

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ГЛАЗНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ИМЕНИ М.М. КРАСНОВА»

на правах рукописи

Рейн Денис Алексеевич

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ И МЕТОДЫ ПРОФИЛАКТИКИ
ФИБРОТИЗАЦИИ ДАКРИОСТОМЫ.**

3.1.5 - Офтальмология (медицинские науки)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
АТЬКОВА ЕВГЕНИЯ ЛЬВОВНА

Москва – 2023 год

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Нормальный и патологический процессы заживления ран.....	13
1.2. Химиотерапевтические методы предотвращения фиброза.....	26
1.3. Заключение по обзору литературы.....	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ	44
2.1. Изучение образцов слизистой оболочки полости носа у пациентов с облитерацией вертикального отдела СОП.....	44
2.1.1. Получение образцов слизистой оболочки полости носа у пациентов с облитерацией вертикального отдела СОП при эндоназальной эндоскопической дакриоцисториностомии.....	44
2.1.2. Определение концентрации цитокинов TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, CTGF, FGF-2 в образцах слизистой оболочки полости носа у пациентов с облитерацией вертикального отдела СОП.....	52
2.1.3. Гистологическое исследование образцов тканей полости носа у пациентов с облитерацией вертикального отдела СОП. Определение миофибробластной инфильтрации.....	54
2.2. Оценка эффективности и безопасности антифибротического препарата Пирфенидон.....	57
2.2.1. Оценка эффективности и безопасности антифибротического препарата Пирфенидон на клеточной культуре фибробластов слизистой оболочки полости носа пациентов с облитерацией вертикального отдела СОП.....	57
2.2.2. Оценка эффективности и безопасности антифибротического препарата Пирфенидон на экспериментальной модели дакриоцисториностомии.....	60
2.3. Методы статистического анализа данных.....	66

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	67
3.1. Результаты лечения пациентов с облитерацией вертикального отдела СОП после эндоназальной эндоскопической дакриоцисториностомии.....	67
3.2. Результаты определение концентрации цитокинов TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, CTGF, FGF-2 в образцах тканей полости носа у пациентов с облитерацией вертикального отдела СОП.....	69
3.3. Результаты гистологического исследования образцов тканей полости носа пациентов с облитерацией вертикального отдела СОП и изучения миофибробластной инфильтрации.....	75
3.4. Результаты изучения эффективности и безопасности антифибротического препарата Пирфенидон на клеточной культуре фибробластов слизистой оболочки полости носа.....	79
3.5. Результаты изучения эффективности и безопасности антифибротического препарата Пирфенидон на экспериментальной модели дакриоцисториностомии.....	83
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	88
ВЫВОДЫ.....	99
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	101
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	103

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

ДЦР – дакриоцисториностомия.

КХВ – коэффициент хронического воспаления

ОКТ – оптическая когерентная томография

СОП – слезоотводящие пути

ЭЭДЦР – эндоскопическая эндоназальная дакриоцисториностомия

CTGF – фактор роста соединительной ткани (connective tissue growth factor)

FGF-2 – основной фактор роста фибробластов (basic fibroblast growth factor)

IFN- γ – интерферон γ

LAP – про-пептид латентности (latency-associated pro-peptide)

miRNA – микроРНК

MMP – матриксные металлопротеиназы

PDGF – тромбоцитарный фактор роста (platelet-derived growth factor)

shRNA – малые РНК, образующие шпильки

siRNA – малые интерферирующие РНК

SPARC – secreted protein, acidic and rich in cysteine (остеонектин)

TGF- β – трансформирующий фактор роста (transforming growth factor β)

TNF – фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor)

TSP-1 – тромбоспондин-1

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor)

α -SMA – гладкомышечный актин α (α smooth muscle actin)

Введение.

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Дакриоцисториностомия (ДЦР), выполненная наружным или эндоназальным доступом, является в настоящее время основным методом лечения облитерации вертикального отдела слезоотводящих путей (СОП). Тем не менее, рецидивирование заболевания после ДЦР наблюдают в 6-35% случаев [10,124]. Одной из основных причин неудачного исхода ДЦР считается заращение дакриостомы вследствие избыточного рубцевания после хирургического лечения.

На клеточном уровне основными агентами, отвечающими за формирование рубца, являются миофибробласты – клетки, сочетающие в себе особенности как фибробластов, так и гладкомышечных клеток [81,168]. Миофибробласты отличаются от фибробластов, которые являются их основной клеткой-предшественником, экспрессией актина гладких мышц α (α smooth muscle actin, α -SMA). Активность этих клеток, продолжающаяся после завершения нормального процесса заживления, считается основной причиной избыточного рубцевания в организме [23,80,236].

Процесс трансформации миофибробластов из клеток-предшественников, их жизнедеятельности и апоптоза регулируется большим количеством белковых регуляторов-цитокинов. Одними из основных цитокинов, вовлеченных в процесс фиброза, являются белки суперсемейства TGF- β (transforming growth factor, трансформирующий фактор роста), их кофактор фактор роста соединительной ткани (connective tissue growth factor, CTGF) и антагонист основной фактор роста фибробластов (basic fibroblast growth factor, bFGF, FGF-2) [44,49,51,117,208,223].

Таким образом, ввиду высокой значимости избыточного рубцевания в исходе ДЦР, поиск и анализ факторов, предрасполагающих к фиброзу

заращению дакриостомы, является актуальной задачей в современной дакриологии.

На современном этапе одним из наиболее распространенных методов медикаментозной профилактики рецидива после ДЦР является применение препарата Митомицин С. Однако, не существует единой методики и дозировки применения данного препарата, а результативность его применения значительно варьирует в исследованиях различных авторов [4,6,22,100,161,238]. Изучение других химиотерапевтических методик предотвращения рубцевания после ДЦР проведено не было. Тем не менее, ряд авторов, исследовавших рубцевание при других видах хирургических вмешательств, указывают на результативность ингибирования нескольких профибротических факторов для предотвращения фиброза [79,155,232].

Следовательно, поиск и испытание новых перспективных препаратов неспецифического антифибротического действия при ДЦР остается актуальным. К таким препаратам можно отнести низкомолекулярный препарат Пирфенидон, продемонстрировавший высокую эффективность в терапии идиопатического фиброза легких [136]. Несмотря на то, что механизм действия препарата остается не до конца изученным, известно, что он оказывает ингибирующее действие на ряд цитокинов и факторов роста, вовлеченных в процесс фиброза [70,93,207]. Таким образом, определение эффективности препарата Пирфенидон в предотвращении избыточного рубцевания в области дакриостомы, а также разработка эффективного и безопасного способа его применения и дозирования, является актуальным.

Цель исследования – изучение патогенетических факторов фибротизации дакриостомы и методов ее профилактики.

Задачи исследования:

1. Определить концентрацию цитокинов, участвующих в процессе фиброза, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, CTGF, FGF-2 в образцах

слизистой оболочки полости носа у пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей и определить их влияние на повышение уровня фибротизации дакриостомы после эндоскопической эндоназальной дакриоцисториностомии.

2. Провести гистологическое исследование образцов тканей полости носа пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей и определить интенсивность миофибробластной инфильтрации.
3. Исследовать связь выраженности гистологических изменений в слизистой оболочке полости носа, характерных для хронического воспаления, с неблагоприятным исходом эндоскопической эндоназальной дакриоцисториностомии у пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей.
4. Изучить антифибротическую активность препарата Пирфенидон в зависимости от его концентрации на клеточной культуре фибробластов слизистой оболочки полости носа пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей *in vitro*.
5. Изучить антифибротическую активность препарата Пирфенидон в эффективной концентрации, определенной в исследовании *in vitro*, на экспериментальной модели эндоназальной эндоскопической дакриоцисториностомии у кроликов *in vivo*.

Научная новизна:

1. Определена концентрация цитокинов TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, FGF-2, CTGF, принимающих участие в процессе фиброза, в образцах слизистой оболочки полости носа у пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей.
2. Впервые изучена корреляция концентрации цитокинов TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, FGF-2, CTGF в слизистой оболочке полости носа

и фибротизации дакриостомы после эндоназальной эндоскопической дакриоцистиностомии у пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей.

3. Впервые в результате гистологического исследования образцов тканей полости носа у пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей определена интенсивность миофибробластной инфильтрации и коэффициент хронического воспаления и их влияние на процесс фибротизации дакриостомы после эндоназальной эндоскопической дакриоцистиностомии.
4. Определена эффективная доза препарата Пирфенидон в ингибировании пролиферации фибробластов на основании исследования на клеточной культуре тканей полости носа пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей *in vitro*.
5. Доказана эффективность препарата Пирфенидон в предотвращении избыточного рубцевания дакриостомы в экспериментальной модели эндоназальной эндоскопической дакриоцистиностомии у кроликов *in vivo* в концентрации, определенной в исследовании *in vitro*.

Теоретическая и практическая значимость:

1. Доказанное повышение концентрации цитокина CTGF в образцах слизистой оболочки полости носа пациентов с заращением дакриостомы после эндоназальной эндоскопической дакриоцистиностомии дает основание считать его прогностическим фактором фибротизации дакриостомы у пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей после данного хирургического вмешательства.
2. Данные, полученные при гистологическом исследовании прижизненных биоптатов тканей слизистой оболочки полости носа

дают объективное подтверждение наличия хронического воспаления и его влияния на процесс избыточного рубцевания в области дакриостомы у пациентов после эндоназальной эндоскопической дакриоцисториностомии.

3. Выявленные в исследовании факторы риска избыточного рубцевания в области дакриостомы после эндоскопической эндоназальной дакриоцисториностомии дают основание для разработки методов специфической профилактики ее фибротизации.
4. Проведенное исследование на клеточной культуре тканей полости носа пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей *in vitro* позволило определить наименее токсичную и эффективную дозу антифибротического препарата Пирфенидон.
5. Доказанная высокая эффективность препарата Пирфенидон в предотвращении рубцового заращения дакриостомы в сочетании с отсутствием побочных явлений в эксперименте на лабораторных животных *in vivo* в дозах, определенных в исследовании *in vitro*, указывает на возможность дальнейшего изучения данного препарата в условиях клиники.

Методология и методы диссертационного исследования.

Методологической основой диссертационной работы явилось применение комплекса методов научного познания. Диссертационное исследование выполнено в соответствии с принципами научного исследования. Работа реализована в дизайне ретроспективного когортного исследования, а также в дизайне проспективного экспериментального открытого одноцентрового сравнительного исследования с использованием клинических, инструментальных, лабораторных, аналитических и статистических методов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Высокая концентрация цитокина CTGF в образцах слизистой оболочки полости носа пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей свидетельствует о более высоком риске избыточного рубцевания дакриостомы после дакриоцисториностомии у данных пациентов.
2. Наличие выраженных признаков хронического воспаления в образцах слизистой оболочки полости носа у пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей, выявленное при гистологическом исследовании, является фактором риска неблагоприятного исхода дакриоцисториностомии в результате рубцового зарращения дакриостомы.
3. Антифибротический препарат Пирфенидон в наименее токсичной дозе, определенной в исследовании *in vitro*, является препаратом, обладающим выраженным ингибирующим действием на пролиферацию фибробластов слизистой оболочки полости носа.
4. Пирфенидон, в дозе, определенной в эксперименте *in vitro*, является эффективным и безопасным антифибротическим препаратом по данным экспериментального исследования модели дакриоцисториностомии на лабораторных животных *in vivo* и дает основание для продолжения его исследования у пациентов с риском избыточного рубцевания дакриостомы после дакриоцисториностомии.

Степень достоверности и апробация результатов исследования.

Степень достоверности результатов проведенных исследований определяется достаточным количеством клинических наблюдений и стандартизацией условий исследования, а также использованием современных высокоточных объективных методов исследования и подтверждена в процессе

статистической обработки материала. Сформулированные в диссертации научные положения, выводы и практические рекомендации аргументированы и логически вытекают из системного анализа результатов клинических и инструментальных исследований.

Результаты диссертационной работы освещены и доложены на научной конференции офтальмологов с международным участием «Невские горизонты 2018» (Санкт-Петербург, Россия, 27-28 апреля 2018 г.), на XIII Всероссийской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы офтальмологии» (Москва, Россия, 20 июня 2018 г.), на междисциплинарном конгрессе «Проблемы диагностики и лечения заболеваний слезной системы» (Казань, Россия, 27 – 28 сентября 2018 г.).

Личный вклад автора.

Автором определены цель и задачи исследования, проведен ретроспективный анализ историй болезни, проведено обследование и лечение пациентов, а также осуществлен послеоперационный мониторинг результатов лечения. Проанализированы и обобщены результаты исследования, проведена статистическая обработка полученных данных. Автором осуществлена подготовка публикаций и докладов по теме настоящей работы.

Внедрение результатов работы.

Результаты настоящего исследования внедрены в клиническую практику ФГБНУ «НИИ глазных болезней».

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 7 работ в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования РФ для публикации основных результатов

диссертации на соискание ученой степени кандидата наук, из них 7 входят в базу цитирования Scopus.

Структура и объем диссертационной работы.

Диссертация изложена на 128 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материала и методов исследования, заключения, выводов и указателя литературы. Работа иллюстрирована 27 рисунками и 7 таблицами. Библиографический указатель содержит 238 источник (13 отечественных и 225 зарубежных).

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Нормальный и патологический процессы заживления ран

Первичная приобретенная облитерация вертикального отдела слезоотводящих путей (СОП) и возникающий вследствие нее хронический дакриоцистит является в настоящее время центральной проблемой в дакриологии. По данным J.J. Woog [214], частота выявления данной патологии составляет 30,47 случаев на 100,000 населения в год. Патология встречается в основном у пациентов старше 40 лет, причем у женщин в 2-8 раз чаще, чем у мужчин [107].

Основной метод лечения данной патологии – хирургический. Он предполагает выполнение дакриоцисториностомии (ДЦР), то есть создания искусственного соустья между слезным мешком и полостью носа наружным или эндоназальным доступом, который в настоящее время в основном выполняют с помощью эндоскопического оборудования [115].

По данным 73 научных работ, проанализированных S. Leong [124], в ходе 4921 операций ДЦР, выполненных различными способами, процент положительных результатов варьировал от 65% до 100% при наружных ДЦР и от 84% до 94% при эндоскопических эндоназальных ДЦР (ЭЭДЦР). По данным отечественной литературы, рецидивы наблюдают в 9-23% случаев после операций с наружным доступом, и в 2-16% – с эндоназальным [10].

Одной из основных причин, приводящих к неудачным исходам оперативного лечения, является рубцевание в области дакриостомы вследствие повышенного образования грануляционной ткани [9,46].

На современном этапе не существует надежной методики прогнозирования и предотвращения избыточного образования

грануляционной ткани, приводящего к закрытию дакриостомы рубцовой тканью.

Известно, что процесс заживления ран в человеческом организме происходит в несколько стадий, плавно переходящих друг в друга. Порядок этих стадий и их характеристики мало отличаются в большинстве тканей, в том числе, в слизистой оболочке полости носа. Клинически, на основании эндоскопической картины полости носа, различают стадии образования кровавой корки (до 10 дня), обструктивной лимфедемы (до 30 дня), мезенхимального роста (до 3 месяцев), а также последующее образование рубца [86]. На гистологическом уровне выделяют фазу коагуляции и гемостаза, фазу воспаления, фазу пролиферации и фазу ремоделирования [30].

В течение фазы ремоделирования грануляционная ткань заменяется рубцом. Ремоделирование во время заживления ран описывают как процесс стабилизации коллагеновых волокон и уплотнения их в содружественно ориентированные тяжи [13]. Функционально данный процесс необходим для восполнения объема поврежденной ткани. Его течение обеспечивается действием особых клеток, сочетающих в себе способность к сокращению, подобную клеткам гладкой мускулатуры, и секреторную активность, присущую фибробластам. Эти клетки были впервые обнаружены G. Gabbiani [168] в 1971 году в грануляционной ткани кожных ран, и названы миофибробластами. Характерной особенностью миофибробластов является их активность при нормальном или нарушенном процессе заживления ран и их отсутствие в неповрежденных тканях [81]. Миофибробласты отличаются от фибробластов экспрессией актина гладких мышц α (α smooth muscle actin, α -SMA), фактора, придающего миофибробластам сократительную активность. В норме, по достижению заживления ткани, миофибробласты подвергаются апоптозу [212] или деактивируются иным способом [191].

Процесс рубцевания, или фиброз, обусловлен активностью миофибробластов, продолжающейся после завершения нормальной регенерации, характеризуется накоплением и сокращением бесклеточного коллагенового матрикса. Фиброз, в отличие от регенерации, характеризуется прогрессирующим угнетением или утратой функции органа, в котором он происходит [23,80,236]. Процесс фиброза регулируется множеством физико-химических факторов, оказывающих влияние на жизнедеятельность миофибробластов.

В настоящее время с целью лучшего понимания механизмов фиброза и разработки терапии, позволяющей эффективно его предотвращать, усилия многих исследователей различных специальностей направлены на определение этих факторов.

В соответствии с современными представлениями, основным фактором, стимулирующим процесс фиброза в органах и тканях человека, считаются белки суперсемейства TGF- β (transforming growth factor, трансформирующий фактор роста), включающие в себя три изоформы. В 1993 году Desmoulière и соавт. [49] и Rønnov-Jessen и соавт. [171] установили, что TGF- β 1 индуцирует нео-экспрессию α -SMA в фибробластах *in vitro* и *in vivo*, то есть отвечает за их превращение в миофибробласты. Внутри клетки, сигнал от рецептора TGF- β (TGF- β R), соответствующего одной из трех изоформ, передается при помощи семейства белков Smad, главным образом Smad2/3 [200]. В свою очередь сигнальная система Smad реализует эффект TGF- β , оказывая стимулирующее влияние на продукцию ряда белков-эффекторов, одним из которых является α -SMA. Kumar и соавт. [117] обнаружили, что добавление к культуре фибробластов слизистой оболочки полости носа TGF- β 1 в концентрации 5 или 10 нг/мл индуцирует их трансформацию в миофибробласты. Все три изоформы TGF- β считаются регуляторами фиброза, но в глазу особое внимание ученых привлек TGF- β 2.

Роль TGF- β 3 в регуляции фиброза остается спорной: данные ряда исследований свидетельствуют как об антифибротическом, так и профибротическом эффекте данного цитокина. В трехмерной модели регенерации с использованием фибробластов роговицы человека было определено, что TGF- β 3 оказывал подавляющее действие на миофибробласты [103]. В то же время он имел противоположный эффект в эксперименте на животном [29]. Сложно обосновать антагонизм TGF- β 3 к TGF- β 1, так как их строение совпадает на 70%, и они связываются с одними и теми же мембранными рецепторами [90,211].

Клетки секретируют все три изоформы TGF- β в неактивном виде, что обеспечивается ассоциацией цитокина с про-пептидом латентности (latency-associated pro-peptide, LAP) [169]. Активация TGF- β осуществляется рядом факторов, среди которых наиболее изученным в настоящее время является связывание с α v интегринами [197]. Кроме того, активация TGF- β может происходить по интегриннезависимому пути в результате протеолиза в области связи с LAP. Можно выделить и еще один путь активации TGF- β , связанный с сдвигом pH в кислую сторону и воздействием гидроксильных радикалов активных форм кислорода. Так как оба этих фактора считаются характерным признаком воспаления, данный путь активации TGF- β можно условно назвать «воспалительным». Механизмы активации TGF- β схематично представлены на **рис. 1**.

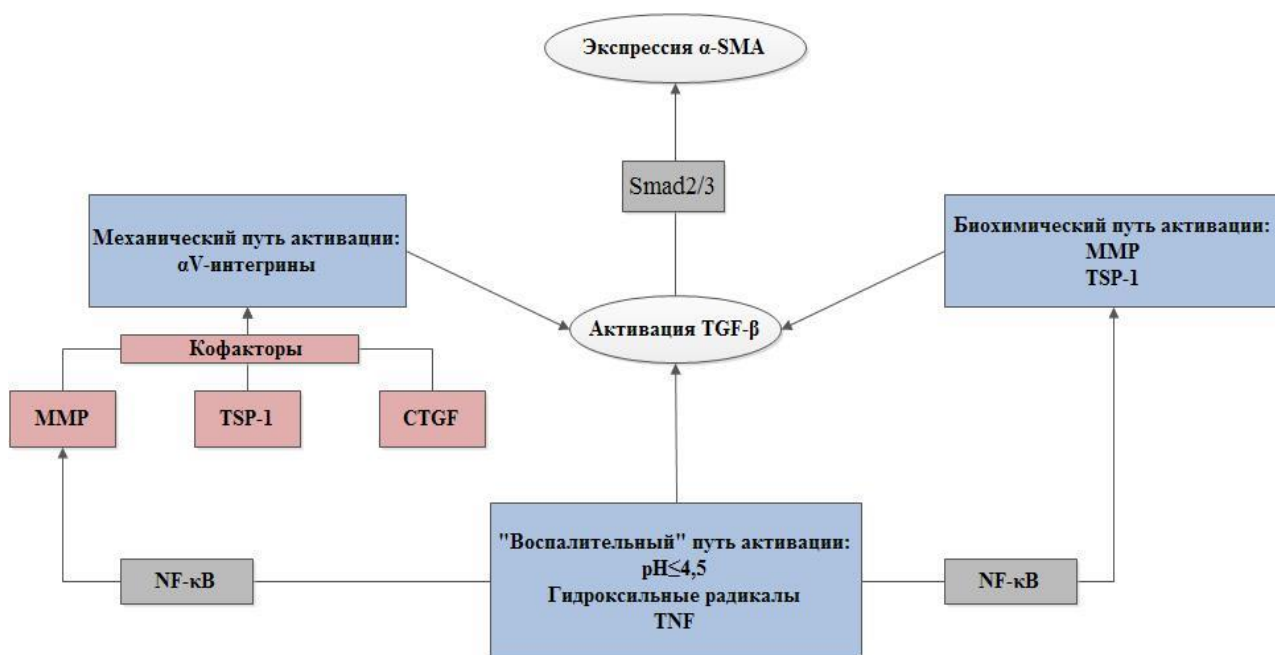


Рисунок 1. Механизм активации TGF-β и его воздействия на процесс фиброза

α v интегрины, белки клеточной мембраны, отвечающие за адгезию, «отрывают» активный TGF- β 1 от LAP, связываясь с латентным комплексом и передавая на него механическое напряжение, характерное для регенерирующей ткани или ткани в состоянии фиброза [42,79,164]. Механическое напряжение вызывает конформационные изменения в структуре ассоциации TGF- β -LAP, которые приводят к разрыву связи между ними. Эффективность активации латентного TGF- β 1 в данном случае прямо пропорциональна силе механического напряжения ткани [113,205].

Интегриннезависимый путь активации TGF- β менее изучен. Имеющиеся данные указывают на то, что идентифицированы далеко не все факторы, способные активировать TGF- β . К известным факторам относятся матриксные металлопротеиназы (matrix metalloproteinase, MMP) и тромбоспондин-1 (thrombospondin-1, TSP-1).

MMP – большое семейство кальцийзависимых и цинксодержащих эндопептидаз, которое играет ключевую роль в ремоделировании тканей и

деградации коллагена и межклеточного матрикса [213]. ММР секретируются в виде комплекса под названием зимоген и впоследствии активируются рядом факторов [92]. Доказано, что некоторые виды ММР могут оказывать протеолитическое действие на связь TGF- β с LAP, таким образом активируя его по интегриннезависимому пути [229]. Помимо самостоятельного действия на активацию TGF- β , ММР также могут связываться с некоторыми видами α V интегринов, облегчая активацию TGF- β по интегринзависимому пути [138]. Кроме того, ММР оказывают и самостоятельное действие на заживление ран [34]. Daniels и соавт. [45] продемонстрировали, что ингибирование ММР снижает сокращение матрикса и продукцию коллагена *in vitro*. Было выявлено достоверное повышение ММР-9 в слезной жидкости пациентов с синдромом «сухого глаза» и разработана тест-система, позволяющая быстро определять у таких пациентов концентрацию ММР-9 с диагностической целью [119].

TSP-1 – гликопротеин, содержащийся в плазме крови. Увеличение его концентрации отмечают при травматическом воздействии [167]. TSP-1 препятствует образованию латентного комплекса TGF- β -LAP, связываясь с LAP внутриклеточно [140]. Помимо участия в фазе ремоделирования посредством активации TGF- β , TSP-1 играет роль в ангиогенезе и агрегации тромбоцитов. Кроме того, M. Matsuba и соавт. [135] предположили, что TSP-1 индуцирует фиброз и другим путем: активацией латентного TGF- β посредством стимуляции клеточной адгезии, в том числе посредством связи с α V-интегринами.

Значительный сдвиг pH в кислую сторону ($\text{pH} \leq 1,5$) приводит к денатурации LAP и быстрой активации TGF- β [129]. Более умеренные значения кислотности ($\text{pH} \leq 4,5$) активируют TGF- β таким же образом, но на 70-80% менее эффективно. Гидроксильные радикалы активных форм кислорода также могут препятствовать связи TGF- β с LAP и приводить к его активации [26,114]. Медиаторами воспаления, чье влияние на фиброз посредством

создания подобных условий среды было изучено, являются фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF) и интерлейкины IL-1.

Блокирование фактора некроза опухоли (TNF) уменьшает фиброз при различных заболеваниях органа зрения и положительно влияет на апоптоз миофибробластов [73,190]. TNF, воздействуя на соответствующий рецептор, активирует сигнальные системы ядерного фактора κB (NF- κB), c-Jun-N-терминальной киназы (JNK) и митоген-активируемой протеинкиназы p38 (p38MAPK) [204]. Активация сигнальной системы NF- κB обеспечивает транскрипцию ряда MMP, что может оказывать опосредованное влияние на активацию TGF- β [50]. TNF также в некоторой степени индуцирует апоптоз, активируя каспазу-8 [63]. Профибротическое действие TNF вероятнее всего обусловлено особым взаимодействием перечисленных факторов.

Интерлейкины семейства IL-1 воздействуют на клетки путем активации ряда транскрипционных факторов, в том числе NF- κB , AP-1, JNK и p38 MAPK [151]. Интересно, что, воздействуя на сходные с TNF сигнальные системы, интерлейкины семейства IL-1 оказывают противоположный TNF эффект, т.е. подавляют активность миофибробластов, и даже индуцируют их апоптоз, что было продемонстрировано в исследованиях на культуре дермальных фибробластов, а позже и в миофибробластах роговицы [25].

Помимо перечисленных следует отметить ряд факторов, чье влияние на активацию TGF- β не доказано. Тем не менее, данные факторы имеют большое значение как самостоятельные регуляторы процесса заживления ран, а также обладают синергизмом с TGF- β или влияют на его продукцию. К ним относятся фактор роста соединительной ткани (connective tissue growth factor, CTGF), фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF), тромбоцитарный фактор роста (platelet-derived growth factor, PDGF).

CTGF – один из важнейших регуляторов фиброза. Различные заболевания, обусловленные процессом фиброза, связаны с мутациями в гене CTGF [98]. По данным исследований различных авторов, CTGF обладает синергизмом с TGF- β 1, потенцируя его действие [208,223,227]. По всей видимости, данный эффект обусловлен связыванием CTGF с α v интегринами. В отсутствие TGF- β 1 CTGF не влияет на активность миофибробластов, но обладает стимулирующим эффектом на пролиферацию фибробластов [120]. Мыши, у которых выключен ген CTGF, защищены от выраженного фиброза [98].

В исследовании Park и соавт. [152] VEGF индуцировал образование TGF- β 1 после операций по поводу глаукомы. По мнению S. Barrientos и соавт. [27], VEGF может являться пусковым фактором всего процесса фиброза, так как увеличенная концентрация VEGF стимулирует депонирование коллагена в образующемся рубце. Тем не менее, S.M. Noh и соавт. [146] обнаружили, что добавление anti-VEGF препарата к культуре фибробластов теноновой капсулы приводит к значительному снижению экспрессии гена TGF- β 1, но не TGF- β 2. Кроме того, конечная концентрация TGF- β в культуре клеток осталась неизменной несмотря на воздействие препарата на экспрессию генов. Таким образом, до настоящего времени влияние и механизм воздействия VEGF на процесс фиброза в регенерирующей ткани остается неясным.

PDGF содержится в α -гранулах тромбоцитов и высвобождается при их активации, то есть попадает в область раневого процесса практически сразу после травматического воздействия. PDGF индуцирует активацию миофибробластов напрямую или в синергизме с TGF- β 1 [76,77]. Блокирование действия PDGF ингибировало активацию миофибробластов в эксперименте на тканях роговицы [105,182].

Гиалуроновая кислота стимулирует активацию миофибробластов [210,224]. Ее повышенная экспрессия приводит к увеличению концентрации

маркеров фиброза, таких как α -SMA и коллагена типа III [57,69]. Тем не менее, механизм воздействия гиалуроновой кислоты на процесс фиброза остается неизвестным.

Остеонектин, или SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteine), - один из ключевых белков, отвечающих за ремоделирование межклеточного матрикса путем воздействия непосредственно на коллаген I типа и на MMP [32,175]. В 2018 году Seet и соавт. [176] обнаружили, что селективное ингибирование SPARC уменьшает депонирование коллагена и ослабляет конъюнктивальное рубцевание у мышей после хирургического вмешательства. Тем не менее, в настоящее время механизм воздействия SPARC на процесс фиброза неизвестен.

Основной фактор роста фибробластов (basic fibroblast growth factor, bFGF, FGF-2) подавляет активацию миофибробластов, являясь прямым антагонистом TGF- β 1 [44,51]. Большое количество фибробластов, имеющих низкую сократительную активность, по всей видимости, способно обеспечить нормальную регенерацию тканей, не приводя к образованию фиброзного стягивания [52]. FGF-2 усиливает пролиферацию фибробластов, что несовместимо с высокой сократительной активностью миофибробластов [191].

В опытах на животных было выявлено, что интерферон γ (IFN- γ) подавляет воспаление, депонирование коллагена и его сокращение [184,203]. Действие IFN- γ при заживлении ран глаза и его придаточного аппарата менее изучено и более противоречиво. К примеру, в 2012 году Nori и соавт. [85] выявили профибротическое действие IFN- γ на эпителиальные клетки хрусталика.

Помимо воздействия перечисленных химических факторов, помещение клеточной культуры кератоцитов в гипоксические условия также ингибирует

трансформацию кератоцитов в миофибробласты, что доказали в своем исследовании Xing и Bonanno [219].

Основные факторы, влияющие на процесс заживления ран, представлены в **табл. 1**.

Таблица 1. Основные факторы, влияющие на течение раневого процесса и возникновение фиброза

Фактор	Влияние на процесс фиброза	В каком виде секретируется	Активатор	Рецептор и сигнальная система
TGF- β 1	Профибротическое	Неактивном (связан с LAP)	α v интегрины, механическое напряжение ткани	Три изоформы рецептора TGF- β R передают сигнал посредством белков семейства Smad, в особенности Smad2/3
TGF- β 2	Профибротическое	Неактивном (связан с LAP)	α v интегрины, механическое напряжение ткани	Три изоформы рецептора TGF- β R передают сигнал посредством белков семейства Smad, в особенности Smad2/3
TGF- β 3	Антифибротическое (сомнительно)	Неактивном (связан с LAP)	α v интегрины, механическое напряжение ткани	Три изоформы рецептора TGF- β R передают сигнал посредством белков семейства Smad, в особенности Smad2/3
CTGF	Профибротическое	Активном	—	Связывается с рядом факторов в межклеточном матриксе, также может связываться с рецепторами интегринов
MMP	Преимущественно профибротическое	Неактивном (секретируется в виде комплекса под названиее зимоген)	Множество факторов, в том числе ртутьорганические соединения, хаотропные агенты и другие протеазы	Не связываются с рецепторами, взаимодействуют с компонентами межклеточного матрикса, в том числе с коллагеном, также могут связываться с рецепторами интегринов
PDGF	Профибротическое	Активном	—	Связывается с рецептором PDGFR; внутриклеточно передачу сигнала обеспечивают сигнальные системы PI3K и STAT3
HA	Профибротическое	Активном (подвергается)	—	Является одной из основных составляющих грануляционной ткани; связывается с

		деградации под действие гиалуронидаз, получившиеся фрагменты стимулируют ангиогенез)		рецепторами CD44, RHAMM и ICAM-1; механизм потенцирования фиброза неясен.
VEGF	Профибротическое	Активном	—	Стимулирует неоангиогенез, связываясь с рецепторами VEGFR.
TSP-1	Профибротическое	Активном	—	Связывается с 12 рецепторами, отвечающими за клеточную адгезию (в том числе αv интегринами), таким образом стимулирует активацию латентного TGF- β .
TNF	Профибротическое	Неактивном (продуцируется в виде трансмембранного белка)	TNF-конвертирующий фермент (ADAM17)	Связывается с рецепторами TNFR1 и 2; внутриклеточно передача сигнала обеспечивается сигнальными системами NF- κ B, JNK и p38MAPK.
SPARC	Профибротическое	Активном	—	Взаимодействует с коллагеном I типа и MMP, отвечая за ремоделирование межклеточного матрикса.
FGF-2	Антифибротическое	Неактивном (связан с мембраной клетки)	Гепарансульфатдеградирующие ферменты	Стимулирует пролиферацию фибробластов, угнетая их трансформацию в миофибробласты.
IL-1	Антифибротическое	Активном	—	Воздействует на ряд IL рецепторов; внутриклеточно передача сигнала обеспечивается сигнальной системой NF- κ B, AP-1, JNK и p38 MAPK.

В качестве среды для изучения цитокинового профиля и явлений фиброза при ДЦР различные авторы использовали слезную жидкость или биопсийный материал из полости носа.

Изменения цитокинового профиля слезной жидкости было описано при различных заболеваниях, в том числе при синдроме «сухого глаза» [170,206], синдроме Шегрена [24], ношении контактных линз [37,159], консервативной терапии глаукомы [144] и диабетической ретинопатии [109]. Исследования цитокинового профиля в слезной жидкости больных с облитерацией вертикального отдела СОП, которым проводили хирургическое лечение, в настоящее время единичны. В 2014 году Lee и Kim [122] обнаружили повышенный уровень TGF- β 2 в слезной жидкости пациентов, которым было проведено хирургическое лечение облитерации вертикального отдела СОП методом ЭЭДЦР, до операции и в послеоперационном периоде. Интересно, что больные с неблагоприятным исходом оперативного вмешательства демонстрировали более высокий уровень TGF- β 2, но слишком малая выборка не позволила сделать какие-либо обоснованные выводы.

L.M. Heindl и соавт. [75] изучали биопсийный материал 350 пациентов, проходивших оперативное лечение с 1999 по 2006 год по поводу облитерации вертикального отдела СОП. Авторы отметили положительный результат операции в 92% случаев. В 8% случаев неудачных исходов оперативного лечения в образцах ткани, взятых из среднего носового хода пациентов было выявлено субэпителиальное рубцевание. G. Smirnov и соавт. [183] установили связь между признаками фиброза, кальцификации и метаплазии в слизистой оболочке полости носа и неудачным исходом ЭЭДЦР на основании исследования биоптатов, полученных таким же способом.

O. Ozer и соавт. [148] предложили использование «коэффициента хронического воспаления» (КХВ) при оценке гистологических образцов, основанного на определении интенсивности воспалительной инфильтрации,

интенсивности фиброза и пролиферации капилляров. Авторы обнаружили связь между величиной данного коэффициента и частотой возникновения рецидива при ДЦР.

Е. Penttilä и соавт. [156] изучали экспрессию цитокинов воспаления в полости носа больных первичной приобретенной облитерацией вертикального отдела СОП и выявили ее значительное увеличение по сравнению с контрольной группой. Тем не менее, несмотря на гистологические данные о связи субэпителиального фиброза с неудачным исходом ДЦР, экспрессия перечисленных выше про- и антифибротических факторов в слизистой полости носа при данном вмешательстве до настоящего времени изучено не было.

1.2. Химиотерапевтические методы предотвращения фиброза

В настоящее время для предотвращения зарращения дакриостомы применяют Митомицин С. Этот препарат относится к группе противоопухолевых антибиотиков. Его действие основано на угнетении РНК, необходимого для синтеза коллагена фибробластами. Воздействие препарата на фибробласты зависит от используемой дозы, к примеру, *in vitro* было показано, что Митомицин С в концентрации 0,4 мг/мл ингибировал 31,3% фибробластов при экспозиции в течение 5 минут [88].

В офтальмологии данный препарат впервые был применен при синустрабекулэктомии с целью предотвращения рубцевания и фиброза [39]. Препарат также применяют в хирургии роговицы [150]. В 1998 году G. Zilelioğlu и соавт. [238] впервые применили Митомицин С при выполнении ЭЭДЦР. Губку, смоченную 0,5 мг/мл раствором Митомицина С, помещали на 2 мин 30 сек в область сформированной дакриостомы. Затем слизистую оболочку, находившуюся в контакте с губкой, орошали изотоническим раствором. Эффективность методики оценивали спустя 5 месяцев после оперативного вмешательства. Доля успешных результатов ЭЭДЦР в группе,

где применяли Митомицин С, составила 77,3% случаев, в контрольной группе – 77,8% случаев. Несмотря на то, что данных о высокой эффективности применения препарата получено не было, авторы на основе наблюдения за пациентами сделали вывод о том, что Митомицин С не всасывается через желудочно-кишечный тракт и соответственно не оказывает системного действия при таком способе применения. S. Ragab и соавт. [163] в своей работе получили похожие результаты (84,2% и 81,6% на 6-й месяц после операции в основной и контрольной группе соответственно) при применении 0,5 мг/мл раствора Митомицина С на ватном тампоне с экспозицией 10 мин.

В России Митомицин С при ЭЭДЦР был впервые применен В.Г. Белоглазовым и соавт. в 1999 году [6]. Авторы отметили результативность применения 0,5 мг/мл Митомицина С аппликационно на ватной турунде в область дакриостомы в течение 5 минут. Через 6 месяцев после операции в основной группе, где препарат был применен, неудачный исход вмешательства наблюдали в 6,8% случаев, в контрольной группе – в 27,5% случаев.

Результативность методики ЭЭДЦР с аппликацией Митомицина С составляла от 80% до 95,5% случаев в работах различных авторов [161,186], срок наблюдения – от 6 до 12 месяцев, концентрация Митомицина С – от 0,2 до 0,5 мг/мл, а время экспозиции – от 2 до 15 мин. [22,94,186].

В исследовании Е.Л. Атьковой и соавт. [4] было выявлено, что при применении Митомицина С аппликационно в дозировках и экспозиции, перечисленных выше, концентрация препарата в тканях не достигала эффективной цитостатической концентрации и составляла менее 0,2 мг/мл. Через сутки после операции наличие препарата в тканях области дакриостомы выявлено не было. Авторы заключили, что неэффективность аппликационного применения Митомицина С может быть обусловлена низкой биодоступностью.

Исследование инъекционного пути применения Митомицина С было проведено S. Kamal и соавт. [100]. Авторы вводили в 4 точки вокруг сформированной дакриостомы 1 мл 0,02% раствора Митомицина С. Также пациентам устанавливали лакримальные импланты на срок 12 недель. За период наблюдения (6 месяцев) положительный результат был достигнут в 94% случаев. Некротических изменений в полости носа выявлено не было, однако концентрация Митомицина С в крови в ходе исследования определена не была. В 2017 году Е.Л. Атькова и соавт. [3] в ходе изучения эффективности инъекционного пути введения Митомицина С при проведении ЭЭДЦР выявили высокую эффективность данного пути введения. Для оценки активности препарата в тканях дакриостомы была использована методика высокоэффективной жидкостной хроматографии-масспектрометрии, показавшая значительно большую концентрацию препарата в тканях при инъекционном пути введения по сравнению с аппликационным. Кроме того, при исследовании крови, полученной у пациентов после применения Митомицина С, препарат обнаружен не был. Тем не менее, по данным исследования Митомицин С отсутствовал в тканях при любом пути введения через 1 сутки после применения, в то время как наибольшая активность процесса рубцевания приходится на 7-14 сутки раневого процесса.

Таким образом, несмотря на многочисленные данные об эффективности Митомицина С, его возможное побочное действие при применении во время ЭЭДЦР, связанное с неспецифической цитотоксичностью препарата, не является изученным до конца [186,221]. Несмотря на многочисленные данные, не существует единой стандартной методики применения препарата, в частности, различия между инъекционным и аппликационным введением препарата остаются неочевидными. Кроме того, применение Митомицина С не гарантирует успешность оперативного вмешательства и не предотвращает процесс рубцевания в области дакриостомы во всех случаях.

Вышеперечисленные факторы обуславливают актуальный в настоящее время поиск альтернативных средств, предотвращающих рубцевание.

Моноклональные антитела обладают значительным преимуществом перед антиметаболитами, заключающимся в их специфичности по отношению к цели. Для лечения фиброза были предложены и испытаны анти-TGF- β 1 и анти-TGF- β 2 антитела [31]. Тем не менее, несмотря на положительные результаты в опытах на культуре клеток и на животных, анти-TGF- β антитела в настоящее время не применяют клинически из-за возможных осложнений, так как, помимо фиброза, TGF- β регулирует и другие процессы, необходимые для нормального заживления ран [110,179]. Кроме того, несмотря на эффективность применения антител к TGF- β 2 в исследованиях *in vitro* [43], в клиническом исследовании антитело CAT-152 продемонстрировало неэффективность в предотвращении рубцевания при применении его субконъюнктивально после синустрабекулэктомии [35]. Среди задействованных в исследовании 388 пациентов успешный исход оперативного лечения был достигнут в 60% случаев в группе, где применяли CAT-152, и в 68% случаев в группе, где было использовано плацебо. Срок наблюдения составил 12 месяцев. В качестве основных причин неудачи авторы указывают слишком маленькую концентрацию антитела для продолжительного влияния на ткани, а также необходимость использования антител к различным изоформам TGF- β , а не только к TGF- β 2.

Кроме того, целью для применения моноклональных антител может послужить VEGF) Несколько исследований подтвердило, что Бевацизумаб, препарат IgG1 моноклональных антител к VEGF, способен подавлять рубцевание *in vitro*, что было подтверждено в опытах на животных [87,126]. Несмотря на эти данные, в клинических исследованиях препарат продемонстрировал меньшую эффективность по сравнению с Митомицином С [18,40,139,145]. Nilforushan и соавт. [145], ориентируясь на уровень снижения внутриглазного давления и количество необходимых инстилляций

антиглаукомных препаратов после операции по поводу глаукомы, выявили, что в группе пациентов, где применяли Митомицин С эффективность составила 100% случаев, а в группе пациентов, где был использован Бевацизумаб – 94% случаев. К аналогичным выводам об эффективности антифибротической терапии моноклональными антителами к VEGF в сравнении с Митомицином С пришли M.J. Pro и соавт. [160], изучавшие применение Ранибизумаба у пациентов с антиглаукомными вмешательствами. В настоящее время многие исследования anti-VEGF-антител направлены на изучение применения этих препаратов в комбинации с Митомицином С или 5-фторурацилом. Тем не менее, подавляющее большинство подобных исследований не выявило разницы в антифибротическом эффекте между комбинациями Митомицина С или 5-фторурацила с моноклональным антителом к VEGF и цитостатиками в качестве монотерапии [54,55,108]. По мнению A. Katsanos и соавт. [104], в настоящее время применение anti-VEGF-антител при антиглаукомных вмешательствах не оправдано из-за отсутствия убедительных данных об адекватном режиме дозирования, способах введения и токсичности при данном способе применения в сочетании с отсутствием очевидных преимуществ перед Митомицином С.

αv интегрин являются самой новой группой факторов, селективное ингибирование которых рассматривается как метод антифибротической терапии, но в настоящее время эффективность применения моноклональных антител к αv интегринам еще недостаточно изучена [97,110]. Имеющиеся данные исследований на культуре клеток и экспериментальных животных демонстрируют высокую эффективность в предотвращении фиброза и отсутствие побочных эффектов. Однако к клиническим испытаниям необходимо подходить с осторожностью, так как αv интегрин активно вовлечены в ряд других биохимических процессов, не относящихся к фиброзу [42,48,79,164].

РНК-интерференция (RNAi) – процесс подавления экспрессии гена на стадии транскрипции, трансляции, деаденилирования или деградации мРНК при помощи малых молекул РНК. Данный процесс был впервые обнаружен и описан Fire и соавт. в 1998 году у нематоды *Caenorhabditis elegans* [60]. Позднее РНК-интерференция была выявлена в клетках многих эукариот, где она играет важную роль в регуляции развития, дифференцировки и экспрессии генов организма. Процесс РНК-интерференции осуществляется с помощью молекул siRNA, shRNA и miRNA.

Малые интерферирующие РНК (siRNA) – это класс двухцепочечных РНК, длиной 20-25 нуклеотидов [67]. siRNA вызывает деградацию матричной РНК (мРНК) целевого гена, предотвращая трансляцию мРНК на рибосомах в кодируемый ею белок.

Малые РНК, образующие шпильки (shRNA) – короткие молекулы рибонуклеиновых кислот, формирующие во вторичной структуре плотные шпильки [174]. И siRNA, и shRNA могут быть использованы для подавления экспрессии гена путем РНК-интерференции.

siRNA, нацеленные на субъединицу β ИкВ-киназы (ИКК β), использовали для посттранскрипционного подавления NF-кВ в фибробластах теноновой капсулы *in vitro* [53]. В качестве цели siRNA-терапии могут служить и непосредственно факторы роста. К примеру, siRNA рецептора к TGF- β (TGF- β RII) показали эффективность в предотвращении фиброза в субконъюнктивальном пространстве у мышей [143]. Yuan и соавт. [230] обнаружили, что shRNA эффективно подавляет экспрессию кератоэпителина и миоцилина, важных белков клеточного цикла фибробластов, в клетках трабекулярной сети. С. Yu-Wai-Man и соавт. [233] обнаружили, что siRNA к миокардин-связанному транскрипционному фактору может быть использована для подавления процесса фиброза в конъюнктиве.

МикроРНК (miRNA) – малые некодирующие молекулы РНК длиной 18—25 нуклеотидов, обнаруженные у растений, животных и некоторых вирусов, принимающие участие в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов путём РНК-интерференции [64].

Одним из наиболее изученных miRNA, вовлеченных в процесс фиброза, является miR-29. Снижение экспрессии этого фактора связывают с фибротическими процессами во многих органах, в том числе сердце [130], легких [188], печени [91], почках [88] и коже [62]. Доказано, что miR-29 регулирует экспрессию ряда генов, кодирующих белки межклеточного матрикса [62]. Ингибирующий эффект miR-29 на продукцию компонентов межклеточного матрикса отметили Toyono T. и соавт. [196] в исследовании эндотелиальных клеток роговицы. Ran W и соавт. [166] обнаружили, что TGF- β усиливает пролиферацию фибробластов теноновой капсулы путем подавления экспрессии miR-29. В эксперименте *in vitro*, Li и соавт. [125] показали, что miR-29 эффективно подавляет экспрессию гена коллагена I типа, а увеличение экспрессии miR-29, в том числе путем ее экзогенного добавления, подавляет активность фибробластов теноновой капсулы. В последующем исследовании на лабораторных животных авторы показали, что терапия miR-29 улучшала результативность антиглаукомных вмешательств [228]. Кроме того, miR-29 подавляет фиброз путем увеличения экспрессии опухолевого супрессора p53 и подавления экспрессии белка, контролирующего деление клеток, CDC42 и мономер-гомомера p85 α [154].

В исследовании Liu и соавт. [128] miR-21 показал себя антагонистом miR-29, стимулируя процесс идиопатического легочного фиброза. К аналогичным выводам пришли исследователи, изучавшие экспрессию miR-21 при ряде других заболеваний, например, миопатии Дюшена [234]. В настоящее время считается, что miR-21 регулирует TGF- β 1 и сигнальную систему MAPK в активированных миофибробластах. Тем не менее, данные Moreira Soares Oliveira B и соавт. [137], изучавших интенсивность фиброза у мышей с

ламинин-дефицитной врожденной мышечной дистрофией, свидетельствуют об отсутствии ингибирования фиброза при подавлении miR-21. Данное противоречие предположительно обусловлено характером фибротических изменений при данном конкретном заболевании.

Помимо miR-21 и miR-29, ключевую роль в процессе фиброза, обусловленного гиперэкспрессией TGF- β , приписывают miR-192, miR-216a и miR-217 [41].

В настоящее время концепция РНК-интерференции активно развивается. Помимо siRNA, shRNA и miRNA было предложено использование некодирующих молекул РНК, не относящихся ни к одной из этих групп. Nakama T и соавт. [142] использовали NK0144, РНК-интерферирующий агент нового класса, для подавления хориоидальной и ретиальной неоваскуляризации при различных заболеваниях сетчатки путем ингибирования периостина. NK0144 показал себя более эффективным в ингибировании периостина в сравнении с аналогичными siRNA.

Kaiser и соавт. [99] вводили siRNA-27 интравитреально пациентам с влажной формой возрастной макулярной дегенерации. За весь период наблюдения у 26 пациентов никаких побочных явлений отмечено не было и был достигнут положительный результат по увеличению остроты зрения и уменьшению толщины фовеа. Несмотря на это, использования РНК-интерферирующих агентов в чистом виде вероятнее всего будет недостаточно для терапии фиброза в тканях органа зрения, так как их молекулы не проходят через мембраны клеток и не защищены от ферментного распада. В настоящее время ведется разработка оптимального способа доставки siRNA, shRNA и miRNA к клетке-мишени. Возможно использование вирусных векторов передачи, в частности, аденовирусного и лентивирусного вектора, которые показали удовлетворительную эффективность трансфекции. Предложены также невирусные системы доставки, в том числе катионные липосомы и

катионные кополимеры, такие как CS-g-(PEI-b-mPEG) [53,153]. Последние были испытаны при синустрабекулэктомии у животных и показали высокую эффективность, хорошую переносимость и отсутствие токсичности [225].

Вместо блокирования нежелательной экспрессии мРНК при помощи РНК-интерференции, другие методы генной терапии направлены на подавление активности фибробластов и миофибробластов путем **усиления экспрессии ингибирующих клеточный цикл генов.**

Упомянутый выше p53 – подавляющий опухоли белок, являющийся транскрипционным фактором для ряда генов, индуцирующих остановку клеточного цикла или апоптоз. Он активируется в случае повреждения ДНК или иного стрессового воздействия, способного к нему привести. Функция p53 заключается в препятствовании репликации и индукции апоптоза потенциально онкогенных клеток [202]. Используя рекомбинантный аденовирус (recombinant Adenovirus, rAd) для p53, Johnson и соавт. [95] индуцировали гиперэкспрессию p53 в фибробластах теноновой капсулы человека и значительно замедлили их пролиферацию.

По данным исследования Perkins и соавт. [158], полученных в эксперименте на кроликах rAd, содержащий ген p21, который является регулятором более низкой степени чем p53, ингибировал пролиферацию фибробластов теноновой капсулы и имел сходную эффективность с митомицином C, примененным при синустрабекулэктомии. При экспериментальной операции на животных Heatley и соавт. [74] обнаружили, что терапия rAd.p21 предотвращает конъюнктивальное рубцевание и достигает даже лучшего контроля внутриглазного давления, чем терапия Митомицином C в контрольной группе. Оба исследования не обнаружили никаких тканевых осложнений, характерных для терапии Митомицином C. Y. Wang и соавт. [209] использовали аденовирусную передачу p21 для оценки влияния данного метода генной терапии на развитие пролиферативной

витреоретонопатии *in vitro* и у кроликов. rAd.p21 значительно ингибировал как пролиферацию и миграцию клеток пигментного эпителия сетчатки *in vitro*, так и витреоретинальную пролиферацию *in vivo*.

Кроме того, Akimoto и соавт. [17] использовали rAd, содержащий ген цитозиндеаминазы, в хирургии глаукомы для превращения пролекарства 5-фторцитозина в активное вещество 5-фторурацил. В более раннем исследовании, те же авторы выявили, что блокирование транскрипционного фактора E2F с помощью японского гемагглютинирующего вируса ингибировало пролиферацию фибробластов при хирургии глаукомы [16].

S. Saika и соавт. [172] представили результаты исследования, свидетельствующие о том, что rAd, экспрессирующий Smad7, который является антагонистом рецептора TGF- β 1, блокирует передачу сигнала TGF- β через Smad2/3 и таким образом подавляет экспрессию коллагена I типа, α -SMA и VEGF в клетках пигментного эпителия сетчатки.

В другом экспериментальном исследовании Yamanaka и соавт. [222] показали, что аденовирусная передача доминантного негативного гена p38MAPK ослабляет фиброз конъюнктивы *in vitro* и *in vivo*. Они обнаружили, что передача негативного гена блокирует увеличение экспрессии коллагена I типа и CTGF под влиянием TGF- β .

Серьезным препятствием в генной терапии остается доставка гена в клетку-мишень. Главным недостатком невирусных методов, таких как баллистические инъекции ДНК и липосомы, является небольшая продолжительность экспрессии генов (несколько дней) и низкая стабильность [232]. Вирусные методы достигают более длительной экспрессии генов: и аденовирусные и аденовирус-ассоциированные векторы вирусной передачи генов показали высокую эффективность и относительную безопасность [39]. Однако существует небольшой, но неизбежный риск мутагенеза при использовании вирусных векторов. Были описаны случаи

лимфопролиферативных заболеваний, ассоциированных с генотерапией [101]. Другим фактором, ограничивающим применение вирусных векторов, в особенности аденовирусов, можно считать риск развития вторичного иммунного ответа, так как у большинства взрослых людей присутствуют антитела к вирусам, персистирующим в ряде органов [147].

Нанотехнологии и наночастицы являются очень интересным объектом для исследований, так как могут быть применены в различных научных областях. В настоящее время изучение применения наночастиц для лечебной деятельности ведет множество групп исследователей по всему миру. Наночастицы имеют несколько ключевых преимуществ перед другими возможными подходами к предотвращению фиброза: большая поверхность, хорошая способность проникать через барьеры и увеличенная биодоступность вследствие лучшей растворимости в воде и прицельной доставки лекарства в определенную локализацию [157].

В экспериментах на животных, которым была проведена глаукомная фистулизирующая операция, выявлено, что топические наночастицы серебра (Ag-NP) позволили достигнуть лучшего продолжительного снижения внутриглазного давления и уменьшения явлений фиброза и ишемии в фильтрационной подушке, чем в группе, где применяли Митомицин С [33]. Ag-NP также продемонстрировали эффективность в ускорении заживления кожных ран, уменьшая рубцевание и оказывая противовоспалительный эффект [116]. Ag-NP считаются безопасными для глаза, но большие размеры частиц и более высокие концентрации ассоциируются с увеличенной цитотоксичностью и генотоксичностью [111].

Помимо самостоятельного применения, наночастицы также могут служить системой доставки для других химиотерапевтических агентов. Seet и соавт. [176] предложили воздействовать на белок SPARC, стимулирующий выработку коллагена и контрактильную активность миофибробластов, при

помощи siRNA, доставляемых к месту воздействия послойно сформированными наночастицами. Испытания *in vitro* показали, что данная система доставки siRNA эффективна и не вызывает токсических побочных эффектов [192]. Для увеличения специфичности Митомицина С Shao и соавт. [177] предложили использовать наночастицы (LDL)-ММС-хитозан. Они связываются с рецепторами LDL, присутствующими на активированных фибробластах, и обеспечивают селективное высвобождение препарата, что приводит к уменьшению его цитотоксичности в отношении здоровых клеток и увеличению эффективности противорубцового действия. Кроме того, A.L. Gomes dos Santos и соавт. [65] показали, что использование антисмысловых олигонуклеотидов к TGF- β 2 может быть эффективным в комплексе с полиэтиленимином благодаря лучшему проникновению в клетку и большей продолжительности действия.

Липосомы – небольшие композитные структуры, состоящие из ламеллярного липидного бислоя и варьирующие в размере от очень маленьких до десятков микрометров. Использование липосом позволяет дольше поддерживать терапевтическую концентрацию препарата, одновременно уменьшая пиковую концентрацию в периоде непосредственно после введения. Липосомные системы доставки были предложены для Омацетаксина мепесукцината (Гомогаррингтонина), ингибитора белкового синтеза [155]; 5-фторурацила, противоопухолевого антибиотика группы аналогов пиримидина [181]; Даунорубицина, антрациклинового противоопухолевого антибиотика [201]; антимитотического препарата Митоксантрона [194]. Ни один из перечисленных противорубцовых препаратов с липосомной системой доставки не был внедрен в клиническую практику. Тем не менее, в настоящее время липосомы широко применяют в исследованиях, посвященных генной терапии, в качестве невирусного вектора передачи.

Дендримеры – это гиперразветвленные наномолекулы, которым можно придать определенную структуру путем химического синтеза. Shaunak и

соавт. [178] в эксперименте на кроликах, которым была выполнена синустрабекулэктомия для предотвращения рубцевания использовали комбинацию дендримера глюкозамина [D(+)-glucosamine], обладающего иммуномодулирующими свойствами, и дендримера глюкозамина 6-сульфата [D(+)-glucosamine 6-sulfate], обладающего антиангиогенными свойствами. Авторы отметили улучшение долговременного хирургического эффекта и отсутствие местных и системных побочных явлений. E.K. Holl и соавт. [82] получили схожий эффект при использовании дендримера полиамидамина третьего поколения.

Протеогликаны — это молекулы, состоящие из белков с ковалентно присоединенными к ним олигосахаридными или полисахаридными цепями.

Декорин – небольшой протеогликан, связывающийся с TGF- β и способный подавлять его активность. Grisanti и соавт. [68] представили отчет о том, что Декорин значительно снижает внутриглазное давление и уменьшает явления фиброза, что было выявлено в эксперименте при синустрабекулэктомии у кроликов. В 2018 году A. Abdullatif и соавт. [14] провели испытание эффективности и безопасности Декорина в предотвращении пролиферативной витреоретинопатии у пациентов с проникающей травмой глаза. Авторы отметили высокую эффективность препарата в сочетании с хорошей переносимостью.

Низкомолекулярные лекарства демонстрируют высокий потенциал как антифибротические факторы. Ингибиторы Rho-ассоциированной протеинкиназы (ROCK) способны блокировать TGF- β -индуцированное рубцевание, ослабляя экспрессию факторов, отвечающих за механическое натяжение тканей [12,193]. Nonjo и соавт. [84] в экспериментальной работе показали, что ингибитор ROCK, Y-27632, предотвращает управляемое фибробластами сокращение межклеточного матрикса *in vitro*, а также улучшает результаты синустрабекулэктомии, которую они проводили у

кроликов. В процессе исследования препарат Y-27632 не вызвал никаких побочных явлений.

Rac1 – один из видов ROCK, вовлеченный в процесс регуляции цитоскелета и увеличивающий механическое напряжение в ткани. Xu и соавт. [220] в своем исследовании показали, что ингибирование Rac1 меняет фенотип фибробластов кожи. Ингибитор Rac1, NSC23766, эффективно ослаблял сокращение матрикса под воздействием фибробластов и миофибробластов [195].

Evelyn и соавт. [58] обнаружили, что низкомолекулярный ингибитор CCG-1423 более эффективен в ослаблении профибротического транскрипционного сигнала, чем ингибиторы ROCK. В 2013 году Bell и соавт. [28] оптимизировали ингибитор второго поколения, CCG-203971, более эффективный и менее токсичный, чем CCG-1423. Ингибиторы CCG показали высокую эффективность в уменьшении явлений фиброза в ряде органов и тканей, но их воздействие на заживление ран в глазу до настоящего времени изучено не было [71,96].

Ингибиторы активин-рецептороподобной киназы 5 (ALK5), также известной как TGF- β рецептор типа I, были изучены как фактор, задействованный в процессе фиброза в глазу. Sapitro и соавт. [173] показали, что ингибитор ALK5, SB-505124, подавляет активность TGF- β и улучшает результативность синустрабекулэктомии в эксперименте на кроликах. Sutariya V. и соавт. [189] разработали особый гель, обеспечивающий доставку данного низкомолекулярного препарата, и подтвердили антифибротический эффект полученного вещества при экспериментальной синустрабекулэктомии у кроликов. Xiao и соавт. [218] также продемонстрировали, что иной ингибитор ALK5 - SB-431542 уменьшает явления послеоперационного рубцевания и фиброза при экспериментальной фильтрационной операции.

Пирфенидон – низкомолекулярный препарат, примененный впервые для терапии идиопатического легочного фиброза [136]. По данным исследований, механизм действия препарата основан на ингибировании синтеза ряда цитокинов и факторов роста, вовлеченных в процесс фиброза [70,93]. В 2009 г. X. Lin и соавт. [127] обнаружили антифибротический эффект препарата при исследовании на фибробластах теноновой капсулы. T. Stahnke и соавт. [187] изучили воздействие Пирфенидона на два подтипа фибробластов орбиты — фибробласты теноновой капсулы и орбитальной клетчатки. Авторы отметили выраженный антипролиферативный эффект препарата на оба подтипа клеток. В экспериментальной модели антиглаукомной операции, выполненной на кроликах, препарат продемонстрировал аналогичный эффект, уменьшив явления послеоперационного рубцевания в области фильтрационной подушки [237]. В исследовании J. Wang и соавт. [207] препарат ингибировал миграцию клеток пигментного эпителия сетчатки, а также снижал уровень продукции фибронектина, фактора роста соединительной ткани, гладкомышечного актина α (α -SMA) и TGF- β . Кроме того, Пирфенидон предотвращал развитие пролиферативной витреоретинопатии у кроликов после проникающего ранения глаза, снижая экспрессию TGF- β и α -SMA [106]. J. Shin и соавт. [180] получили аналогичный результат при исследовании препарата на культуре фибробластов полипа полости носа.

Применение ни одного из перечисленных выше препаратов за исключением Митомицина С при дакриоцисториностомии изучено не было.

A. Zeldovich и соавт. [235] посвятили исследование вопросу применения кортикостероидов с целью предотвращения перифокальной реакции, способной оказать влияние на процесс заживления в области дакриостомы. Кортикостероиды задерживали рост ткани слизистой оболочки полости носа в области дакриостомы и уменьшали рубцевание. Проведенное хирургическое лечение было признано успешным в 89% случаев.

Использование ферментных коллагенолитических препаратов, таких как коллагеназа, коллагеннолизин, коллализин, также было предложено для предотвращения избыточного рубцевания. Необходимо отметить, что широкому применению данных препаратов препятствует неспецифичность их протеолитического действия [8]. Тем не менее, М.Т. Азнабаев и соавт. [1] показали, что промывание СОП ферментным препаратом Коллагеназа КК способно снижать количество рецидивов после ДЦР без характерных осложнений. На основании полученных данных авторы сделали вывод о специфичности действия данного препарата в отношении рубцовой ткани.

W. Wu и соавт. [217] исследовали эффективность препарата Мерогель – производного гиалуронана. Авторы отметили увеличение результативности ДЦР в группе пациентов, где применяли препарат. Тем не менее, по данным исследований других авторов, достоверных различий между группами пациентов, где применяли Мерогель, и контрольными группами выявлено не было [216].

1.3 Заключение по обзору литературы

На основании проанализированных работ можно сделать вывод о том, что предотвращение рубцевания является одним из основных направлений научных исследований в медицине. Учитывая относительно высокую распространенность обструктивных изменений СОП, требующих хирургического лечения, проблема избыточного рубцевания, ухудшающего результативность ДЦР, является одной из ведущих в дакриологии. Тем не менее, аспекты послеоперационного рубцевания, предрасполагающие к нему факторы и методы предотвращения исследованы недостаточно.

Рубцевание, или фиброз, – сложный и протяженный по времени процесс, в обеспечении нормального течения которого задействованы множество физических и биохимических факторов, обладающих разными уровнями влияния на течение данного процесса. Несмотря на то, что в настоящее время

именно изоформы TGF- β считаются основными «виновниками» избыточного рубцевания, многие исследователи показали наличие большого количества других медиаторов, регулирующих фиброз как посредством взаимодействия с TGF- β , так и самостоятельно. Кроме того, по данным исследований, применение селективных ингибиторов TGF- β обладает сомнительной клинической эффективностью и безопасностью, так как данный фактор влияет и на другие аспекты процесса заживления ран.

Необходимо отметить, что ряд исследователей обнаружил связь между неблагоприятным исходом ДЦР и явлениями хронического воспаления в слизистой оболочке полости носа, такими как сквамозная метаплазия поверхностного эпителия и субэпителиальный фиброз. Однако предложенные ими критерии оценки воспалительных изменений недостаточно объективны. Также авторы не изучали корреляцию описанных морфологических изменений с концентрацией медиаторов фиброза. В свою очередь исследования медиаторов воспаления и фиброза при ДЦР единичны и не позволяют составить целостную картину их влияния на исход оперативного лечения.

Золотым стандартом в терапии послеоперационного фиброза при ДЦР в настоящее время считается Митомицин С – препарат неселективного цитостатического действия. Тем не менее, ряд исследований ставит под сомнение эффективность и безопасность применения препарата. В частности, остается не до конца изученным оптимальный способ введения препарата. Несмотря на определенные сведения о превосходстве инъекционного введения, данная методика требует дальнейшего исследования, в особенности направленного на окончательное решение о его безопасности.

К сожалению, ограниченные данные о применении других препаратов при ДЦР не позволяют рассматривать их как весомую альтернативу Митомицину С. Подавляющее большинство работ, проанализированных в данном обзоре, рассматривают применение новых перспективных препаратов

при других видах нозологий. Тем не менее, относительное единообразие процессов, происходящих в различных тканях организма при фиброзе, позволяют экстраполировать полученные в данных исследованиях результаты для оценки потенциального применения этих препаратов при ДЦР.

Большое количество исследований, посвященных препаратам, селективно ингибирующим один из факторов фиброза, свидетельствуют о меньшей или сравнимой с имеющимися методиками предотвращения фиброза эффективности. Эти данные подтверждают многофакторную природу процесса фиброза, а также отсутствие в настоящий момент достаточно эффективной системы доставки таких препаратов, обеспечивающей в том числе и их пролонгированное действие. Многие другие препараты комбинированного действия в настоящее время находятся на стадии доклинических испытаний, что также не позволяет рассматривать их как надежные антифибротические средства.

Суммируя перечисленные данные, необходимо особо отметить низкомолекулярный препарат Пирфенидон. В отличие от ряда других медикаментозных средств, перечисленных в настоящем обзоре, Пирфенидон одобрен к применению как средство от идиопатического фиброза легких по итогам ряда клинических испытаний. Кроме того, большое количество исследований, демонстрирующих высокую эффективность и безопасность Пирфенидона, посвящено применению препарата при других нозологиях, в том числе в офтальмологии. Руководствуясь имеющимися данными, можно сделать заключение, что исследование применения данного препарата в качестве противорубцового средства при ДЦР перспективно.

Глава 2. Материал и методы исследования

2.1 Изучение образцов слизистой оболочки полости носа у пациентов с облитерацией вертикального отдела СОП.

2.1.1. Получение образцов слизистой оболочки полости носа у пациентов с облитерацией вертикального отдела СОП при эндоназальной эндоскопической дакриоцисториностомии.

В исследование были включены 83 пациента (83 случая) с облитерацией вертикального отдела СОП, из них 23 мужчины и 60 женщин в возрасте от 46 до 65 лет (в среднем $56,8 \pm 5,2$ лет).

Всем пациентам было проведено стандартное офтальмологическое обследование, а также определение степени выраженности слезотечения по шкале Мунка, пробы Ширмера и Норна, лакримальная менискометрия при помощи оптической когерентной томографии (ОКТ), проводимой на оптическом когерентном томографе RTVue-100-2 (Optovue, США), «цветные» канальцевая и носовая пробы, промывание СОП, при необходимости зондирование горизонтального отдела СОП, эндоскопическое обследование полости носа, которое выполняли при помощи ригидных эндоскопов диаметром 2,7 мм с углами обзора 0° и 30° (Karl Storz, Германия), мультиспиральная компьютерная томография СОП выполненная на 64-спиральном компьютерном томографе фирмы GE «Light Speed» VCT (Великобритания) с толщиной срезов 0,6 мм в аксиальной плоскости. При контрастировании СОП использовали водорастворимый контрастный препарат Визипак (320 мг йода/мл) (Nycomed Imaging, Норвегия), вводя его посредством канюли. Анализ полученных изображений осуществляли в программе «Syngo» (Siemens, Германия). Оценивали уровень непроходимости слезоотводящих путей, а также их анатомическое соотношение со структурами полости носа (**Рис. 2**).

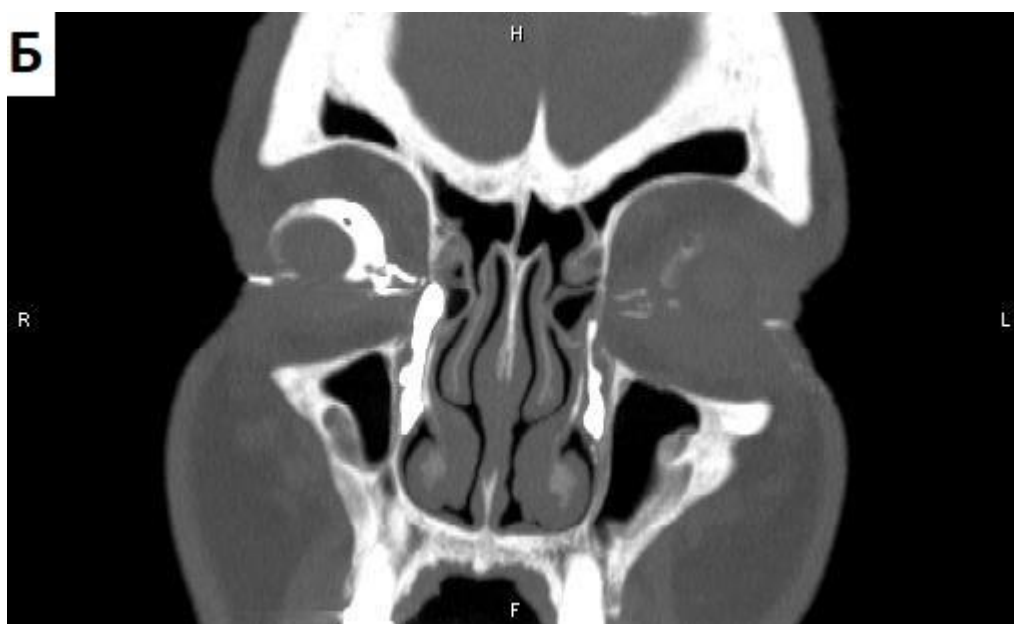
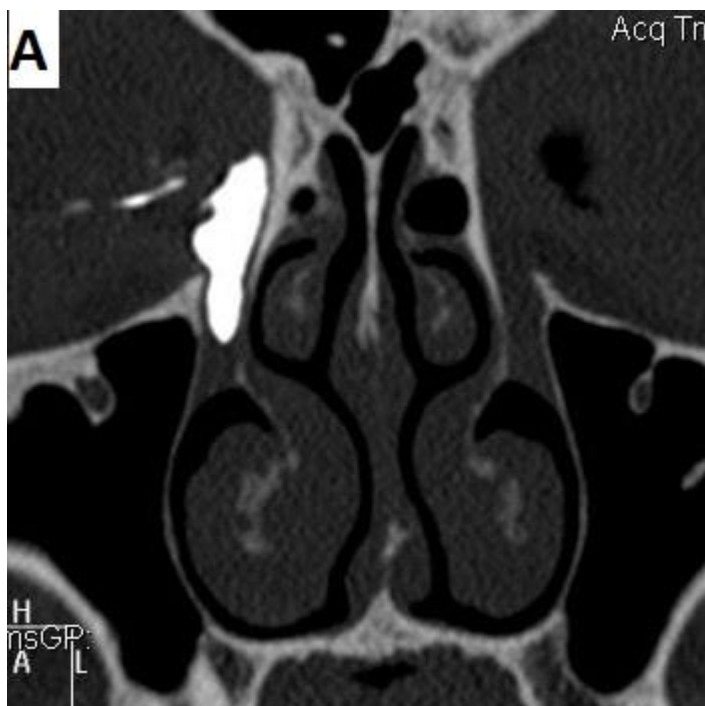


Рисунок 2. МСКТ-изображение СОП в коронарной реконструкции у пациента с непроходимостью СОП

а – непроходимость СОП на уровне шейки слезного мешка; б – непроходимость СОП на уровне устья носослезного протока.

Критериями исключения из исследования являлись посттравматические изменения СОП, новообразования СОП, ранее проведенное лечение заболеваний СОП, заболевания полости носа и околоносовых пазух, требующие лечения. В исследование не вошли пациенты с облитерирующей

формой дакриоцистита. Кроме того, из исследования были исключены пациенты, которым на завершающем этапе операции была выполнена интубация СОП лакримальным имплантатом.

Все пациенты подписали информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

Всем пациентам была выполнена ЭЭДЦР. Оперативное вмешательство во всех случаях выполняли по методике Р. Wormald [199]. Все операции осуществлял один хирург на базе ФГБНУ «НИИ Глазных болезней» им. М.М. Краснова.

При выполнении операции был использован стандартный набор эндоскопического инструментария фирмы Karl Storz (Германия). Для резекции костной ткани применяли выкусыватель Керрисона и интраназальную дрель с комплектом алмазных и режущих боров диаметром 3-4 мм (Karl Storz, Германия). Кроме того, для выполнения разрезов слизистой оболочки использовали радиохирургический аппарат «Сургитрон» (Ellman International, США) с набором электродов по Javate. Хирургическое вмешательство проводили под местным обезболиванием в сочетании с внутривенной анестезией.

Под контролем эндоскопической оптики радиохирургическим прибором выполняли П-образный разрез слизистой оболочки полости носа в области проекции слезной ямки. Получившийся лоскут отсепаровывали тупым способом, затем его часть срезали ножницами для получения полнослойных тканевых биоптатов. После получения образца слизистой оболочки полости носа его делили на две части: первую часть, предназначенную для иммуноферментного анализа с целью выявления концентраций цитокинов, немедленно взвешивали на прецизионных лабораторных весах СКЛ-210В (ЭВА, Россия) и помещали в стерильные флаконы емкостью 2 мл, после чего добавляли стерильный фосфатный буферный раствор из расчета 1 мл на 0,1 г

тканевого биоптата; вторую часть фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина в стерильных одноразовых емкостях для передачи на гистологическое исследование (Рис. 3).

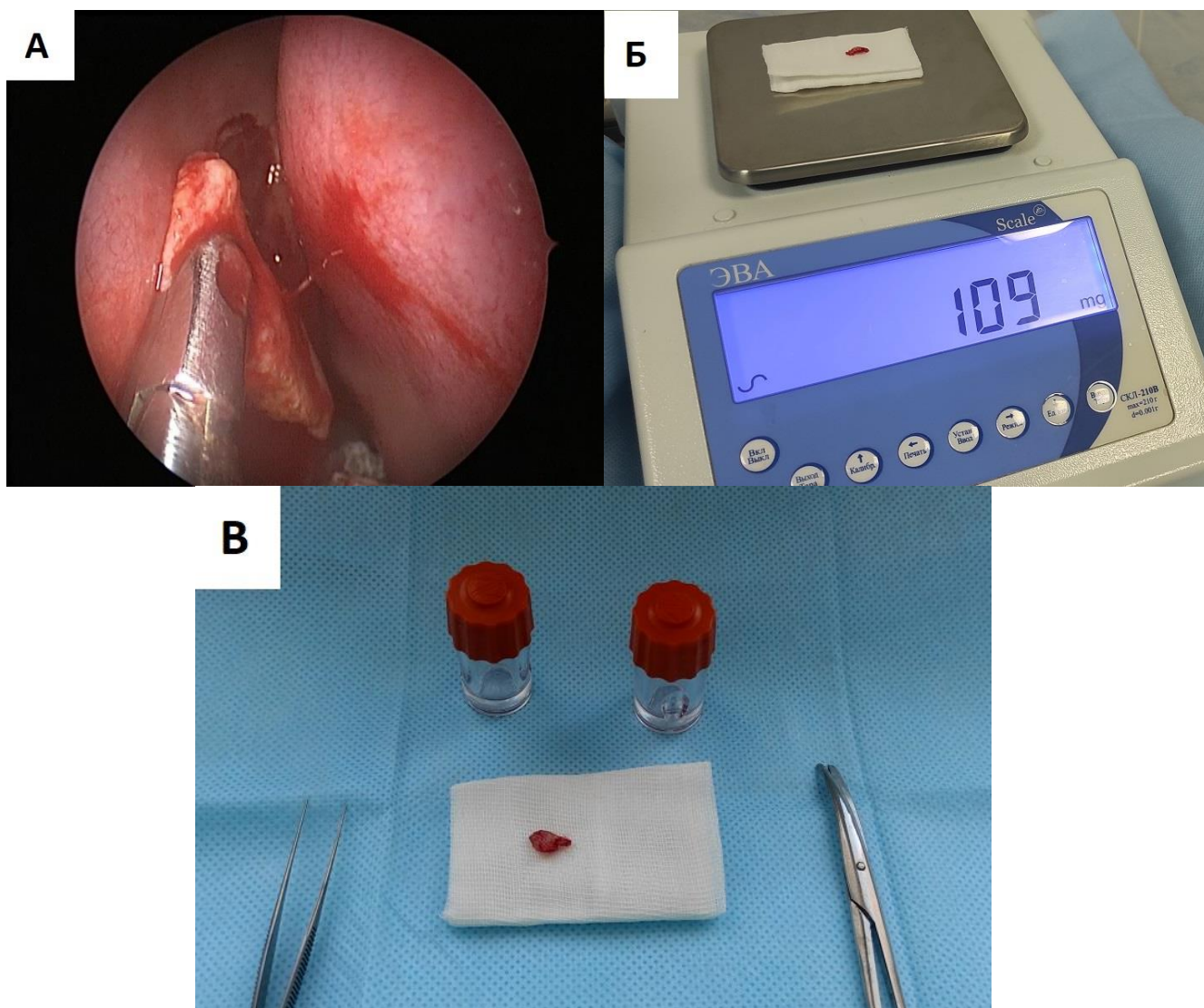


Рисунок 3. Этапы получения тканевых биоптатов при ЭЭДЦР:

- а – эндоскопическая картина взятия образца слизистой оболочки полости носа;
- б – взвешивание образца на прецизионных лабораторных весах;
- в – стерильные флаконы для образцов.

Костным выкусывателем удаляли фрагменты лобного отростка верхней челюсти в области нижних отделов слезной ямки и слезной кости. Получившееся костное «окно» расширяли при помощи дрели, обнажая медиальную стенку слезного мешка. При помощи зонда Боумана, введенного в нижнюю слезную точку, медиальную стенку слезного мешка смещали в

сторону полости носа. Разрез медиальной стенки слезного мешка осуществляли по переднему краю костного «окна» игольчатым электродом радиохирургического прибора «Сургитрон». Содержимое слезного мешка удаляли посредством промывания слезоотводящих путей 0,9% раствором натрия хлорида в сочетании с вакуум-аспирацией. Пластику созданной дакриостомы выполняли следующим образом: лоскут слизистой оболочки полости носа укладывали на обнаженную костную стенку носа, разрез медиальной стенки слезного мешка продолжали таким образом, чтобы получившийся лоскут максимально соприкасался с фрагментом слизистой оболочки полости носа. Вмешательство завершали тампонадой области дакриостомы гемостатической коллагеновой губкой (Белкозин, Россия). Этапы проведения хирургического вмешательства представлены на **рис. 4**.

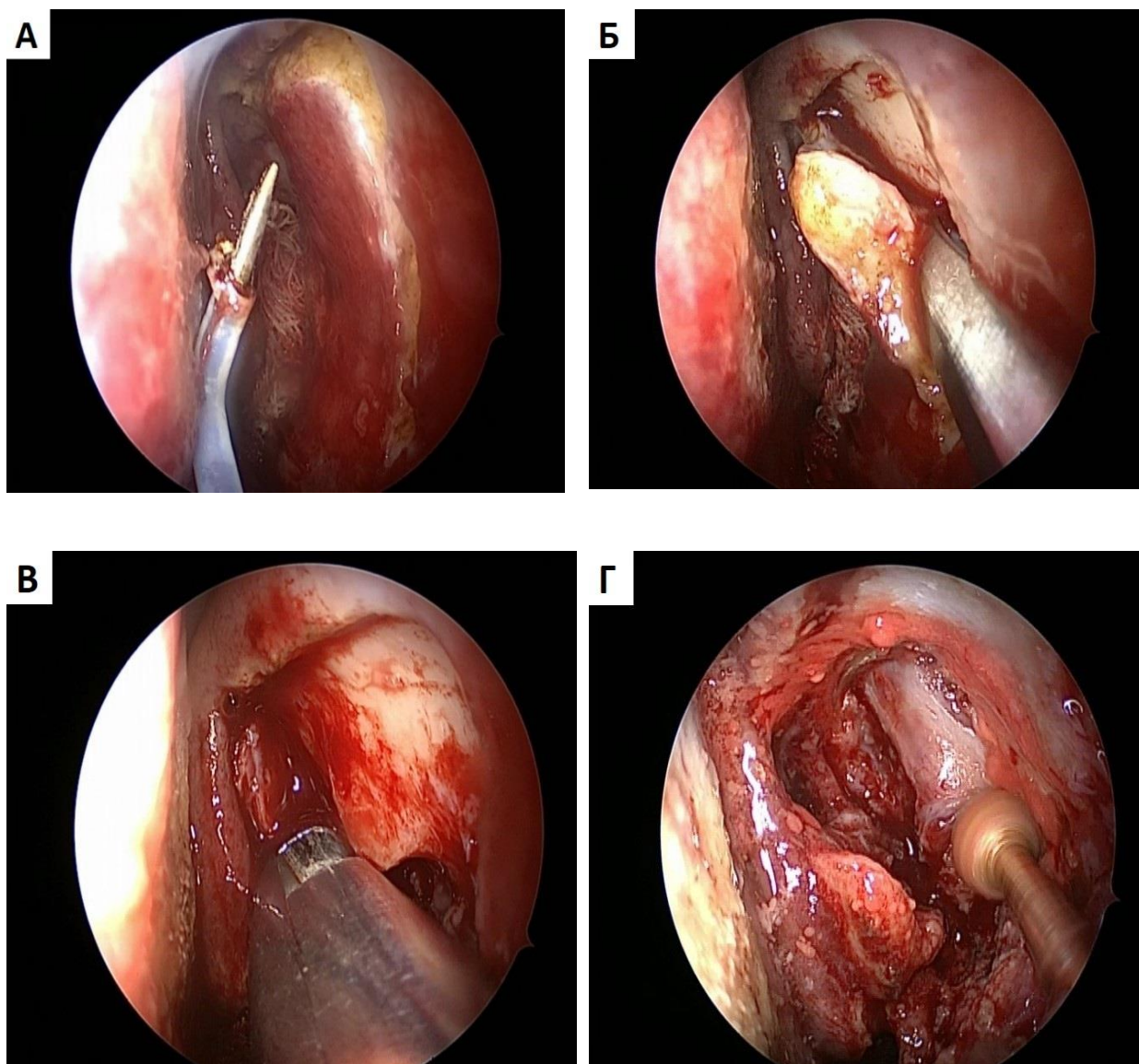


Рисунок 4. Этапы проведения ЭДЦР.

а – формирование лоскута слизистой оболочки боковой стенки носа с помощью аппарата «Сургитрон»; б – отсепаровывание лоскута слизистой оболочки полости носа; в – формирование остеотомы с помощью выкусывателя; г – шлифовка остеотомы при помощи бора.

В послеоперационном периоде проводили системную и местную антибактериальную терапию. Тампоны из полости носа удаляли на вторые сутки после операции. Ежедневное промывание полости носа изотоническим солевым раствором на срок 3 месяца после вмешательства было назначено всем пациентам. Промывание СОП раствором 0,02% нитрофураля (фурацилина), (Домхим фарм, Россия) – 5,0 мл на промывание, а также туалет

полости носа в условиях анемизации, проводили на третьи сутки после операции и далее при каждом осмотре.

Срок послеоперационного наблюдения составил шесть месяцев. Контрольные осмотры осуществляли в срок 7, 14, 28 дней, 3 и 6 месяцев после оперативного вмешательства.

Основываясь на изучении выраженности слезотечения по шкале Munk, наличию или отсутствию отделяемого из СОП, определении высоты слезного мениска по данным ОКТ, проведении «цветных» проб, промывании СОП, данных состояния дакриостомы, полученного при эндоскопии полости носа определяли эффективность проведенного хирургического вмешательства.

Выраженность эпифоры по шкале Munk 0 баллов, отсутствие гнойного отделяемого, снижение глубины слезного мениска, положительные «цветные» канальцевые и носовые пробы, свободная проходимость слезоотводящих путей при промывании, наличие сформированной дакриостомы при эндоскопии полости носа считали «выздоровлением».

Уменьшение выраженности эпифоры по шкале Munk, отсутствие гнойного отделяемого, сохранение прежней или уменьшение глубины слезного мениска, положительные или замедленные «цветные» пробы, прохождение жидкости в носовую полость при давлении на поршень шприца или прохождение ее тонкой струйкой, наличие сформированной дакриостомы при эндоскопии полости носа – «улучшением».

Сохранение или увеличение выраженности эпифоры по шкале Munk, гнойное отделяемое из слезоотводящих путей, сохранение прежней или увеличение значения глубины слезного мениска, отрицательные «цветные» пробы, непроходимость слезоотводящих путей при промывании, рубцовая деформация сформированной дакриостомы при эндоскопии полости носа – «рецидивом» (Рис. 5)

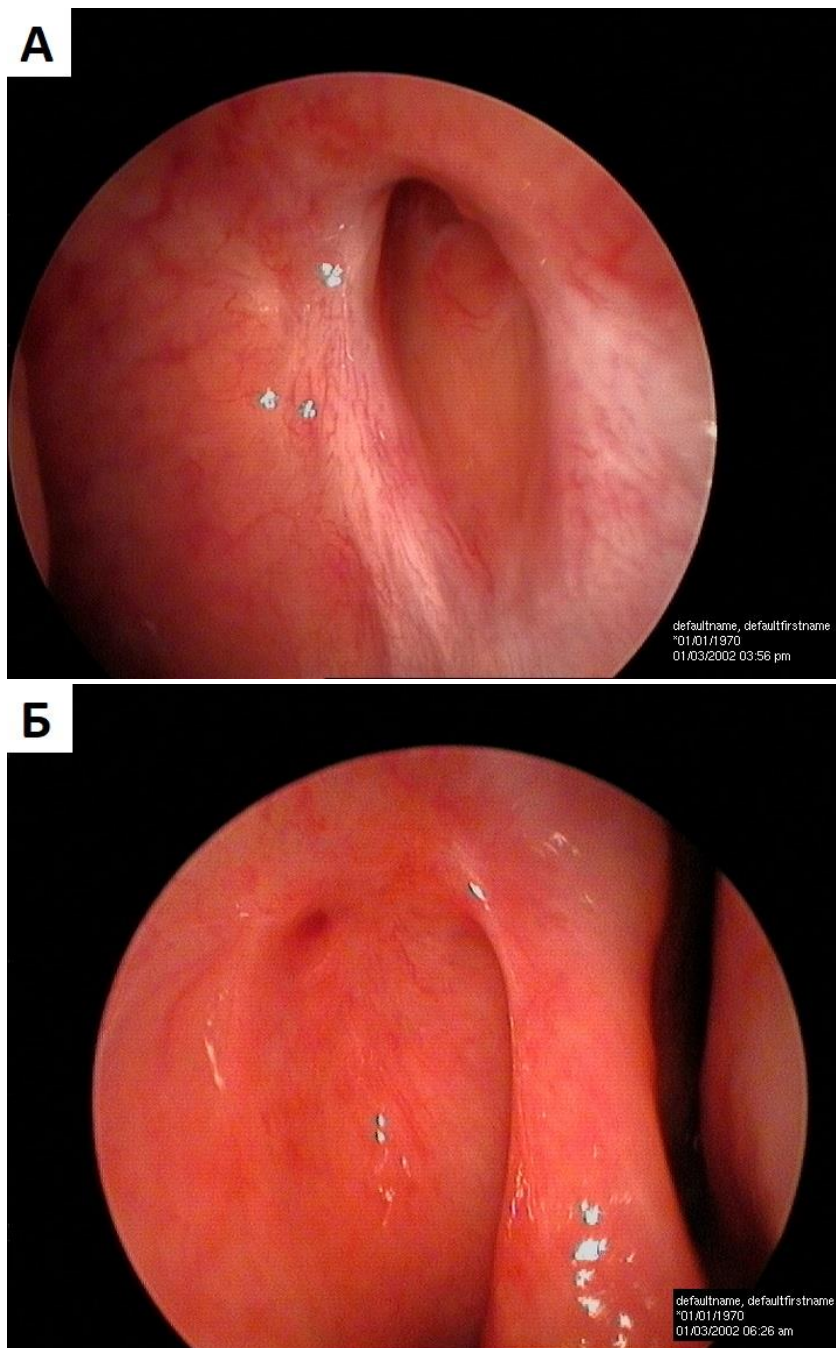


Рисунок 5. Эндоскопическая картина дакриостомы через 6 месяцев после хирургического вмешательства.

а – анатомически проходима дакриостома; б – анатомически непроходима дакриостома в результате рубцового зарращения.

«Выздоровление» или «улучшение» определяли как положительный исход операции, «рецидив» – отрицательный.

На основании исхода оперативного вмешательства пациенты были разделены на 2 группы:

- Группа 1 (10 пациентов, 10 случаев) – с рецидивом.
- Группа 2 (73 пациента, 73 случая) – с положительным исходом оперативного вмешательства.

2.1.2. Определение концентрации цитокинов TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, CTGF, FGF-2 в образцах слизистой оболочки полости носа у пациентов с облитерацией вертикального отдела СОП.

83 образца, помещенные во флакон с стерильным фосфатным буферным раствором были переданы в клинико-диагностическую лабораторию. Образцы гомогенизировали на скорости 1000 об/мин в течение 5 мин. Полученную в результате гомогенизации суспензию центрифугировали на скорости 3000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4°C (центрифуга Elmi; ELMi Ltd., Латвия). Надосадочную часть отбирали, ее объем доводили до 2 мл путем добавления стерильного фосфатного буферного раствора. Смесь разделяли на 6 частей объемом 310 мкл в 6 отдельных флаконов. Один флакон затем использовали для определения общего белка реакцией с пирогаллоловым красным, остальные замораживали при температуре -80°C до исследования.

Перед исследованием образцы размораживали при комнатной температуре. Содержание цитокинов TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, CTGF, FGF-2 в образцах определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием готовых наборов производства Cusabio Life Sciences (КНР) (**Рис. 6**). Исследование проводили в соответствии с протоколом и рекомендациями, предоставленными компанией-производителем. Результаты регистрировали на планшетном спектрофотометре Яхонт 01 (Россия). Калибровочную кривую строили по алгоритму нелинейной аппроксимации с использованием программного пакета GraphPad Prism (GraphPad Software, США). Каждый образец исследовали в дуплетах, в качестве итогового показателя результата концентрации исследуемого

вещества использовали среднее арифметическое рассчитанной концентрации в двух лунках. Полученные результаты нормализовали по содержанию общего белка в гомогенизате ткани.

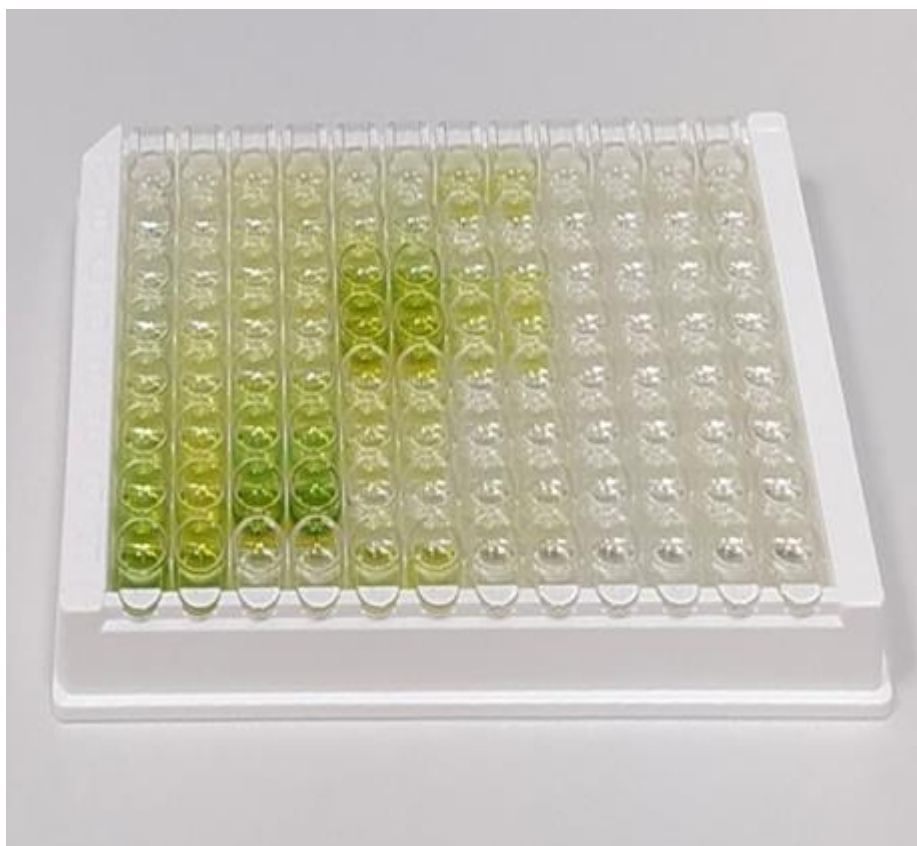


Рисунок 6. Планшет для выполнения ИФА.

Чувствительность и диапазон обнаружения использованных наборов для определения концентрации цитокинов представлена в **табл. 2**.

Таблица 2. Чувствительность и диапазон обнаружения использованных наборов для твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

Исследуемый фактор	Чувствительность набора, пг/мл	Диапазон обнаружения, пг/мл
TGF- β 1	747	780-50000
TGF- β 2	7,81	31,25-2000
TGF- β 3	3,9	15,6-1000
CTGF	1,875	3,75-120
FGF-2	0,39	1,56-100

Проводили сравнительный анализ результатов определения концентрации цитокинов TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, CTGF, FGF-2 в образцах тканей полости носа, полученных во время хирургического вмешательства и исходов оперативного лечения пациентов.

2.1.3. Гистологическое исследование образцов тканей полости носа у пациентов с облитерацией вертикального отдела СОП. Определение миофибробластной инфильтрации.

Вторую половину материала, полученную при выполнении ЭЭДЦР у 83 включенных в исследование пациентов, фиксировали в течение 24 часов в 10% растворе нейтрального формалина (рН 7,0 \pm 0,2). Фрагменты ткани после обезвоживания в гистопроцессоре карусельного типа STP120 (Thermo Fisher Scientific, Германия) заливали в парафин в модульной системе заливки TES-99 (Medite, Германия). Гистологические срезы толщиной 4 мкм изготавливали на ротационном микротоме HM340E (Micom GmbH, Германия), окрашивали

гематоксилином и эозином в автомате для окрашивания срезов HMS 70 (Thermo Fisher Scientific, Германия).

Для выявления миофибробластной инфильтрации было использовано коммерческое моноклональное антитело Actin, Smooth Muscle (клон 1A4) фирмы Cell Marque (США) в разведении 1:400. Срезы толщиной 4 мкм наносили на высокоадгезивные стекла, высушивали в течение 2 ч при температуре 58°C, затем 18 часов при температуре 37° С. Восстановление антигенной активности проводили в водяной бане WB-4MS (BioSan, Латвия) в Target Retrieval Solution pH 6 (Dako Denmark A/S, Дания). Дальнейшие операции с препаратами выполняли во влажной камере Slide Master (Bio-Optica Milano SpA, Италия). Инактивацию эндогенной пероксидазной активности осуществляли посредством инкубирования с блокирующим раствором (Dako Denmark A/S, Дания) в течение 15 мин. Инкубацию с первичными антителами проводили при температуре 4-8° С в течение 18 часов. Далее следовала инкубация со вторичными антителами системы детекции REAL EnVision Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (Dako Denmark A/S, Дания) в течение 30 мин при комнатной температуре, с последующей двукратной инкубацией с диаминбензидином в хромогенном растворе в течение 3 мин при комнатной температуре. После каждого этапа обработки антителами срезы промывали в фосфатном солевом буфере (Cell Marque, США). На последнем этапе препараты докрасивали гематоксилином Майера (Dako Denmark A/S, Дания) и заключали в синтетическую смолу Shandon-Mount (Thermo Fisher Scientific, Германия). Также были проведены реакции в положительных и отрицательных контролях.

Срезы, окрашенные гематоксилином-эозином и иммуногистохимическим методом по α -SMA, анализировали на микроскопе AxioImager Z1 (Carl Zeiss AG, Германия). Фотосъемку осуществляли при помощи камеры AxioCam (Carl Zeiss AG, Германия) с последующей обработкой изображений в программе AxoVision, version 4.7 (Carl Zeiss AG,

Германия).

При морфологическом анализе оценивали состояние поверхностного эпителия слизистой оболочки полости носа, наличие, характер и состав инфильтратов собственной пластинки слизистой оболочки, наличие и степень выраженности субэпителиального фиброза, наличие и выраженность плоскоклеточной (сквамозной) метаплазии поверхностного эпителия. Среднее количество α -SMA-позитивных клеточных элементов на 1 мм² вычисляли на основании подсчета в нескольких полях зрения для каждого образца.

Выраженность гистопатологических явлений, ассоциированных с хроническим воспалением, определяли при помощи коэффициента хронического воспаления (КХВ), по методике О. Ozer и соавт [148]. Для этого при 400-кратном увеличении микроскопа оценивали в поле зрения выраженность следующих явлений:

1. воспалительной инфильтрации (количество лимфоцитов, гистиоцитов и плазматических клеток в поле зрения): слабая (менее 50 клеток), умеренная (50-200 клеток), выраженная (более 200 клеток);
2. фибротических изменений (содержание фиброзной ткани в поле зрения): слабая (менее 25%), умеренная (25-50%), выраженная (более 50%);
3. капиллярной пролиферации (количество капилляров в поле зрения): слабая (менее 5), умеренная (5-10), выраженная (более 10).

В соответствии с интенсивностью каждого из этих элементов ему присваивали коэффициент от 1 до 3. Таким образом, КХВ каждого образца составлял от 3 до 9 в зависимости от выраженности каждого из перечисленных явлений.

Учитывая тот факт, что позитивное окрашивание по α -SMA характерно

не только для миофибробластов, но и для других клеток, в частности для гладких миоцитов, являющихся частью сосудистой стенки, для исключения влияния гладких миоцитов на итоговые показатели α -SMA-позитивных элементов, подсчет проводили в отдалении от крупных сосудов, а также использовали усредненные показатели.

2.2. Оценка эффективности и безопасности антифибротического препарата Пирфенидон.

2.2.1. Оценка эффективности и безопасности антифибротического препарата Пирфенидон на клеточной культуре фибробластов слизистой оболочки полости носа пациентов с облитерацией вертикального отдела СОП.

Образцы слизистой оболочки полости носа для культивирования были получены у 3 случайно выбранных пациентов с облитерацией вертикального отдела СОП во время ЭЭДЦР. Материал получали из области перехода нижней носовой раковины в наружную стенку полости носа и немедленно передавали для культивации. Методика выполнения оперативного вмешательства пациентам не отличалась от описанной выше.

Образец ткани измельчали при помощи хирургического скальпеля до получения фрагментов размером 2×2 мм. Фрагменты помещали в чашки Петри (Corning Inc., США) с площадью ростовой поверхности 10 см² и культивировали в ростовой среде Gibco DMEM (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением антибиотиков (пенициллин 100 ед/мл; стрептомицин 100 мкг/мл, Thermo Fisher Scientific, США), 2 мМ GlutaMax (Thermo Fisher Scientific, США) и 10% фетальной сыворотки теленка (HyClone, США) во влажной атмосфере при температуре 37° С и 5% содержанием CO₂. На 5-е сутки культивирования клетки начинали мигрировать из фрагментов ткани на пластик. Спустя 14 суток культивирования эксплантаты удаляли, диссоциировали клетки при помощи 0,05% раствора Trypsin-EDTA (Thermo

Fisher Scientific, США) и осуществляли пассаж с коэффициентом рассева 1:4.

Наблюдение за ростом клеток и оценку их морфологии осуществляли на инвертированном микроскопе Zeiss Axio Vert.A1 (Carl Zeiss AG, ФРГ).

Для характеристики полученной клеточной культуры проводили окрашивание на специфические маркеры фибробластов — виментин и CD90. Для окраски на виментин клетки рассеивали на чашки Петри для конфокальной микроскопии (5×10^3 клеток на чашку). При достижении клетками 50% монослоя их фиксировали 4% параформальдегидом (10 мин при температуре 4°C). После трехкратной промывки натрий-фосфатным буферным раствором (Phosphate buffered saline, PBS) клетки инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в PBS, содержащем 0,2% Tween 20, 0,2% Triton X-100, 2% сыворотки крови козы. После этого клетки инкубировали с раствором первичных антител к виментину (Abcam plc, США) в разведении 1:40 в PBS с 0,2% Tween 20, 0,2% Triton X-100 и 0,2% сывороткой крови козы (1 ч при 37°C). Затем клетки три раза промывали PBS, вносили вторичные антитела к иммуноглобулинам мыши Goat anti-Mouse Alexa Fluor 555 в разведении 1:750 (Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали 1 ч при 37°C . После трехкратной промывки PBS докрашивали ядра клеток с помощью 1:400 DAPI (Thermo Fisher Scientific, США). Для визуализации CD90 клетки выращивали и фиксировали по аналогичному протоколу. Клетки инкубировали (10 мин при температуре 4°C) с 1:11 раствором первично меченых антител против CD90 (Miltenyi Biotec, Германия), несущих флуоресцентную метку phycoerythrin (Ex-Max 496 nm/Em-Max 578 nm).

Сканирование проводили с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Nikon A1R MP+ (Nikon Corporation, Япония). В исследовании использовали лазеры с эмиссией 405, 488, 561 и 638 нм. Используемая оптика: Plan Apo 20X/0,75 Dic N, Apo IR 60X/1,27 WI и Apo TIRF 60X/1,49 oil Dic объективы. Обработку полученных изображений

проводили с помощью программного обеспечения NIS-Elements (Nikon Corporation, Япония).

В эксперименте была использована порошковая форма препарата Пирфенидон, предоставленная компанией-производителем (5-метил-1-фенил-2-(1H)-пиридон, P2116-10MG, Sigma-Aldrich Co. LLC). Для получения отдельных концентраций препарат разводили в ростовой среде Gibco DMEM.

Токсичность препарата определяли по результатам MTS-теста (способности живых метаболически активных клеток переводить соль тетразолина в формазан, растворимый в среде культивирования). В работе использовали набор CellTiter 96 AQueous One Solution Reagent (Promega Corporation, США). Исследование выполняли согласно протоколу, предоставленному фирмой-производителем реагента (Promega Corporation, США, протокол TB245). Клетки высаживали в лунки 96-луночного культурального планшета (по 2 тыс. клеток на лунку в 100 мкл ростовой среды Gibco DMEM) с добавлением антибиотиков (пенициллин 100 ед/мл, стрептомицин 100 мкг/мл), 2 mM GlutaMax и 10% фетальной сыворотки теленка. Через 24 ч культивирования в лунки вносили исследуемый препарат в концентрациях 0,01; 0,1; 0,2; 0,3 и 0,5 мг/мл. После 24 и 48 ч инкубации с препаратом в каждую лунку к 100 мкл ростовой среды добавляли 20 мкл MTS-реагента (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2H-тетразолиум). Положительным контролем служили лунки с клетками без препарата; в качестве бланка использовали лунки с ростовой средой. Планшет инкубировали в течение 4 ч при 37° С во влажной атмосфере с 5% CO₂. В качестве положительного контроля были приняты лунки с клетками без добавления препарата. Бланком служили лунки, не содержащие клеток и заполненные ростовой средой. Время экспозиция с MTS-реагентом составляло 4 ч при стандартных условиях. Оптическую плотность измеряли на планшетном анализаторе при $\lambda=490$ нм. Тест был поставлен в 3 повторах. Количество жизнеспособных клеток рассчитывалось по формуле:

$$\text{Количество живых клеток} = (A_0 - A_6) / (A_k - A_6) \times 100\%,$$

где A_0 — среднее значение оптической плотности в образце, A_6 — в бланке, A_k — в контроле.

На основании полученных значений проводили построение графика зависимости количества живых клеток от концентрации препарата.

Для оценки эффекта препарата Пирфенидон на миграцию и пролиферацию фибробластов слизистой оболочки полости носа была использована модель раны монослоя. Для этого осуществляли пассаж клеток в 6-луночный культуральный планшет до образования ими монослоя. Монослой повреждали с помощью наконечника для дозатора (до 10 мкл) (**Рис. 7**). Нарушение монослоя фотофиксировали с помощью инвертированного микроскопа при 10-кратном увеличении. Затем ростовую среду заменяли на содержащую препарат в концентрациях 0,15 и 0,3 мг/мл. В контрольную лунку препарат не вносили. Степень восстановления монослоя фиксировали через 24 ч инкубации клеток с препаратом.

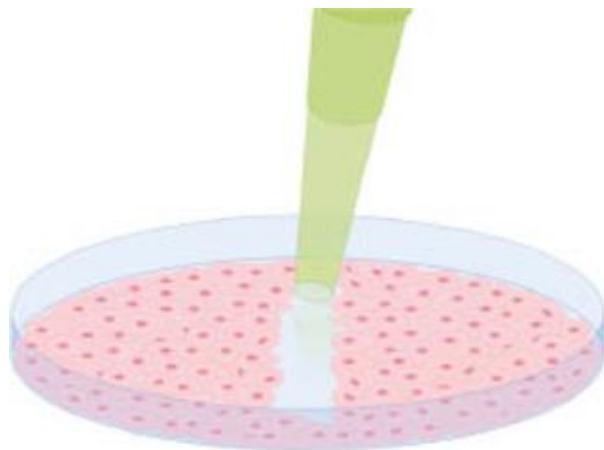


Рисунок 7. Схематичное изображение нанесения раны монослоя.

2.2.2. Оценка эффективности и безопасности антифибротического препарата Пирфенидон на экспериментальной модели дакриоцисториностомии.

Изучение препарата Пирфенидон было проведено на экспериментальной модели ЭЭДЦР у кроликов на базе Центрального вивария ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и соответствовало международным рекомендациям по работе с лабораторными животными Стокгольмской декларации о гуманитарном обращении с лабораторными животными. В исследовании были использованы 18 кроликов (18 СОП) породы шиншилла весом от 2 до 2,5 кг. Животные были размещены в индивидуальных клетках с циклом смены дня и ночи равным 12 ч, их кормление осуществляли *ad libitum*. Все животные до начала исследования проходили акклиматизацию в течение недели.

Анестезию осуществляли следующим образом: для премедикации за 15 мин до введения средства для наркоза использовали 0,1% раствор Атропина сульфата (Дальхимфарм, Россия) из расчета 0,04 мг/кг подкожно, далее выполняли внутримышечную инъекцию тилетамина гидрохлорида в сочетании с золазепамом гидрохлоридом (Золетил 100, Virbac Sante Animale, Франция) из расчета 10 мг/кг, для местной инфильтрационной анестезии использовали 0,5% раствор Лидокаина гидрохлорида (Мосхимфармпрепараты им. Н.А.Семашко, Россия), в конъюнктивальный мешок инстиллировали 0,5% раствор проксиметакаина гидрохлорида (Алкаин, Alcon-Couvreur N.V. S.A., Бельгия).

Всем кроликам была выполнена ЭЭДЦР справа. Слезную точку и слезный каналец расширяли коническими зондами Зихеля возрастающего диаметра. Далее перфорировали костную стенку коническим зондом наибольшего диаметра. Контроль положения зонда осуществляли с помощью

эндоскопа Karl Storz (Германия) диаметром 2,7 мм, с углом обзор 30°. Вводя специально разработанный трепан вдоль зонда, формировали костное «окно» (Рис. 8).

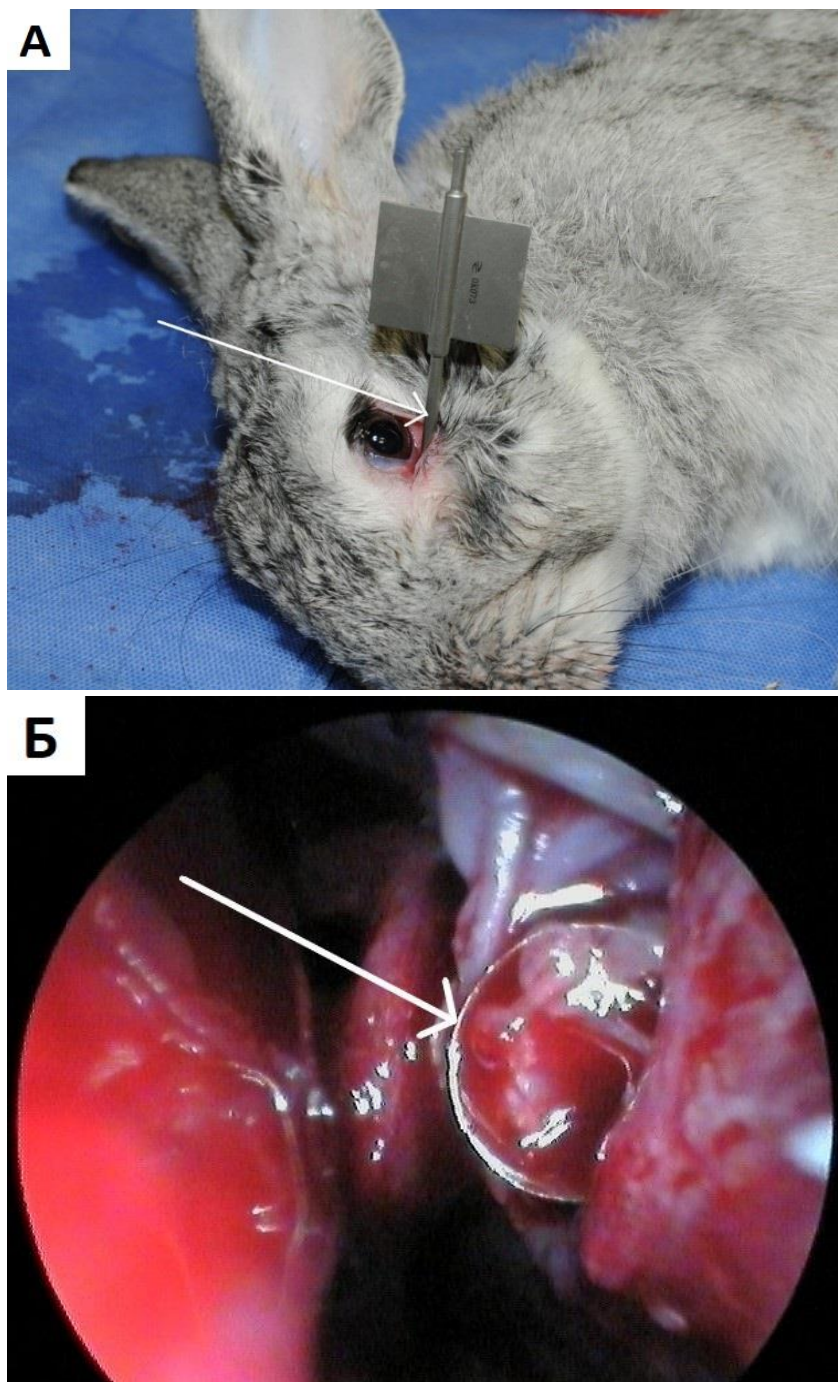


Рисунок 8. Этапы эндоназальной эндоскопической дакриоцисториностомии у кролика

а – вид трепана, проведенного в полость носа через нижний слезный каналец;

б – эндоскопическая картина сформированной дакриостомы с введенным в нее трепаном (указан стрелкой).

Костные и мягкотканые фрагменты удаляли щипцами эндоназально под контролем эндоскопа. По краям сформированной дакриостомы в 5 точек специальной иглой вводили по 0,2 мл в каждую точку (суммарно 1 мл) раствор Пирфенидона, приготовленного следующим образом: препарат разводили дистиллированной водой, нагревая получившийся раствор до 60°C в течении 30 мин на водяной бане. В эксперименте были использованы концентрации Пирфенидона 0,15 мг/мл и 0,3 мг/мл (**Рис. 9**).

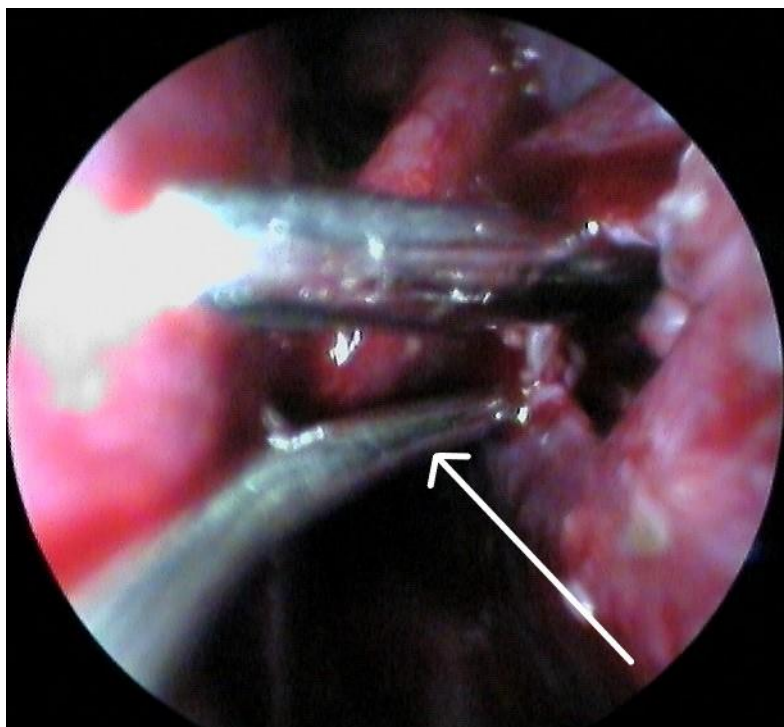


Рисунок 9. Эндоскопическая картина этапа введения Пирфенидона в область дакриостомы (игла указана стрелкой).

Животным контрольной группы препарат не вводили.

Операцию завершали промыванием образованной дакриостомы 5 мл 0,9% раствора натрия хлорида с помощью канюли через нижний слезный каналец. В конъюнктивальный мешок инстиллировали 0,25% раствор хлорамфеникола (Лекко ЗАО, Россия). Тампонаду полости носа не выполняли.

Экспериментальные животные были разделены на 3 группы в зависимости от введенной дозы Пирфенидона:

- 1-ая группа – 6 животным (6 СОП) Пирфенидон вводили в концентрации 0,15 мг/мл

- 2-ая группа – 6 животным (6 СОП) Пирфенидон вводили в концентрации 0,3 мг/мл
- 3-я группа (контрольная) – 6 животным (6 СОП) препарат не вводили.

До оперативного вмешательства и после него на 1, 3, 7, 14, 28 день оценивали проходимость СОП путем промывания их 0,9% физиологическим раствором в условиях топической анестезии 0,5% раствором проксиметакаина гидрохлорида (Алкаин, Alcon-Couvreur N.V. S.A., Бельгия). Результат хирургического лечения считали отрицательным, если СОП были непроходимы при их промывании или просвет дакриостомы был закрыт рубцовой тканью при осмотре материала после вывода животного из эксперимента.

Животных выводили из эксперимента на 7 (6 кроликов), 14 (6 кроликов) и 28 день (6 кроликов) после хирургического вмешательства. Для этого в краевую ушную вену вводили 2 мл раствора тиопентала натрия (ОАО «Синтез», Россия). Наступление смерти фиксировали по остановке дыхания и сердечной деятельности, отсутствию рефлексов.

Материал для исследования из области дакриостомы получали, выполняя горизонтальный распил носовой перегородки вдоль крыши носа до заднего края наружного носа. Лоскут откидывали вверх, частично удаляли носовые раковины для обнажения области дакриостомы. С целью определения ее локализации через слезный каналец в дакриостому вводили зонд (**Рис. 10**). Гистологический материал получали из области дакриостомы вокруг зонда. Его немедленно фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина (рН $7,0 \pm 0,2$) и передавали для гистологического исследования.

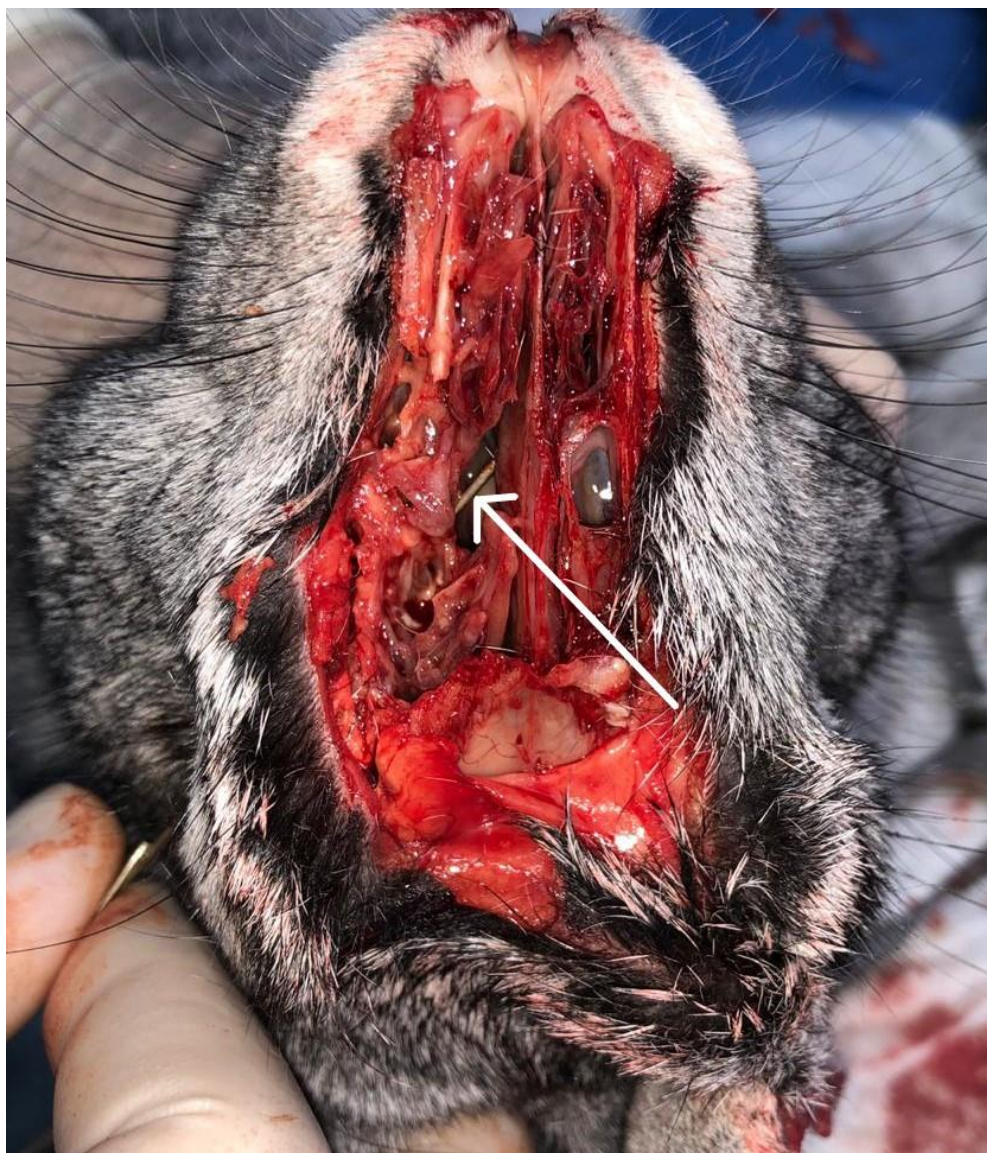


Рисунок 10. Обнаженная полость носа кролика после горизонтального распила и откидывания лоскута. Пуговчатый зонд Боумена проведен через слезный каналец в полость носа через дакриостому (указан стрелкой).

Обработку полученных образцов проводили способом, описанным выше. После фиксации в 10% растворе нейтрального формалина и обезвоживания, образцы заливали в парафин и изготавливали из них срезы на ротационном микротоме. Полученные срезы окрашивали гематоксилином-эозином.

Гистологическое исследование с специфическим окрашиванием по α -SMA выполняли методом, описанным выше. Однако во избежание

диффузного окрашивания ткани для детекции использовали вторичные антитела не к кроличьим, а к мышинным антигенам.

Гистологические срезы анализировали на микроскопе AxioImager Z1 (Carl Zeiss AG, Германия). Фотосъемку осуществляли при помощи камеры AxioCam (Carl Zeiss AG, Германия) с последующей обработкой изображений в программе AxoVision, version 4.7 (Carl Zeiss AG, Германия).

Среднее количество клеток на 1 мм² определяли, подсчитывая их в нескольких полях зрения и вычисляя среднее значение. Так же, как и в образцах ткани слизистой оболочки полости носа пациентов с хроническим дакриоциститом, полученных во время выполнения им ЭЭДЦР, при подсчете старались избегать тканевых образований, для которых характерно интенсивное прокрашивание по α -SMA в норме. Определение КХВ для данных образцов не выполняли.

2.3. Методы статистического анализа данных

Статистический анализ полученных данных выполнен в пакете программ IBM SPSS Statistics v23 (IBM Corporation, США). Для определения характера распределения в выборке использовали критерий Колмогорова-Смирнова и Лилиефорса для нормальности. Распределение считали отличным от нормального при $p < 0,05$, в противном случае распределение считали нормальным. Для определения корреляционных зависимостей между значениями выборок использовали критерии хи-квадрат Пирсона, ранговой корреляции Спирмена, U-тест Манна-Уитни. Статистические гипотезы принимали как значимые при $p < 0,05$. Количественные данные представлены в виде средних значений (M) \pm стандартное отклонение (SD).

Глава 3. Результаты собственных исследований.

3.1. Результаты лечения пациентов с облитерацией вертикального отдела СОП после эндоназальной эндоскопической дакриоцисториностомии.

Результаты исследований 83 пациентов (83 случая) с хроническим дакриоциститом после ЭЭДЦР, проведенных для определения эффективности хирургического лечения через 6 месяцев после вмешательства представлены в **табл. 3**. Положительный исход наблюдали в 73 случаях (87,9%), из которых 59 (71,1%) были классифицированы как "выздоровление" и 14 (16,9%) – как "улучшение". "Рецидив", то есть отрицательный результат хирургического лечения, наблюдали у 10 пациентов (12,1%).

Таблица 3. Результаты исследований, проведенных для определения исхода ЭЭДЦР через 6 месяцев после вмешательства у включенных в исследование пациентов.

			Частота случаев	
			Абсолютное количество (случаи)	Относительное количество (%)
Оценка слезотечения по шкале Munk, баллы	0		59	71,1
	1		11	13,3
	2		4	4,8
	3		4	4,8
	4		5	6,0
«Цветные» пробы	канальцевая	положительная	68	81,9
		замедленная	10	12,1
		отрицательная	5	6,0
	носовая	положительная	60	72,3
		замедленная	13	15,7
		отрицательная	10	12,1

Отделяемое из СОП	есть	6	7,2
	нет	77	92,8
Промывание СОП	свободное	61	73,5
	форсированное	12	14,5
	не проходимы	10	12,1
Эндоскопия полости носа	Рубцовая деформация дакриостомы	10	12,1
	Полностью сформированная дакриостома	73	87,9
Изменение глубины слезного мениска	снижение	65	78,3
	без изменений	14	16,9
	увеличение	4	4,8

На основании представленных данных можно сделать вывод о том, что причиной всех случаев неблагоприятного исхода хирургического вмешательства в группе 1 послужила рубцовая деформация дакриостомы, приведшая к закрытию ее просвета и рецидиву дакриоцистита. Сроки возникновения рецидива представлены в **табл. 4**.

Таблица 4. Сроки возникновения рецидива дакриоцистита по данным периодического послеоперационного наблюдения

Сроки возникновения рецидива (дни, месяцы)	Частота случаев	
	Абсолютное количество (случаи)	Относительное количество (%)
14-28 день	1	10,0
1-3 месяцев	6	60,0
3-6 месяцев	3	30,0

У всех пациентов группы 2 исход хирургического вмешательства оценивали как «выздоровление» или «улучшение». Данный исход сохранялся на протяжении всего периода послеоперационного наблюдения.

3.2. Результаты определение концентрации цитокинов TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, CTGF, FGF-2 в образцах тканей полости носа у пациентов с облитерацией вертикального отдела СОП.

Данные о концентрациях исследованных цитокинов в образцах слизистой оболочки полости носа представлены в **табл. 5**.

Таблица 5. Средние значения исследованных цитокинов в группах пациентов.

	Количество случаев	FGF-2 (пг/мл)	CTGF (пг/мл)	TGF-β1 (пг/мл)	TGF-β2 (пг/мл)	TGF-β3 (пг/мл)
Группа 1	10	1,58±2,87	46,49±37,95	4093,21±1031,13	40,36±36,41	108,54±80,58
Группа 2	73	1,71±3,03	22,12±26,41	4433,36±2357,36	45,17±26,54	147,25±155,72
P*		0,901	0,015	0,661	0,647	0,456

Примечание: * при вычислении коэффициента ранговой корреляции Спирмен

Концентрация цитокина FGF-2 достигла порога чувствительности тест-системы в 30 образцах (36,1%). Статистически достоверной корреляции между концентрацией FGF-2 и возникновением рецидива определено не было ($p>0,05$). Среднее значение FGF-2 во всех образцах составило $1,68\pm 2,96$ пг/мл (рис. 11).

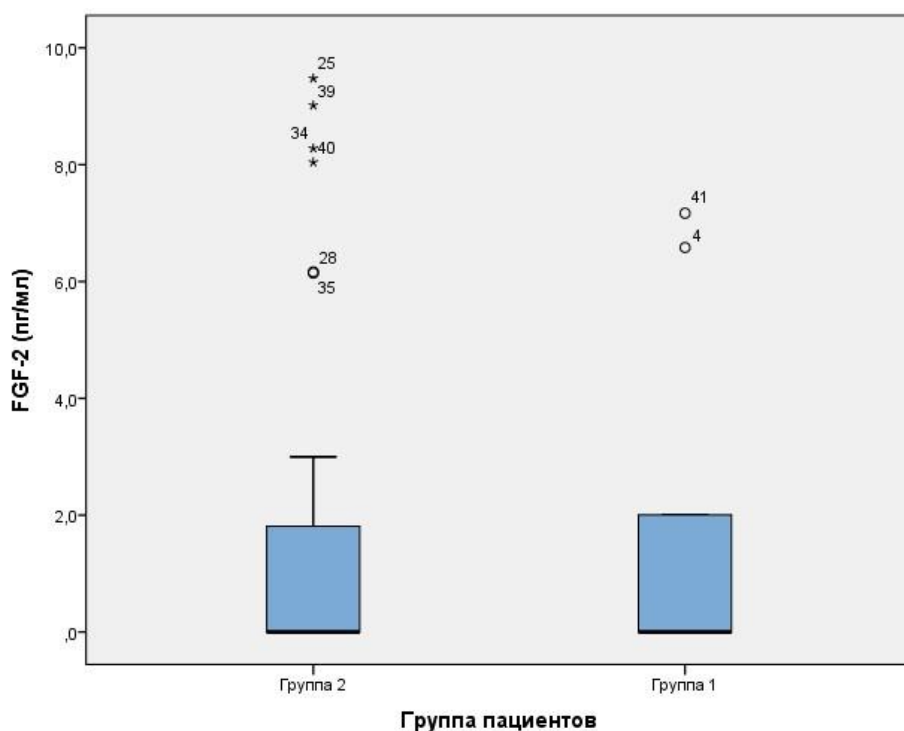


Рисунок 11. Концентрация FGF-2 в образцах слизистой оболочки полости носа двух групп пациентов.

Концентрация цитокина CTGF достигла порога чувствительности в 76 образцах (91,5%). У 9 из 10 пациентов группы 1 концентрация CTGF в образцах слизистой оболочки полости носа превышала средние значения концентрации в группе пациентов 2. Корреляция между уровнем CTGF и рубцовым заращением соустья после дакриоцисториностомии была признана статистически достоверной ($p<0,05$) (рис. 12).

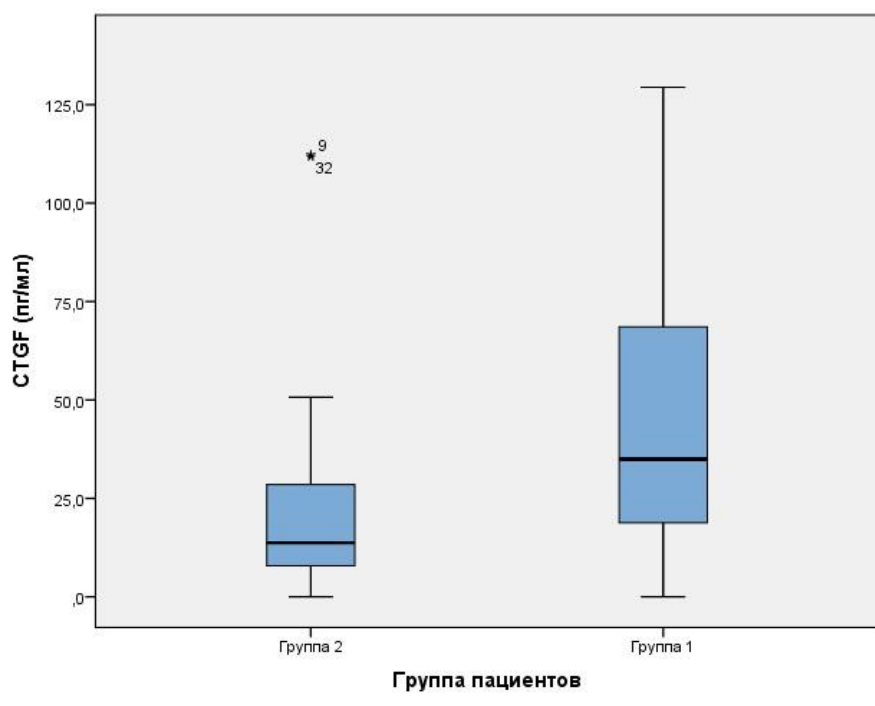


Рисунок 12. Концентрация СТGF в образцах слизистой оболочки полости носа двух групп пациентов.

Концентрация цитокина TGF- β 1, TGF- β 2 была определена во всех образцах, TGF- β 3 – в 79 образцах (95,2%). Статистически достоверная корреляция между концентрацией данных цитокинов и возникновением рецидива отсутствовала ($p > 0,05$). Средняя концентрация TGF- β 1, TGF- β 2 и TGF- β 3 составила $4,36 \pm 2,12$ нг/мл, $44,08 \pm 28,67$ пг/мл и $138,45 \pm 142,26$ пг/мл соответственно (Рис. 13,14,15).

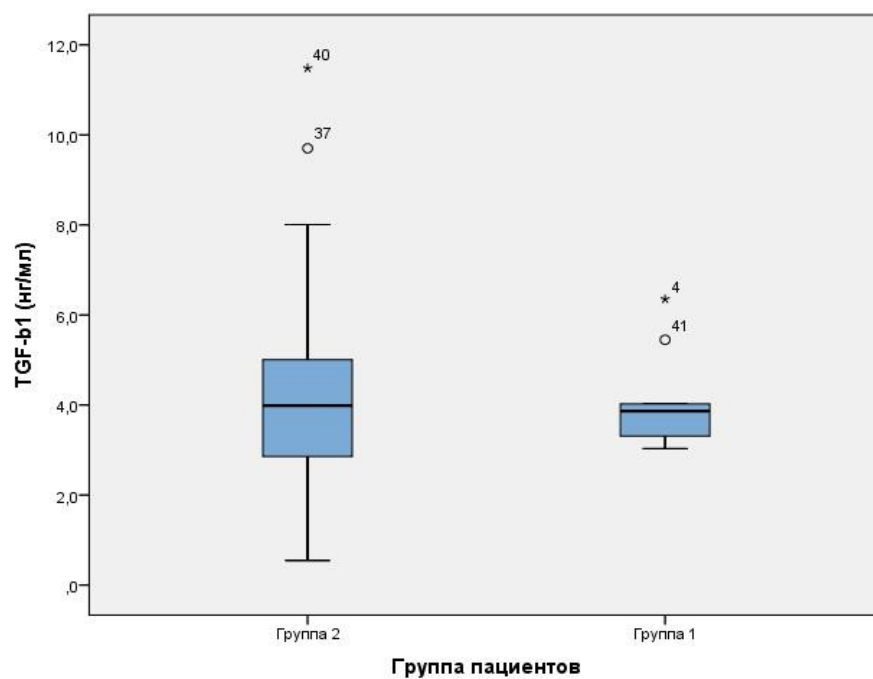


Рисунок 13. Концентрация TGF-β1 в образцах слизистой оболочки полости носа двух групп пациентов.

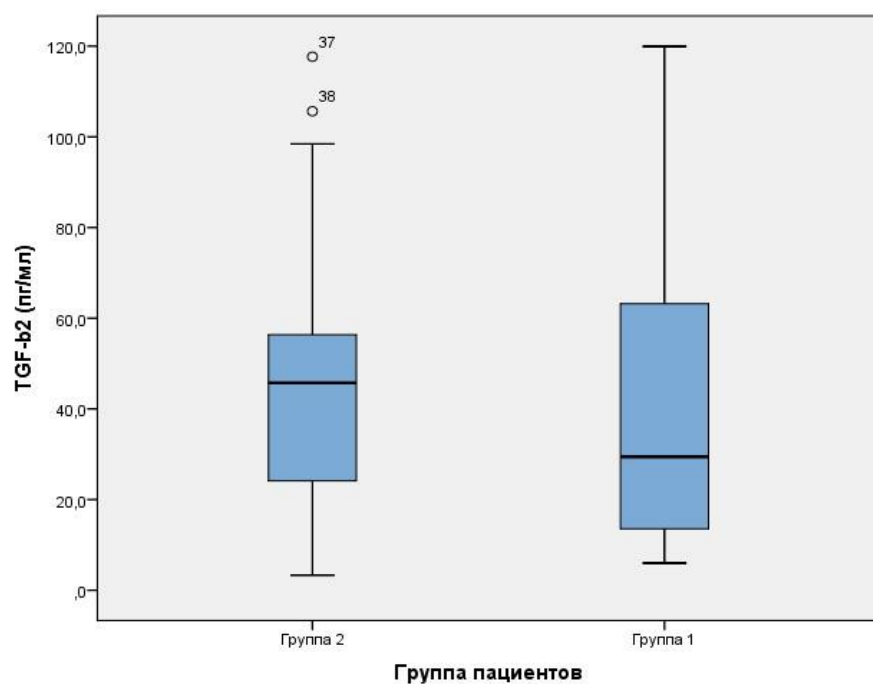


Рисунок 14. Концентрация TGF-β2 в образцах слизистой оболочки полости носа двух групп пациентов.

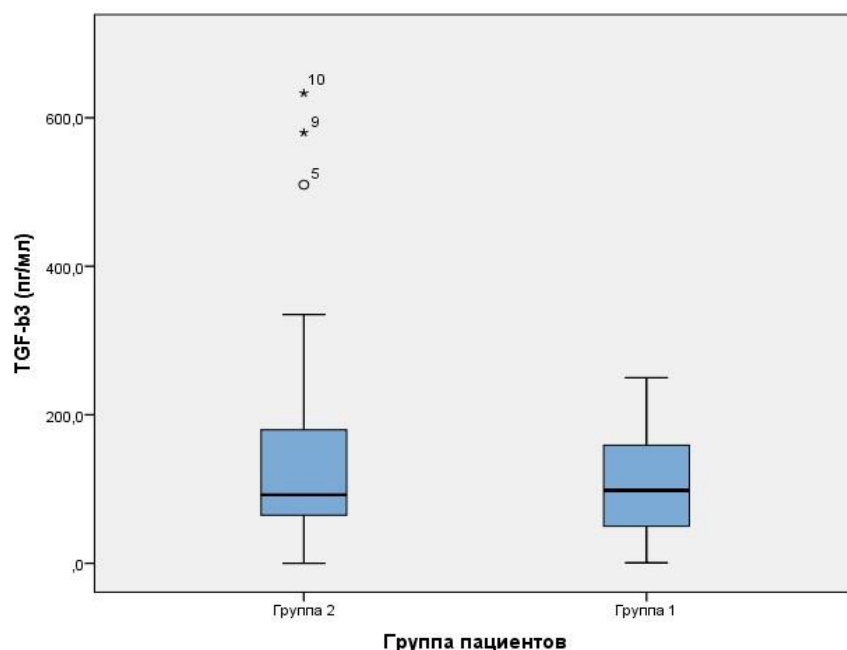


Рисунок 15. Концентрация TGF-β3 в образцах слизистой оболочки полости носа двух групп пациентов.

3.3. Результаты гистологического исследования образцов тканей полости носа пациентов с облитерацией вертикального отдела СОП и изучения миофибробластной инфильтрации.

Во всех образцах были выявлены воспалительная инфильтрация, субэпителиальный фиброз, сквамозная (плоскоклеточная) метаплазия поверхностного эпителия слизистой оболочки. Перечисленные изменения являются признаком длительно протекающего воспаления в слизистой оболочке полости носа.

Положительно окрашенные по α-SMA клеточные элементы были обнаружены во всех исследованных образцах тканей. Среднее количество α-SMA-позитивных клеточных элементов во всех образцах составило 4447 ± 1481 . Средний КХВ – 6,17.

Средний КХВ для образцов слизистой оболочки полости носа, полученных у пациентов группы 1 составил 8,33. Диапазон значений КХВ в данной группе пациентов составил от 7 до 9. Выраженный фиброз наблюдали во всех образцах тканей, полученных у пациентов группы 1. Ему также

сопутствовала выраженная инфильтрация клеточными элементами, имеющими положительное окрашивание по α -SMA (Рис. 16).

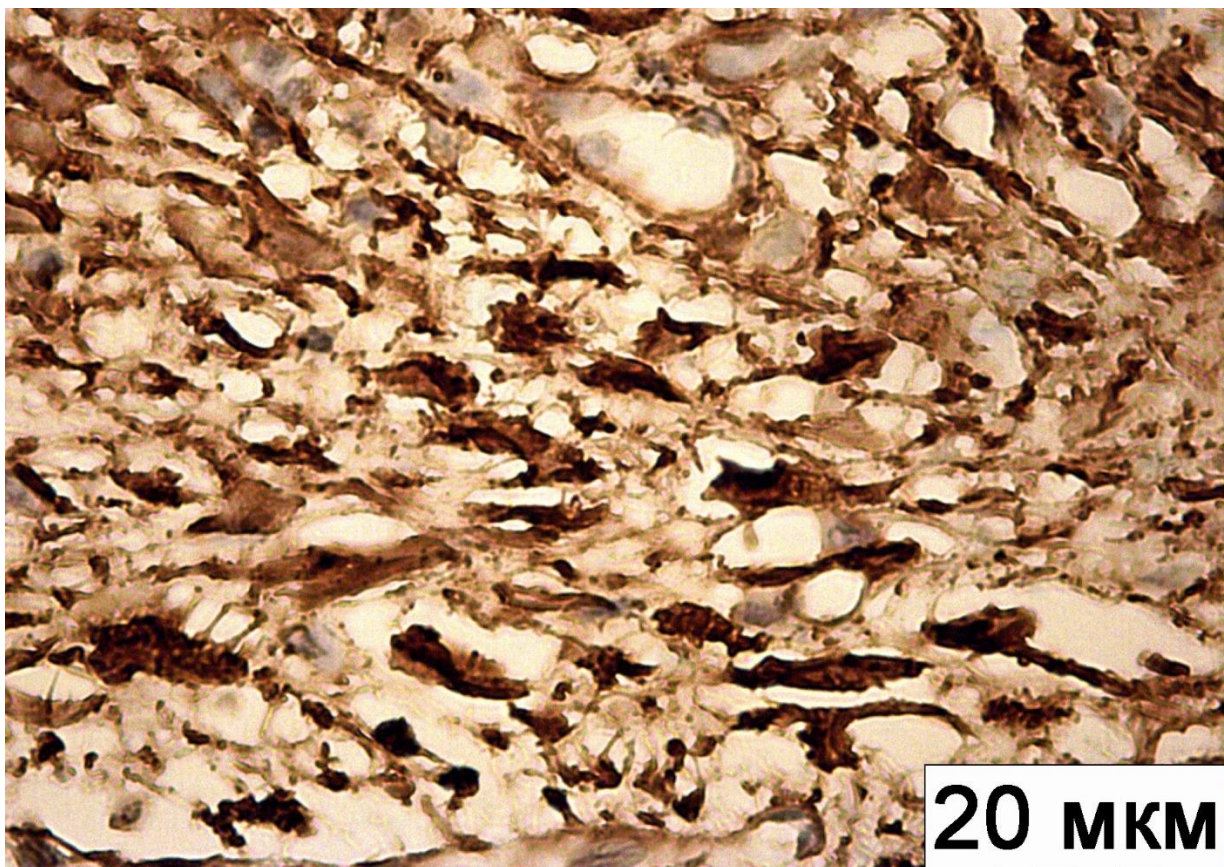


Рисунок 16. Выраженная миофибробластная инфильтрация в слизистой оболочке полости носа. Докрашивание гематоксилином Майера. Увеличение $\times 250$.

Для образцов слизистой оболочки полости носа, полученных у пациентов группы 2, была характерна меньшая, чем у пациентов группы 1, выраженность воспалительной инфильтрации и сквамозной метаплазии поверхностного эпителия, а также меньшая инфильтрация α -SMA-положительными клеточными элементами (Рис. 17). Средний КХВ для данной группы пациентов составил 5,72, диапазон значений КХВ – от 4 до 8.

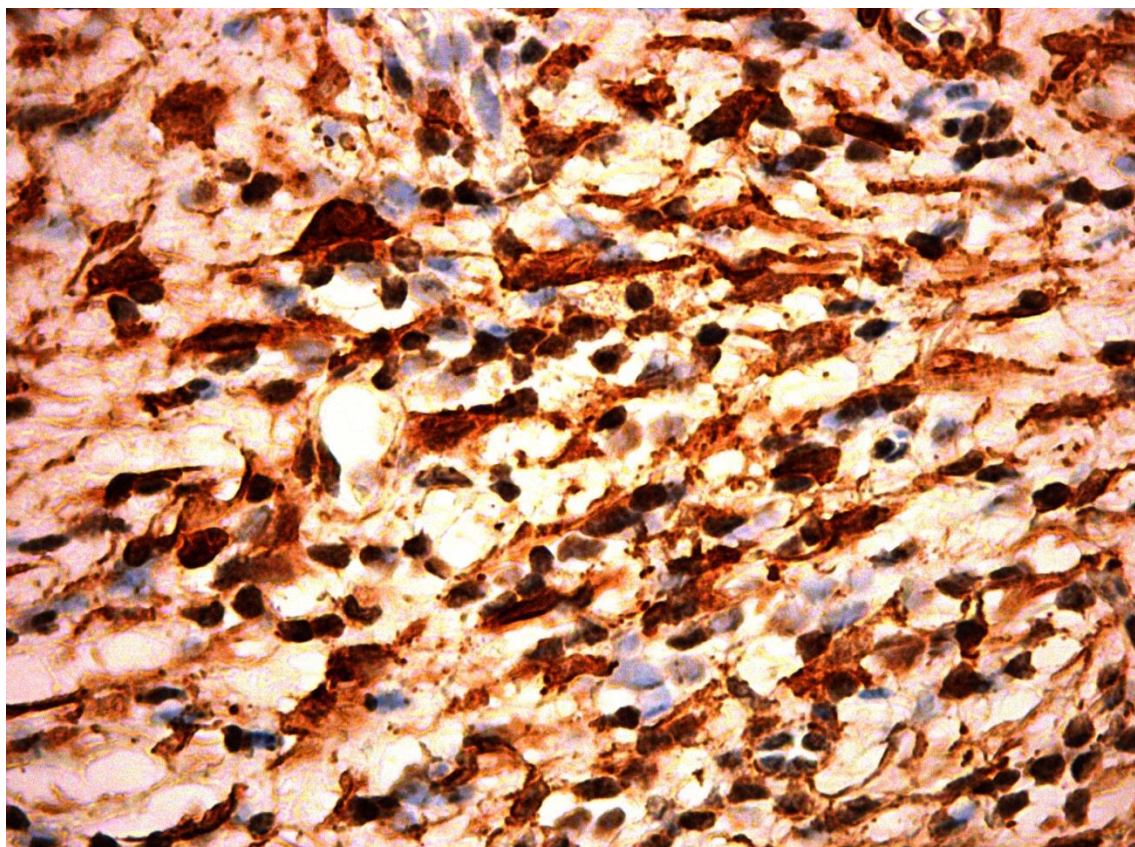


Рисунок 17. Умеренная миофибробластная инфильтрация в слизистой оболочке полости носа. Докрашивание гематоксилином Майера. Увеличение x250.

Количественная характеристика миофибробластной инфильтрации представлена в **табл. 6**. Корреляционная зависимость умеренной силы (0,392) между количеством α -SMA-позитивных клеточных элементов и возникновением рецидива дакриоцистита была статистически достоверной ($p < 0,05$) (**Рис. 18**).

Таблица 6. Количественная характеристика миофибробластной инфильтрации в образцах слизистой оболочки полости носа

Группа пациентов	N	Количество α -SMA-положительных клеточных элементов	Стандартное отклонение	p*
1	10	6026,38	1944,29	0,02
2	73	4120,39	1160,08	

* - согласно коэффициенту ранговой корреляции Спирмена

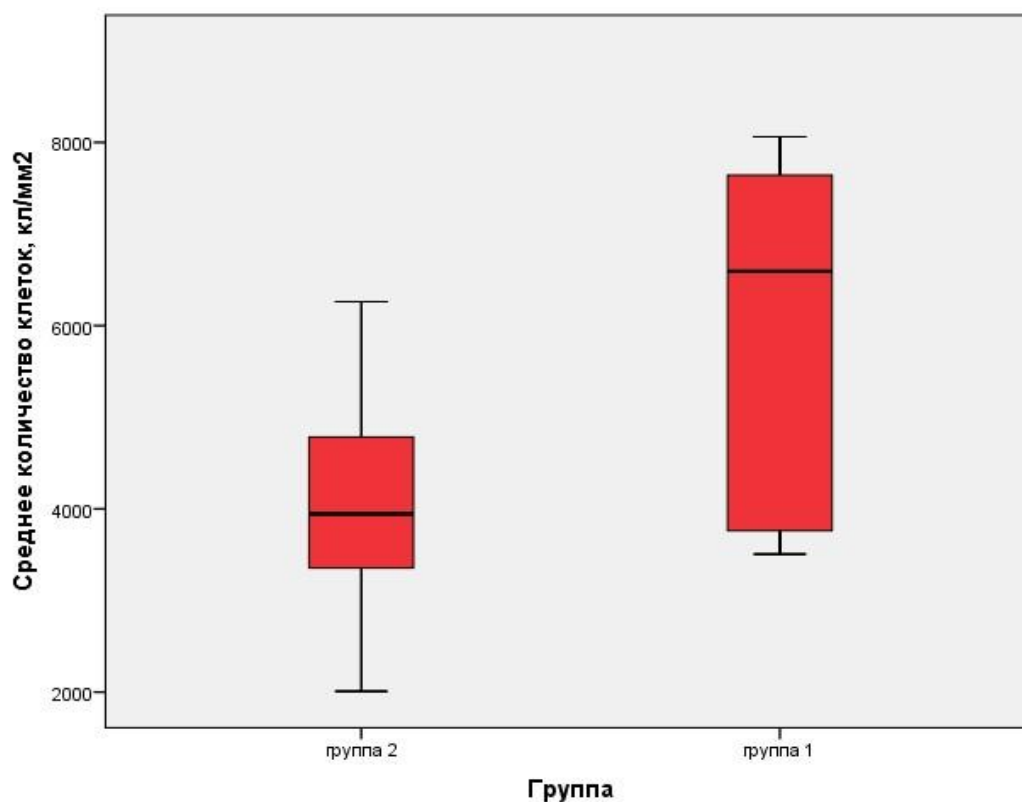


Рисунок 18. Количество α -SMA-положительных клеточных элементов в образцах слизистой оболочки полости носа.

3.4. Результаты изучения эффективности и безопасности антифибротического препарата Пирфенидон на клеточной культуре фибробластов слизистой оболочки полости носа.

Фибробласты начинали мигрировать из эксплантов и адгезироваться к пластику на 5 сутки культивирования, клетки имели характерную веретеновидную форму (*Рис. 19*).

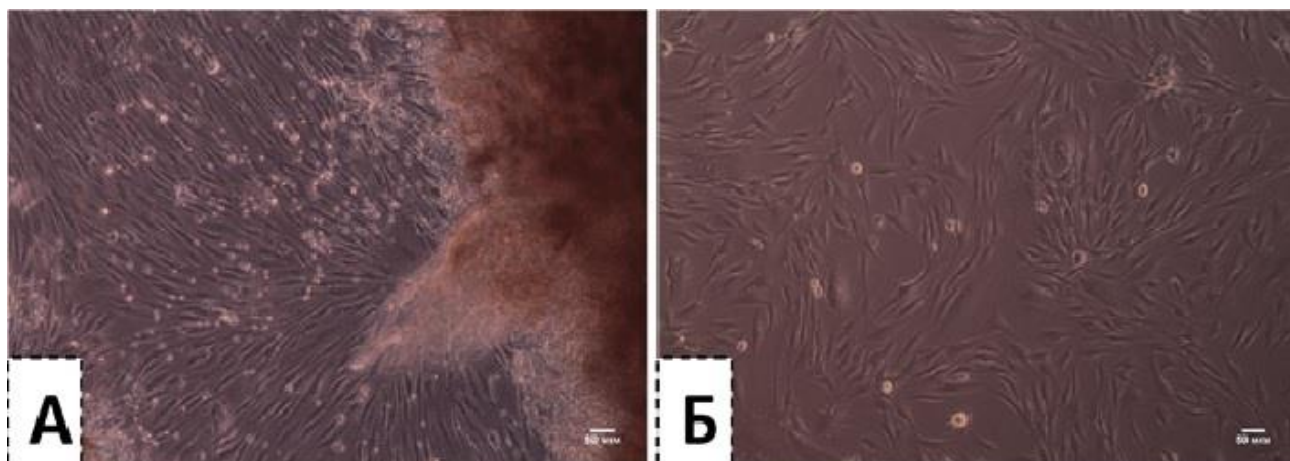


Рисунок 19. Миграция фибробластов из эксплантов.

А - культура фибробластов на 1 пассаже, экспланты удалены

Б - Фазово-контрастная микроскопия, Zeiss Axio Vert.A1, отрезок: 50 мкм.

Гистологический анализ подтвердил, что полученные клетки экспрессируют специфические маркеры фибробластов – виментин и CD90 (*Рис. 20*).

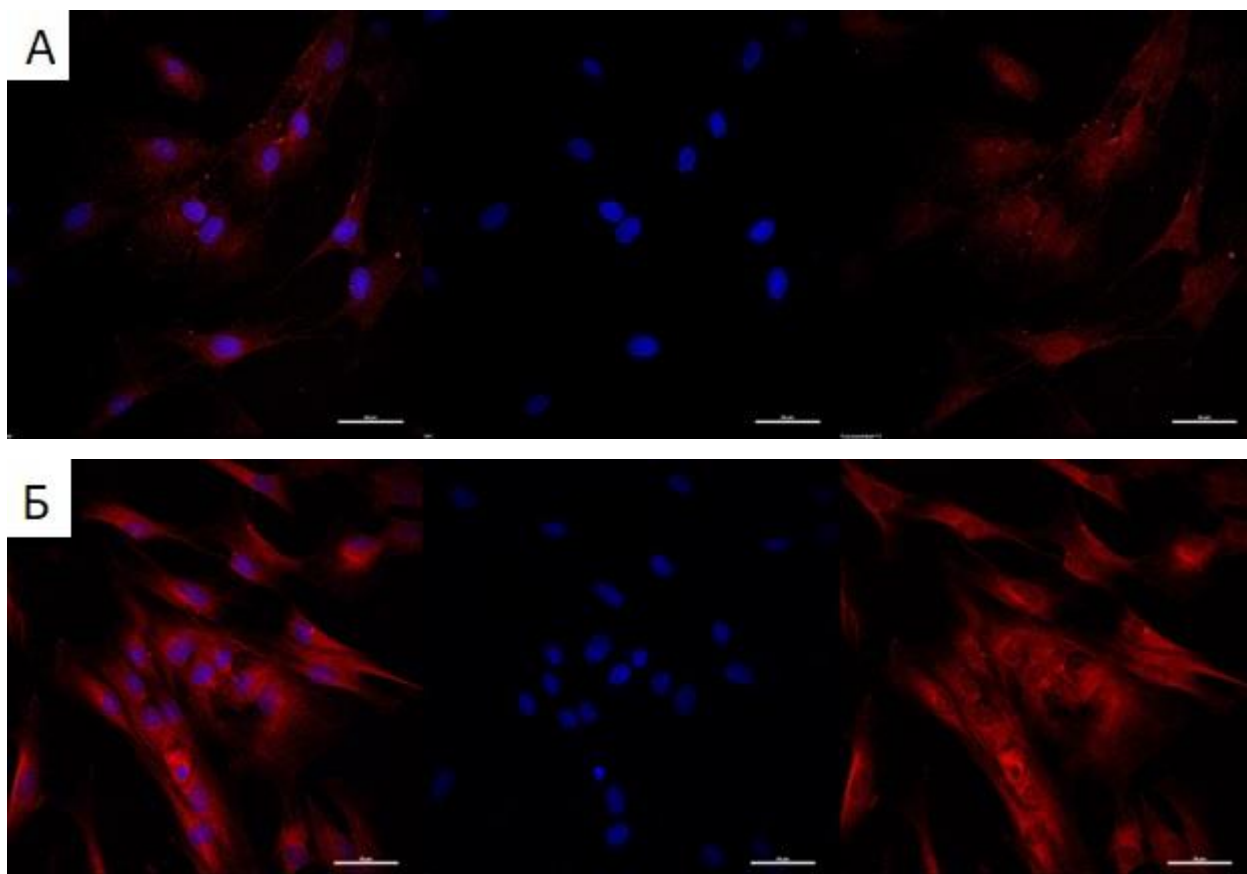


Рисунок 20. Иммуноцитохимическое окрашивание CD90 и виментина в культуре фиксированных фибробластов.

А - Первичномеченные антитела CD90-PE (Miltenyi Biotec, 1:11) для визуализации CD90 (красная флуоресценция).

Б - Для визуализации виментина использовали первичные моноклональные антитела против виментина (Abcam, 1:40) и вторичные антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с флуоресцентной меткой Alexa555 (Invitrogen, 1:750), (красная флуоресценция). Ядра клеток окрашены DAPI (Invitrogen, 1:400) (синяя флуоресценция). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия (Nikon A1). Отрезок: 50 мкм.

Исследуемый препарат добавляли к клеткам в концентрациях 0,01 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,2 мг/мл, 0,3 мг/мл и 0,5 мг/мл. Доля жизнеспособных клеток по истечении 24 часов инкубации при указанных концентрациях препарата составила 100%, 97,1%, 92,3%, 85,7% и 76,4% соответственно; после 48 часов инкубации – 100%, 86,1%, 86,2%, 88,4% и 81,1% соответственно. Зависимость процента погибших клеток от концентрации препарата представлена на **рис. 21**. Полученные результаты позволили сделать заключение, что исследуемый препарат обладает низкой степенью цитотоксичности.

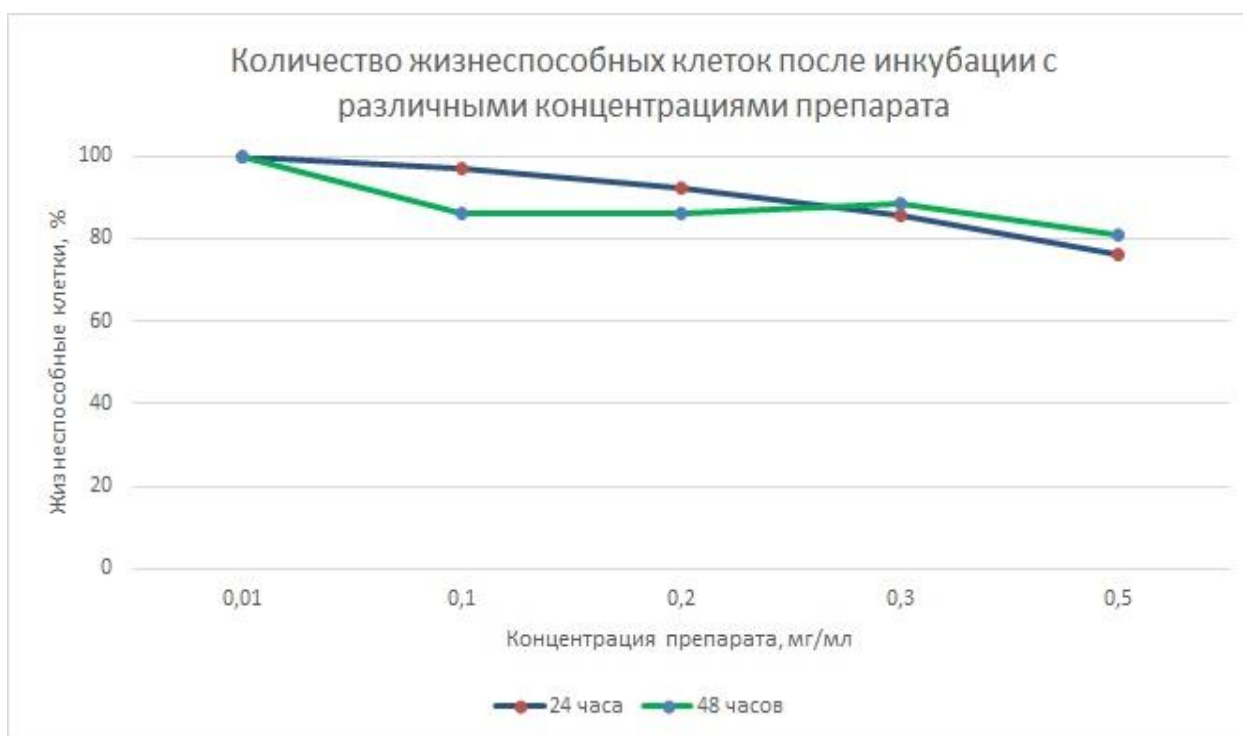


Рисунок 21. Количество жизнеспособных клеток после инкубации с различными концентрациями препарата Пирфенидон.

Было исследовано влияние двух концентраций препарата Пирфенидон (0,15 мг/мл и 0,3 мг/мл) на восстановление монослоя фибробластов после повреждения. В контрольной группе после 24 часов инкубации восстановление клеточного монослоя произошло практически полностью (на $84,88 \pm 4,80\%$). В опытных лунках монослой практически не восстановился. Рост монослоя в группах с добавлением 0,15 мг/мл препарата составил $8,26 \pm 6,09\%$. При культивации с 0,3 мг/мл Пирфенидона было отмечено незначительное увеличение, а не уменьшение ширины поврежденного участка монослоя, которое составило $2,10 \pm 2,69\%$. Изменение ширины поврежденного участка в каждой из групп статистически достоверно отличалось в сравнении с другими группами ($p < 0,05$). Сравнительные данные о ширине поврежденного участка через 24 часа культивирования с различными концентрациями препарата представлены на **рис. 22 и 23**.

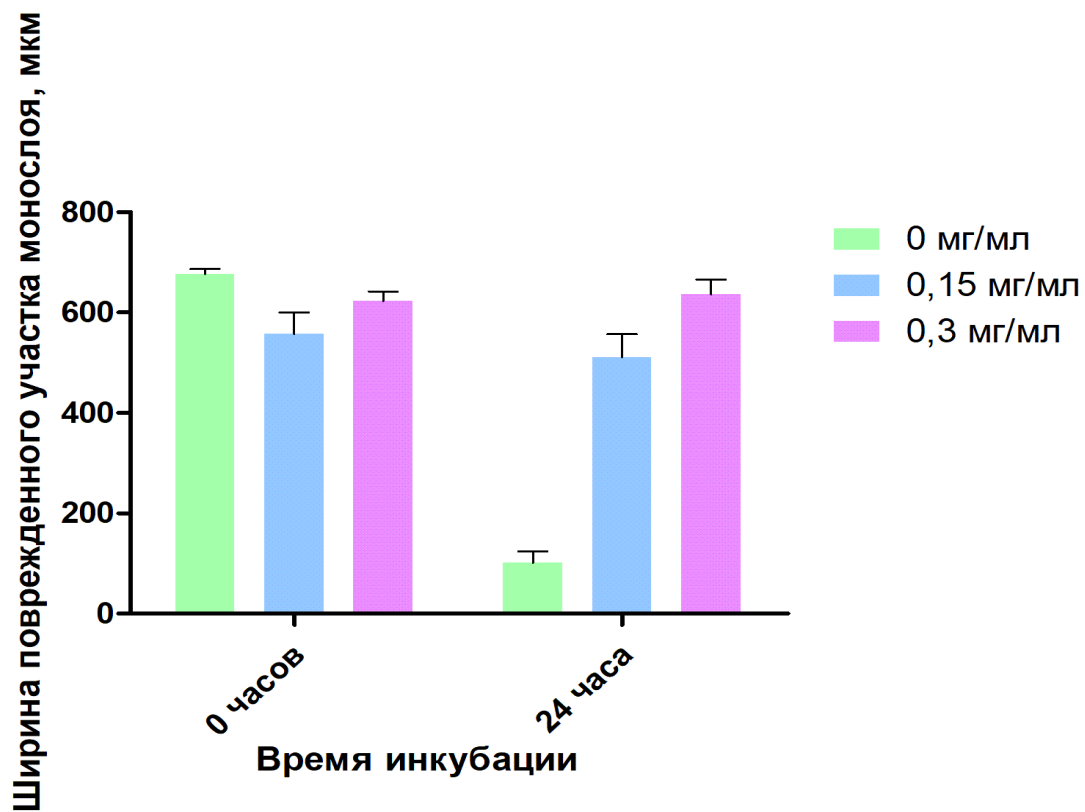


Рисунок 22. Зависимость ширины поврежденного участка монослоя от концентрации препарата Пирфенидон после 24 часов инкубации с клетками.

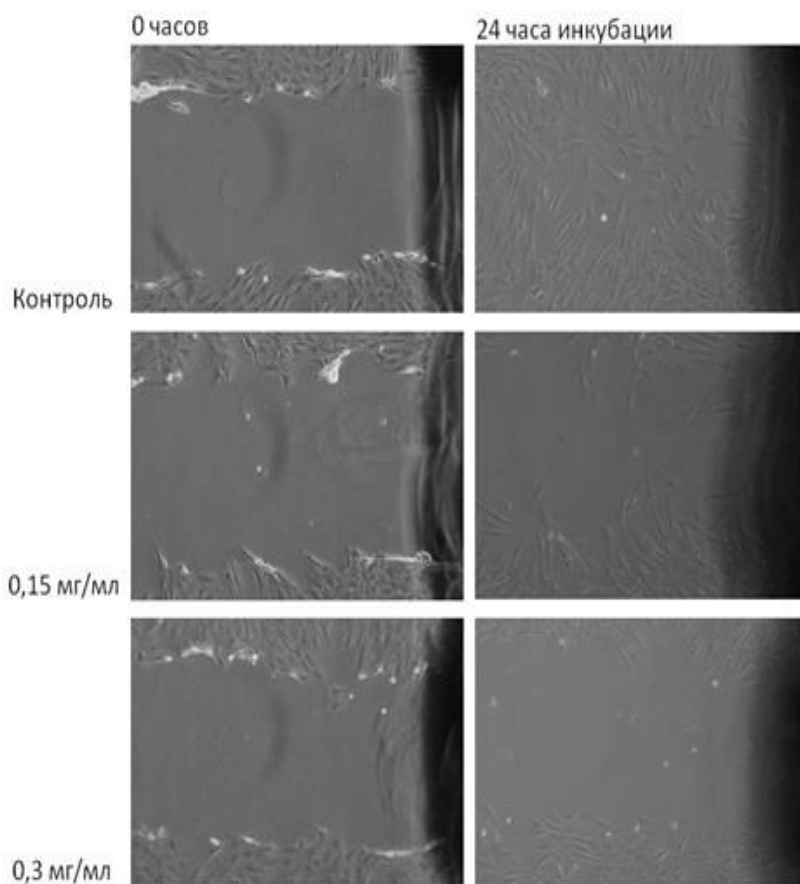


Рисунок 23. Пирфенидон ингибирует восстановление монослоя фибробластов. Данные фазово-контрастной микроскопии.

3.5. Результаты изучения эффективности и безопасности антифибротического препарата Пирфенидон на экспериментальной модели дакриоцисториностомии.

Из 18 включенных в эксперимент животных положительный результат оперативного вмешательства на момент вывода из эксперимента наблюдали у 14 (77,7%). У 4 кроликов контрольной группы, выведенных из эксперимента на 14 и 28 день после оперативного вмешательства, наблюдали неблагоприятный исход ДЦР, связанный с рубцовым заращением дакриостомы в промежутке между 7 и 28 днем послеоперационного наблюдения (по данным промывания СОП). Благоприятный исход ДЦР наблюдали у всех животных, получавших инъекции Пирфенидона в концентрациях 0,15 мг/мл и 0,3 мг/мл вне зависимости от времени вывода из эксперимента, а также у 2 кроликов контрольной группы, выведенных из эксперимента на 7 день после оперативного вмешательства.

При гистологическом исследовании образцов слизистой оболочки полости носа, полученных у лабораторных животных во всех образцах отмечали явления фиброза, наиболее выраженные в группе 3 на 14 и 28 день после ДЦР, и явления воспалительной инфильтрации, наиболее выраженные в образцах всех групп животных, полученных на 7 день после хирургического вмешательства (**Рис. 24, 25**).

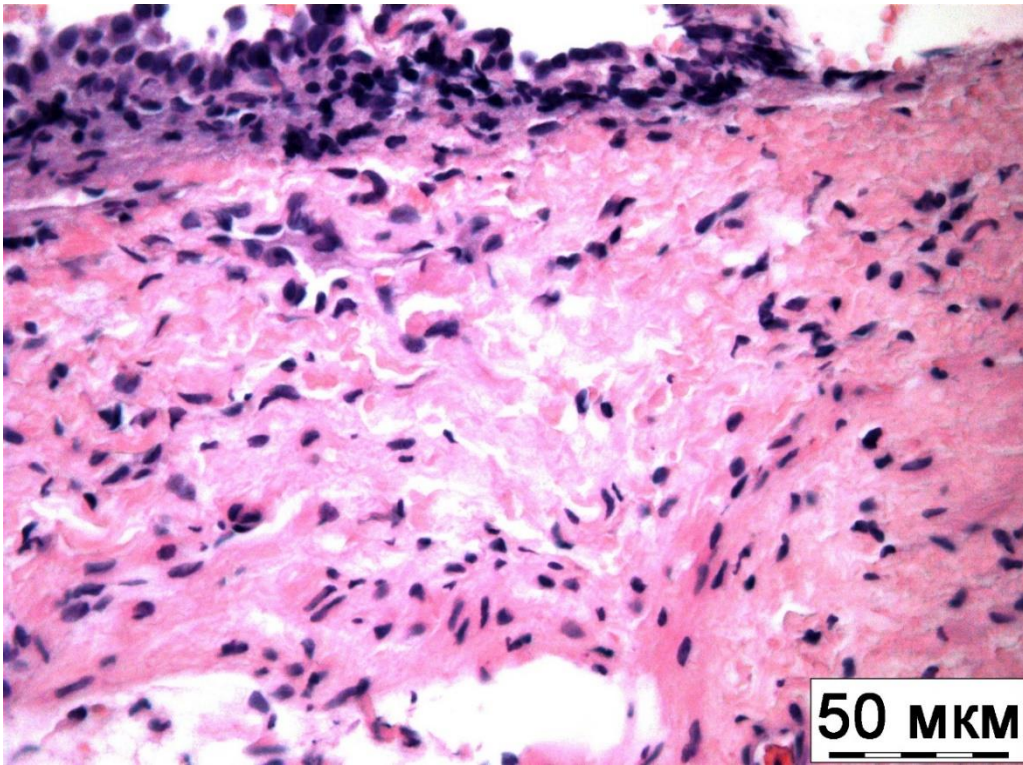


Рисунок 24. Низкая интенсивность фиброза и плотность миофибробластов в субэпителиальной ткани.

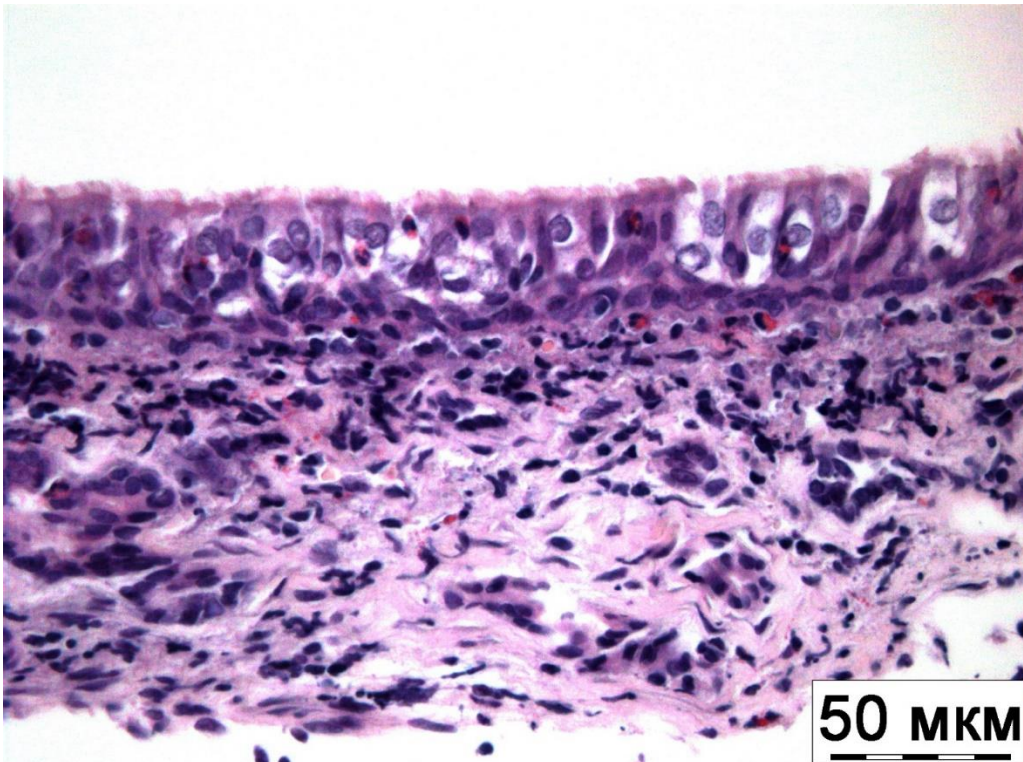


Рисунок 25. Высокая интенсивность фиброза и плотность миофибробластов в субэпителиальной ткани.

Средние значения количества клеточных элементов, положительно окрашенных по α -SMA в образцах, полученных от лабораторных животных, представлены в **табл. 7**. Количественная характеристика миофибробластной инфильтрации для группы 1 и группы 2 статистически достоверно отличалась от контрольной, а также между этими двумя группами ($p < 0,05$). Средние значения количества α -SMA-позитивных клеточных элементов в образцах также различались в зависимости от времени их получения, достигая пика на 14 день после вмешательства, что было особенно выражено в контрольной группе (**Рис. 26**).

Таблица 7. Количественная характеристика миофибробластной инфильтрации в образцах, полученных от лабораторных животных

Группа животных	N	Количество α -SMA-позитивных клеточных элементов	Стандартное отклонение	Количество неблагоприятных исходов ДЦР
Группа 1	6	4811,83	357,56	0
Группа 2	6	4216,67	90,65	0
Группа 3 (контрольная)	6	6735,00	941,41	4 (66,6%)

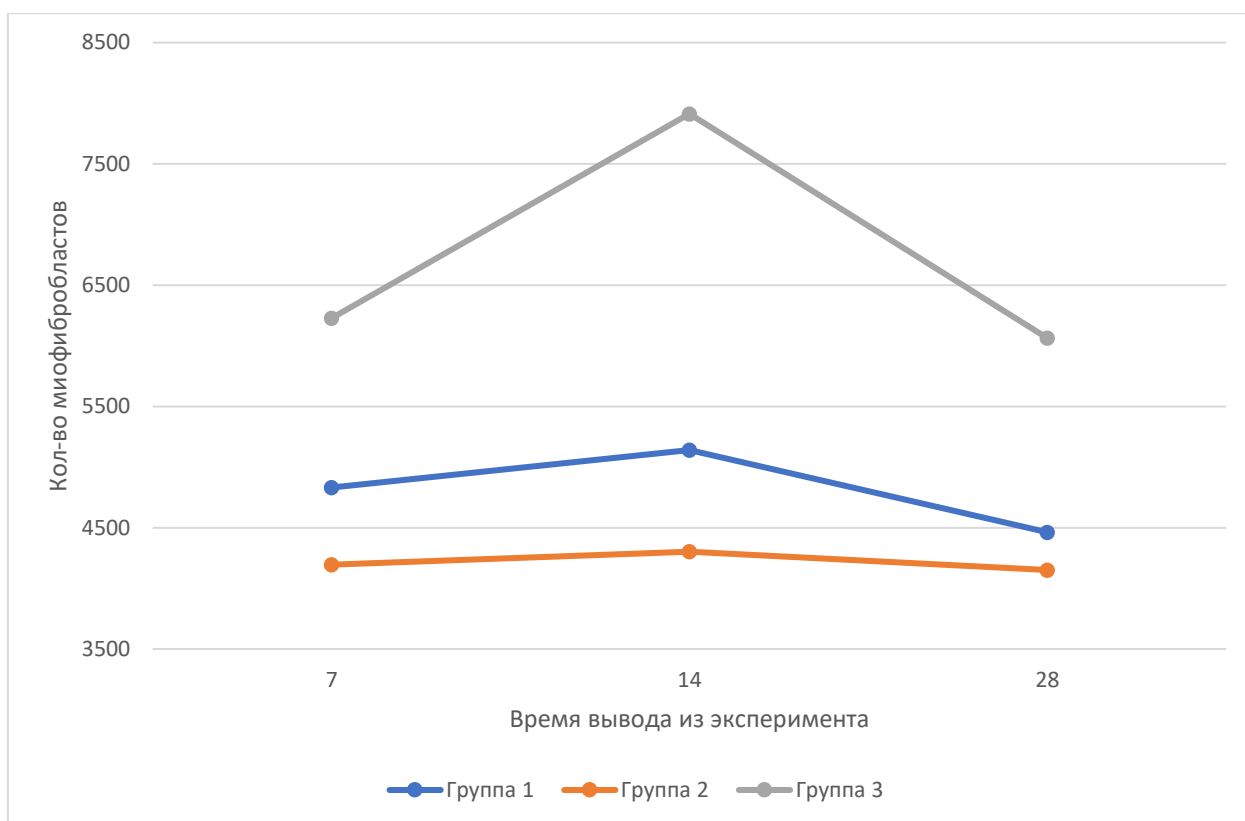


Рисунок 26. Динамика количества α -SMA-позитивных клеточных элементов в зависимости от времени забора образца слизистой оболочки полости носа.

Заключение

В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что дакриоцисториностомия является основным и наиболее результативным методом лечения облитерации вертикального отдела СОП. Однако частота рецидива при данном вмешательстве достигает 16% случаев, независимо от применяемого подхода: наружного или эндоназального. Общеизвестным остается мнение, что рубцовые изменения в области вмешательства приводят к рецидиву заболевания после проведенной операции и не позволяют получить необходимый результат.

По данным настоящего исследования благоприятный исход ЭЭДЦР был получен у 86,3% пациентов, что соответствует сведениям об эффективности этого хирургического вмешательства, полученным в ходе исследований других авторов. Рубцовое заращение дакриостомы в большинстве случаев было выявлено в период с 1 до 6 месяцев после операции, то есть после наступления фазы ремоделирования, основными агентами которой являются миофибробласты. Таким образом, представляется, что именно эти клетки вызвали рубцовое заращение дакриостомы у всех пациентов группы 1.

Нами была изучена взаимосвязь между неблагоприятным исходом ЭЭДЦР и медиаторами фиброза FGF-2, оказывающим антифибротическое действие, и TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, оказывающими профибротическое действие. Учитывая, что корреляционной зависимости между этими факторами и неблагоприятным исходом ЭЭДЦР выявлено не было, можно сделать вывод, что их исходная дооперационная концентрация в ткани слизистой оболочки полости носа не оказывает влияния на исход хирургического вмешательства. Тем не менее, это не говорит о том, что данные факторы не влияют на течение процесса фиброза при заживлении в области дакриостомы. Руководствуясь данными ряда исследований, можно предположить, что пик секреции TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 наступает после

оперативного вмешательства [49,200,211]. Кроме того, концентрация TGF- β 1, полученная в нашем исследовании, может в неполной мере отражать реальную активность этого фактора, так как система детекции при ИФА обнаруживает как активный «свободный» TGF- β 1, так и неактивный связанный с LAP. Таким образом, рубцовое заращение дакриостомы не связано с избыточной концентрацией TGF- β в ткани на момент ЭЭДЦР, но скорее с другими факторами, облегчающими активацию основных медиаторов фиброза или избыточно усиливающих их секрецию после повреждения, связанного с хирургическим вмешательством.

К таким факторам может относиться CTGF. CTGF – один из профибротических медиаторов, оказывающих действие на миофибробласты не напрямую, а опосредованно [98]. В процессе заживления раны CTGF способствует активации латентного TGF- β 1, связываясь с α v-интегринами [120,208,223,227]. Кроме того, CTGF стимулирует пролиферацию фибробластов, основных клеток-предшественников миофибробластов [120]. Таким образом, CTGF опосредованно стимулирует активность миофибробластов, как облегчая активацию основного медиатора фиброза TGF- β 1, так и предоставляя достаточное количество клеток-предшественников для трансформации под действием TGF- β 1 в миофибробласты.

Ряд исследователей обращали внимание на роль CTGF в патологических процессах, связанных с фиброзом, в глазном яблоке. Так I. Klaassen и соавт. [112] рассмотрели роль CTGF в диабетической ретинопатии. По мнению авторов, данный медиатор обеспечивает переход от фазы неоваскуляризации к фиброзу, характерному для поздних стадий патогенеза заболевания. В. Ма и соавт. [131] изучали влияние CTGF на развитие вторичной катаракты и пришли к выводу, что данный медиатор ускоряет развитие помутнения задней капсулы хрусталика и усиливает его интенсивность. С.С. Tsai и соавт. [198] пришли к аналогичному выводу, исследуя роль CTGF в TGF- β -

индуцированном фиброзе при болезни Грейвса. Наконец, CTGF рассматривается как один из основных медиаторов фиброза при неблагоприятном исходе хирургии глаукомы [56,121]. Все перечисленные авторы сделали вывод о том, что CTGF может быть выбран в качестве цели для терапевтического воздействия с целью предотвращения или ослабления фиброза при перечисленных патологических состояниях.

Полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют о связи повышенной концентрации CTGF в слизистой оболочке полости носа на момент операции с рубцовым заращением дакриостомы. Представляется вероятным, что изначально накопленный в ткани CTGF облегчает активацию TGF- β после ЭЭДЦР и таким образом запускает порочный круг стимуляции образования миофибробластов. В свою очередь избыточная активность миофибробластов приводит к заращению дакриостомы рубцовой тканью.

Данные результаты, а также результаты гистологического анализа образцов слизистой оболочки полости носа, полученные в ходе нашего исследования поддерживают гипотезу о связи длительно существующего хронического воспаления в слизистой оболочке полости носа с неблагоприятным исходом ДЦР [36,75,148,156,183].

Несмотря на то, что явления хронического воспаления в слизистой оболочке полости носа в целом сопровождают течение облитерации вертикального отдела СОП, что было подтверждено в ходе настоящего исследования, по наблюдениям ряда авторов интенсивность данного процесса также влияет и на эффективность хирургического лечения [75,148,156,183]. Chakrabarti S. и соавт. [36] предложили оценивать интенсивность хронического воспаления с целью прогнозирования результатов ДЦР на основании количественного коэффициента хронического воспаления (КХВ), который мы использовали и в этой работе.

Средний КХВ, полученный нами в образцах, составил 6,17, что соответствует умеренной степени хронического воспаления. Тем не менее, в группе 1 средний КХВ составил 8,33, что соответствует выраженной степени хронического воспаления, в то время как в группе 2 средний КХВ составил 5,72, что соответствует умеренной степени хронического воспаления. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что более высокая выраженность хронического воспаления в слизистой оболочке полости носа до хирургического вмешательства ассоциирована с неблагоприятным исходом ДЦР.

Конкретный механизм связи между рубцовым заращением дакриостомы и хроническим воспалением в полости носа остается неясен. Тем не менее, учитывая, что хроническое воспаление характеризуется чередованием процессов альтерации и пролиферации, можно предположить, что при этом процессе в ткани накапливается избыточное количество медиаторов, оказывающих стимулирующее действие на пролиферацию, к которым относится и CTGF. Интенсивность гистологических признаков пролиферации в ткани, таких как сквамозная метаплазия и субэпителиальный фиброз, свидетельствует о количестве прошедших циклов альтерации-пролиферации и, таким образом, о давности данного хронического воспаления. Кроме того, вероятнее всего именно эти изменения являются основным гистологическим признаком активности CTGF в слизистой оболочке полости носа. В схематичном виде характер взаимодействия CTGF и последовательности «воспаление-ремоделирование-фиброза» представлен на **рис. 27**.

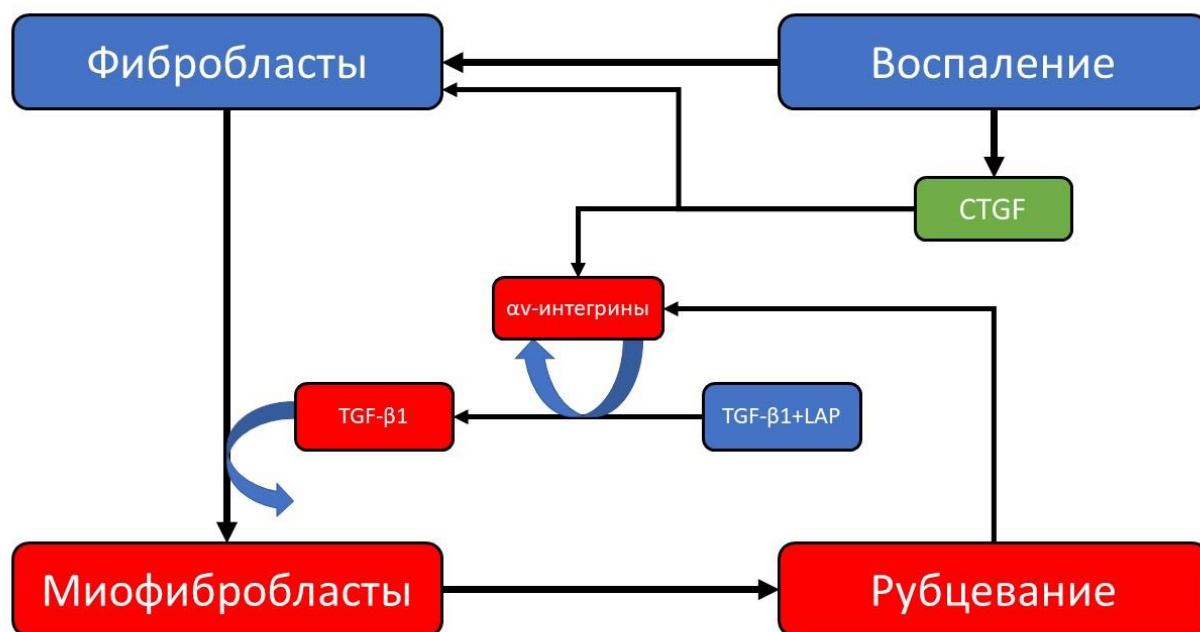


Рисунок 27. Схема взаимосвязи воспалительных изменений в слизистой оболочке полости носа, выявленных в настоящем исследовании, и избыточного рубцевания.

CTGF – фактор роста соединительной ткани; *TGF-β1* – изоформа 1 трансформирующего фактора роста; *TGF-β1+LAP* – неактивный комплекс изоформы 1 трансформирующего фактора роста, ассоциированный с пропептидом латентности.

Помимо гистологического анализа образцов слизистой оболочки полости носа в настоящем исследовании нами было применено специфическое окрашивание по α -SMA с целью выявления миофибробластов – клеток, считающихся основными «виновниками» избыточного рубцевания в организме [80,81,168]. Положительное окрашивание по α -SMA при гистологическом исследовании является характерным отличием миофибробластов от фибробластов, но может быть характерно и для других типов клеток, обладающих сократительной активностью, наиболее распространенными из которых являются гладкие миоциты [81]. В слизистой оболочке полости носа такими клетками являются гладкие миоциты сосудистой стенки, поэтому подсчет α -SMA-положительных клеточных элементов проводили на отдалении от крупных сосудов. Кроме того, подсчет

проводили в нескольких полях зрения, на основании которого вычисляли среднее значение для каждого образца. Однако, необходимо отметить, что даже принятые нами меры для стандартизации подсчета α -SMA-положительных клеточных элементов допускают незначительные отклонения полученных нами данных от истинного значения миофибробластной инфильтрации.

В настоящем исследовании нами была выявлена корреляционная зависимость умеренной силы между количественной характеристикой миофибробластной инфильтрации в слизистой оболочке полости носа и вероятностью неблагоприятного исхода ДЦР. Так, среднее количество α -SMA-положительных клеточных элементов в образцах, полученных у пациентов группы 1 было значительно выше, чем в образцах слизистой оболочки полости носа пациентов группы 2. На основании этого можно сделать вывод о том, что бóльшая выраженность хронического воспаления ассоциируется с бóльшей «фоновой» активностью миофибробластов. Такая активность также является вероятной причиной формирования гистологических признаков длительно протекающего хронического воспаления, описанных выше. Активность этих клеток в слизистой оболочке полости носа может поддерживаться как выявленной в нашем исследовании повышенной активностью CTGF, так и действием других медиаторов, активность которых повышается в условиях воспаления, не изученных в настоящем исследовании. Кроме того, активность миофибробластов также регулируется механическим напряжением в ткани – фактором, который невозможно объективно исследовать *in vivo* [113,205].

На основании полученных нами данных можно сделать вывод о взаимосвязи всех выявленных изменений в слизистой оболочке полости носа, а также об их влиянии на исход хирургического вмешательства при облитерации вертикального отдела СОП. Высокая концентрация CTGF и явления выраженного хронического воспаления в ткани создают повышенную

склонность слизистой оболочки полости носа к избыточному рубцеванию, выраженную в высоких значениях количественной характеристики миофибробластной инфильтрации. В результате наступления повреждения тканей при формировании дакриостомы процесс заживления ран на фоне таких изменений протекает с пролонгированной фазой ремоделирования и избыточным рубцеванием. В свою очередь это способствует избыточному образованию рубцовой ткани и закрытию просвета дакриостомы.

В настоящее время в клиническую практику внедрено несколько методов предотвращения зарращения дакриостомы после ДЦР. К ним относится: модификации хирургической техники выполнения отдельных этапов операции, интубация просвета дакриостомы лагримальными имплантатами различной конструкции, интраоперационное применение Митамицина С.

Существует множество модификаций методики выполнения ДЦР. Основными из них является выполнение ДЦР наружным доступом и эндоназальную эндоскопическую ДЦР, которую проводят через полость носа. Тем не менее, по данным исследований, значительной разницы в частоте рецидивов между этими двумя методиками выявлено не было [124]. В свою очередь модификациям подвергались и отдельные этапы этих хирургических вмешательств: формирование мукопериостального лоскута на боковой стенке полости носа в области проекции слезной ямки [165,199], формирование костного «окна» в боковой стенке полости носа [215,231], вскрытие слезного мешка и формирование дакриостомы [199,217]. Однако ряд исследователей обращают внимание на отсутствие значимых различий в частоте неблагоприятных исходов ДЦР при использовании различных модификаций хирургической техники [102,134].

Для интубации дакриостомы было предложено большое количество материалов, которые можно условно разделить на четыре группы:

абсорбирующие губки [123], марлевые турунды [2,141], трансканаликулярные стенты [162] и другие материалы [15,47]. Как правило, марлевые турунды и абсорбирующие губки применяют для сохранения положения фрагментов слизистой оболочки непосредственно после ДЦР, после чего материал извлекают из полости носа [19,102,199]. Ряд авторов также рекомендовал применение абсорбирующей губки в дополнение к трансканаликулярным имплантатам, «продевая» стент через губку с целью фиксации [102,133,199]. Тем не менее, часть исследователей считает, что использование гемостатических губок не уменьшает, а увеличивает риск заражения дакриостомы, так как вызывает локальную воспалительную реакцию в области контакта со слизистой оболочкой полости носа [5,72].

Несмотря на то, что первые лакримальные импланты были предложены для лечения патологии слезоотводящих путей еще в начале 20-ого века [66], широкое распространение они получили лишь после появления синтетических материалов, таких как силикон, обладающих биологической инертностью [78]. Интубация силиконовыми лакримальными имплантатами была многократно модифицирована различными авторами и предложена к использованию как при наружном, так и эндоназальном методе ДЦР [7,21]. В настоящее время интубация дакриостомы лакримальными имплантами воспринимается некоторыми хирургами как обязательный этап ДЦР [132]. Однако, помимо очевидного недостатка такого подхода в виде увеличения стоимости и длительности вмешательства, существует и ряд осложнений, связанных с интубацией слезоотводящих путей: повреждения роговицы, рассечение слезных канальцев, образование грануляций в области слезных канальцев и в полости носа, смещение и выпадение имплантата, местные воспалительные реакции глазной поверхности и слизистой оболочки полости носа и носовое кровотечение [83]. Кроме того, большое количество исследований не выявили значимой разницы между ДЦР, выполненными с интубацией дакриостомы и без нее [59,149]. К. Allen и соавт. [20] на основании

своего исследования высказали мнение, впоследствии поддержанное многими авторами, об отсутствии необходимости интубации дакриостомы при рутинной ДЦР. Наконец, не существует единого мнения о сроках экстубации дакриостомы. Несмотря на то, что большинство исследований рекомендуют удалять лакримальный имплант через 2 месяца после операции [11], ряд авторов рекомендовал продление срока ношения импланта до 6 месяцев и более [185,226]. Таким образом, интубация дакриостомы лакримальными имплантами может быть эффективна в определенных случаях, например при сопутствующей патологии слезных канальцев, но скорее всего не подходит для рутинного использования при ДЦР.

Применение Митомицина С – один из наиболее эффективных и перспективных методов предотвращения заращения дакриостомы из используемых в настоящее время. Противоопухолевый антибиотик Митомицин С обладает неспецифическим цитотоксическим действием и подавляет в том числе синтез коллагена, из которого формируется матрикс рубцовой ткани. Тем не менее, как уже было описано выше, как безопасность, так и эффективность препарата ставятся многими авторами под сомнением [220,238]. Кроме того, не существует единого мнения о необходимой дозировке и способе применения препарата.

Кроме того, необходимо отметить, что для оценки эффективности хирургического вмешательства авторы используют различные критерии и различные сроки послеоперационного наблюдения, что осложняет оценку реальной эффективности того или иного способа предотвращения рецидивов после ДЦР. Таким образом, можно сделать вывод об отсутствии «идеального» способа увеличения эффективности ДЦР, что обуславливает дальнейший поиск методов предотвращения рубцового заращения дакриостомы.

В настоящем исследовании нами была оценена потенциальная эффективность препарата Пирфенидон в предотвращении рубцевания

дакриостомы *in vitro* на клеточной культуре фибробластов полости носа и *in vivo* на экспериментальной модели ДЦР на лабораторных животных. Действие препарата основано на ингибировании экспрессии ряда профибротических цитокинов, таких как TGF- β 1 и CTGF [70,93]. Кроме того, в отличие от Митомицина С Пирфенидон не стимулирует, а подавляет апоптоз, так как является антиоксидантом и связывает активные формы кислорода, высокая активность которых является основным триггером апоптоза клеток в организме [61]. В этом различии и состоит главное преимущество Пирфенидона перед широко применяемым в настоящее время Митомицином С: клинический эффект Пирфенидона реализуется не за счет неспецифической цитотоксичности, а за счет прицельного воздействия на определенные профибротические факторы.

Это было подтверждено и в настоящем исследовании *in vitro*. Доля жизнеспособных клеток после культивации с различными концентрациями препарата отличалась незначительно и составила от 100% до 81,1% через 48 часов после добавления Пирфенидона, что позволило охарактеризовать токсичность препарата как низкую. В испытанных дозировках препарат также показал сходную эффективность в ингибировании восстановления монослоя фибробластов после повреждения, что позволяет оценить эффективность его антифибротического действия как высокую. В данном конкретном случае, вероятнее всего, ингибирование восстановления монослоя связано преимущественно с подавлением Пирфенидоном экспрессии CTGF, отвечающего за пролиферацию фибробластов в отсутствие TGF- β .

При исследовании на клеточной культуре более высокая концентрация препарата (0,3 мг/мл) вызвала не только угнетение пролиферации фибробластов, но и незначительно выраженное расширение поврежденного участка монослоя, что может быть связано с токсическим действием препарата. Тем не менее, в связи с общей низкой токсичностью препарата и слабо выраженным расширением поврежденного участка монослоя,

исследование на клеточной культуре не позволяет однозначно говорить о более низкой концентрации Пирфенидона (0,15 мг/мл) как о более безопасной и столь же эффективной. По этой причине в дальнейшем этапе исследования *in vivo* были использованы обе концентрации препарата.

Таким образом, исследование *in vitro* позволило подтвердить относительную безопасность и эффективность препарата для дальнейшего исследования на экспериментальной модели ДЦР.

В ходе исследования у лабораторных животных не было выявлено ни одного из наиболее часто встречающихся при системном применении у людей побочных эффектов Пирфенидона: кожных высыпаний, снижения аппетита, рвоты, анорексии, диареи, утомляемости [118]. Также на момент вывода из эксперимента ни у одного из животных не наблюдали местных реакций, свидетельствующих о цитотоксичности препарата. Это согласуется с данными нашего исследования на клеточной культуре и позволяет сделать вывод о безопасности применения препарата для профилактики послеоперационного заражения дакриостомы.

В контрольной группе животных рубцовое заращение дакриостомы наступало в период между 7 и 14 днем послеоперационного наблюдения, то есть в период наибольшей активности TGF- β -индуцированных миофибробластов [81]. Применение Пирфенидона в группах 1 и 2 предотвратило рубцовое заращение дакриостомы, по всей видимости, за счет воздействия препарата на экспрессию TGF- β и его кофакторов, таких как CTGF.

На основании анализа количественной характеристики миофибробластной инфильтрации в группах образцов, полученных у лабораторных животных на различных сроках наблюдения после экспериментальной ДЦР, можно сделать вывод о влиянии различных концентраций Пирфенидона на пролиферацию миофибробластов. В

контрольной группе среднее значение миофибробластной инфильтрации было значительно выше, чем в группе 1 и 2. Кроме того, в контрольной группе наблюдался более выраженный «пик» активности миофибробластов на 14 день после операции, что соответствует стандартному процессу заживления ран. Интересно, что в группах 1 и 2 применение Пирфенидона приводило как к снижению среднего количества α -SMA-позитивных клеточных элементов в любой точке наблюдения по сравнению с контрольной группой, так и к сглаживанию «пика» активности миофибробластов. Наиболее выраженное подавление пролиферации миофибробластов наблюдали в группе 2 (концентрация препарата 0,3 мг/мл), но учитывая одинаковый клинический эффект обеих концентраций на эффективность экспериментальной ДЦР и отсутствие местных и системных побочных эффектов в обеих группах лабораторных животных, сделать вывод о более предпочтительной концентрации препарата для применения при ДЦР не представляется возможным по результатам настоящего исследования.

На основании результатов настоящего исследования и данных литературных источников можно сделать вывод о том, что применение антифибротических препаратов, оказывающих влияние сразу на несколько элементов процесса патологического рубцевания, таких как Пирфенидон или Митомицин С, представляется более эффективным, чем воздействие на отдельные элементы селективными ингибиторами, такими как моноклональные антитела. Как следует из данных нашего исследования, повышенный уровень CTGF в слизистой оболочке полости носа до операции предрасполагает к более интенсивному фиброзу после ДЦР. Таким образом, для предотвращения рубцового зарастания дакриостомы в данной ситуации наиболее целесообразно будет применение препарата, оказывающего ингибирующее действие и на основной медиатор фиброза TGF- β , так и его кофактор CTGF, уже присутствующий в ткани.

Выводы

1. На основании изучения концентрации цитокинов, участвующих в процессе фиброза, сравнительного анализа результатов гистологического исследования образцов слизистой оболочки полости носа 83 пациентов (83 случая) с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей и результатов их хирургического лечения установлен ряд патогенетических факторов фибротизации дакриостомы после дакриоцистиностомии и определены возможные методы ее профилактики.
2. Оценка концентрации цитокинов, принимающих участие в процессе фиброза (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, FGF-2, CTGF) в образцах слизистой оболочки полости носа у 83 пациентов (83 случая) с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей позволила доказать, что концентрация цитокина CTGF у 10 пациентов (10 случаев) с заращением дакриостомы после эндоназальной эндоскопической дакриоцистиностомии статистически достоверно выше ($46,49 \pm 37,95$ пг/мл), чем у пациентов с положительным исходом эндоназальной эндоскопической дакриоцистиностомии ($22,12 \pm 26,41$ пг/мл) ($p=0,015$), что подтверждает влияние медиатора фиброза CTGF на исход оперативного лечения.
3. Проведенный корреляционный анализ между количественной характеристикой миофибробластной инфильтрации, полученной в результате гистологического исследования образцов ткани слизистой оболочки полости носа пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей и результатами их хирургического лечения показал, что у пациентов с заращением дакриостомы после эндоназальной эндоскопической дакриоцистиностомии миофибробластная инфильтрация статистически достоверно выше ($6026,38 \pm 1944,29$), чем у пациентов с положительным исходом

эндоназальной эндоскопической дакриоцисториностомии ($4120,39 \pm 1160,08$) ($p=0,02$), что объясняет патологическое заживление дакриостомы после вмешательства.

4. По данным гистологического исследования образцов ткани слизистой оболочки полости носа пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей была выявлена большая выраженность воспалительной инфильтрации, субэпителиального фиброза и сквамозной метаплазии поверхностного эпителия слизистой оболочки (признаки хронического воспаления) у пациентов с заращением дакриостомы после эндоназальной эндоскопической дакриоцисториностомии. Коэффициент хронического воспаления у данной группы пациентов был достоверно выше (средний коэффициент хронического воспаления – 8,33), чем у пациентов с положительным исходом эндоназальной эндоскопической дакриоцисториностомии (средний коэффициент хронического воспаления – 5,72), что подтверждает влияние хронического воспаления на результат хирургического лечения.
5. На основании изучения восстановления монослоя фибробластов после повреждения при исследовании на клеточной культуре тканей полости носа пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей *in vitro* определена наиболее эффективная доза антифибротического препарата Пирфенидон - 0,15 мг/мл и 0,3 мг/мл. При культивации с добавлением препарата в концентрации 0,15 мг/мл рост монослоя фибробластов составил $8,26 \pm 6,09\%$, при культивации с добавлением препарата в концентрации 0,3 мг/мл отмечено слабо выраженное увеличение раны монослоя фибробластов на $2,10 \pm 2,69\%$.
6. Доказана низкая степень токсичности препарата Пирфенидон в дозах 0,15 мг/мл и 0,3 мг/мл (доля жизнеспособных клеток после культивации с препаратом в этих дозах отличалась незначительно и

составила 85,7%, 76,4% соответственно через 24 часа после добавления препарата и 88,4%, 81,1% соответственно через 48 часов).

7. На основании анализа количественной характеристики миофибробластной инфильтрации в образцах, полученных после эндоназальной эндоскопической дакриоцисториностомии у кроликов в эксперименте *in vivo* на различных сроках наблюдения доказана эффективность Пирфенидона на пролиферацию миофибробластов: в препаратах группы животных, получивших Пирфенидон (в дозах, определенных при исследовании *in vitro* – 0,15 мг/мл и 0,3 мг/мл) среднее значение миофибробластной инфильтрации было достоверно ниже ($4811,83 \pm 357,56$ и $4216,67 \pm 90,65$ соответственно), чем в образцах группы контроля ($6735,00 \pm 941,41$ ($p < 0,05$)).

Практические рекомендации

1. Повышение концентрации цитокина CTGF в образцах слизистой оболочки полости носа у пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей может являться предиктором зарастания дакриостомы после эндоназальной эндоскопической дакриоцисториностомии, что диктует необходимость применения профилактических мер в интра – и послеоперационный периоде.
2. Для снижения риска возникновения облитерации слезоотводящих путей и в последующем избыточного рубцевания в области дакриостомы после эндоназальной эндоскопической дакриоцисториностомии необходимо проводить лечение пациентов с хроническим воспалением слизистой оболочки полости носа.
3. Пирфенидон является эффективным препаратом в ингибировании пролиферации клеток, играющих одну из основных ролей в процессе фиброобразования. Наиболее эффективной и малотоксичной дозой

Пирфенидона для предотвращения избыточного рубцевания является 0,15 мг/мл и 0,3 мг/мл.

4. Дальнейшее изучение антифибротического препарата Пирфенидон должно быть направлено на экспериментальное обоснование применения наиболее оптимальной из вышеуказанных доз, определение целесообразного способа введения препарата, что даст основание для последующего исследования его в условиях клиники с целью предотвращения зарращения дакриостомы у пациентов с облитерацией слезоотводящих путей после дакриоцисториностомии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азнабаев М.Т., Мунирова Л.Н. К вопросу о профилактике рецидивов дакриоцистита после хирургического лечения // Вестник офтальмологии. – 2008. – № 3 – С. 42-43.
2. Архангельский В.Н. Профилактика рецидивов непроходимости вновь образованного оттока из слезного мешка после операции дакриоцисториностомии. // Офтальм. журн. – 1951. – № 3. – С. 137-138.
3. Атькова Е.Л., Раменская Г.В., Роот А.О., Краховецкий Н.Н., Ярцев В.Д., Ярцев С.Д., Петухов А.Е., Шохин И.Е. Применение митомицина-С при эндоскопической эндоназальной дакриоцисториностомии // Вестник офтальмологии. – 2017. – Т. 133 – № 5 – С. 16-23.
4. Атькова Е.Л., Роот А.О., Краховецкий Н.Н., Ярцев В.Д., Ярцев С.Д. Изучение насыщения тканей дакриостомы Митомицином-С // Офтальмологические ведомости. - 2017. - Т. 10 - №1 - С. 17-22.
5. Белоглазов В.Г. Эндоназальные методы хирургического лечения нарушений проходимости слезоотводящих путей. Методические рекомендации. ВНИИ ГБ – М. 1980.
6. Белоглазов В.Г., Груша О.В., Саад-Ельдин Н.М., Атькова Е.Л., Малаева Л.В. Профилактика и лечение рецидивов после дакриоцисториностомии // Вестник офтальмологии. – 1999. – Т. 115 – № 5 – С. 14-17.
7. Белоглазов В.Г., Джарулла-заде Ч.Д. Реконструктивная хирургия слезоотводящих путей с использованием силиконовых трубок. Методические рекомендации. ВНИИ ГБ – М. 1988. С. 24.
8. Лебедев О.И. Регуляция репаративных процессов при антиглаукоматозной хирургии с помощью коллализина // Вестник офтальмологии. – 1989. – № 3. – С. 4-6.
9. Михеева О.Ф., Школьник С.Ф., Паштаев Н.П., Волков О. А. Состояние дакриологической помощи на современном этапе // Вестник российских университетов. Математика. – 2017. – Т. 6 – № 2.

10. Ободов В. А., Усоскин М. С., Шляхтов М. И. Стандарт медицинской помощи больным с дакриоциститами // Вестник ОГУ. – 2011. – Т. 133 – №14.
11. Пальчун В.Т., Магомедов М.М. Эндоскопическая эндоназальная микродакриоцисториностомия // Росс. ринология. – 2001. – № 2. – С. 169-170.
12. Петров С.Ю., Сафонова Д.М. Ингибиторы Rho-киназы - новые препараты местной гипотензивной терапии глаукомы // Национальный журнал Глаукома. – 2014. – Т. 13 – № 4 – С. 92-100.
13. Серов В.В. «Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология)». М.: Медицина. – 1981 – 312 с.
14. Abdullatif A.M., Macky T.A., Abdullatif M.M., Nassar K., Grisanti S., Mortada H.A., Soliman M.M. Intravitreal decorin preventing proliferative vitreoretinopathy in perforating injuries: a pilot study // Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. – 2018. – Vol. 256 – N. 12 – P. 2473-2481.
15. Aguirre Vila-Coro A., Gutierrez Sevilla M.A., Rodriguez-Bermejo Guijo M.C., Aguirre Vila-Coro A. Inflatable Catheter for Dacryocystorhinostomy // Arch Ophthalmol. – 1988. – Vol. 106 – N. 5 – P. 692-694.
16. Akimoto M., Hangai M., Okazaki K., Kogishi J., Honda Y., Kaneda Y. Growth inhibition of cultured human Tenon's fibroblastic cells by targeting the E2F transcription factor // Exp Eye Res. – 1998. – Vol. 67 – N. 4 – P. 395-401.
17. Akimoto M., Miyahara T., Arai J., Akimoto A., Hamada H., Yoshida Y., Yoshimura N. A new delivery system for 5-fluorouracil using prodrug and converting enzyme // Br J Ophthalmol. – 2002. – Vol. 86 – N. 5 – P. 581-6.
18. Akkan J.U., Cilsim S. Role of subconjunctival bevacizumab as an adjuvant to primary trabeculectomy: a prospective randomized comparative 1-year follow-up study // J Glaucoma. – 2015. – Vol. 24 – N. 1 – P. 1-8.
19. Ali M.J., Psaltis A.J., Bassiouni A., Wormald P.J. Long-term outcomes in primary powered endoscopic dacryocystorhinostomy // Br J Ophthalmol. – 2014. – Vol. 98 – N. 12 – P. 1678-80.

20. Allen K., Berlin A.J. Dacryocystorhinostomy failure: association with nasolacrimal silicone intubation // *Ophthalmic Surg.* – 1989. – Vol. 20 – N. 7 – P. 486-489.
21. Anderson R.L., Edwards J.J. Indications, complications and results with silicone stents // *Ophthalmology.* – 1979. – Vol. 86 – P. 1474-1487.
22. Apuhan T., Yıldırım Y.S., Eroglu F., Sipahier A. Effect of mitomycin C on endoscopic dacryocystorhinostomy // *J Craniofac Surg.* – 2011. – Vol. 22 – N. 6 – P. 2057-9.
23. Aydın M.M., Akçalı K.C. Liver fibrosis // *Turk J Gastroenterol.* – 2018 – Vol. 29 – N. 1 – P. 14-21.
24. Baldini C., Ferro F., Elefante E., Bombardieri S. Biomarkers for Sjögren's syndrome // *Biomark Med.* – 2018. – Vol. 12 – N. 3 – P. 275-286.
25. Barbosa F.L., Chaurasia S.S., Kaur H., de Medeiros F.W., Agrawal V., Wilson S.E. Stromal interleukin-1 expression in the cornea after haze-associated injury // *Exp Eye Res.* – 2010. – Vol. 91 – N. 3 – P. 456-461.
26. Barcellos-Hoff M.H., Dix T.A. Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1 // *Mol. Endocrinol.* – 1996. – Vol. 10 – N. 9 – P. 1077–83.
27. Barrientos S., Stojadinovic O., Golinko M.S., Brem H., Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing // *Wound Repair Regen.* – 2008. – Vol. 16 – N. 5 – P. 585-601.
28. Bell J.L., Haak A.J., Wade S.M., Kirchoff P.D., Neubig R.R., Larsen S.D. Optimization of novel nipecotic bis(amide) inhibitors of the Rho/MKL1/SRF transcriptional pathway as potential anti-metastasis agents // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2013. – Vol. 23 – N. 13 – P. 3826-32.
29. Bettahi I., Sun H., Gao N., Wang F., Mi X., Chen W., Liu Z., Yu F.S. Genome-wide transcriptional analysis of differentially expressed genes in diabetic, healing corneal epithelial cells: hyperglycemia-suppressed TGFbeta3 expression contributes to the delay of epithelial wound healing in diabetic corneas // *Diabetes.* – 2014. – Vol. 63 – N. 2 – P. 715-727.

30. Beule A.G. Physiology and pathophysiology of respiratory mucosa of the nose and the paranasal sinuses // *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* – 2010. – Vol. 9 – Doc. 07.
31. Biernacka A., Dobaczewski M., Frangogiannis N.G. TGF- β signaling in fibrosis // *Growth Factors.* – 2011. – Vol. 29 – N. 5 – P. 196-202.
32. Bornstein P., Sage E.H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function // *Curr Opin Cell Biol.* – 2002. – Vol. 14 – N. 5 – P. 608–16.
33. Butler M.R., Prospero Ponce C.M., Weinstock Y.E., Orengo-Nania S., Chevez-Barrios P., Frankfort B.J. Topical silver nanoparticles result in improved bleb function by increasing filtration and reducing fibrosis in a rabbit model of filtration surgery // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – Vol. 54 – N. 7 – P. 4982-90.
34. Caban M., Owczarek K., Lewandowska U. The Role of Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitors on Ocular Diseases: Focusing on Potential Mechanisms // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23 – N. 8 – P. 4256.
35. CAT-152 0102 Trabeculectomy Study Group; Khaw P., Grehn F., Holló G., Overton B., Wilson R., Vogel R., Smith Z. A phase III study of subconjunctival human anti-transforming growth factor beta(2) monoclonal antibody (CAT-152) to prevent scarring after first-time trabeculectomy // *Ophthalmology.* – 2007. – Vol. 114 – N. 10 – P. 1822-30.
36. Chakrabarti S., Dasgupta S., Banerjee M., Pal D. Role of Histomorphology and Chronic Inflammation Score in Chronic Dacryocystitis // *J Clin Diagn Res.* – 2016. – Vol. 10 – N. 7 – EC01-3.
37. Chao C., Richdale K., Jalbert I., Doung K., Gokhale M. Non-invasive objective and contemporary methods for measuring ocular surface inflammation in soft contact lens wearers - A review // *Cont Lens Anterior Eye.* – 2017. – Vol. 40 – N. 5 – P. 273-282.
38. Chen C.W., Huang H.T., Bair J.S., Lee C.C. Trabeculectomy with simultaneous topical application of mitomycin-C in refractory glaucoma // *J Ocul Pharmacol.* – 1990. – Vol. 6 – N. 3 – P. 175-82.

39. Chen Y.H., Keiser M.S., Davidson B.L. Viral Vectors for Gene Transfer // *Curr Protoc Mouse Biol.* – 2018. – Vol. 8 – N. 4 – e58.
40. Cheng J.W., Cheng S.W., Wei R.L., Lu G.C. Anti-vascular endothelial growth factor for control of wound healing in glaucoma surgery // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2016. – Vol. 2016 – N. 1 – CD009782.
41. Chung A.C., Lan H.Y. MicroRNAs in renal fibrosis // *Front Physiol.* –2015. – Vol. 6 – P. 50.
42. Conroy K.P., Kitto L.J., Henderson N.C. α v integrins: key regulators of tissue fibrosis // *Cell Tissue Res.* – 2016. – Vol. 365 – N. 3 – P. 511-9.
43. Cordeiro M.F., Gay J.A., Khaw P.T. Human anti-transforming growth factor-beta2 antibody: a new glaucoma anti-scarring agent // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 1999. – Vol. 40 – N. 10 – P. 2225-34.
44. Cushing M.C., Mariner P.D., Liao J.T., Sims E.A., Anseth K.S. Fibroblast growth factor represses Smad-mediated myofibroblast activation in aortic valvular interstitial cells // *Faseb J.* – 2008. – Vol. 22 – N. 6 – P. 1769-1777.
45. Daniels J.T., Cambrey A.D., Occleston N.L., Garrett Q., Tarnuzzer R.W., Schultz G.S., Khaw P.T. Matrix metalloproteinase inhibition modulates fibroblast-mediated matrix contraction and collagen production in vitro // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2003. – Vol. 44 – N. 3 – P. 1104-10.
46. Dave T.V., Mohammed F.A., Ali M.J., Naik M.N. Etiologic analysis of 100 anatomically failed dacryocystorhinostomies // *Clin Ophthalmol.* – 2016. – Vol. 10 – P. 1419-1422.
47. De Castro D.K., Santiago Y.M., Cunningham M., Gray S.T., Metson R., Fay A. A modified lacrimal sac implant for high-risk dacryocystorhinostomy // *Ophthalmic Plast Reconstr Surg.* – 2013. – Vol. 29 – N. 5 – P. 367-72.
48. Decaris M.L., Schaub J.R., Chen C., Cha J., Lee G.G., Rexhepaj M., Ho S.S., Rao V., Marlow M.M., Kotak P., Budi E.H., Hooi L., Wu J., Fridlib M., Martin S.P., Huang S., Chen M., Muñoz M., Hom T.F., Wolters P.J., Desai T.J., Rock F., Leftheris K., Morgans D.J., Lepist E.I., Andre P., Lefebvre E.A., Turner S.M. Dual

inhibition of $\alpha\text{v}\beta 6$ and $\alpha\text{v}\beta 1$ reduces fibrogenesis in lung tissue explants from patients with IPF // *Respir Res.* –2021. – Vol. 22 – N. 1 – P. 265.

49. Desmoulière A., Geinoz A., Gabbiani F., Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts // *J Cell Biol.* – 1993 – Vol. 122 – N. 1 – P. 103-11.

50. DiDonato J.A., Hayakawa M., Rothwarf D.M., Zandi E., Karin M. A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB // *Nature.* – 1997. – Vol. 388 – P. 548-54.

51. Dolivo D.M. Anti-fibrotic effects of pharmacologic FGF-2: a review of recent literature // *J Mol Med (Berl).* – 2022. – Vol. 100 – N. 6 – P. 847-860.

52. Dolivo D.M., Larson S.A., Dominko T. Fibroblast Growth Factor 2 as an Antifibrotic: Antagonism of Myofibroblast Differentiation and Suppression of Pro-Fibrotic Gene Expression // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2017. – Vol. 38 – P. 49-58.

53. Duan Y., Guan X., Ge J., Quan D., Zhuo Y., Ye H., Shao T. Cationic nanocopolymers mediated IKKbeta targeting siRNA inhibit the proliferation of human Tenon's capsule fibroblasts in vitro // *Mol Vis.* –2008. – Vol. 14 – P. 2616-28.

54. Elgin U., Sen E., Çolak S., Yilmazbas P. Initial trabeculectomy with 5-fluorouracil with or without subconjunctival bevacizumab in the management of pseudoexfoliation glaucoma // *Int Ophthalmol.* – 2019. – Vol. 39 – N. 6 – P. 1211-1217.

55. Elgin U., Sen E., Ozdemir K., Ozdal P., Berker N. The outcome of initial mitomycin C-augmented trabeculectomy with subconjunctival bevacizumab in the management of secondary glaucoma associated with Fuchs heterochromic iridocyclitis // *Int Ophthalmol.* – 2020. – Vol. 40 – N. 4 – P. 795-802.

56. Esson D.W., Neelakantan A., Iyer S.A., Blalock T.D., Balasubramanian L., Grotendorst G.R., Schultz G.S., Sherwood M.B. Expression of connective tissue growth factor after glaucoma filtration surgery in a rabbit model // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2004. – Vol. 45 – N. 2 – P. 485-91.

57. Evanko S.P., Potter-Perigo S., Petty L.J., Workman G.A., Wight T.N. Hyaluronan Controls the Deposition of Fibronectin and Collagen and Modulates TGF- β 1 Induction of Lung Myofibroblasts // *Matrix Biol.* – 2015. – Vol. 42 – P. 74-92.
58. Evelyn C.R., Wade S.M., Wang Q., Wu M., Iñiguez-Lluhí J.A., Merajver S.D., Neubig R.R. CCG-1423: a small-molecule inhibitor of RhoA transcriptional signaling // *Mol Cancer Ther.* – 2007. – Vol. 6 – N. 8 – P. 2249-60.
59. Feng Y.F., Cai J.Q., Zhang J.Y., Han X.H. A metaanalysis of primary dacryocystorhinostomy with and without silicone intubation // *Can J Ophthalmol.* – 2011. – Vol. 46 – P. 521-527.
60. Fire A.Z. Gene silencing by double-stranded RNA // *Cell Death Differ.* – 2007. – Vol. 14 – N. 12 – P. 1998-2012.
61. Fois A.G., Posadino A.M., Giordo R., Cossu A., Agouni A., Rizk N.M., Pirina P., Carru C., Zinellu A., Pintus G. Antioxidant Activity Mediates Pirfenidone Antifibrotic Effects in Human Pulmonary Vascular Smooth Muscle Cells Exposed to Sera of Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients // *Oxid Med Cell Longev.* – 2018. – Vol. 2018 – P. 2639081.
62. Gallant-Behm C.L., Piper J., Lynch J.M., Seto A.G., Hong S.J., Mustoe T.A., Maari C., Pestano L.A., Dalby C.M., Jackson A.L., Rubin P., Marshall W.S. A MicroRNA-29 Mimic (Remlarsen) Represses Extracellular Matrix Expression and Fibroplasia in the Skin // *J Invest Dermatol.* – 2019. – Vol. 139 – N. 5 – P. 1073-1081.
63. Gaur U., Aggarwal B.B. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily // *Biochem Pharmacol.* – 2003. – Vol. 66 – N. 8 – P. 1403–8.
64. Ghanbarian H., Yıldız M.T., Tutar Y. MicroRNA Targeting // *Methods Mol Biol.* – 2022 – Vol. 2257 – P. 105-130.
65. Gomes dos Santos A.L., Bochet A., Tsapis N., Artzner F., Bejjani R.A., Thillaye-Goldenberg B., de Kozak Y., Fattal E., Behar-Cohen F. Oligonucleotide-polyethylenimine complexes targeting retinal cells: structural analysis and

application to anti-TGFbeta-2 therapy // *Pharm Res.* – 2006. – Vol. 23 – N. 4 – P. 770-81.

66. Graue G. *An Soc mex de oftal y oto-rino-laryng.* 1932; 9: P. 114

67. Grijalvo S., Alagia A., Jorge A.F., Eritja R. Covalent Strategies for Targeting Messenger and Non-Coding RNAs: An Updated Review on siRNA, miRNA and antimir Conjugates // *Genes (Basel).* – 2018. – Vol. 9 – N. 2 – P. 74.

68. Grisanti S., Szurman P., Warga M., Kaczmarek R., Ziemssen F., Tatar O., Bartz-Schmidt K.U. Decorin modulates wound healing in experimental glaucoma filtration surgery: a pilot study // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2005. – Vol. 46 – N. 1 – P. 191-6.

69. Guo N., Li X., Mann M.M., Funderburgh M.L., Du Y., Funderburgh J.L. Hyaluronan synthesis mediates the fibrotic response of keratocytes to transforming growth factor beta // *J Biol Chem.* – 2010. – Vol. 285 – N. 42 – P. 32012-32019.

70. Gurujeyalakshmi G., Hollinger M.A., Giri S.N. Pirfenidone inhibits PDGF isoforms in bleomycin hamster model of lung fibrosis at the translational level // *Am J Physiol.* – 1999. – Vol. 276 – N. 2 – L. 311-8.

71. Haak A.J., Appleton K.M., Lisabeth E.M., Misesk S.A., Ji Y., Wade S.M., Bell J.L., Rockwell C.E., Airik M., Krook M.A., Larsen S.D., Verhaegen M., Lawlor E.R., Neubig R.R. Pharmacological Inhibition of Myocardin-related Transcription Factor Pathway Blocks Lung Metastases of RhoC-Overexpressing Melanoma // *Mol Cancer Ther.* – 2017. – Vol. 16 – N. 1 – P. 193-204.

72. Hawes M.J.: Gelfoam dacryocystorhinostomy stent: one cause of surgical failure? // *Ophthalmic Surg.* – 1988. – Vol. 19 – P. 824–825.

73. He J., Bazan H.E. Synergistic effect of platelet-activating factor and tumor necrosis factor-alpha on corneal myofibroblast apoptosis // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2006. – Vol. 47 – N. 3 – P. 883-891.

74. Heatley G., Kiland J., Faha B., Seeman J., Schlamp C.L., Dawson D.G., Gleiser J., Maneval D., Kaufman P.L., Nickells R.W. Gene therapy using p21WAF-1/Cip-1 to modulate wound healing after glaucoma trabeculectomy surgery in a

primate model of ocular hypertension // *Gene Ther.* – 2004. – Vol. 11 – N. 12 – P. 949-55.

75. Heindl L.M., Junemann A., Holbach L.M. A clinicopathologic study of nasal mucosa in 350 patients with external dacryocystorhinostomy // *Orbit.* – 2009. – Vol. 28 – N. 1 – P. 7-11.

76. Heldin C.H. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment // *Cell Commun Signal.* – 2013. – Vol. 11 – N. 1 – P. 97.

77. Heldin C.H., Lennartsson J., Westermark B. Involvement of platelet-derived growth factor ligands and receptors in tumorigenesis // *J Intern Med.* – 2018. – Vol. 283 – N. 1 – P. 16-44.

78. Henderson J.W. Management of strictures of the lacrimal canaliculi with polyethylene tubes // *Arch Ophthalmol.* – 1950. – Vol. 44 – P. 198–203.

79. Henderson N.C., Arnold T.D., Katamura Y., Giacomini M.M., Rodriguez J.D., McCarty J.H., Pellicoro A., Raschperger E., Betsholtz C., Ruminski P.G., Griggs D.W., Prinsen M.J., Maher J.J., Iredale J.P., Lacy-Hulbert A., Adams R.H., Sheppard D. Targeting of α v integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs // *Nat Med.* – 2013. – Vol. 19 – N. 12 – P. 1617-1624.

80. Henderson N.C., Rieder F., Wynn T.A. Fibrosis: from mechanisms to medicines // *Nature.* – 2020. – Vol. 587 – N. 7835 – P. 555-566.

81. Hinz B. Myofibroblasts // *Exp Eye Res.* – 2016. – Vol. 142 – P. 56-70.

82. Holl E.K., Bond J.E., Selim M.A., Ehanire T., Sullenger B., Levinson H. The nucleic acid scavenger polyamidoamine third-generation dendrimer inhibits fibroblast activation and granulation tissue contraction // *Plast Reconstr Surg.* – 2014. – Vol. 134 – N. 3 – P. 420e-433e.

83. Hollsten D.A. Complications of lacrimal surgery // *Int Ophthalmol Clin.* – 1992. – Vol. 32 – P. 49-66.

84. Honjo M., Tanihara H., Kameda T., Kawaji T., Yoshimura N., Araie M. Potential role of Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 in glaucoma

filtration surgery // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2007. Vol. 48 – N. 12 – P. 5549-57.

85. Horii K., Matsuda A., Ebihara N., Imai K., Mori K., Funaki T., Watanabe Y., Nakatani S., Okada K., Matsuo O., Murakami A. Involvement of plasminogen activator inhibitor-1 in the pathogenesis of atopic cataracts // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2012. – Vol. 53 – N. 4 – P. 1846-1851.

86. Hosemann W., Wigand M.E., Göde U., Länger F., Dunker I. Normal wound healing of the paranasal sinuses: clinical and experimental investigations // *Eur Arch Otorhinolaryngol.* – 1991. – Vol. 248 – N. 7 – P. 390-394.

87. How A., Chua J.L., Charlton A., Su R., Lim M., Kumar R.S., Crowston J.G., Wong T.T. Combined treatment with bevacizumab and 5-fluorouracil attenuates the postoperative scarring response after experimental glaucoma filtration surgery // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2010. – Vol. 51 – N. 2 – P. 928-32.

88. Hu D., Sires B.S., Tong D.C., Royack G.A., Oda D. Effect of brief exposure to mitomycin C on cultured human nasal mucosa fibroblasts // *Ophthalmic Plast Reconstr Surg.* – 2000. – Vol. 16 – N. 2 – P. 119-25.

89. Hu S., Hu H., Wang R., He H., Shui H. microRNA-29b prevents renal fibrosis by attenuating renal tubular epithelial cell-mesenchymal transition through targeting the PI3K/AKT pathway // *Int Urol Nephrol.* – 2021. – Vol. 53 – N. 9 – P. 1941-1950.

90. Huang T., Schor S.L., Hinck A.P. Biological activity differences between TGF-beta1 and TGF-beta3 correlate with differences in the rigidity and arrangement of their component monomers // *Biochemistry.* – 2014. – Vol. 53 – N. 36 – P. 5737-5749.

91. Huang Y.H., Yang Y.L., Wang F.S. The Role of miR-29a in the Regulation, Function, and Signaling of Liver Fibrosis // *Int J Mol Sci.* – 2018. – Vol. 19 – N. 7 – P. 1889.

92. Iyer R.P., Patterson N.L., Fields G.B., Lindsey M.L. The history of matrix metalloproteinases: milestones, myths, and misperceptions // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2012. – Vol. 303 – N. 8 – P. 919-930.

93. Iyer S.N., Gurujeyalakshmi G., Giri S.N. Effects of pirfenidone on procollagen gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis // *J Pharmacol Exp Ther.* – 1999. – Vol. 289 – N. 1 – P. 211-8.
94. Jayantha Kedilaya Y., Chacko A., Poorey V.K. Improving the Results of Endonasal Dacryocystorhinostomy with Mitomycin C Application: A Prospective Case-Control Study // *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* – 2018. – Vol. 70 – N. 4 – P. 477-481.
95. Johnson K.T., Rödicker F., Heise K., Heinz C., Steuhl K.P., Pützer B.M., Hudde T. Adenoviral p53 gene transfer inhibits human Tenon's capsule fibroblast proliferation // *Br J Ophthalmol.* – 2005. – Vol. 89 – N. 4 – P. 508-12.
96. Johnson L.A., Rodansky E.S., Moons D.S., Larsen S.D., Neubig R.R., Higgins P.D.R. Optimisation of Intestinal Fibrosis and Survival in the Mouse S. Typhimurium Model for Anti-fibrotic Drug Discovery and Preclinical Applications // *J Crohns Colitis.* – 2017. – Vol. 11 – N. 6 – P. 724-736.
97. Jolly L., Stavrou A., Vanderstoken G., Meliopoulos V.A., Habgood A., Tatler A.L., Porte J., Knox A., Weinreb P., Violette S., Hussell T., Kolb M., Stampfli M.R., Schultz-Cherry S., Jenkins G. Influenza promotes collagen deposition via $\alpha\beta6$ integrin-mediated transforming growth factor β activation // *J Biol Chem.* – 2014. – Vol. 289 – N. 51 – P. 35246-63.
98. Jun J.I., Lau L.F. Taking aim at the extracellular matrix: CCN proteins as emerging therapeutic targets. // *Nat Rev Drug Discov.* – 2011. – Vol. 10: – P. 945-963.
99. Kaiser P.K., Symons R.C., Shah S.M., Quinlan E.J., Tabandeh H., Do D.V., Reisen G., Lockridge J.A., Short B., Guerciolini R., Nguyen Q.D.; Sirna-027 Study Investigators. RNAi-based treatment for neovascular age-related macular degeneration by Sirna-027 // *Am J Ophthalmol.* – 2010. – Vol. 150 – N. 1 – P. 33-39.e2.
100. Kamal S., Ali M.J., Naik M.N. Circumostial injection of mitomycin C (COS-MMC) in external and endoscopic dacryocystorhinostomy: efficacy, safety profile,

and outcomes. – *Ophthalmic Plast Reconstr Surg.* – 2014. – Vol. 30 – N. 2 – P. 187-90.

101. Kang E.M., Tisdale J.F. The leukemogenic risk of integrating retroviral vectors in hematopoietic stem cell gene therapy applications // *Curr Hematol Rep.* – 2004. – Vol. 3 – N. 4 – P. 274-81.

102. Kansu L., Aydin E., Axcı S., Kal A., Gedik S. Comparison of surgical outcomes of endonasal dacryocystorhinostomy with or without mucosal flaps // *Auris Nasus Larynx.* – 2009. – Vol. 36 – N. 5 – P. 555-559.

103. Karamichos D., Hutcheon A.E., Zieske J.D. Reversal of fibrosis by TGF-beta3 in a 3D in vitro model // *Exp Eye Res.* – 2014. – Vol. 124 – P. 31-36.

104. Katsanos A., Gorgoli K., Mikropoulos D.G., Arranz-Marquez E., Athanasopoulos G.P., Teus M.A., Konstas A.G.P. Assessing the role of ranibizumab in improving the outcome of glaucoma filtering surgery and neovascular glaucoma // *Expert Opin Biol Ther.* – 2018. – Vol. 18 – N. 6 – P. 719-724.

105. Kaur H., Chaurasia S.S., de Medeiros F.W., Agrawal V., Salomao M.Q., Singh N., Ambati B.K., Wilson S.E. Corneal stroma PDGF blockade and myofibroblast development // *Exp Eye Res.* – 2009. – Vol. 88 – N. 5 – P. 960-965.

106. Khanum B.N.M.K., Guha R., Sur V.P., Nandi S., Basak S.K., Konar A., Hazra S. Pirfenidone inhibits post-traumatic proliferative vitreoretinopathy // *Eye (Lond).* – 2017. – Vol. 31 – N. 9 – P. 1317-1328.

107. Khatoon J., Rizvi S.A.R., Gupta Y., Alam M.S. A prospective study on epidemiology of dacryocystitis at a tertiary eye care center in Northern India // *Oman J Ophthalmol.* – 2021. – Vol.14 – N. 3 – P. 169-172.

108. Kiddee W., Orapiriyakul L., Kittigoonpaisan K., Tantisarasart T., Wangsupadilok B. Efficacy of Adjunctive Subconjunctival Bevacizumab on the Outcomes of Primary Trabeculectomy With Mitomycin C: A Prospective Randomized Placebo-controlled Trial // *J Glaucoma.* – 2015. – Vol. 24 – N. 8 – P. 600-6.

109. Kim H.J., Kim P.K., Yoo H.S., Kim C.W. Comparison of tear proteins between healthy and early diabetic retinopathy patients // *Clin Biochem.* –2012. – Vol. 45 – N. 1-2 – P. 60-67.
110. Kim K.K., Sheppard D., Chapman H.A. TGF- β 1 Signaling and Tissue Fibrosis // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2018. – Vol. 10 – N. 4 – a022293.
111. Kim N.J., Harris A., Gerber A., Tobe L.A., Amireskandari A., Huck A., Siesky B. Nanotechnology and glaucoma: a review of the potential implications of glaucoma nanomedicine // *Br J Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 98 – N. 4 – P. 427-31.
112. Klaassen I., van Geest R.J., Kuiper E.J., van Noorden C.J., Schlingemann R.O. The role of CTGF in diabetic retinopathy // *Exp Eye Res.* – 2015. – Vol. 133 – P. 37-48.
113. Klingberg F., Chow M.L., Koehler A., Boo S., Buscemi L., Quinn T.M., Costell M., Alman B.A., Genot E., Hinz B. Prestress in the extracellular matrix sensitizes latent TGFbeta1 for activation // *J Cell Biol.* – 2014. – Vol. 207 – N. 2 – P. 283-297.
114. Koli K., Myllärniemi M., Keski-Oja J., Kinnula V.L. Transforming growth factor-beta activation in the lung: focus on fibrosis and reactive oxygen species // *Antioxid Redox Signal.* – 2008. – Vol. 10 – N. 2 – P. 333-42.
115. Kshirsagar R.S., Vu P.Q., Liang J. Endoscopic versus external dacryocystorhinostomy: temporal and regional trends in the United States Medicare population // *Orbit.* – 2019. – Vol. 38 – N. 6 – P. 453-460.
116. Kumar S.S.D., Rajendran N.K., Houreld N.N., Abrahamse H. Recent advances on silver nanoparticle and biopolymer-based biomaterials for wound healing applications // *Int J Biol Macromol.* – 2018. – Vol. 115 – P. 165-175.
117. Kumar V., Ali M.J., Ramachandran C. Effect of mitomycin-C on contraction and migration of human nasal mucosa fibroblasts: implications in dacryocystorhinostomy // *Br J Ophthalmol.* – 2015. – Vol. 99 – N. 9 – P. 1295–1300.
118. Lancaster L.H., de Andrade J.A., Zibrak J.D., Padilla M.L., Albera C., Nathan S.D., Wijssenbeek M.S., Stauffer J.L., Kirchgassler K.U., Costabel U. Pirfenidone

safety and adverse event management in idiopathic pulmonary fibrosis // *Eur Respir Rev.* – 2017. – Vol. 26 – N. 146 – P. 170057.

119. Lanza N.L., Valenzuela F., Perez V.L., Galor A. The Matrix Metalloproteinase 9 Point-of-Care Test in Dry Eye // *Ocul Surf.* – 2016. – Vol. 14 – N. 2 – P. 189-95.

120. Leask A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation // *Circ Res.* – 2010. – Vol. 106 – N. 11 – P. 1675-1680.

121. Lee E.J., Han J.C., Park D.Y., Cho J., Kee C. Effect of connective tissue growth factor gene editing using adeno-associated virus-mediated CRISPR-Cas9 on rabbit glaucoma filtering surgery outcomes // *Gene Ther.* – 2021. – Vol. 28 – N. 5 – P. 277-286.

122. Lee J.K., Kim T.H. Changes in cytokines in tears after endoscopic endonasal dacryocystorhinostomy for primary acquired nasolacrimal duct obstruction // *Eye.* – 2014. – Vol. 28 – N. 5 – P. 600–607.

123. Leone C.R. Jr. Gelfoam-thrombin dacryocystorhinostomy stent // *Am J Ophthalmol.* – 1982. – Vol. 94 – P. 412-413.

124. Leong S.C., Macewen C.J., White P.S. A systematic review of outcomes after dacryocystorhinostomy in adults // *Am J Rhinol Allergy.* – 2010. – Vol. 24 – N. 1 – P. 81-90.

125. Li N., Cui J., Duan X., Chen H., Fan F. Suppression of type I collagen expression by miR-29b via PI3K, Akt, and Sp1 pathway in human Tenon's fibroblasts // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2012. – Vol. 53 – N. 3 – P. 1670-8.

126. Li Z., Van Bergen T., Van de Veire S., Van de Vel I., Moreau H., Dewerchin M., Maudgal P.C., Zeyen T., Spileers W., Moons L., Stalmans I. Inhibition of vascular endothelial growth factor reduces scar formation after glaucoma filtration surgery // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2009. – Vol. 50 – N. 11 – P. 5217-25.

127. Lin X., Yu M., Wu K., Yuan H., Zhong H. Effects of pirfenidone on proliferation, migration, and collagen contraction of human Tenon's fibroblasts in vitro // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2009. – Vol. 50 – N. 8 – P. 3763-70.

128. Liu G., Friggeri A., Yang Y., Milosevic J., Ding Q., Thannickal V.J., Kaminski N., Abraham E. miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis // *J Exp Med.* – 2010. – Vol. 207 – N. 8 – P. 1589-97.
129. Lyons R.M., Keski-Oja J., Moses H.L. Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium // *J. Cell Biol.* – 1988. – Vol. 106 – N. 5 – P. 1659–65.
130. Lyu G., Guan Y., Zhang C., Zong L., Sun L., Huang X., Huang L., Zhang L., Tian X.L., Zhou Z., Tao W. TGF- β signaling alters H4K20me3 status via miR-29 and contributes to cellular senescence and cardiac aging // *Nat Commun.* – 2018. – Vol. 9 – N. 1 – P. 2560.
131. Ma B., Jing R., Liu J., Yang L., Li J., Qin L., Cui L., Pei C. CTGF Contributes to the Development of Posterior Capsule Opacification: an in vitro and in vivo study // *Int J Biol Sci.* – 2018. – Vol. 14 – N. 4 – P. 437-448.
132. Madge S.N., Selva D. Intubation in routine dacryocystorhinostomy: why we do what we do // *Clinical and Experimental Ophthalmology.* – 2009. – Vol. 37 – P. 620–623.
133. Massaro B.M., Gonnering R.S., Harris G.J. Endonasal laser dacryocystorhinostomy. A new approach to nasolacrimal duct obstruction // *Arch Ophthalmol.* – 1990. – Vol. 108 – P. 1172–1176.
134. Masegur H., Trias E., Adema J.M. Endoscopic dacryocystorhinostomy: modified technique // *Otolaryngol Head Neck Surg.* – 2004. – Vol. 130 – P. 39–46.
135. Matsuba M., Hutcheon A.E., Zieske J.D. Localization of thrombospondin-1 and myofibroblasts during corneal wound repair // *Exp Eye Res.* – 2011. – Vol. 93 – N. 4 – P. 534-540.
136. Meyer K.C., Decker C.A. Role of pirfenidone in the management of pulmonary fibrosis // *Ther Clin Risk Manag.* – 2017. – Vol. 13 – P. 427-437.
137. Moreira Soares Oliveira B., Durbeej M., Holmberg J. Absence of microRNA-21 does not reduce muscular dystrophy in mouse models of LAMA2-CMD // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12 – N. 8 – e. 0181950.

138. Mu D., Cambier S., Fjellbirkeland L., Baron J.L., Munger J.S., Kawakatsu H., Sheppard D., Broaddus V.C., Nishimura S.L. The integrin $\alpha(v)\beta8$ mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF- β 1 // *J Cell Biol.* – 2002. – Vol. 157 – N. 3 – P. 493–507.
139. Muhsen S., Compan J., Lai T., Kranemann C., Birt C. Postoperative adjunctive bevacizumab versus placebo in primary trabeculectomy surgery for glaucoma // *Int J Ophthalmol.* – 2019. – Vol. 12 – N. 10 – P. 1567-1574.
140. Murphy-Ullrich J.E., Suto M.J. Thrombospondin-1 regulation of latent TGF- β activation: A therapeutic target for fibrotic disease // *Matrix Biol.* – 2018. – Vol. 68-69 – P. 28-43.
141. Murube del Castillo J. Dacriocistorrinostomia con compression ab interno // *Arch Soc Oftal Hisp-Am.* – 1967. – Vol. 27 – P. 1085-1090.
142. Nakama T., Yoshida S., Ishikawa K., Kubo Y., Kobayashi Y., Zhou Y., Nakao S., Hisatomi T., Ikeda Y., Takao K., Yoshikawa K., Matsuda A., Ono J., Ohta S., Izuhara K., Kudo A., Sonoda K.H., Ishibashi T. Therapeutic Effect of Novel Single-Stranded RNAi Agent Targeting Periostin in Eyes with Retinal Neovascularization // *Mol Ther Nucleic Acids.* – 2017. – Vol. 6 – P. 279-289.
143. Nakamura H., Siddiqui S.S., Shen X., Malik A.B., Pulido J.S., Kumar N.M., Yue B.Y. RNA interference targeting transforming growth factor-beta type II receptor suppresses ocular inflammation and fibrosis // *Mol Vis.* – 2004. – Vol. 10 – P. 703-11.
144. Nättinen J., Aapola U., Nukareddy P., Uusitalo H. Clinical Tear Fluid Proteomics-A Novel Tool in Glaucoma Research // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23 – N. 15 – P. 8136.
145. Nilforushan N., Yadgari M., Kish S.K., Nassiri N. Subconjunctival bevacizumab versus mitomycin C adjunctive to trabeculectomy // *Am J Ophthalmol.* – 2012. – Vol. 153 – N. 2 – P. 352-357
146. Noh S.M., Abdul Kadir S.H., Crowston J.G., Subrayan V., Vasudevan S. Effects of ranibizumab on TGF- β 1 and TGF- β 2 production by human Tenon's fibroblasts: An in vitro study // *Mol Vis.* – 2015. – Vol. 21 – P. 1191-200.

147. Nwanegbo E., Vardas E., Gao W., Whittle H., Sun H., Rowe D., Robbins P.D., Gambotto A. Prevalence of neutralizing antibodies to adenoviral serotypes 5 and 35 in the adult populations of The Gambia, South Africa, and the United States // *Clin Diagn Lab Immunol.* – 2004. – Vol. 11 – N. 2 – P. 351-7.
148. Ozer O., Eskiizmir G., Unlü H., İşisağ A., Aslan A. Chronic inflammation: a poor prognostic factor for endoscopic dacryocystorhinostomy // *Eur Arch Otorhinolaryngol.* – 2012. – Vol. 269 – N. 3 – P. 839-45.
149. Pakdel F. Silicone Intubation Does not Improve the Success of Dacryocystorhinostomy in Primary Acquired Nasolacrimal Duct Obstruction // *J Ophthalmic Vis Res.* – 2012. – Vol. 7 – N. 3 – P. 271-2.
150. Palewski M., Budnik A., Konopińska J. Evaluating the Efficacy and Safety of Different Pterygium Surgeries: A Review of the Literature // *Int J Environ Res Public Health.* – 2022. – Vol. 19 – N. 18 – P. 11357.
151. Palomo J., Dietrich D., Martin P., Palmer G., Gabay C. The interleukin (IL)-1 cytokine family--Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases // *Cytokine.* – 2015. – Vol. 76 – N. 1 – P. 25-37.
152. Park H.Y., Kim J.H., Park C.K. VEGF induces TGF-beta1 expression and myofibroblast transformation after glaucoma surgery // *Am J Pathol.* – 2013. – Vol. 182 – N. 6 – P. 2147-2154.
153. Park J., Park J., Pei Y., Xu J., Yeo Y. Pharmacokinetics and biodistribution of recently-developed siRNA nanomedicines // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2016. – Vol. 104 – P. 93-109.
154. Park S.Y., Lee J.H., Ha M., Nam J.W., Kim V.N. miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42 // *Nat Struct Mol Biol.* – 2009. – Vol. 16 – N. 1 – P. 23-9.
155. Peng D., Yu K., Zeng S., Li Y., Lin J., Wu Y., Zhou W. An experimental study on homoharringtonine liposome and glaucoma filtration surgery // *Yan Ke Xue Bao.* – 1999. – Vol. 15 – N. 1 – P. 51-4, 50.
156. Penttilä E., Hyttinen J., Hytti M., Kauppinen A., Smirnov G., Tuomilehto H., Seppä J., Nuutinen J., Kaarniranta K. Upregulation of inflammatory genes in the

nasal mucosa of patients undergoing endonasal dacryocystorhinostomy // *Clinical Ophthalmology*. – 2014. – Vol. 8 – P. 799-805.

157. Pérez-Herrero E., Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy // *Eur J Pharm Biopharm.* – 2015. – Vol. 93 – P. 52-79.

158. Perkins T.W., Faha B., Ni M., Kiland J.A., Poulsen G.L., Antelman D., Atencio I., Shinoda J., Sinha D., Brumback L., Maneval D., Kaufman P.L., Nickells R.W. Adenovirus-mediated gene therapy using human p21WAF-1/Cip-1 to prevent wound healing in a rabbit model of glaucoma filtration surgery // *Arch Ophthalmol.* – 2002. – Vol. 120 – N. 7 – P. 941-9.

159. Poyraz C., Irkeç M., Mocan M.C. Elevated tear interleukin-6 and interleukin-8 levels associated with silicone hydrogel and conventional hydrogel contact lens wear // *Eye Cont Lens.* – 2012. – Vol. 38 – N. 3 – P. 146-149.

160. Pro M.J., Freidl K.B., Neylan C.J., Sawchyn A.K., Wizov S.S., Moster M.R.. Ranibizumab versus mitomycin C in primary trabeculectomy--a pilot study // *Curr Eye Res.* – 2015. – Vol. 40 – N. 5 – P. 510-5.

161. Qadir M., Ahangar A., Dar M.A., Hamid S., Keng M.Q. Comparative study of dacryocystorhinostomy with and without intraoperative application of Mitomycin C // *Saudi J Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 28 – N. 1 – P. 44-8.

162. Quickert M.H., Dryden R.M. Probes for intubation in lacrimal drainage // *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* – 1970. – Vol. 74 – P. 431-433.

163. Ragab S.M., Elsherif H.S., Shehata E.M., Younes A., Gamea A.M. Mitomycin C-enhanced revision endoscopic dacryocystorhinostomy: a prospective randomized controlled trial // *Otolaryngol Head Neck Surg.* – 2012. – Vol. 147 – N. 5 – P. 937-42.

164. Rahman S.R., Roper J.A., Grove J.I., Aithal G.P., Pun K.T., Bennett A.J. Integrins as a drug target in liver fibrosis // *Liver Int.* – 2022. – Vol. 42 – N. 3 – P. 507-521.

165. Ramakrishnan V.R., Hink E.M., Durairaj V.D., Kingdom T.T. Outcomes after endoscopic dacryocystorhinostomy without mucosal flap preservation // *Am J Rhinol.* – 2007. – Vol. 21 – N. 6 – P. 753-757.
166. Ran W., Zhu D., Feng Q. TGF- β 2 stimulates Tenon's capsule fibroblast proliferation in patients with glaucoma via suppression of miR-29b expression regulated by Nrf2 // *Int J Clin Exp Pathol.* – 2015. – Vol. 8 – N. 5 – P. 4799-806.
167. Raugi G.J., Olerud J.E., Gown A.M. Thrombospondin in early human wound tissue // *J Invest Dermatol.* – 1987. – Vol. 89 – N. 6 – P. 551–4.
168. Ribatti D., Tamma R. Giulio Gabbiani and the discovery of myofibroblasts // *Inflamm Res.* – 2019. – Vol. 68 – N. 3 – P. 241-245.
169. Robertson I.B., Rifkin D.B. Unchaining the beast; insights from structural and evolutionary studies on TGFbeta secretion, sequestration, and activation // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2013. – Vol. 24 – N. 4 – P. 355-372.
170. Roda M., Corazza I., Bacchi Reggiani M.L., Pellegrini M., Taroni L., Giannaccare G., Versura P. Dry Eye Disease and Tear Cytokine Levels-A Meta-Analysis // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21 – N. 9 – P. 3111.
171. Rønnev-Jessen L., Petersen O.W. Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia // *Lab Invest.* – 1993. – Vol. 68 – N. 6 – P. 696-707.
172. Saika S., Yamanaka O., Nishikawa-Ishida I., Kitano A., Flanders K.C., Okada Y., Ohnishi Y., Nakajima Y., Ikeda K. Effect of Smad7 gene overexpression on transforming growth factor beta-induced retinal pigment fibrosis in a proliferative vitreoretinopathy mouse model // *Arch Ophthalmol.* – 2007. – Vol. 125 – N. 5 – P. 647-54.
173. Sapitro J., Dunmire J.J., Scott S.E., Sutariya V., Geldenhuys W.J., Hewit M., Yue B.Y., Nakamura H. Suppression of transforming growth factor- β effects in rabbit subconjunctival fibroblasts by activin receptor-like kinase 5 inhibitor // *Mol Vis.* – 2010. – Vol. 16 – P. 1880-92.

174. Sato M., Shibata Y., Inoue S., Igarashi A., Tokairin Y., Yamauchi K., Kimura T., Nemoto T., Sato K., Nakano H., Abe S., Nishiwaki M., Kobayashi M., Yang S., Minegishi Y., Furuyama K., Kubota I. MafB enhances efferocytosis in RAW264.7 macrophages by regulating Axl expression // *Immunobiology*. – 2018. – Vol. 223 – N. 1 – P. 94-100.
175. Seet L.F., Su R., Barathi V.A., Lee W.S., Poh R., Heng Y.M., Manser E., Vithana E.N., Aung T., Weaver M., Sage E.H., Wong T.T. SPARC deficiency results in improved surgical survival in a novel mouse model of glaucoma filtration surgery // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5 – N. 2 – e. 9415.
176. Seet L.F., Tan Y.F., Toh L.Z., Chu S.W., Lee Y.S., Venkatraman S.S., Wong T.T. Targeted therapy for the post-operative conjunctiva: SPARC silencing reduces collagen deposition // *Br J Ophthalmol*. – 2018. – Vol. 102 – N. 10 – P. 1460-1470.
177. Shao T., Li X., Ge J. Target drug delivery system as a new scarring modulation after glaucoma filtration surgery // *Diagn Pathol*. – 2011. – Vol. 6 – P. 64.
178. Shaunak S., Thomas S., Gianasi E., Godwin A., Jones E., Teo I., Mireskandari K., Luthert P., Duncan R., Patterson S., Khaw P., Brocchini S. Polyvalent dendrimer glucosamine conjugates prevent scar tissue formation // *Nat Biotechnol*. – 2004. – Vol. 22 – N. 8 – P. 977-84.
179. Shi N., Wang Z., Zhu H., Liu W., Zhao M., Jiang X., Zhao J., Ren C., Zhang Y., Luo L. Research progress on drugs targeting the TGF- β signaling pathway in fibrotic diseases // *Immunol Res*. – 2022. Vol. 70 – N. 3 – P. 276-288.
180. Shin J.M., Park J.H., Park I.H., Lee H.M. Pirfenidone inhibits transforming growth factor β 1-induced extracellular matrix production in nasal polyp-derived fibroblasts // *Am J Rhinol Allergy*. – 2015. – Vol. 29 – N. 6 – P. 408-13.
181. Simmons S.T., Sherwood M.B., Nichols D.A., Penne R.B., Sery T., Spaeth G.L. Pharmacokinetics of a 5-fluorouracil liposomal delivery system // *Br J Ophthalmol*. – 1988. – Vol. 72 – N. 9 – P. 688-91.
182. Singh V., Santhiago M.R., Barbosa F.L., Agrawal V., Singh N., Ambati B.K., Wilson S.E. Effect of TGFbeta and PDGF-B blockade on corneal myofibroblast development in mice // *Exp Eye Res*. – 2011. – Vol. 93 – N. 6 – P. 810-817.

183. Smirnov G., Pirinen R., Tuomilehto H., Seppa J., Terasvirta M., Uusitalo H., Nuutinen J., Kaarniranta K. Strong expression of HSP47 in metaplastic nasal mucosa may predict a poor outcome after primary endoscopic dacryocystorhinostomy: a prospective study // *Acta Ophthalmol.* – 2011. – Vol. 89 – N. 2 – P. 132-136.
184. Sobral L.M., Montan P.F., Martelli-Junior H., Graner E., Coletta R.D. Opposite effects of TGF-beta1 and IFN-gamma on transdifferentiation of myofibroblast in human gingival cell cultures // *J Clin Periodontol.* – 2007. – Vol. 34 – N. 5 – P. 397-406.
185. Sodhi P.K., Pandey R.M., Malik K.P. Experience with bicanalicular intubation of the lacrimal drainage apparatus combined with conventional external dacryocystorhinostomy // *J Craniomaxillofac Surg.* – 2003. – Vol. 31 – N. 3 – P. 187-90.
186. Sousa T.T.S., Schellini S.A., Meneghim R.L.F.S., Cataneo A.J.M. Intra-Operative Mitomycin-C as Adjuvant Therapy in External and Endonasal Dacryocystorhinostomy: Systematic Review and Meta-Analysis // *Ophthalmol Ther.* – 2020. – Vol. 9 – N. 2 – P. 305-319.
187. Stahnke T., Kowtharapu B.S., Stachs O., Schmitz K.P., Wurm J., Wree A., Guthoff R.F., Hovakimyan M. Suppression of TGF- β pathway by pirfenidone decreases extracellular matrix deposition in ocular fibroblasts in vitro // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12 – N. 2 – e. 0172592.
188. Sun J., Li Q., Lian X., Zhu Z., Chen X., Pei W., Li S., Abbas A., Wang Y., Tian L. MicroRNA-29b Mediates Lung Mesenchymal-Epithelial Transition and Prevents Lung Fibrosis in the Silicosis Model // *Mol Ther Nucleic Acids.* – 2019. – Vol. 14 – P. 20-31.
189. Sutariya V., Miladore N., Geldenhuys W., Bhatia D., Wehrung D., Nakamura H. Thermoreversible gel for delivery of activin receptor-like kinase 5 inhibitor SB-505124 for glaucoma filtration surgery // *Pharm Dev Technol.* – 2013. – Vol. 18 – N. 4 – P. 957-62.

190. Taguchi S., Azushima K., Yamaji T., Urate S., Suzuki T., Abe E., Tanaka S., Tsukamoto S., Kamimura D., Kinguchi S., Yamashita A., Wakui H., Tamura K. Effects of tumor necrosis factor- α inhibition on kidney fibrosis and inflammation in a mouse model of aristolochic acid nephropathy // *Sci Rep.* – 2021. – Vol. 11 – N. 1 – P. 23587.
191. Talele N.P., Fradette J., Davies J.E., Kapus A., Hinz B. Expression of α -Smooth Muscle Actin Determines the Fate of Mesenchymal Stromal Cells // *Stem Cell Reports.* – 2015 – Vol. 4 – N. 6 – P. 1016-30.
192. Tan Y.F., Mundargi R.C., Chen M.H., Lessig J., Neu B., Venkatraman S.S., Wong T.T. Layer-by-layer nanoparticles as an efficient siRNA delivery vehicle for SPARC silencing // *Small.* – 2014. – Vol. 10 – N. 9 – P. 1790-8.
193. Tanna A.P., Johnson M. Rho Kinase Inhibitors as a Novel Treatment for Glaucoma and Ocular Hypertension // *Ophthalmology.* – 2018. – Vol. 125 – N. 11 – P. 1741-1756.
194. Tilleul P., Denis P., Maignen F., Eléna P.P., Nordmann J.P., Leverage R., Rostène W. Effects of different formulations of mitoxantrone (solutions, nanospheres, liposomes) on glaucoma surgery in rabbits // *Ophthalmic Res.* – 1997. – Vol. 29 – N. 4 – P. 218-26.
195. Tovell V.E., Chau C.Y., Khaw P.T., Bailly M. Rac1 inhibition prevents tissue contraction and MMP mediated matrix remodeling in the conjunctiva // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2012. – Vol. 53 – N. 8 – P. 4682-91.
196. Toyono T., Usui T., Villarreal G. Jr., Kallay L., Matthaei M., Vianna L.M., Zhu A.Y., Kuroda M., Amano S., Jun A.S. MicroRNA-29b Overexpression Decreases Extracellular Matrix mRNA and Protein Production in Human Corneal Endothelial Cells // *Cornea.* – 2016. – Vol. 35 – N. 11 – P. 1466-1470.
197. Travis M.A., Sheppard D. TGF- β activation and function in immunity // *Annu Rev Immunol.* – 2014. – Vol. 32 – P. 51-82.
198. Tsai C.C., Wu S.B., Kau H.C., Wei Y.H. Essential role of connective tissue growth factor (CTGF) in transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)-induced

- myofibroblast transdifferentiation from Graves' orbital fibroblasts // *Sci Rep.* – 2018. – Vol. 8 – N. 1 – P. 7276.
199. Tsirbas A., Wormald P.J. Endonasal dacryocystorhinostomy with mucosal flaps // *Am J Ophthalmol.* – 2003. – Vol. 135 – N. 1 – P. 76-83.
200. Tzavlaki K., Moustakas A. TGF- β Signaling // *Biomolecules.* – 2020 – Vol. 10 – N. 3 – P. 487.
201. Varma D., Sihota R., Agarwal H.C. Evaluation of efficacy and safety of daunorubicin in glaucoma filtering surgery // *Eye (Lond).* – 2007. – Vol. 21 – N. 6 – P. 784-8.
202. Vieler M., Sanyal S. p53 Isoforms and Their Implications in Cancer // *Cancers (Basel).* – 2018. – Vol. 10 – N. 9 – P. 288.
203. Vu T.N., Chen X., Foda H.D., Smaldone G.C., Hasaneen N.A. Interferon- γ enhances the antifibrotic effects of pirfenidone by attenuating IPF lung fibroblast activation and differentiation // *Respir Res.* – 2019. – Vol. 20 – N. 1 – P. 206.
204. Wajant H., Pfizenmaier K., Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling // *Cell Death Differ.* – 2003. – Vol. 10 – N. 1 – P. 45–65.
205. Walker M., Godin M., Pelling A.E. Mechanical stretch sustains myofibroblast phenotype and function in microtissues through latent TGF- β 1 activation // *Integr Biol (Camb).* – 2020. – Vol. 12 – N. 8 – P. 199-210.
206. Wang H.H., Chen W.Y., Huang Y.H., Hsu S.M., Tsao Y.P., Hsu Y.H., Chang M.S. Interleukin-20 is involved in dry eye disease and is a potential therapeutic target // *J Biomed Sci.* – 2022. – Vol. 29 – N. 1 – P. 36.
207. Wang J., Yang Y., Xu J., Lin X., Wu K., Yu M. Pirfenidone inhibits migration, differentiation, and proliferation of human retinal pigment epithelial cells in vitro // *Mol Vis.* – 2013. – Vol. 19 – P. 2626-35.
208. Wang Q., Usinger W., Nichols B., Gray J., Xu L., Seeley T.W., Brenner M., Guo G., Zhang W., Oliver N., Lin A., Yeowell D. Cooperative interaction of CTGF and TGF-beta in animal models of fibrotic disease // *Fibrogenesis Tissue Repair.* – 2011. – Vol. 4 – N. 1 – P. 4.

209. Wang Y., Yuan Z., You C., Han J., Li H., Zhang Z., Yan H. Overexpression p21WAF1/CIP1 in suppressing retinal pigment epithelial cells and progression of proliferative vitreoretinopathy via inhibition CDK2 and cyclin E // *BMC Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 14 – P. 144.
210. Webber J., Jenkins R.H., Meran S., Phillips A., Steadman R. Modulation of TGFbeta1-dependent myofibroblast differentiation by hyaluronan // *Am J Pathol.* – 2009. – Vol. 175 – N. 1 – P. 148-160.
211. Wilson S.E. TGF beta -1, -2 and -3 in the modulation of fibrosis in the cornea and other organs // *Exp Eye Res.* – 2021. – Vol. 207 – P. 108594.
212. Wilson S.E., Chaurasia S.S., Medeiros F.W. Apoptosis in the initiation, modulation and termination of the corneal wound healing response // *Exp Eye Res.* – 2007. – Vol. 85 – P. 305-311.
213. Wong T.T., Mead A.L., Khaw P.T. Prolonged antiscarring effects of ilomastat and MMC after experimental glaucoma filtration surgery // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2005. – Vol. 46 – N. 6 – P. 2018-22.
214. Woog J.J.. The incidence of symptomatic acquired lacrimal outflow obstruction among residents of Olmsted County, Minnesota, 1976-2000 (an American Ophthalmological Society thesis) // *Trans Am Ophthalmol Soc.* – 2007. – Vol.105 – P. 649-66.
215. Wormald P.J. Powered endonasal dacryocystorhinostomy // *Laryngoscope.* – 2002. – Vol. 112 – P. 69–72.
216. Wormald P.J., Boustred R.N., Le T., Hawke L., Sacks R. A prospective single-blind randomized controlled study of use of hyaluronic acid nasal packs in patients after endoscopic sinus surgery // *Am J Rhinol.* – 2006. – Vol. 20 – N. 1 – P. 7-10.
217. Wu W., Cannon P.S., Yan W., Tu Y., Selva D., Qu J. Effects of Merogel coverage on wound healing and ostial patency in endonasal endoscopic dacryocystorhinostomy for primary chronic dacryocystitis // *Eye (Lond).* – 2011. – Vol. 25 – N. 6 – P. 746-53.

218. Xiao Y.Q., Liu K., Shen J.F., Xu G.T., Ye W. SB-431542 inhibition of scar formation after filtration surgery and its potential mechanism // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2009. – Vol. 50 – N. 4 – P. 1698-706.
219. Xing D., Bonanno J.A. Hypoxia reduces TGFbeta1-induced corneal keratocyte myofibroblast transformation // *Mol Vis.* – 2009. – Vol. 15 – P. 1827-1834.
220. Xu S.W., Liu S., Eastwood M., Sonnylal S., Denton C.P., Abraham D.J., Leask A. Rac inhibition reverses the phenotype of fibrotic fibroblasts // *PLoS One.* – 2009. – Vol. 4 – N. 10 – e7438.
221. Xue K., Mellington F.E., Norris J.H. Meta-analysis of the adjunctive use of mitomycin C in primary and revision, external and endonasal dacryocystorhinostomy // *Orbit.* – 2014. – Vol. 33 – N. 4 – P. 239-44.
222. Yamanaka O., Saika S., Ohnishi Y., Kim-Mitsuyama S., Kamaraju A.K., Ikeda K. Inhibition of p38MAP kinase suppresses fibrogenic reaction in conjunctiva in mice // *Mol Vis.* – 2007. – Vol. 13 – P. 1730-9.
223. Yanagihara T., Tsubouchi K., Gholiof M., Chong S.G., Lipson K.E., Zhou Q., Scallan C., Upagupta C., Tikkanen J., Keshavjee S., Ask K., Kolb M.R.J. Connective-Tissue Growth Factor Contributes to TGF- β 1-induced Lung Fibrosis // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2022. – Vol. 66 – N. 3 – P. 260-270.
224. Yang Y.M., Nouredin M., Liu C., Ohashi K., Kim S.Y., Ramnath D., Powell E.E., Sweet M.J., Roh Y.S., Hsin I.F., Deng N., Liu Z., Liang J., Mena E., Shouhed D., Schwabe R.F., Jiang D., Lu S.C., Noble P.W., Seki E. Hyaluronan synthase 2-mediated hyaluronan production mediates Notch1 activation and liver fibrosis // *Sci Transl Med.* – 2019. – Vol. 11 – N. 496 – eaat. 9284.
225. Ye H., Qian Y., Lin M., Duan Y., Sun X., Zhuo Y., Ge J. Cationic nanoparticles mediated IKK β targeting siRNA to modulate wound healing in a monkey model of glaucoma filtration surgery // *Mol Vis.* – 2010. – Vol. 16 – P. 2502-10.

226. Yener H.I., Ozcimen M. Long-Term Results in Transcanalicular Laser and External Dacryocystorhinostomy // *Beyoglu Eye J.* – 2020. – Vol. 5 – N. 1 – P. 22-25.
227. Yin Q., Liu H. Connective Tissue Growth Factor and Renal Fibrosis // *Adv Exp Med Biol.* – 2019. – Vol. 1165 – P. 365-380.
228. Yu J., Luo H., Li N., Duan X. Suppression of Type I Collagen Expression by miR-29b Via PI3K, Akt, and Sp1 Pathway, Part II: An In Vivo Investigation // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2015. – Vol. 56 – N. 10 – P. 6019-28.
229. Yu Q., Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis // *Genes Dev.* – 2000. – Vol. 14 – N. 2 – P. 163–76.
230. Yuan C., Zins E.J., Clark A.F., Huang A.J. Suppression of keratoepithelin and myocilin by small interfering RNAs (siRNA) in vitro // *Mol Vis.* – 2007. – Vol. 13 – P. 2083-95.
231. Yung M.W., Hardman-Lea S. Endoscopic inferior dacryocystorhinostomy // *Clin Otolaryngol Allied Sci.* – 1998. – Vol. 23 – N. 2 – P. 152-157.
232. Yu-Wai-Man C., Khaw P.T. Developing novel anti-fibrotic therapeutics to modulate post-surgical wound healing in glaucoma: big potential for small molecules // *Expert Rev Ophthalmol.* – 2015. – Vol. 10 – N. 1 – P. 65-76.
233. Yu-Wai-Man C., Tagalakakis A.D., Manunta M.D., Hart S.L., Khaw P.T. Receptor-targeted liposome-peptide-siRNA nanoparticles represent an efficient delivery system for MRTF silencing in conjunctival fibrosis // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6 – P. 21881.
234. Zanotti S., Gibertini S., Curcio M., Savadori P., Pasanisi B., Morandi L., Cornelio F., Mantegazza R., Mora M. Opposing roles of miR-21 and miR-29 in the progression of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy // *Biochim Biophys Acta.* – 2015. – Vol. 1852 – N. 7 – P. 1451-64.
235. Zeldovich A., Ghabrial R. Revision endoscopic dacryocystorhinostomy with betamethasone injection under assisted local anaesthetic // *Orbit.* – 2009. – Vol. 28 – N. 6 – P. 328-31.

236. Zhao M., Wang L., Wang M., Zhou S., Lu Y., Cui H., Racanelli A.C., Zhang L., Ye T., Ding B., Zhang B., Yang J., Yao Y. Targeting fibrosis, mechanisms and cilinical trials // *Signal Transduct Target Ther.* – 2022. –Vol. 7 – N. 1 – P. 206.
237. Zhong H., Sun G., Lin X., Wu K., Yu M. Evaluation of pirfenidone as a new postoperative antiscarring agent in experimental glaucoma surgery // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2011. – Vol. 52 – N. 6 – P. 3136-42.
238. Zilelioğlu G., Uğurbaş S.H., Anadolu Y., Akiner M., Aktürk T. Adjunctive use of mitomycin C on endoscopic lacrimal surgery // *Br J Ophthalmol.* – 1998. – Vol. 82 – N. 1 – P. 63-6.