения во II группе. Парафиновые срезы. Окраска гематоксилин-эозином. Ув.х250.

В контрольной группе, несмотря на полную реэпителизацию отмечали неравномерный по толщине пласт эпителия, незавершенную послойную дифференцировку клеток, включая базальный слой. Эпителиальная гиперплазия в центральной зоне (в виде фасеток) сочеталась с умеренной фибропластической пролиферацией с образованием нежной рубцовой ткани (рис. 17).

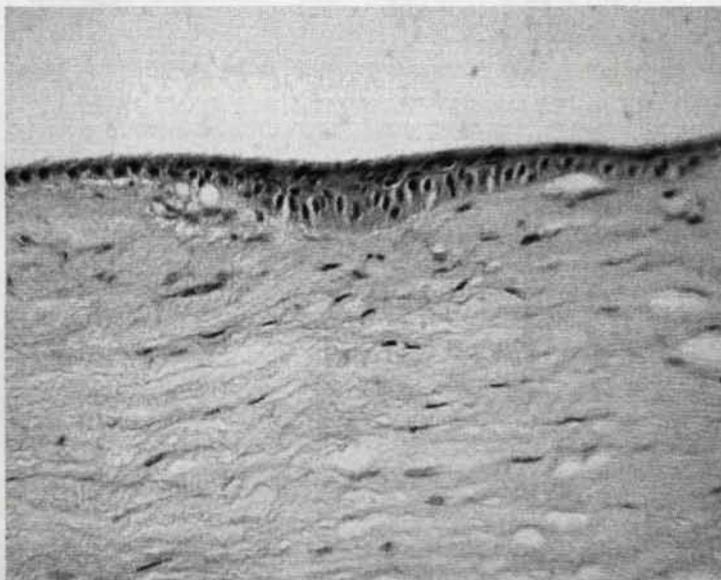


Рис. 17. 15 день после операции. Различная степень дифференцировки эпителия в зоне нанесенного дефекта в зависимости от метода лечения в контрольной группе. Парафиновые срезы. Окраска гематоксилин-эозином. Ув.х250.

Таким образом, применение форсированных инстилляций Суперлимфа ускоряло процесс восстановления оптических свойств роговицы кролика по сравнению с контрольной группой. Совместное применение иммуностропного препарата Суперлимф с кератопротектором Аппликолл способствовало к качественному восстановлению прозрачности эпителиального дефекта роговицы кролика без нарушения архитектоники коллагеновых структур и помутнения.

3.3 Анализ экспрессии генов TLR9 и HBD-2 у здоровых детей и больных герпетическим кератитом.

Уровень экспрессии генов HBD2 и TLR9 определяли у 16 здоровых детей и 24 пациентов с герпетическим кератитом до и после лечения.

Для определения нормы уровня генов HBD2 и TLR9 исследовали мазки с конъюнктивы и роговицы здоровых детей.

У детей с герпетическим кератитом стерильной ватной палочкой брали мазок с конъюнктивы и роговицы двукратно: до лечения и через 7 дней после лечения.

Пациентов с герпетическим кератитом разделили на 2 группы:

1 группа (12 детей) – в комплексном лечении которых применяли форсированные инстилляции препарата Суперлимф

2 группа (12 детей) – применяли только традиционное лечение.

Полученные нами данные показали, что уровень экспрессии гена Toll-подобного рецептора (TLR9) в группах здоровых доноров и в группах больных с герпетическим кератитом не зависел от возрастной категории.

Уровни экспрессии противомикробного пептида (HBD2) в различных возрастных группах также достоверно не отличались, как в группе здоровых детей, так и в группе с герпетическим кератитом, следовательно, группы можно не разделять по возрастному признаку (табл. 6).

Таблица 6

Уровень экспрессии TLR9 и HBD2 у больных с герпетическим кератитом до и после лечения в основной и контрольной группе

Группа	Значение TLR9 М ср(lg)		Значение HBD-2 М ср (lg)	Достоверность
Норма	3,67±0,37	P<0,05	6,44 ± 0,04	P>0,05
Герпетический кератит до лечения	5,31 ±2,39	P<0,05	6,62 ± 0,38	P>0,05
Герпетический кератит после лечения Суперлимфом	3,85 ±0,78	P<0,05	6,95 ± 0,58	P>0,05
Герпетический кератит контрольная группа до лечения	6,05 ±2,65	P<0,05	7,13 ±0,84	P>0,05
Герпетический кератит контрольная группа после лечения	2,53 ± 1,12	P<0,05	6,97±0,61	P>0,05

Методом полимеразной цепной реакции были определены уровни экспрессии генов TLR9 и HBD-2 в эпителиальных клетках конъюнктивы и роговицы детей с диагнозом герпетический древовидный кератит по сравнению со здоровыми детьми. В эпителиальных клетках конъюнктивы и роговицы здоровых детей экспрессировались гены TLR9 и HBD-2. У детей больных герпетическим кератитом наблюдалось достоверное увеличение экспрессии гена TLR9 в 20 раз и более ($p<0,05$) по сравнению с нормой (Рис.18). Уровень экспрессии гена β -дефенсина (HBD-2) при герпетическом кератите практически не отличается от уровня экспрессии у здоровых детей (рис.19).

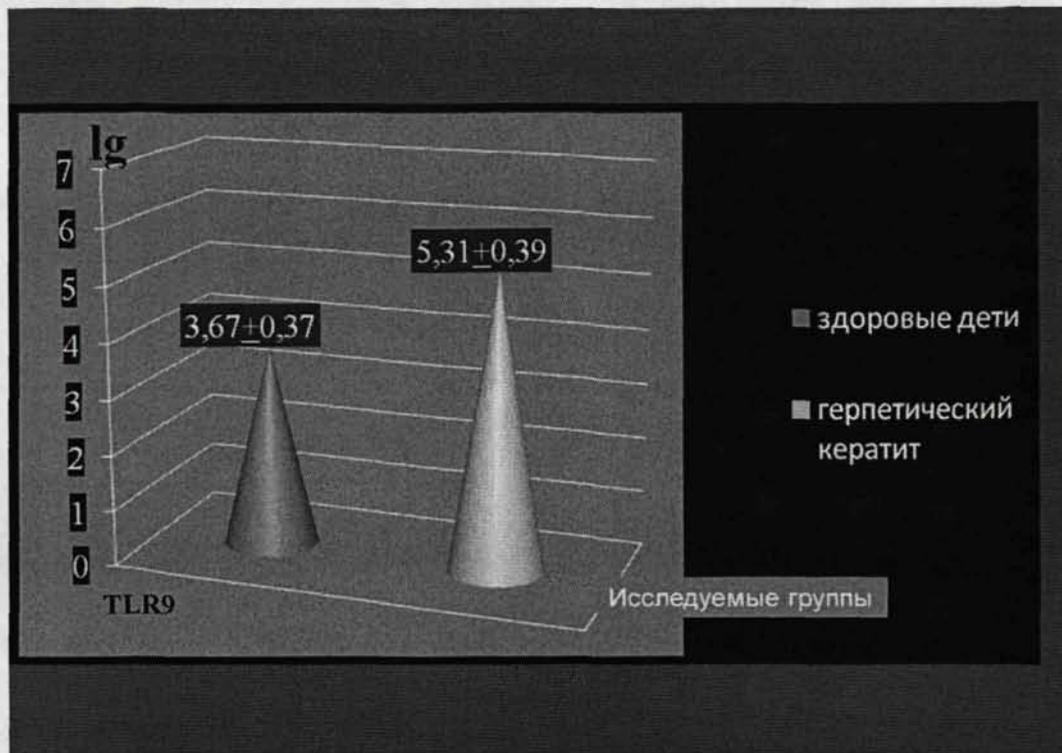


Рис. 18. Уровень экспрессии генов TLR9 в конъюнктиве и роговице у здоровых детей и больных герпетическим кератитом до лечения.

$p < 0,05$ уровень значимости по критерию Манна-Уитни по оси ординат lg числа копий генов TLR9 относительно экспрессии гена β -актина по оси абсцисс – исследуемые группы

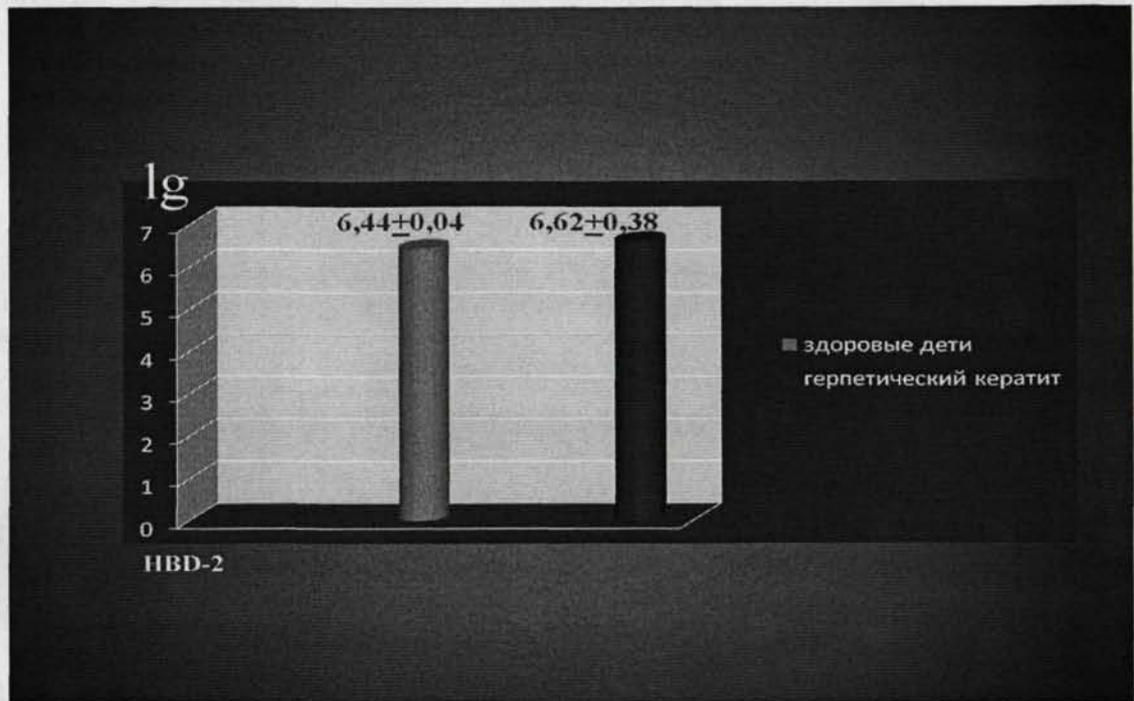


Рис.19. Уровень экспрессии генов HBD-2 в конъюнктиве глаза здоровых детей и больных герпетическим кератитом до лечения
 $p < 0,05$ уровень значимости по критерию Манна-Уитни
 по оси ординат lg числа копий генов относительно экспрессии гена β -актина
 по оси абсцисс – исследуемые группы

В работах ряда авторов показано увеличение выработки провоспалительных цитокинов, интерферонов при вирусных кератитах (Ковальчук Л.В., Ганковская О.А., Долгина Е.Н., 2003). На основе полученных нами данных можно предположить, что гиперэкспрессия гена TLR9 при вирусном кератите не индуцирует экспрессию противомикробных пептидов, а приводит к увеличению выработки ИНФ α/β и провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, и ФНО- α), которые наряду с противовирусным действием могут вызывать глубокие повреждения роговицы и склеры.

Необходимость коррекции гиперэкспрессии гена TLR9 в конъюнктиве детей с вирусным кератитом, послужила основанием для применения в комплексном лечении препарата Суперлимф, представляющего комплекс природных цитокинов и противомикробных пептидов. Механизм действия Суперлимфа связан с регуляцией клеток врожденного иммунитета, снижением воспалительной реакции, усиление процессов репарации роговицы.

Включение в комплексное лечение препарата Суперлимф, обусловлено также его прямым противовирусным действием и протективным эффектом на неинфицированные клетки (Ковальчук Л.В., Лавров В.Ф., Ганковская Л.В., 2005).

В результате лечения Суперлимфом происходила нормализация экспрессии генов TLR9, в то время как при традиционном лечении больных с герпетическим кератитом происходит угнетение экспрессии гена TLR9 по сравнению со здоровыми детьми в 15 раз ($2,31 \pm 0,6$ lg кДНК относительно $3,67 \pm 1,2$ lg кДНК) (рис.20). Этот факт указывает на снижение местного иммунитета, т.к. нарушается распознавание и снижается реакция на ДНК вируса простого герпеса, что может вызывать рецидивы герпетических кератитов.

С другой стороны достоверных отличий в экспрессии гена NBD-2 при всех методах лечения не было выявлено, что вероятно также связано с блоком одной из адаптерных молекул сигнального пути NBD-2 (рис.21).

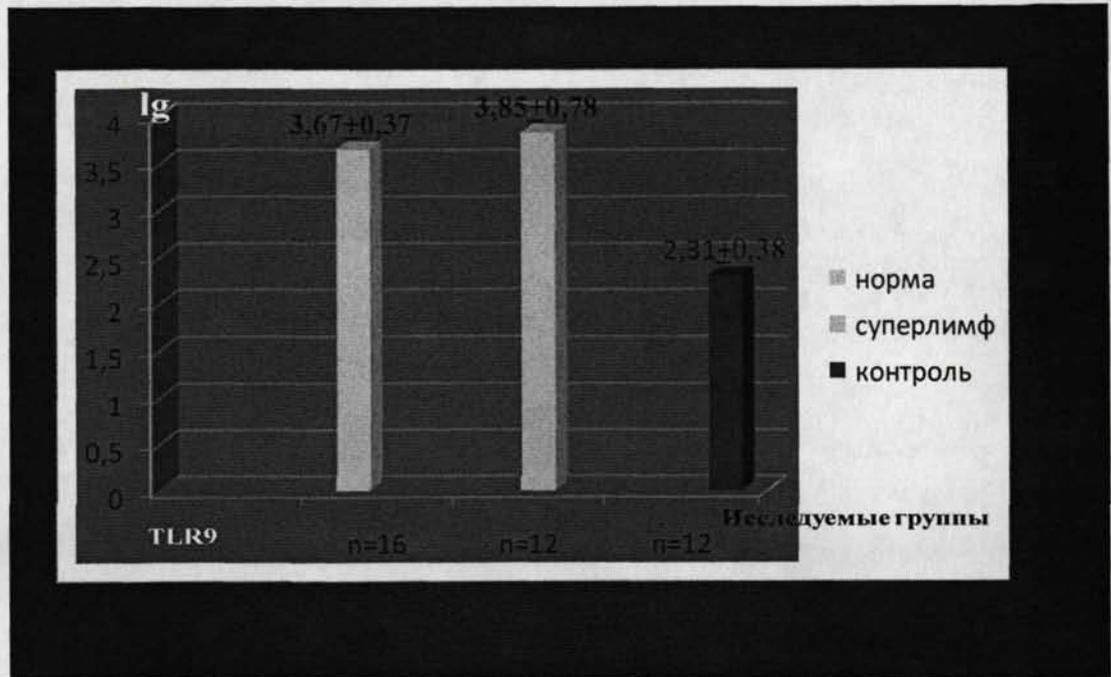


Рис. 20. Уровень экспрессии генов TLR9 в конъюнктиве и роговице глаза больных герпетическим кератитом после лечения.

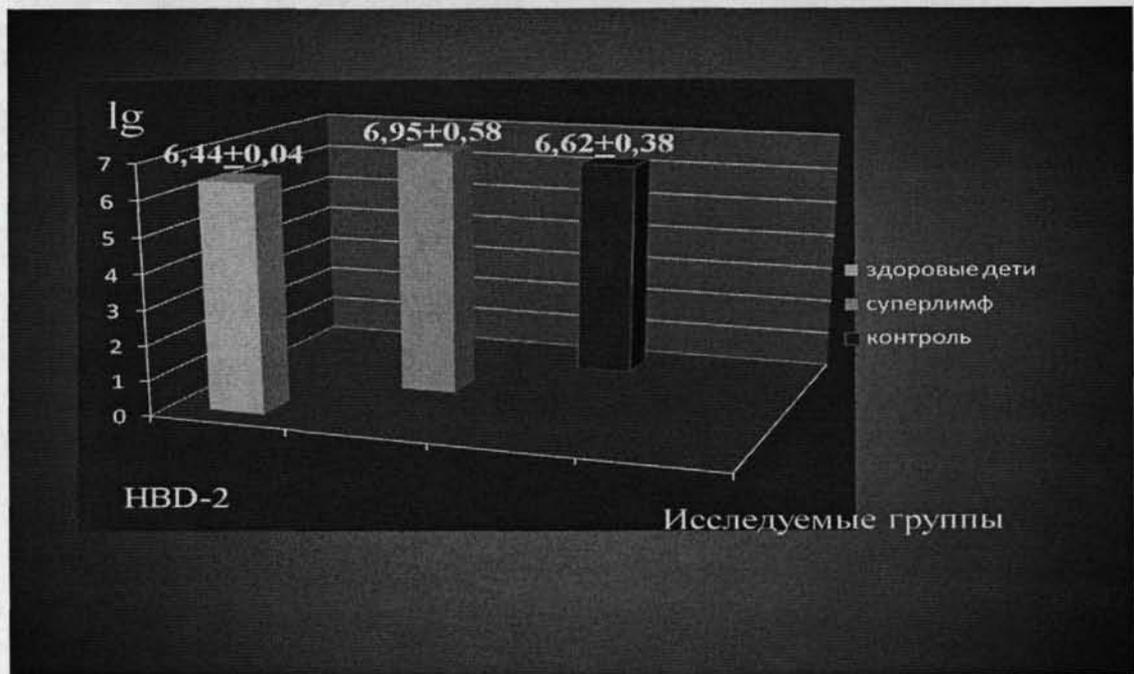


Рис. 21. Уровень экспрессии генов TLR9 (а) и HBD-2 (б) в конъюнктиве и роговице глаза больных герпетическим кератитом после лечения.

$p < 0,05$ уровень значимости по критерию Манна-Уитни
 по оси ординат Ig числа копий генов относительно экспрессии гена β -актина
 по оси абсцисс – исследуемые группы

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать заключение, что применение в комплексной терапии иммуностропных препаратов (Суперлимфа) способствует нормализации врожденного иммунитета при герпетическом кератите.

В дальнейшем, результаты данного исследования помогут понять роль механизмов врожденного иммунитета глаза в защите от вирусной инфекции, разработать новые подходы к диагностике иммунных нарушений и к адекватной иммунотерапии

3.4 Результаты применения Суперлимфа и Аппликолл при герпетическом кератите

Клинические испытания проведены у детей с герпетическим и травматическим кератитом. Больных разделили на 3 группы:

1-я основная группа, где в комплексном лечении применяли препарат Суперлимф в виде форсированных инстилляций по 1 капле через каждые 5 минут в течение 1 часа 1 раз в день на аппликацию кератопротектора Аппликолл и традиционное лечение.

2-я основная группа, где в комплексном лечении применяли форсированные инстилляциии Суперлимфа (по 1 капле через каждые 5 минут в течение 1 часа 1 раз в день) и традиционное лечение.

3-я контрольная группа, где применяли традициинное лечение.

Анализ эффективности применения цитокинотерапии в комплексном лечении герпетического кератита проведен у 55 больных (55 глаз) на основании клинического наблюдения и результатов лечения.

В 1-ой основной группе было 19пациентов, из них мальчиков - 8 (42,1%), девочек11 (57,9%), во второй основной группе – 28 детей, из них мальчиков - 12 (42,8%), девочек – 16 (57,2%). В контрольной группе с герпетическим кератитом наблюдали 25 детей, мальчиков – 10 (40%), девочек-15(60%). Среди больных данной группы значительно преобладали

лица школьного возраста от 11 до 15 лет – 19 (40,4%) в основной группе и в контрольной 10 (40%) (табл.7).

Таблица 7

Распределение больных по возрасту с герпетическим кератитом

Возраст пациентов			Группа		Контрольная	
	1-я Суперлимф+ Апликолл		2-я Суперлимф			
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
0-5	5	27,8	8	28,6	7	28
6-10	6	33,4	9	32,1	8	32
11-15	8	38,8	11	39,3	10	40
Всего	19	100	28	100	25	100

Клинический диагноз устанавливали по следующим признакам:

1. Частая связь офтальмогерпеса с общим инфекционным заболеванием
2. Наличие сопутствующих герпетических высыпаний на коже лица и слизистой оболочке губ
3. Нейротрофический характер поражения – понижение чувствительности роговицы при кератите
4. Замедленная регенерация
5. Безуспешность антибактериальной терапии
6. Склонность к рецидивам

На основании клинической картины этиологический диагноз достаточно твердо устанавливали с помощью метода биомикроскопии при наличии древовидного изъязвления роговицы.

Клинический диагноз всегда подтверждали исследованием анализа крови: определение антител (IgG, IgM) к вирусу простого герпеса

методом ИФА в вирусологической лаборатории Морозовской детской городской клинической больницы.

У детей в группе от 0 до 5 лет определялись как антитела IgG – 85,2% , так и антитела IgM – 75,9%.

В возрасте от 6 до 15 лет в большинстве случаев определялись антитела IgG – 95,6%.

У всех больных с герпетическим кератитом в основной и контрольной группе имелись одинаковые клинические проявления роговичного синдрома (слезотечение, светобоязнь, блефароспазм, невралгическая боль), а также снижение зрения, степень которого зависела от локализации и тяжести процесса, снижении чувствительности роговой оболочки. При биомикроскопии определяли слизистое отделяемое, выраженную смешанную или перикорнеальную инъекцию, на роговице различной формы инфильтраты (в виде «веточки», пузырьков, звездочки, снежинки, в форме диска).

В 95 % случаев наблюдали древовидный герпетический кератит.

Клиническая картина показала, что при применении цитокиноотерапии Суперлимфом купирование отека роговицы произошло на $4,8 \pm 0,4$ сутки, а совместно с кератопротектором Аппликолл – на сутки раньше ($3,7 \pm 0,3$), тогда как в контрольной группе купирование отека роговицы наблюдали лишь на $7,1 \pm 0,2$ сутки. Перикорнеальная инъекция исчезла в 1-ой основной группе на $3,8 \pm 0,4$ сутки, во 2-ой основной группе - на $4,6 \pm 0,3$ сутки, в контрольной – на 2-3 суток позже. Полная эпителизация произошла в 1-ой основной группе на $6,2 \pm 0,4$ сутки, во второй основной группе – на $7,4 \pm 0,4$ сутки, тогда как в контрольной – на 4 дня позже ($p < 0.05$).

Сокращение продолжительности воспалительного процесса привело к сокращению сроков пребывания пациентов в стационаре. В основной группе койко-день сократился практически в 2 раза (табл. 8).

Показатели клинической эффективности Суперлимфа и совместно с кератопротектором Апликолл при лечении герпетического кератита у детей.

Критерии	1-я основная группа Суперлимф+ Апликолл (сутки)	2 –я основная группа Суперлимф (сутки)	Контрольная группа (сутки)
Купирование отека роговицы	3,7±0,3	4,8±0,4	7,1±0,2
Исчезновение перикорнеальной инъекции	3,8±0,4	4,6±0,3	6,8±0,4
Купирование роговичного синдрома	4,3±0,4	5,4±0,4	7,2±0,4
Полная эпителизация	6,2±0,4	7,4±0,4	12,3±0,6
Койко-день	7,5±0,5	8,9±0,5	14,4±0,4

Показатели эффективности лечения в основной группе обследованных были лучше, чем в контрольной и разница статистически достоверна ($p < 0,05$).

Острота зрения при поступлении составила в основном от <0.1 до 0.4 (рис. 22).

Восстановление прозрачности роговицы обеспечило высокую остроту зрения в 1-й и во 2-ой основных группах по сравнению с контрольной (рис. 23).

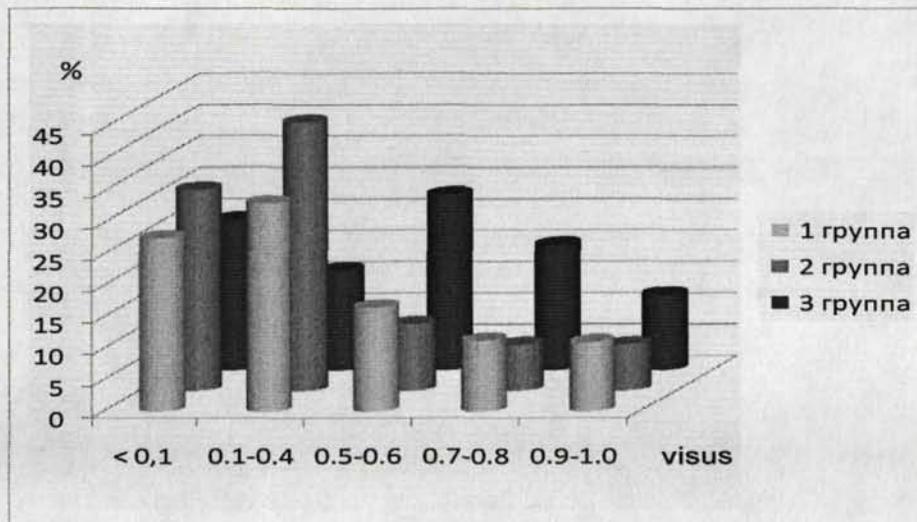


Рис. 22. Острота зрения у детей с герпетическим кератитом до лечения

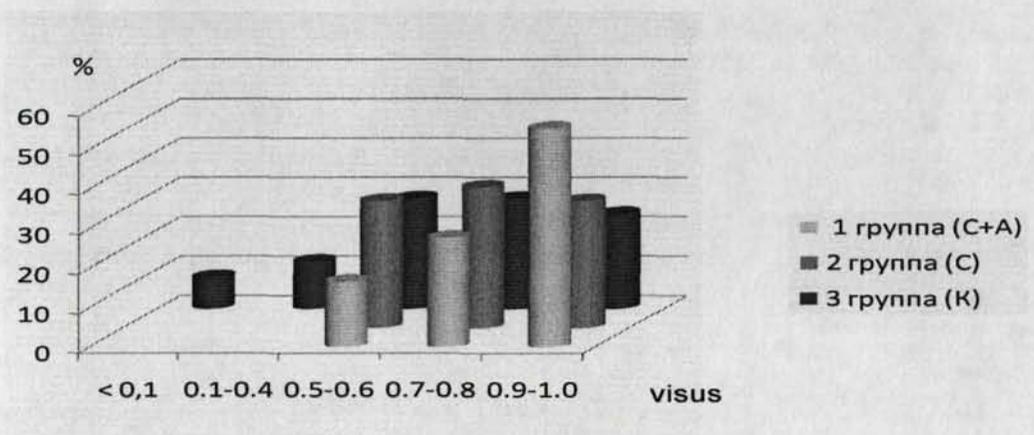


Рис.23. Острота зрения у детей с герпетическим кератитом после лечения

Таким образом, в ходе клинических наблюдений за результатами лечения пациентов нами подтверждён высокий эффект препарата Суперлимф в комплексном лечении герпетического кератита, который усиливался при совместном использовании с кератопротектором Аппликолл, сокращая сроки пребывания больного в стационаре почти в 2 раза.

3.5 Результаты применения Суперлимфа и Аппликолла при травматическом кератите

Травматический кератит наблюдали у детей после непроникающих ранений роговицы, внедрения в роговицу инородного тела, ношения контактных линз.

С травматическим кератитом в первой основной группе наблюдали 18 детей, среди них мальчиков - 10 (52,9%) и девочек - 8 (37,1%), во второй основной группе – 27 детей, среди них мальчиков - 16 (59,2%) и девочек - 11 (40,8%). В контрольной группе – 25 детей, мальчиков – 14 (56%), девочек – 11 (44%).

Субъективная симптоматика при поступлении: боль в глазу, слезотечение, светобоязнь, блефароспазм, снижение остроты зрения.

В большинстве случаев травматический кератит отмечали в возрасте от 6 до 10 лет, в первой основной группе 50%, во второй основной группе – 51,9%, в контрольной группе – 48% (табл. 9)

Распределение больных по возрасту с травматическим кератитом

Возраст пациентов	Группа					
	1-я Суперлимф+ Апликолл		2-я Суперлимф		Контрольная	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
0-5	4	22,2	6	22,2	5	20
6-10	9	50	14	51,9	12	48
11-15	5	27,3	7	25,9	8	32
Всего	18	100	27	100	25	100

Сравнительный анализ результатов лечения показал, что купирование отека роговицы произошло в первой основной группе на $3,6 \pm 0,3$ сутки, во второй на $2,7 \pm 0,4$ сутки, в контрольной группе – на $5,1 \pm 0,5$ сутки, $p < 0,05$.

Болевой синдром исчезал на 2 суток раньше во второй основной группе, и на сутки – в первой в отличие от контрольной группы, в которой болевой синдром купировался на $4,8 \pm 0,4$ сутки.

Купирование роговичного синдрома произошло в 1-й основной группе на 2-сутки, а во второй – на 1,5 суток раньше, чем в контрольной.

Койко-день пребывания в стационаре детей с травматическим кератитом в первой основной группе сократился в 2 раза, а во второй основной группе - в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой (табл. 10).

Показатели клинической эффективности Суперлимфа и совместно с кератопротектором Аппликолл при лечении травматического кератита у детей.

Критерии	1-я группа Суперлимф +Аппликолл (сутки)	2 –я группа Суперлимф (сутки)	Контрольная группа (сутки)
Купирование отека роговицы	2,7±0,4	3,6±0,3	5,1±0,5
Купирование болевого синдрома	2,8±0,4	3,6±0,3	4,8±0,4
Купирование роговичного синдрома	2,6±0,4	3,8±0,5	5,6±0,4
Полная эпителизация	3,5,±0,4	4,3±0,4	6,8±0,5
Койко-день	4,8±0,5	5,7±0,5	9,6±0,4

Показатели эффективности лечения в основной группе обследованных были лучше, чем в контрольной и разница статистически достоверна ($p < 0,05$).

Острота зрения у пациентов с травматическим кератитом при поступлении в стационар составила в большинстве случаев 0.1-0.4 (рис.24)

Восстановление остроты зрения до 0.9- 1.0 в первой основной группе произошло в 71,4% случаев, во второй опытной группе в 83,3% случаев, в контрольной - 30,6 % случаев (рис. 25).

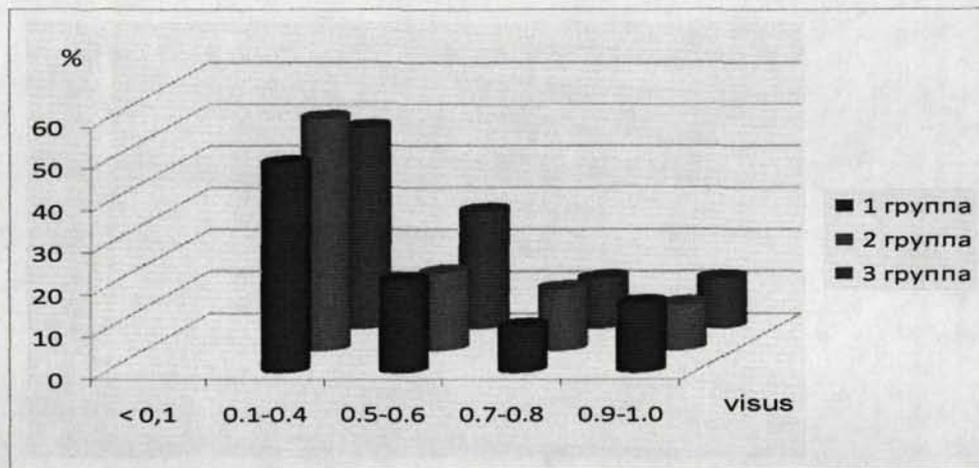


Рис. 24. Острота зрения у детей с травматическим кератитом до лечения

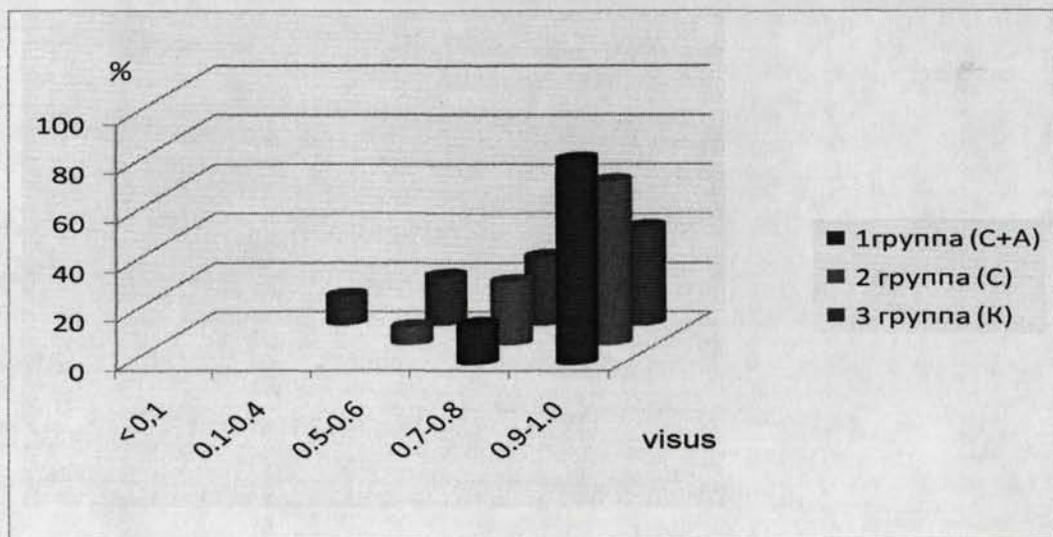


Рис. 25. Восстановление остроты зрения у детей с травматическим кератитом после лечения

Таким образом, клиническая картина показала, что применение форсированных инстилляций препарата Суперлимф совместно с кератопротектором Аппликолл в комплексном лечении травматического кератита у детей, положительно влияет на процессы регенерации, значительно сокращает сроки эпителизации роговичного дефекта, сокращает сроки лечения, улучшает исходы травм по сравнению с контрольной группой, где применяли только традиционное лечение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что на сегодняшний день предложено большое количество разнообразных лекарственных препаратов [23] в лечении герпетического и травматического кератита, не всегда с их помощью достигается полный терапевтический эффект.

Иммуномодулирующая терапия в последние годы заметно возросла и обусловлено это следующими факторами: накопились новые сведения об устройстве и функционировании иммунной системы человека; появилось много иммуномодулирующих препаратов; расширилось число нозологических форм, при лечении которых применяются иммуномодулирующие препараты, иммуномоделирующая терапия стала внедряться в практику не только врачей-иммунологов, но и врачей других специальностей.

Необходимо уточнить, что иммуномодуляторы – лекарственные препараты, которые в терапевтических дозах восстанавливают нарушение функции иммунной системы.

Целью иммуномодулирующей терапии является купирование клинических проявлений иммунной недостаточности, нормализация исходно измененных показателей иммунитета и повышение тем самым эффективности терапии основного заболевания [23].

Наиболее частыми причинами, способствующими развитию нарушений иммунитета при патологии глаза, являются вирусные, бактериальные инфекции, травмы, включая операционные. Одним из таких нарушений представляется дисбаланс в системе цитокинов, содержащихся в слезной жидкости и регулирующих «взаимоотношения» между клетками. Дисбаланс в выработке цитокинов может нарушать существующие в локальной системе взаимосвязи, что приводит к нарушению процессов регенерации и развитию тяжелых экссудативных реакций.

На протяжении 10 лет интенсивно изучается проблема врожденного иммунитета и, особенно, рецепторов врожденного иммунитета, так

называемых паттерн - распознающих рецепторов (ПРР). Новый взгляд на природу врожденного иммунитета формирует совершенно иные подходы к диагностике иммунных нарушений в организме, к применению иммуннокорректирующей терапии.

На кафедре иммунологии РГМУ г. Москва разработан иммунотропный препарат Суперлимф, который предназначен для лечения раневых и воспалительных процессов, сопровождающихся нарушением репарации и локальных иммунных механизмов. Суперлимф широко применяли в стоматологии, гинекологии, а также в лечении различной глазной патологии у взрослых, а также в оториноларингологии у детей.

Целью нашего исследования явилось оценить влияние препарата цитокинов в комплексном лечении герпетического и травматического кератита у детей.

Была предложена новая схема применения иммунотропного препарата при комплексном лечении герпетического и травматического кератита. С целью пролонгированного действия препарата Суперлимф мы впервые использовали аппликации кератопротектора Апликолл. Для этого мы провели экспериментальные исследования.

Экспериментальные исследования были проведены на 18 кроликах породы «Шиншилла». В результате эксперимента мы обратили внимание, что применение форсированных инстилляций препарата Суперлимф совместно с кератопротектором Апликолл сокращает сроки эпителизации на 4 суток, тогда как применение форсированных инстилляций препарата Суперлимф сокращает сроки эпителизации на 3 суток по сравнению с контрольной группой.

Это может быть обусловлено тем, что терапия Суперлимфом сокращала сроки полной эпителизации, однако применение Суперлимфа на пленку Апликолл способствовало постепенному поступлению комплекса цитокинов и коллагена, что усиливало процессы реэпителизации.

Купирование отека роговицы, исчезновение перикорнеальной инъекции, отсутствие слизистого отделяемого наблюдали на 4 сутки в первой опытной группе, где применяли (Суперлимф+Аппликолл), что на 1,5 суток раньше, чем во второй опытной группе, где применяли только Суперлимф, и на 3 суток быстрее по сравнению с контрольной группой, где использовали традиционное лечение.

Гистологическое исследование на 15-е сутки показало, что в первой опытной группе произошла полная реэпителизация с дифференцировкой 4-5 слоев на всем протяжении. В подлежащей строме не было признаков воспаления, нарушения архитектоники коллагеновых пластин.

Во второй опытной группе, после форсированных инстилляций «Суперлимфа», также наступила полная реэпителизация, эпителий имел равномерную толщину, завершённую послойную дифференцировку клеток. Обращали на себя внимание участки перинуклеарного отека в базальном слое эпителия, что могло отражать состояние трансцеллюлярного транспорта жидкости.

В контрольной группе, несмотря на полную реэпителизацию отмечали неравномерный по толщине пласт эпителия, незавершённую послойную дифференцировку клеток, включая базальный слой. Эпителиальная гиперплазия в центральной зоне (в виде фасеток) сочеталась с умеренной фибропластической пролиферацией с образованием нежной рубцовой ткани.

Исследование уровня экспрессии генов Toll-подобного рецептора (TLR9) и противомикробного бета - дефенсина (HBD-2) в конъюнктиве и роговице здоровых детей и с герпетическим кератитом показало, что на фоне применения противовирусных препаратов (интерферон, полудан, офтальмоферон, зовиракс) происходило резкое снижение экспрессии гена TLR9, значительно ниже нормы (в 15 раз). Этот факт указывает на снижение местного иммунитета, к. нарушается распознавание и снижается

реакция на ДНК вируса простого герпеса, что может вызывать рецидивы герпетических кератитов.

Включение в комплексное лечение иммуностропного препарата Суперлимф приводило к нормализации уровня экскреции генов TLR9.

С другой стороны достоверных отличий в экспрессии гена HBD-2 при всех методах лечения не было выявлено, что вероятно связано с блоком одной из адаптерных молекул сигнального пути HBD-2.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать заключение, что применение в комплексной терапии иммуностропного препарата Суперлимф способствует нормализации врожденного иммунитета при герпетическом кератите.

Применение цитокинотерапии Суперлимфом и его совместное использование с кератопротектором Аппликолл в лечении герпетического кератита сократило продолжительность воспалительного процесса. Клиническая картина показала, что купирование отека роговицы произошло на 1,5 сутки раньше, чем во второй группе и на 3-е суток раньше, чем в контрольной группе. Перикорнеальная инъекция исчезла в 1-ой основной группе на $3,8 \pm 0,4$ сутки, во 2-ой основной группе - на $4,6 \pm 0,3$ сутки, в контрольной – на 2-3 суток позже. Полная эпителизация произошла в 1-ой основной группе на $6,2 \pm 0,4$ сутки, во второй основной группе – $7,4 \pm 0,4$ на сутки, тогда как в контрольной – на 4 дня позже.

Сокращение продолжительности воспалительного процесса привело к сокращению сроков пребывания пациентов в стационаре. В основной группе койко-день сократился в 2 и 1,5 раза по сравнению с контрольной группой.

Восстановление остроты зрения до 0.9-1.0 в первой опытной группе наблюдали в 55,5% случаев, во второй опытной группе – в 39,3%, в контрольной группе – в 12%.

Сравнительный анализ пациентов с травматическим кератитом показал, что добавление в комплексное лечение иммуностропного препарата Суперлимф и его совместное применение с кератопротектором Аппликолл повысило эффективность лечения.

В первой основной группе положительную динамику наблюдали уже на 2-3 сутки лечения, во второй основной группе – на 3-4 сутки, тогда как в контрольной группе только на 5-6 сутки. Основные признаки заболевания у больных контрольной группы сохранялись на 2-2,5 суток дольше, чем у больных основных групп.

Сокращение сроков исчезновения патологических признаков кератита у больных первой и второй основной группы обусловило более полноценную регенерацию, с менее интенсивными помутнениями и повышением зрительных функций. В большинстве глаз 94,5% первой основной группы отметили полное восстановление прозрачности роговицы, в двух случаях (5,5%) образовалось облаковидное помутнение. В контрольной группе восстановление прозрачности роговицы отмечено у 82% больных, в семи случаях (18%) образовалось облаковидное помутнение. Неполное восстановление зрительных функций объясняется не только формированием помутнений центральной локализации, но и развитием обскурационной амблиопии в контрольной группе, а также сопутствующими нарушениями рефракции в основной.

Купирование отека роговицы произошло в первой основной группе на 2,5-3 суток раньше, во второй основной группе на 1,5-2 суток раньше, по сравнению с контрольной группой ($5,1 \pm 0,5$ сутки).

Болевой синдром исчезал на 1,5 -2 суток раньше – в первой основной группе, 2,5 суток - во второй основной группе, в отличие от контрольной группы, в которой болевой синдром купировался на $4,8 \pm 0,4$ сутки.

Купирование роговичного синдрома произошло в первой и во второй основной группе на 2- суток раньше, чем контрольной.

Более полноценная регенерация привела к тому, что острота зрения повысилась до 0,9 - 1,0 - в первой основной группе 83,3%, во второй основной группе –71,4%, в контрольной 30,6% случаев.

Положительное влияние цитокиноотерапии и ее совместное применения с кератопротектором Аппликолл привело к сокращению срока пребывания детей с травматическим кератитом в стационаре, в первой основной группе на 4-5 суток, во второй основной группе - на 3 суток, по сравнению с контрольной группой, где средний койко-день составил $9,6 \pm 0,4$ суток.

Таким образом, применение цитокиноотерапии препаратом Суперлимф при лечении дефекта поверхностных слоев роговицы кролика привело к быстрому купированию воспалительных реакций и ускорению репаративных процессов. Однако применение иммуностропного препарата на аппликацию кератопротектора Аппликолл привело к более качественному восстановлению эпителиального дефекта с формированием более нежного рубца, без помутнения, по сравнению с традиционным лечением, где наблюдали длительное заживление и формирование помутнения роговицы в эксперименте.

Использование цитокиноотерапии препаратом Суперлимф в комплексном лечении герпетического и травматического кератита у детей способствовало быстрому и стойкому купированию локального воспалительного процесса, которое усиливалось при совместном применении с кератопротектором Аппликолл и способствовало восстановлению прозрачности роговицы, снижению интенсивности помутнений, повышению остроты зрения и сокращению сроков лечения.

Выводы

1. Применение цитокинолтерапии Суперлимфом в лечении экспериментального травматического дефекта роговицы кролика приводило к ускорению репаративных процессов, быстрому купированию воспалительной реакции по сравнению с традиционным лечением. Совместное применение цитокинолтерапии Суперлимфом с кератопротором Аппликолл способствовало более качественному восстановлению эпителиального дефекта роговицы без нарушения архитектоники коллагеновых структур.
2. Впервые изучены в конъюнктиве и роговице здоровых детей показатели врожденного иммунитета сигнального рецептора TLR9 и противомикробного пептида β - дефенсина HBD-2, обеспечивающих противовирусную и антибактериальную защиту тканей глаза. Уровни экспрессии TLR9 и HBD-2 в группе здоровых детей и группе с герпетическим кератитом не зависят от возраста и пола детей.
3. Установлено достоверное увеличение экспрессии генов рецептора TLR9 в 20 раз ($p < 0,05$) у детей с герпетическим кератитом до лечения, уровень экспрессии генов HBD-2 достоверно не отличается от уровня экспрессии генов в группе здоровых детей.
4. Применение в комплексном лечении детей с герпетическим кератитом иммуномодулятора Суперлимф вызывает нормализацию уровня экспрессии гена TLR9 в конъюнктиве и роговице глаза. Тогда как традиционная противовирусная терапия герпетического кератита приводит к достоверному снижению уровня экспрессии гена TLR9 (более чем на два порядка) по сравнению со здоровыми детьми ($p < 0.05$).
5. Включение цитокинолтерапии в комплексное лечение герпетического кератита привело к быстрому и стойкому купированию локального воспалительного процесса, сокращению сроков лечения на 3-4 суток

($8,9 \pm 0,5$, $p < 0.05$) по сравнению с контрольной группой ($14,4 \pm 0,4$, $p < 0.05$).

6. Совместное применение цитокинотерапии Суперлимфом и кератопротекции Апликоллом ускорило сроки полной эпителизации роговицы у детей с герпетическим кератитом на 4-5 суток, сокращению койко-дня на 5-6 суток ($7,5 \pm 0,5$). В то время как в контрольной группе пациентов, получающих традиционную противовирусную терапию койко-день составил $14,4 \pm 0,4$ суток. Комбинированное лечение травматических кератитов с использованием Суперлимфа и Суперлимфа в сочетании с Апликоллом вызывало более быстрое купирование воспалительной реакции, сокращение сроков лечения до $5,7 \pm 0,5$ к/д и $4,2 \pm 0,5$ к/д соответственно. В контрольной группе койко-день составил $9,6 \pm 0,4$ ($p < 0.05$).
7. Разработаны показания и схема применения препарата Суперлимф (форсированные инстилляции по 1 капле через каждые 5 минут в течение часа 1 раз в сутки) на аппликации кератопротектора Апликолл в комплексном лечении герпетического и травматического кератитов у детей.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Предложен для практического здравоохранения метод лечения глазных заболеваний. Метод позволяет усилить медикаментозное лечение, приносит экономический эффект за счет сокращения койко-дня в стационаре.

2. Для ускорения процессов эпителизации и предупреждения стромальных дефектов, уменьшения воспалительной реакции, профилактики осложнений, сокращения сроков и улучшения исхода лечения рекомендуется совместное использование цитокинотерапии и кератопротекции.

3. При лечении пациентов с вирусным и травматическим кератитом рекомендуется включить в комплекс лечебных мероприятий цитокинотерапию и кератопротекцию в течение первых суток после повреждения роговицы.

Показания к цитокинотерапии и кератопротекции

Герпетические и травматические кератиты, эрозии роговицы, для улучшения заживления корнеосклеральных разрезов после любых внутриглазных операций, послеоперационные осложнения.

Противопоказания к цитокинотерапии и кератопротекции

Индивидуальная непереносимость препарата Суперлимфа и кератопротектора Аппликолл.

Публикации по теме диссертации.

1. Раднаева Д.Ц., Сидоренко Е.И., Павлюк Е.Ю., Бадинова Н.С., Федоров А.А., Христофоров В.Н. Влияние магнитно-инфракрасно-лазерного излучения на репаративную регенерацию роговицы (экспериментальное исследование) // Российская педиатрическая офтальмология. – 2007. № 2. – С. 45 - 48.
2. Гусева М.Р., Дубовская Л.А., Бадинова Н.С., Бесланеева М.Б., Мищенко Н.П. Изучение клинической эффективности препарата Гистохром в комплексном лечении внутриглазных кровоизлияний у детей с контузиями глаз // XIV Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» - М. – 2007. – С. 281.
3. Гусева М.Р., Бадинова Н.С., Бесланеева М.Б., Горбунова Е.Д., Кузнецова Ю.Д., Кан И.Г. Научно-практический анализ травм глаз у детей по данным глазного стационара Морозовской детской клинической городской больницы // Российская педиатрическая офтальмология. – 2008. - № 2. – С. 6 - 10.
4. Джамбинова Н.С., Гусева М.Р., Ганковская Л.В., Маклакова И.А., Федоров А.А., Раднаева Д.Ц. Цитокиноterapia «Суперлимфом» и кератопротекция «Апликоллом» в улучшении регенерации роговицы при травматическом кератите (экспериментальное исследование) // Российская педиатрическая офтальмология. – 2008. № 3. – С. 42 – 44.
5. Джамбинова Н.С., Гусева М.Р., Ганковская Л.В., Маклакова И.А., Федоров А.А., Раднаева Д.Ц. Влияние цитокинотерапии «Суперлимфом» и кератопротекции «Апликоллом» на регенерацию травматического дефекта роговицы // Юбилейной конференции Поражения органа зрения. Санкт -Петербург. – 2008. – С.59
6. Джамбинова Н.С. Регенеративные подходы к лечению травм и воспалительной патологии роговицы (экспериментально-клиническое исследование) // V международной научно-практической конференции

«Пролиферативный синдром в офтальмологии». Москва. – 2008. – С. - 74 – 75.

7. Джамбинова Н.С., Гусева М.Р., Сидоренко Е.И., Ганковская Л.В., Ковальчук Л.В., Федоров А.А., Кузнецова Ю.Д., Горбунова Е.Д. Цитокиноterapia в регуляции репаративных процессов роговицы (экспериментально-клиническое исследование) // Вестник офтальмологии. – Т.125. - №6. – 2009.- С. – 18 – 21.

В 2007 году фамилия автора была изменена с Бадиновой Н.С. на Джамбинову Н.С.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акчурина Г.З., Гусева М.Р., Лисицына Л.И., Лобань И.Г., Толоконникова Р.М., Панфилова Л.И. Тупые травмы глаз у детей. Возрастные особенности органа зрения в норме и патологии у детей. – Москва, 1981. – С. 72 – 77.
2. Абаева М.Р. Профилактика рецидивов офтальмогерпеса переднего отдела глаза амиксином в комбинации с противогерпетической вакциной. Автореф. дис. канд. мед. наук. – М., 1994. – С. 23.
3. Аветисов Э.С., Ковалевский Е.И., Хватова А.В. Руководство по детской офтальмологии. – М.: Медицина, 1987. – С. 496.
4. Аветисов С.Э., Каспаров А.А., Каспарова Евг.А., Павлюк А.С., Фадеева Л.Л., Скрипкин К.М. Лечение вирусных заболеваний переднего отрезка глаза. Пособие для врачей. - М., 2005. – С. 20.
5. Адо М.С. Травматические кератиты: особенности клинических вариантов и течения, комплексное лечение. Автореф. дис. канд. мед. наук. – М., 1994. – С. 19.
6. Акберова С.И., Леонтьева Н.А., Строева О.Г., Галегов Г.А. Парааминобензойная кислота в лечении экспериментального кератита, вызванного вирусом простого герпеса у кроликов: терапевтический эффект и снижение инфекционного титра // Вестник офтальмологии – 1996. - № 4. С – 23 – 26.
7. Акберова С.И. Лечение герпетических кератитов // Рефракционная хирургия и офтальмология. – 2003. – Том 3 (№ 2). С. – 60 - 62.
8. Баринский И.Ф., Шубладзе А.К., Каспаров А.А., Гребенюк В.Н. Герпес (этиология, диагностика, лечение). – М.: Медицина. – 1986. – С. - 269.
9. Баринский И.Ф., Сидорович И.Г., Лазаренко А.А., Платонова А.Л. Способность полиоксидония повышать иммуногенность герпесвирусных вакцин // Иммунология. – 2001. - № 2. – С. – 17 – 20.
10. Батенева Е.И., Трофимов Д.Ю., Хайтов Р.М., Шульженко А.Е., Алексеев Л.П. Использование количественной полимеразной реакции для оценки

- цитокинового профиля человека // Иммунология. – 2006. - № 1. – С. – 9 – 12.
11. Боброва Н.Ф. Травмы глаза у детей. - М.: «Медицина», 2003. – С. - 192.
12. Большунов А.В. Лечение герпетического кератита лазером (экспериментально-клиническое исследование) // Автореф. дисс. канд. мед. наук. – М., 1976. – С. - 22.
13. Большунов А.В. Лечение герпетического кератита лазером. М., 1983. – С. 15–20.
14. Бржевийский В.В., Сомов Е.Е. Синдром «сухого глаза». – Спб.: Аполлон, 1998 – С. - 96.
15. Будихина А.С., Пинегин Б.В. α -Дефенсины – антимикробные пептиды нейтрофилов: свойства и функции // Иммунология. – 2008. - № 5. – С. – 317 – 320.
16. Валькова И.В. Тупая травма глаза. Рига, 1988. – С. - 93.
17. Винькова Г. А. К вопросу комплексного лечения рецидивирующих форм герпетических кератитов // Офтальмол. журн. – 1989. - №4. - С. 221-224.
18. Гайдамака Т.Б. Послойная и сквозная кератопластика при экспериментальном герпетическом кератите // Офтальмологический журнал. – 2003. - № 5. - С. – 53 – 58.
19. Ганковская Л. В., Иммуноцитокнины. регуляция функций макрофагов локальная иммунокоррекция // Автореф. дис. канд. мед. наук. – М., 1976. С. – 22.
20. Ганковская Л. В., Ковальчук Л.В., Радыгина Т.В., Константинова Н.А., Хорошилова-Маслова И.П. и др. Регуляция цитокинами постожоговой регенерации роговицы в эксперименте // Бюлл. Эксперимент. Биологии и медицины. – 2000. – Т. 127. № 3. С. 314 – 316.
21. Ганковская О.А., Бахарева И.В., Ганковская Л.В., Сомова О.Ю., Зверев В.В., Исследование экспрессии генов TLR9, МР-кВ, ФНО α в клетках слизистой цервикального канала беременных с герпесвирусной инфекцией // ЖМЭИ - 2009. - №2. - С. - 61 – 64.

22. Гетман Ю.В. Эффективность применения негемоглобинового переносчика кислорода (перфторан) в лечении посттравматических поражений роговицы // Офтальмологический журнал. – 2004. № 4. – С. – 49 - 52.
23. Горностаева Ю.А. Иммуномоделирующая терапия в клинической практике // Consilium medicum.- 2008. – том 10. - № 10. – С. 18.
24. Гундорова Р. А. Механизм регуляции заживления проникающих ранений роговицы с помощью естественного комплекса цитокинов // Вестн. офтальмологии. – 1995. - Т.111. №4. - С. - 14-19.
25. Гундорова Р.А. Макаров П.В., Слепова О.С., Бордюгова Г.Г., Ганковская Л.В. Ковальчук Л.В., Быковская Г.Н., Гаврилова Я.А. Клинико-иммунологические критерии активности воспалительной реакции и аутолимфокиноterapia при проникающих ранениях глаза // Вестник офтальмологии – 1996. №3. С – 19-21.
26. Гундорова Р.А., Чеснокова Н.Б., Шехтер А.Б., Пекшев А.В., Кваша О.И., Давыдова Н.Г., Безнос О.В., Косакян С.М., Горбачева О.А. Возможности использования оксида азота в газовом потоке для лечения травматических повреждений роговицы (экспериментальное исследование) // Рефракционная хирургия и офтальмология. – 2002. –Т. 2.- №. 1. –С. 59-62.
27. Гундорова Р.А. Повреждения органа зрения. Вопросы, требующие дальнейших разработок. // Вест. офтальмол. – 2006. - Т. 122. - № 1 - С. 24-26.
28. Гундорова Р.А., Нероев В.В., Кашников В.В. Травмы глаза М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 560 с.
29. Гусева М.Р. Диагностика и патогенетическая терапия увеитов у детей: Дис. док. мед. наук. – М., 1996. – С. 63.
30. Гусева М.Р. Некоторые детские инфекции и глаз. В книге Болезни глаз при общих заболеваниях у детей - под редакцией Ковалевского Е.И. – М., 2003. – С. 202-220.

31. Гусева М.Р., Чиненов И.М., Ширшов М.В., Горбунова Е.Д., Павлюк А.Ю. Применение антиоксидантного препарата Гистохром в комплексном лечении внутриглазных кровоизлияний у детей разного возраста // Вестник офтальмологии. – 2005. - Том 121. - №2. – С. 24 – 28.
32. Дадамухамедова Ш.М. Анализ травм органа зрения у детей // VIII съезд офтальмологов России. Тезисы докладов Москва, 2005. - С.351.
33. Даутова З.А., Вавилова О.В. Азидарег при травмах роговицы // VII съезд офтальмологов России: Тезисы докладов. – М., 2000. - Часть 2. - С.72.
34. Еричев В.П., Ганковская Л. В., Образцова Е.Н., Василенкова Л.В. Аутолимфокиноterapia как профилактика избыточного рубцевания при антиглаукоматозных операциях. Глаукома. Сб. науч. Тр. М., 1996, вып. 2, С. 156 – 158.
35. Зайцева Н.С., Кацнельсон Я.И. Увеиты. – М. – Медицина. – 1984. – 320 с.
36. Зеленская М.В., Черкашина М.Г. Осложнения при контактной коррекции зрения и их профилактика // Актуальные вопросы контактной коррекции зрения. – М., 1989. – С. – 64 – 66.
37. Иванова Д.Ф., Кучкова Л.И., Кабаков В.А., Сидоренко М.Р., Корниенко С.В. К вопросу о терапии повреждений и заболеваний роговицы в детской офтальмологической практике. – Москва. – 1976. Тезисы докладов первой всесоюзной конференции по вопросам детской офтальмологии. Часть II. - С. - 385 – 386.
38. Каспаров А. А., Зейтленок Н.А., Вильнер Л.М., Фадеева Л.Л. и др. Экспериментальное обоснование лечебно- профилактического применения индукторов интерферона при вирусных заболеваниях // Офтальмологический журнал. – 1972. - № 1. – С. 49 – 55.
39. Каспаров А.А. // Офтальмогерпес. – М., 1994 – С.224.
40. Каспаров А.А., Труфанов С.В. Использование консервированной амниотической мембраны для реконструкции поверхности переднего отрезка глаза // Вестн. Офтальмол. – 2003. - № 3. – С. 45 - 47.

41. Каспаров А.А. Лечение герпетического кератита. Вчера, сегодня, завтра // Рефракционная хирургия и офтальмология. – 2005. - № 4. – 31-37.
42. Каспаров А. А. Лечение важнейших заболеваний роговицы // VIII съезд офтальмологов России. Тезисы докладов Москва, 2005. - С. 450-451.
43. Каспарова Евг. А., Каспаров А. А., Павлюк А.С. , Куренков В.В., Полунин Г.С., Митягина О.Н. Полудан как основа экспресс-аутоцитокинотерапии различных заболеваний роговицы // Тезисы VI Всероссийского конгресса «Человек и лекарство» М., 1999, апрель, с.299.
44. Каспарова Евг. А. Локальная экспресс-аутоцитокинотерапия в лечении заболеваний переднего отрезка глаза // Автореф. дис. канд. мед. наук. – М., 2001. – 27 с.
45. Каспарова Евг. А. О применении цитокинов и их комплексов в офтальмологии // Вестник офтальмологии – 2002. - №4. С – 47 – 49
46. Кетлинская О. С. Провоспалительные цитокины в патогенезе офтальмогерпеса // Автореф. дисс. канд. мед. наук. – М., - 1995.
47. Кетлинский С.А., Калинина Н.М. Иммунология для врача. – СПб., 1998.
48. Ковальчук Л.В., Боярт Б., Ганковская Л.В. Лимфокинотерапия раневого процесса в эксперименте // Бюлл. эксп. биологии и медицины. – 1989. №9. – С. 340 – 342.
49. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Крайнова Т.А., Егорова Э.В., Власова Т.И., Ионин И.Э. Аутолимфотерапия в стимуляции репаративных процессов тканей глаза // Вест. офтальмол. – 1993. - Т. 109. - № 3. – С. 8-9.
50. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Крайнова Т.П., Матаипова А.К., Манько В.М., Хорошилова- Маслова И.П. Естественный комплекс цитокинов в лечении проникающих ранений роговицы глаза кролика в эксперименте // Бюл. экспер. биол. – 1993. - №3. – С. 284-286.
51. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Рубакова Э.И. Система цитокинов. – М.: РГМУ, 2000. - 64 с.

52. Ковальчук Л. В., Ганковская Л. В. Природный комплекс Суперлимф в топической иммунокоррекции // Аллергия, астма и клиническая иммунология. — 2000. — Том 4, N 7. — С. 25-27.
53. Ковальчук Л. В., Ганковская Л. В., Левченкова В.А. Иммунокоррекция цитокинами // Вестник РГМУ. - 2002 Том 3 (№ 24). — С. 6 - 11.
54. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Долгина Е.Н., Еричев В.П., Хорошилова-Маслова И.П., Василенкова Л.В., Курышева Н.И. Клинико-иммунологический анализ эффективности нового иммуномодулятора Суперлимф при различных заболеваниях органа зрения. Часть I. Применение препарата Суперлимф при хирургическом лечении глаукомы // Рефракционная хирургия и офтальмология. – 2003. – том 3 (№ 2), С. - 29 - 36.
55. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Долгина Е.Н., Гундорова Р.А., Хорошилова-Маслова И.П., Слепова О.С., Макаров П.В., Варданян И.Р., Юдина С.М., Баранов В.П., Яковлева А.В. Клинико-иммунологический анализ эффективности нового иммуномодулятора Суперлимф при различных заболеваниях органа зрения. Часть II // Рефракционная хирургия и офтальмология. – 2003. – том 3 (№ 3), С – 41-48.
56. Ковальчук Л.В., Хорева М.В., Варивода А.С. Врожденные компоненты иммунитета: Toll-подобные рецепторы в норме и иммунопатологии. ЖМЭИ. – 2005. - №4. – 96-104.
57. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Аведова Т.А., Брико Н.И., Есшина А.С., Дмитриева Н.Ф. Бактерицидное действие *in vitro* комплекса естественных цитокинов *Streptococcus pyogenes* // ЖМЭИ – 2006.- №3. – С. – 67-71.
58. Ковальчук Л.В., Хорева М.В., Варивода А.С., Пащенко О.Е., Грачева Л.А., Быкова Л.П., Бологов А.А. Влияние лигандов Toll-подобных рецепторов на выработку *in vitro* противовоспалительных цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови здоровых людей и больных с общей вариабельной иммунологической недостаточностью // ЖМЭИ – 2007. - №1. – С. – 38 - 42.

59. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Мартиросова Н.И., Василенкова Л.В., Соколова Е.В., Левченко В.А. Подходы к иммунокорректирующей терапии в офтальмологии с позиции новых представлений о врожденном иммунитете. Обзор // Рефракционная хирургия и офтальмология – 2008. - №1. – С. 44 - 48.
60. Ковальчук Л. В., Мартиросова Н. И., Соколова Е. В., Левченко В. А. Основные направления иммунотерапии в офтальмологии. Обзор // Рефракционная хирургия и офтальмология. — 2008. — Том 8, N 2 . — С. 45 - 50.
61. Ковальчук Л. В., Хорева М. В., Варивода А. С. и др. Рецепторы врожденного иммунитета: подходы к количественной и функциональной оценке toll-подобных рецепторов человека // Иммунология. — 2008. — Том 29, N 4 . — С. 223-227.
62. Ковалевский Е. И. Принципы, методы, результаты и пути дальнейшего совершенствования лечения и профилактики повреждений у детей.
63. Ковалевский Е. И. Болезни глаз при общих заболеваниях у детей. – 2-е изд., перераб. И доп. – М.: Медицина, 2003. – 288 с.
64. Козлов В.А., Громыкина Н.Ю. Интерлейкин-1: роль в иммунитете // Иммунология. 1987. - №4. – С. 24 – 30.
65. Козлова Т.В. Экспериментально-клиническое обоснование применения коллагеновых покрытий для роговицы в офтальмологии: Автореф. дис. канд. мед. наук. - М., - 1990.
66. Кокряков В. Н. Очерки о врожденном иммунитете. СПб. «Наука», 2006, с. 261.
67. Кокряков В. Н., Ковальчук Л. В., Алешина Г. М., Шамова О. В. Катионные противомикробные пептиды как молекулярные факторы иммунитета: мультифункциональность // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии . — 2006. — N 2 . — С. 98-105.
68. Копоненко Л.А., Майчук Ю.Ф. Эффективность колбиоцина в виде глазной мази и капель в лечении бактериальных кератитов и язв роговицы

- // Рефракционная хирургия и офтальмология. – 2004. –Т. 4.- №. 3. –С. 39-42.
69. Копаева В.Г. Глазные болезни. – М.: Медицина, 2002. – 560с.
70. Косакян С.М. Влияние оксида азота в газовом потоке на заживление эрозий и проникающих ран роговицы (экспериментальное исследование) // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2002. - 25с.
71. Костюкова Н.Ю. Клинико-морфологические параллели при лечении поражений роговицы фармацевтической композицией в эксперименте // Российская педиатрическая офтальмология. – 2008. - № 1. – С. – 53 – 54.
72. Кочергин С.А. Бытовые травмы органа зрения // Медицинский вестник. – 2006. - № 20-21. – С. 363 – 364.
73. Крайнова Т.А., Ганковская Л.В., Балашова Л.М. Лимфокинотерапия проникающих ранений роговицы // Тезисы докладов 1 Съезда иммунологов России, Новосибирск. -1992. С.- 249.
74. Крайнова Т.А. Регуляция раневого процесса в роговице естественным комплексом цитокинов: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - М., - 1994. С.26
75. Краснов М.М., Каспаров А.А., Оганесян В.А. Применение мягких контактных линз при различных заболеваниях роговицы // Вестник офтальмологии. – 1975. №6. – С. 39 – 41.
76. Краснов М.М., Каспаров А.А., Юдина Ю.В. Опыт применения солкосерила в лечении офтальмологических заболеваний роговицы // Вестник офтальмологии. – 1982. №4. – С. 64 – 67.
77. Краснов М.М., Каспаров А.А., Воробьева О.К., Ульянова Т.Ю., Фадеева Л.Л. Полудан в лечении вирусных заболеваний глаза. Методические рекомендации. Вестник офтальмологии. – 1997. – Том 113 (№ 5). – С. 35 – 39.
78. Кремкова Е.В. Лазерное лечение травматических кератитов и их осложнений // Современные лазерные технологии в диагностике и

лечении повреждений органа зрения и их последствий: науч.-практич. Конф. – М., 1999. С. 14 – 15.

79. Кричевская Г.И., Каспаров А. А. Материалы изучения явной и скрытой инфекции при различных клинических формах герпетической болезни глаз. – Материалы докладов конференции офтальмологов. – Уфа, 1972. – С. 52-54.
80. Кричевская Г.И., Анжелов В.О., Катаргина Л.А., Старикова А.В., Денисова Е.В., Звонарев А.Ю., Кулякина М.Н., Цуцкиридзе Н.Г. Реактивация персистентных герпесвирусных инфекций как фактор патогенеза эндогенных увеитов у детей // Вестник офтальмологии – 2005. №2. - С – 22 – 24.
81. Куничева Г.С., Каспаров А. А., Зейтленок Н.А., Вильнер Л.М. Клинический опыт применения интерферогена при лечении аденовирусных и герпетических поражений глаз // Вестник офтальмологии – 1996. - №6. - С – 17 – 20.
82. Курешева Н.И., Ганковская Л. В., Ковальчук Л. В., Шилкин Г.А. и др. Применение комплекса цитокинов для предупреждения избыточного рубцевания при антиглаукоматозных операциях непроникающего типа // Офтальмохирургия. – 2001. - № 3. – С. – 30 – 37.
83. Лаврентьева А.М., Маевская Т.М. Значение кожных проб в диагностике и лечении герпетических кератитов // Вестник офтальмологии. – 1966. – Т.1. – С. 45 – 48.
84. Лаврентьева А.М. Кератиты у детей. – В кн.: Возрастные особенности органа зрения в норме и при патологии у детей. – М., 1968. Вып.1 – С. 38-40.
85. Либман Е.С., Шлимович Р.А., Белов Ю.А. Основные медико-социальные характеристики инвалидности вследствие тяжелых последствий травм органа зрения // Офтальмол. журн. – 1976. №5. – С. 331-334.
86. Либман Е.С., Бочарова И.В., Шахова Е.В., Шмакова О.В. и др. Первичная инвалидность вследствие повреждений

органа зрения в Российской Федерации // Неотложная помощь, реабилитация и лечение осложнений при травмах органа зрения и в чрезвычайных ситуациях: Материалы науч-практ. конф.- М., 2003. - С. 183 -186.

87. Либман Е.С., Шахова Е.В. Слепота и инвалидность по зрению в населении России // VIII съезд офтальмологов России. Тезисы докладов Москва, 2005. - С.78-79.
88. Майчук Ю.Ф. Вирусные заболевания глаз.- М., Медицина.- 1981. С. – 272.
89. Майчук Ю.Ф. Клиника, диагностика и лечение глубоких форм офтальмогерпеса. М– 1982. – С. 34
90. Майчук Ю.Ф. Тактивин в комплексном лечении герпес вирусной инфекции глаз. – М. – 1987. – С. – 14.
91. Майчук Ю. Ф., Казаченко М.А. Ацикловир и ацикловир в сочетании с интерфероном в лечении офтальмогерпеса // Офтальмол. журнал. - 1988. - №7. - С. 402-405.
92. Майчук Ю.Ф. Успехи и проблемы эпидемиологии и фармакотерапии воспалительных заболеваний глаз // 7-й съезд офтальмологов России. Тезисы докладов.- М., 2000.- С. 153-154.
93. Майчук Ю.Ф. Современные вопросы фармакотерапии инфекционных заболеваний глаз. // Актуальные вопросы офтальмологии. М., 2000. – Ч. 2. – С. 5-10.
94. Майчук, Ю.Ф. Терапевтические алгоритмы при инфекционных язвах роговицы // Вестн. офтальмологии. – 2000. – № 3. – С. 35-37.
95. Майчук Ю.Ф. Селективная противовирусная и иммуномодулирующая терапия при герпетических кератитах // Клинич. медицина. 2001. - Т.79. - №9. - С. - 70-71.
96. Майчук Ю.Ф. Селективные противовирусные средства зовиракс и валтрекс в лечении герпетического кератита. – М. -2001. – С. 12.

97. Майчук Ю.Ф. Фармакотерапия воспалительных заболеваний глаз: вчера, сегодня, завтра. Актуальные вопросы воспалительных заболеваний глаз. - М., 2005. - С. 7 - 17.
98. Майчук Д.Ю., Яни Е.В., Щипанова А.И., Майчук Ю. Ф. Офтальмоферон в противовоспалительной и симптоматической терапии вторичного сухого глаза // Рефракционная хирургия и офтальмология - 2005. - Том 5 (№2). - С. - 61 - 65.
99. Майчук Ю.Ф. Антиоксидантный препарат Гистохром в лечении дистрофических и воспалительных заболеваний роговицы // Рефракционная хирургия и офтальмология - 2005. - № 3. - С. - 48 - 52.
100. Майчук Ю.Ф., Щипанова А.И., Казаченко М.А., Яни Е.В., Гапонюк П.Я. Офтальмоферон как средство цитокиновой терапии вирусных заболеваний глаз // Материалы науч.-практич. конф. Офтальмоиммунология. Итоги и перспективы. - Москва. - 2007. - С. 185 - 188.
101. Майчук Ю.Ф. Лорткинанидзе М.М., Позднякова В.В., Поздняков В.И. Атопический кератоконъюнктивит. Тяжелые формы роговичной патологии и алгоритмы терапии // Рефракционная хирургия и офтальмология - 2007. - №7. - С. - 53-57.
102. Майчук Ю.Ф. Оптимизация фармакотерапии воспалительных болезней глазной поверхности. // Российский офтальмологический журнал. - 2008. № 3. С. - 18 - 25.
103. Макаров П.В. Метод локальной иммунокоррекции - аутолимфокинотерапия в комплексном лечении больных с проникающими ранениями глаза. Автореф. канд. дис. М., 1995.
104. Монастырский И.Я., Чередниченко Л.П. Способ лечения травматических, бактериальных кератитов // VII съезд офтальмологов России: Тезисы докладов. - М., 2000. - Часть 2. - С. 33-34.

105. Матаипова А. К. Естественный комплекс цитокинов в лечении проникающих ранений роговицы глаза кролика в эксперименте // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1993. - Т.115. №3. С. - 284-287.
106. Морозов В.Я., Яковлев А.А. Фармакотерапия глазных болезней. - М.: Медицина, 2001. – С. - 468.
107. Мошетьова Л.К. Контузии глаза. М.: ЦОЛИВУР, 1985. -22с.
108. Мошетьова Л.К. Механические травмы глаза (клинико-морфологическое исследование) // Автореф. дис. ... доктор. мед. наук. – М., 1993. – С. - 48.
109. Мошетьова Л.К., Бенделик Е.К., Алексеев И.Б. и др. Контузии глаза, клиническая характеристика и исходы // Вестник офтальмологии. – 1999. – №3. – С. 10 – 13.
110. Мошетьова Л.К., Кочергин С.А., Крюкова Е.А. Основные направления совершенствования системы оказания неотложной офтальмологической помощи пострадавшим в чрезвычайных ситуациях в мегаполисе // Российская педиатрическая офтальмология. – 2008.- №4. С. 8 – 10.
111. Насибуллина Г. Х. Применение препаратов интерферона и его индукторов для лечения офтальмогерпеса // Современные аспекты клинической офтальмологии. – 1992. - С. – 41 - 44.
112. Нахабина Т.П., Новин А.Я. Фонофорез коллализина в лечении больных с помутнениями роговицы // VIII съезд офтальмологов УССР: Тезисы докладов. – Одесса, 1990. – С. - 316 - 317.
113. Неделька А.Ф. Применение ультразвука и глазных лекарственных пленок в лечении травматических повреждений роговой оболочки // Офтальмол. журн. – 1985. - № 1. – С. 42-45.
114. Неделька А.Ф. Новое лекарственное средство – глазные пленки с апилаком // VIII съезд офтальмологов УССР: Тезисы докладов. – Одесса, 1990. – С. 317-318.
115. Нероев В.В. Разработка системы диагностики и хирургического лечения больных с внутриглазными инородными телами: Дис. канд. мед.

- наук. – М.- 1998.-371с.зВ. Ликвидация устранимой слепоты: Всемирная инициатива ВОЗ. Ликвидация детской слепоты: Материалы II Российского межрегионального симпозиума. – М., 2004. – С. 39 – 49.
116. Обухова О.О., Трунов А.Н., Трунова Л. А., Шваюк А.П., Горбенко О.М. Баланс цитокинов у пациентов с обострением хронической герпетической инфекции в динамике иммунокорректирующей терапии // Иммунология. – 2007. № 6. С. - 335 – 338.
117. Овчарова Н.Г. Применение покрытия «Цитокол» в лечении комбинированных ожогов глаз // Автореф. канд. дис. – 2000. – С. –
118. Паршина О. В. Влияние актипола на уровень интерферона в слезной жидкости. (Клинико-лабораторные исследования) // Вестн. офтальмологии. – 2001. - Т.117. - №6. - С. - 33-35.
119. Пащенко М.В., Пинегин Б.В. Физиология клеток врожденной иммунной системы: дендритные клетки // Иммунология. – 2006. - № 6. С. – 368 - 378.
120. Паучков В.С., Кауфман О.Я. Взаимоотношения «местного» и «общего» в воспалении // Архив патологии. – 1998. - №7. – С. 7 – 16.
121. Пинегин Б.В., Андропова Т.М., Хаитов Р.М. Все, что известно на сегодня о цитокинах // Практикующий врач. – 1996. - №3. – С. 13 – 16.
122. Пчеленок С.В. Шейная лимфоаденопатия при хроническом тонзиллите и гипертрофии аденоидных вегетаций у детей. Локальная цитокиноterapia // Автореф. канд. дис. М., 2007.
123. Пятницына В.В., Должич Р.Р. Оценка эффективности нового способа лечения рецидивирующих эрозий роговицы // VIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Федоровские чтения» - 2009. – Сб. тезисов. – С. 100 – 101.
124. Радыгина Т. В., Цитокиноterapia, роль естественного комплекса цитокинов в постожоговой регенерации роговицы // Автореф. канд. дис. М., 1999.

125. Сапоровский С.С. Коллагенопластика и коллагенотерапия травматических кератитов // Клиника, диагностика и лечение проникающих и осколочных ранений глаза осложненных инфекцией : Материалы научно – практической конференции. – М., 1994. – С. 37 – 39.
126. Саркович В.Н. Применение субалина в лечении герпетических кератитов // Офтальмологический журнал. – 2003. - № 4. - С. – 47 – 50.
127. Сидоренко Е.И., Волгин Н.И. Влияние инфразвука на функции организма человека и животных при его локальном воздействии на глаз // Физиология и патология внутриглазного давления: Республиканский сборник научных трудов. – М., 1985. – С. 156-159.
128. Сидоренко Е.И., Филатов В.В., Алимова Ю.М., Макаров И.А., Полуниин Г.С. Лечение посттравматических помутнений роговицы инфразвуком // Актуальные вопросы офтальмологии. Материалы юбилейной Всеросс. науч.-практич. конф. к 100-летию Гельмгольца Ч. 1. - Москва, 2000. - С. 87-88.
129. Сидоренко Е.И. Доклад по охране зрения детей. Проблемы и перспективы детской офтальмологии. // Вест. офтальмол. – 2006. - Т. 122. - № 1 - С. 41-43.
130. Симбирцев А.С. Интерлейкин-8 и другие хемокины // Иммунология. – 1999. - №4. – С. 9 - 14.
131. Симбирцев А.С. Клиническое применение препаратов цитокинов // Иммунология. – 2004. № 4. – С. 247 - 251.
132. Симбирцев А.С. Толл-белки: специфические рецепторы неспецифического иммунитета // Иммунология. – 2005. № 6. – С. 368-377.
133. Сомов Е.Е. Герпетические и эпидемические вирусные кератоконъюнктивиты. - С. - Петербург.- 1996. – С. - 48.
134. Сидиков З. У. Наш опыт лечения герпетических кератитов // Актуальные вопросы офтальмологии. - 1991 С.- 62-65.
135. Слепова О.С., Герасименко В.А., Макаров П.В. Сравнительное исследование роли цитокинов при разных формах глазных

- заболеваний // Вестник офтальмологии – 1998. №3. С – 28-32.
136. Слепова О.С. Практическое значение исследования цитокинов при разных формах глазных заболеваний глаз // Тез. Докл. Ч.2 VII Съезда офтальмологов России. – 2000. – С. – 159 – 160.
137. Слепова О.С., Садрисламова Л.Ф., Гундорова Р.А. и др. Обоснование и подходы к применению иммунокорректирующих средств при контузионных травмах глаза // Вестник офтальмологии. – 2000. – №2. – С.- 27 – 31.
138. Слепова О.С. Патогенетическая роль цитокинов при различных заболеваниях глаз как основа для прогнозирования и выбора тактики иммунокорректирующего лечения // Российский офтальмологический журнал. – 2008. № 3. С. – 36 – 42.
139. Сурков В.К., Гищева З.А., Талипова П.Р. Экспериментально-клиническое исследование эффективности керакола при лечении ожогов и механических травм роговой оболочки // Вест. офтальмол. – 1994. - Т. 110. - № 3 - С. 5-7.
140. Сусайлова М.С., Вериго Е.Н., Иванов А.Н., Кваша О.И. Неотложная помощь при микротравмах роговой оболочки // Рефракционная хирургия и офтальмология. – 2004. –Т. 4.- №. 3. –С. 35-38.
141. Тазулахова Э. Б. Динамика интерферонового статуса у больных с герпетическими кератитами при лечении новым индуктором интерферона актиполом // Вестн. офтальмологии. - 2001 - Т.117. - №1. – С. - 33 - 36.
142. Тарасова Л.Н., Шаимова В.А., Симбирцев А.С. Роль противовоспалительных цитокинов в развитии бактериальных кератитов // Вестник офтальмологии – 2004. - №6. С. – 16 – 18.
143. Теплинская Л.Е., Филичкина Н.С., Матевосова К.С. Эффективность лечения увеитов препаратом Суперлимф // Вестник офтальмологии – 2005. №4. С – 22 – 26.
144. Терехина Н.А., Петрович Ю.А., Гольдфельд Н.Г. // Офтальмол. журнал – 1989 - №3. С –184 - 187.

145. Терехина Н.А., Реук С.Э., Петрович Ю.А. Использование ферментного анализа слезной жидкости для прогнозирования рецидивов герпетического кератита у детей // Вестник офтальмологии – 2007.- №4. С – 23 – 24.
146. Тимофеева А.В., Скрыпина Н.А., Савочкина Л.П., Бибилашвили Р.Ш. Оценка экспрессии генов рецепторов к цитокинам в тканях человека с помощью полимеразной цепной реакции // Иммунология. – 2000ю - № 2. С. – 8 – 10.
147. Филатов В.В. Инфразвуковой фонофорез в лечении бактериальных кератитов и язв роговицы // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 1995. – С. - 20.
148. Хватова А.В. Профилактика, клиника и лечение травм глаза у детей: Автореф. дис. док. мед. наук. – М., 1967.
149. Хватова А.В. Профилактика слепоты и слабосидения у детей: Материалы Всероссийской научно-практической конф. Детских офтальмологов. – М., 1996. С. 3 – 12.
150. Хватова А.В., Арестова Н.Н., Кравцов К.Г. Современные тенденции изменения нозологической структуры слепоты и слабосидения у детей – инвалидов по зрению с детства // Российская педиатрическая офтальмология. – 2008. - №1. С. 13 – 16.
151. Хорошилова-Маслова И. П. Изучение репаративных свойств реальдирона при травме роговицы. Тезисы докладов научно-практической конференции "Диагностика и микрохирургия осколочных ранений глаза сегодня и завтра". – 1991. - С. – 81 - 82.
152. Хорошилова-Маслова И.П., Ганковская Л.В., Илатовская, Чавла Р., Родыгина Т.В., Бахтулова М.Е. Естественный комплекс цитокинов как лекарственный биорегулятор при заживлении щелочных ожогов роговицы экспериментально-морфологическое исследование // Вестник офтальмологии – 1998. №1. С. – 41 – 46.

153. Хорошилова-Маслова И.П., Ганковская Л.В., Андреева Е.Д., Еричев В.П., Василенкова Л.В., Илатовская Л.В. Ингибирующее влияние комплекса цитокинов на заживление ран после глаукомофильтрирующей операции в эксперименте // Вестник офтальмологии – 2000. - №1. - С. – 5 - 8.
154. Черешнева М.В., Шилов Ю.И., Гаврилова Т.В., Гейн О.Н., Гейн С.В., Черешнев В.А. Иммунокоррекция травматических и стрессорных нарушений функции иммунной системы при проникающем ранении глаза. – 2006. - № 2. – С. – 42 - 46.
155. Шабашова Н.В. Лекции по клинической иммунологии. СПб.: Фолиант. 2002. - 123с.
156. Шаимова В.А. Защитные факторы слезной жидкости и сыворотки при воспалительных заболеваниях глаз (Обзор литературы) // Офтальмохирургия и терапия. – 2004. – Том 4. - № 2. – С. – 13 – 15.
157. Шаимова В.А. Роль противоспалительных цитокинов при заболеваниях глаз (Обзор литературы) // Офтальмохирургия и терапия. – 2004. – Том 4. - № 3. – С. – 30 - 32.
158. Шевчук Н. Е. Продукция цитокинов при герпетических и хламидийных заболеваниях глаз // Новые технологии в офтальмологии. – 2000. - С. 252-256.
159. Шичкин В.П. Патогенетическое значение цитокинов и перспективы цитокиновой / антицитокиновой терапии // Иммунология. – 1998. – №2. – С. – 9 – 12.
160. Шишкин М.К., Исаков В.А., Ермоленко Д.К. и др. Герпесвирусные инфекции. / В кн.: Избранные вопросы терапии инфекционных больных. Руководство для врачей под ред.Ю.В.Лобзина. СПб. Фолиант. 2005.- С.636-664.
161. Шубич М.Г., Авдеева М.Г. Медиаторные аспекты воспалительного процесса // Архив патологии. – 1992. Т.59. – С. 3 - 8.
162. Шубладзе А.К., Маевская Т.М. Герпес. – Медицина, 1971.

163. Шульпина Н.Б. Биомикроскопия глаза. М.: Медицина, 1974. – 263с.
164. Щипанова А. И. Противовирусный препарат локферон в лечении герпетических кератитов и аденовирусных конъюнктивитов // Рус. офтальмол. журн. – 2001. - №1. - С. - 41-43
165. Яковлева А.В., Юдина С.М., Баранов В.И. Эффективность локальной иммунотерапии при патологии глаза // Медицинская иммунология - С.-Пб. - 1999. Т.1. - №3-4. С. – 140-141.
166. Яковлева А. В. Клинико-иммунологическая эффективность локальной цитокинолтерапии при офтальмогерпесе // Междунар. журн. иммунореабилитации. – 2000. - Т.2. - №1. - С. 74-80.
167. Яковлева А. В. Эффективность локальной цитокинолтерапии при некоторых видах глазной патологии. Автореф. канд. дис. Курск, 2000.
168. Abuja P.M., Zenz A., Trabi M. The cyclic antimicrobial peptide RTD1 induces stabilized lipide-peptide domains more efficiently than its open-chain analogue // FEBS Lett. 2004. Vol. 566. – P. 301 – 306.
169. Akira S., Sato S. // Scand J. Infect. Dis. 2003. V.35. №9. P.555-562.
170. Akira S., Takeda K. Toll- like receptor signaling // Nat. Rev. Immunol. – 2004/ - Vol. 4. – P. 499- 511.
171. Ayabe T. et al. Secretion of microbial defensins by interstitial Paneth cells in response to bacteria // Nat. Immunol. – 2000. Vol. 1. P. 113 – 118.
172. Bayry J., Lacroix – Desmazes S., Kazatchkine M.D. et al. // Blood. – 2004. Vol. 104, N 8 – P.2441-2443.
173. Bellou A., Schaub&NBSP;B., Ting L., Finn P.W. // Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2003. V.3. №6. P.487-499.
174. Boasen J., Chisholrn D., Lebet L. et al. // J. Allergy and Clin. Immunol. 2005. V.116. P.185-195.
175. Boyd J.H., Mathur S., Wang Y. et al. // Cardiovasc. Res. – 2006. – Vol. 72. N 3. – P. 384-393.

176. Bourcier T. et al. Bacterial keratitis: predisposing factors: clinical and microbiological review of 300 cases // *Br. J. Ophthalmol.* – 2003. – Vol. 87, № 7. – P. 834-838.
177. Brown D. Ocular herpes simplex // *Invest. Ophthalmol.* – 1971. – Vol. 10. P. 210 - 215.
178. Chung J.H., Kang Y.G., Kim H.J. Effect of 0.1% dexamethasone on epithelial healing corneal alkali wounds: morphological changes during the repair process // *Graetes Arch Chn Exp Ophthalmol.* 1998. T. 236. N 7. P. 537-545.
179. Cunningham-Rundles Ch., Radigan L. // *Clin. Immunol.* – 2005. Vol. 115, N 2. – P. 147 – 153.
180. Cunningham-Rundles Ch., Radigan L., A.K. et ai. // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 13, N 1. – P. 68 – 76.
181. Di Iorio E, Barbaro V, Ruzza A, Ponzin D, Pellegrini G, De Luca M. Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jul 5;102(27):9523-8. Epub 2005. - Jun 27.
182. Ebihara N., Chen I., Tokura T., Ushio H., Iwatsu M., Marakami A. Distinct functions between toll-like receptors 3 and 9 in retinal pigment epithelial cells // *Ophthalmic. Res.* – 2007. – Vol. 39. – N 3. – P. 155 – 163.
183. Ferwerda G, Meyer-Wentrup F, Kullberg BJ, Netea MG, Adema GJ. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages // *Cell Microbiol* 2008. – Vol. 10. – P. 2058-2066.
184. Fitzsimmons T.D. et al. Endogenous hyaluronan in corneal disease // *Invest-Ophthalmol. – Vis.-Sci.* 1994.- N. 35(6).- P. 2774-82.
185. Friedman H.M., Wang L., Fishman N.O. et al. Immune evasion properties of herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC // *J. Virol.* 1996. – Vol.70. – P. 4253-4260.

186. Froy O. Regulation of mammalian defensin expression by Toll-like receptor-dependent and independent signalling pathways // *Cell Microbiol.* - 2005. – Vol. 7. – P. 1387-1397.
187. Gabay J.E., Almeida R.I. Defensins: microbicidal and cytotoxic peptides of mammalian host defense cells. // *Med. Microbiol.* – 1992. – Vol. 181. – P. 99 – 105.
188. Ganz T., Oren A., Lehner R.I. Defensins: microbicidal and cytotoxic peptides of mammalian host defens cells // *Med. Microbiol.*, 1992; Vol.181. – P.99-105.
189. Ganz T, Weiss J. Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia // *Semin Hematol.* - 1997. - Vol. 34. - P. 343-354
190. Gard P., Sharma S., Rao G.N. // *Ophthalmology.* – 1999. - Vol. 106, № 7. - P. 1319-1320.
191. Gilad E, Bahar I, Rotberg B, Weinberger D. Therapeutic contact lens as the primary treatment for traumatic corneal erosions // *Isr Med Assoc J.* 2004. - Jan; 6(1): 28-9.
192. Hanada K., Shimazaki J., Shimmura S., Tsubota K. Multilayered amniotic membrane transplantation for severe ulceration of the cornea and sclera. // *Am. J. Ophthalmol.* – 2001. – Vol. 131(3). – P. 324 - 330.
193. Harter L., Mica L., Shocker R. et al. // *Shock.* – 2004. Vol. 22, N 5. – P. 403 – 409.
194. Heine H., Lien E. // *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2003. V.130. №3. P.180-191.
195. Hander J., Bartels J., Christophers E. Isolation and characterization of human β -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic // *J. Biol. Chem.* - 2001. – Vol. 276. – P. 5707 – 5713.
196. Hashimoto C., Hudson K.L., Anderson K.V. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. // *Cell.* 1988. – Vol.52. – P.269 – 279.

197. Hayashi K., Hooper I.C., Chin M.S., Nagineni C. N., Hooks J.J. Herpes simplex virus 1 (HSV-1) DNA and immune complex (HSV-1- human IgG) elicit vigorous interleukin 6 release from infected corneal cells via Toll-like receptors // *J. Gen. Virol.* – 2006. – Vol. – 87. – N 8. – P. 2161 – 2169.
198. Ito T., Amakawa R., Fukuhara S. Roles of toll-like receptors in natural interferon-producing cells as sensors in immune surveillance // *Hum. Immunol.* – 2002. Vol. 63. – P. 1120 – 1125.
199. Janeway C.A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology // *Quant. Biol.* 1989. V.54. P.1-13.
200. Jing Li, Michael Raghunath, Donald Tan, Ricky R. Lareu, ZhenCheng Chen, Roger W. Beuerman. Defensins HNP1 and HBD2 Stimulation of Wound-Associated Responses in Human Conjunctival Fibroblast // *Investigative Ophthalmology and Visual Science.* - 2006. - Vol. – 47. - P. - 3811-3819.
201. Kabelitz D, Schröder J. Mechanisms of epithelial defense. *Chem Immunol Allergy.* Basel, Karger, 2005. - Vol. 86. - P. 51.
202. Kaisho T, Akira S. Toll-like Receptor and RIG-1-like Receptor Signaling // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2008 – 1143 –P. 1–20.
203. Katz H.R. Ciprofloxacin monotherapy and bacterial keratitis (letter) // *Ophthalmology.* – 1999. - Vol. 106, № 10. - P. 1853-1854.
204. Kovalchuk L.V., Khoroshilova-Maslova I.P., Gankovskaya L.V., Krainova T.A., Gundorova R.A. Natural complex cytokines is a potent stimulant to posttraumatic regeneration of rabbit cornea // *Ocular pharmacology and therapeutics* – 1996 – Vol. 12 -№3 -p.271-281
205. Kawagoe, T., Sato, S., Matsushita, K., Kato, H., Matsui, K., Kumagai, Y., Saitoh, T., Kawai, T., Takeuchi, O. and Akira, S. Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat Immunol.*-2008. - №9. - p. 684-691.
206. Kijlstra A. The role of cytokines in ocular inflammation // *British Journal of Ophthalmology.* 1994. Vol. 78. P. 885—887.

207. Kim J.C., Tseng S.C.G. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas // *Cornea*. – 1995 – Vol. 14, P. 473-484.
208. Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez CN, Dale BA. Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue // *Infect Immun*. - 1998. - Vol.66. - P. 4222-4228.
209. Lemaitre B. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle Toll cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults // *Cell*. – 1996. – Vol. 86. – P. 973 - 983.
210. Li Liwu // *Curr. Drug Targets-Inflamm. Allergy*. – 2004. – Vol. 3. – P. 81-86.
211. Limberg M.B. A review of bacterial keratitis and bacterial conjunctivitis // *Amer. J. Ophthalmol*. 1991. Vol. 112, № 4. P. 2—9.
212. Lubinski J.M., Wang L., Soulika A.M. et al. Herpes simplex virus 1 glycoprotein gC mediates immune evasion in vivo. *J. Virol*. – 1998. Vol. 72. P. 8257 – 8263.
213. Medzhitov R., Preston-Huriburt P., Janeway C. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity // *Nature*. – 1997. – Vol. 91. – P. 295 – 298.
214. Medzhitov R., Janeway Jr C.A. Innate immunity // *The New England Journal of Medicine*. - 2000. – Aug. – P. 338 – 344.
215. Moreau S.M., Green L.C., Engel L.S., Hill S.M., O'Callaghan R.J. Effect of ciprofloxacin-polystyrene sulfonate (PSS), ciprofloxacin and ofloxacin in a *Staphylococcus keratitis* model // *Curr Eye Res*. 1998. T. 17 N 8. P. 808-12.
216. Morris R., Witherspoon C.D., Kuhn F., Brown S. Epidemiology of Pediatric Injuries from the Injury Registry of Alabama (ERA). Presented at the First International Symposium of Ophthalmology. –Bordeaux, 1993.
217. Morrison G., Kilanowski F., Davidson D. Characterization of the mouse β -defensin 1 *Defb1*, mutant mouse model // *Infect. Immun*. – 2002. – Vol. 70. P. 338 – 356.

218. Moser C. et al // β - Defensin 1 contributes to pulmonary innate immunity in mice. *Infect Immun.* – 2002. Vol. 19. P. 3068 – 3072.
219. Mosman T.R., Fong T.A. Specific assay for cytokine production. *J. Immunol. Meth.*, 1989, Vol. 116, № 2, P. 151 – 158.
220. Myriam A., Fenton M.J. // *Genome Biology.* 2002. V.3. №1. P.3011-3026.
221. Nicola N.A. *Guidebook to Cytokines and their Receptors* Oxford, 1994. – 261 p.
222. Nurozler A.B. Results of therapeutic penetrating keratoplasty // *Jpn. J. Ophthalmol.* – 2004. – Vol. 48, № 4. – P. 368-371.
223. O'Brien W.J., Segundo A.P., Guy J et al. Herpes stromal disease response to acyclovir / steroid therapy. *Acta // Ophthalmol. Scand.* – 1996. – Vol. 75. N 3. – P. 265 – 270.
224. O'Neill L.A., Dunne A. // *J. Endotoxin Res.* 2003. V.9. №1. P.55-59.
225. Ozteurk F., Kurt E., Jnan U.U., Emioeglu L., Luer S.S. The effect of acetylcholine and propolis extract on corneal epithelial wound healing in rats cornea. *Ophthalmologie.* 1999. T. 18 N 4. P. 466-471.
226. Pasare C., Medzhitov R. // *Curr. Opin. Immunol.* 2003. V.15. №6. P.677-689.
227. Patil A., Hugnes A.L., Zhang G. Rapid evolution and diversification of mammalian alpha-defensins as revealed by comparative analysis of rodent and primate genes // *Physiol. Genomics.* – 2004. – Vol. 20. P. 1-11.
228. Petroutsos G., Guimaraes R., Pouliquen Y. The effect of concentrated antibiotics on the rabbit's corneal epithelium // *Int. Ophthalmol.* – 1984. – Vol. 7, № 2. - P. 65-69.
229. Pflugfelder S. *Cornea, external diseases and anterior segment trauma.* LEO. San Francisco. 1996; 17
230. Picard C., Puel A., Bonnet M. et al. // *Science.* – 2003. – Vol. 299. – P. 2076 – 2079.
231. Pierre K.B., Guarner F., Braesco C. // *Amer. J. Clin. Nutrition.* 2003. V.78. №4. P.675-692.

232. Pivarsi A., Nagy I., Koreck A. et al. Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines and human β -defensin-2 in vaginal epithelial cells // *Microbes and Infection*. – 2005. Vol. 7. P. 1117 – 1127.
233. Platz J. et al. Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells // *Immunol.* – 2004. Vol. 173. P. 1219 – 1223.
234. Pulendran B., Kumar P., Cutler C. et al. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses *in vivo* // *J. Immunol.* – 2001. – Vol. 167. P. 5067 - 5076.
235. Rezende R., Bisol T., Hammersmith K. et al. Epithelial herpes simplex keratitis recurrence and graft survival after corneal transplantation in patients with and without atopy // *American Journal of Ophthalmology*. – 2007. - Vol. 143, N 4. – P. – 623 – 628.
236. Rock F.A. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1998. Vol. 95. P. 588 – 583.
237. Rosenberg K.D. et al. *Fusarium* Endophthalmitis following keratitis associated with contact lenses // *Opht. Surg. Las. Imag.* – 2006. – Vol. 37, № 4. – P. 310-313.
238. Rossi M., Young J.W. Human dendritic cells // *J. of Immunology*. – 2005. Vol. 175. P. 1373 – 1381.
239. Saito T., Kawabata S. et al. A novel big defensin identified in horseshoe crab hemocytes: isolation, amino acid sequence and antibacterial activity // *J. Biochem.*, 1995; Vol. 117; P. 1131-1137 .
240. Saloch M., Shimoda Y., Maesawa C. et al. // *Int. J. Cardiol.* – 2006. – Vol. 109, N 2. – P. 226 – 234.
241. Soehnlein O, Zernecke A, Eriksson EE, Rothfuchs AG, Pham CT, Herwald H, Bidzhekov K, Rottenberg ME, Weber C, Lindbom L: Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes // *Blood* 2008. - Vol. 112. P. 1461-1471.
242. Song P., Tonya A. Abraham, Youngmin Park, Adam S. Zivony, Brad Harten, Henry F. Edelhauser, Sherry L. Ward, Cheryl A. Armstrong, and John

- C. Ansel. The Expression of Functional LPS Receptor Proteins CD14 And Toll-Like Receptor 4 in Human Corneal Cells // IOVS, November. - 2001. - Vol. 42. - N. 12.
243. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity // *Int Immunol.* 2005 - Jan; 17 (1) - P. 1 - 14.
244. Taylor J. L., Tom P.O., Brien W.J. Combined effects interferon – alpha and acyclovir on herpes simplex virus type 1 DNA polymerase and alkaline Phosphatase // *Antiviral Res.*, 1998. – Vol. 38. – N 2. – P. 95 – 106.
245. Thakur A., Willcox M.D. Cytokine and lipid inflammatory mediator profile of human tears during contact lens associated inflammatory diseases // *Exp. Eye Res.*, 1998. Vol. 67, № 1. P. 9—19.
246. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence // *Nat Rev Immunol* 2007, 7: 179-190.
247. Tsan Min-Fu, Gao B. // *J. Leukocyte Biol.* – 2004. Vol. 76. – P. 514 -519.
248. Tsuji R.F., Hoshino K., Noro Y. et al. // *Clin. Exp. Allergy.* 2003. V.33. P.249-258.
249. Uematsu, S., Jang, M.H., Chevrier, N., Guo, Z., Kumagai, Y., Yamamoto, M., Kato, H., Sougawa, N., Matsui, H., Kuwata, H., Hemmi, H., Coban, C., Kawai, T., Ishii, K.J., Takeuchi, O., Miyasaka, M., Takeda, K. and Akira, S.. Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. *Nat. Immunol.* 2006 - №7. - p.868-874.
250. Valore E., Ganz T. Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cell // *Blood*, 1992; Vol. 79 (6). – P. 1538 – 1544.
251. Vandenbulcke L., Bachert C., Cauwenberge P.V. et al. // *Int. Arch. Allergy Immunol.* - 2006. Vol. 139. P. 159 -165.
252. Vinagre C., Martinez M.J., Vogei M et al. Role of herpes simplex virus in the immune stromal keratitis // *Rev. Med. Chil.* – 2001. – Vol. – 129. – N 3. – P. 259 – 263.

253. Wang X. et al. Airway epithelia regulate expression of human β -defensin 2 through Toll-like reseptor 2. FASEB J. – 2003. – P. 1727 – 1729.
254. Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schroder JM, Harder J. Pseudomonas aeruginosa- and IL-1beta-mediated induction of human beta-defensin-2 in keratinocytes is controlled by NF-kappaB and AP-1. // J Invest Dermatol 2006. – Vol. 126. P. 121-127.
255. Werling D., Jungi T.W. // Vet. Immunol. Immunopathol. 2003. V.91. №1. P.1-16.
256. Wilhelmus K. R., Falcon M. G., Jones B. R. Bilateral herpetic keratitis. // Br J Ophthalmol. - 1981. – Vol. 65. P. 385 – 387.
257. WU Xin-yi, GAO Jian-lu and REN Mei-yu. Expression profiles and function of Toll-like receptors in human corneal epithelia // Chinese Medical Journal. – 2007. – Vol. 120(10). – P. 893-897.