



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ "СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ"
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА "БИОХИМИЯ"

Петър Борисов Ефтимов

***ВИСКОЕЛАСТИЧНИ СВОЙСТВА НА ЖИВОТИНСКИ МЕЙБОМИЕВИ
ЛИПИДИ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НА ПОЛИМЕРИ С КОМПОНЕНТИ
НА СЛЪЗНИЯ ФИЛМ***

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за придобиване на научна и образователна степен "ДОКТОР"

Професионално направление
4.3. – Биологически науки (Молекулярна биология – Биологични мембрани)

Научен ръководител:
доц. Георги Георгиев

**София,
2017 г.**

Благодарности:

*За проявеното търпение, неизменната подкрепа
и великодушното споделяне на идеи,
изказвам благодарност на своя
научен ръководител - доц. д-р Георги Георгиев.*

*Благодаря и на всички колеги от катедра Биохимия –
за това, че ме приеха в екипа си и насърчаваха усилията ми.*

Дисертационният труд съдържа 147 страници, 42 фигури и 7 таблици. Цитирани са 304 литературни източника.

Докторантът е зачислен в редовна докторантура към катедра „Биохимия” при Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски” с научен ръководител доц. д-р Георги Ас. Георгиев.

Изследванията по дисертацията са извършени в катедра „Биохимия“ и „Цитология, Хистология и Ембриология“ при Биологически факултет, както и в катедра „Оптика и спектроскопия“ при Физически факултет на СУ „Св.Климент Охридски“. Пробите от компанияни животни са взети във ветеринарна клиника „НОВА“, с любезното съдействие на д-р Мария Савова.

АНОТАЦИЯ

Стабилността на слъзния филм е от ключово значение за нормалното функциониране на външната очна повърхност. Доскоро се смяташе, че решаваща за стабилизирането му, е повишената резистентност към изпарение на сълзите. Съвременните експериментални доказателства обаче показват, че в същност човешките сълзи се изпаряват със скорост близка до тази на обикновен физиологичен разтвор. Това налага преосмисляне на концепцията за факторите отговорни за стабилността на слъзния филм и провеждането на нови изследвания с цел идентифициране на свойствата определящи неговата нормална функционалност.

В настоящият дисертационен труд бяха изследвани липид-белтъчни филми, образувани от секрет на мейбомиевите жлези (MGS) на човек и животни с близка до човешката (котка, куче) или много различна (заек) мигателна динамика.

С оглед установяване на значението на липид-белтъчния слой, продуциран от мейбомиевите жлези за стабилността на слъзния филм бяха направени сравнителни изследвания на цели сълзи и филми, получени от мейбиум на съответните видове. Беше извършен анализ на техните повърхностни и реологични свойства, а морфологията на слоевете беше регистрирана с Брюстер ъглова микроскопия.

Друго перспективно ново направление е изясняването на ролята на омокрянето на роговицата за стабилността на слъзния филм. Поради това беше отделено внимание на влиянието на хидрофилни полимери (мембранно свързан муцин и фармацевтични агенти) върху статичния и динамичен контактен ъгъл на роговичния епител. Взаимодействието между корнеалната повърхност и слъзния филм беше изследвано *in vitro* с помощта на моделни клетъчни линии.

Получените резултати показват наличие на взаимовръзка между повърхностните свойства на мейбомиеви липиди взети от различни животински видове и от човек и стабилността на СФ при тези видове, както и корелация между омокрянето на роговичния епител, и състава и структурата на гликокаликса.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ADDE-*Aqueous Tear-Deficient Dry Eye*, сухо око в следствие на дефицит на водни сълзи

BAM – *Brewster Angle Microscopy*, микроскопия под ъгъла на Брюстер

DES – *dry eye syndrome*, синдром на сухото око

EDE – *evaporative dry eye*, сухо око, в следствие от ускорено изпаряване на водната фаза

HCEC – *human corneal epithelial cell line*, клетъчна линия от човешки корнеален епител

HEC – *hydroxyethyl cellulose*, хидроксиетил целулоза

HPMC-*hydroxypropyl-methyl cellulose*, хидрокципропил-метил целулоза

NPL – *non-polar lipids*, неполярни липиди

MGS– мейбомиев секрет

hMGS – мейбомиев секрет от човек

cMGS – мейбомиев секрет от куче

fMGS – мейбомиев секрет от котка

rMGS – мейбомиев секретот заск

PO12 - *Poloxamer 12*, полиоксоетилен-полиоксопропилен гликол

PBS – *Phosphate Buffered Saline*, буферизиран физиологичен разтвор

TBUT – *tear brake-up time*, време за разкъсване на слъзния филм

TF – *tear film*, слъзен филм

TFLL – *tear film lipid layer*, липидно-белтъчен слой на слъзния филм

SCS – *sodium chondroitin sulfate*, натриев хондроитин сулфат

SIRC–*Statens Seruminstitut Rabbit Cornea*, клетъчна линия от заешки корнеален епител

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Поредица от изследвания на нашата и други изследователски групи, показва че еластичността на мейбомиевите липиди би могла да има важно значение за стабилизирането на фазовата граница слъза/въздух *in vivo*. От тази гледна точка е интересно да се сравнят характеристиките на филми от мейбомиеви липиди на човек с филми от мейбиум на животни с мигателни навици близки или различни от тези на човека (т.е. с различни изисквания към стабилността на слъзния филм *in vivo*).

Също така, макар че ролята на хидрофилността на твърдата подложка за стабилността на омокрящи филми *in vitro* е добре известна и в областта има сериозна дискусия относно значението на гликокаликса за нормалното овлажняване на роговичния епител, почти няма съобщени експерименти, които показват взаимовръзката между състава и структурата на гликокаликса и омокрянето на очната повърхност.

С оглед на тези отворени въпроси по отношение на функционалността на външната очна повърхност в настоящата работа бяха поставени следните цели.

1. Цели

- Да се установи има ли взаимовръзка между повърхностните свойства на мейбомиеви липиди взети от различни животински видове и от човек и стабилността на СФ при тези видове.

- Да се установи дали мейбиумът е определящ за повърхностните свойства на животинските и човешки „цели сълзи“.
- Да се установи има ли взаимовръзка между омокрянето на роговичния епител и състава и структурата на неговия гликокаликс.

С оглед постигане на поставените цели бяха формулирани следните експериментални задачи:

2. Задачи

- 2.1. Изследване на $\pi(A)$ -изотерми/изоцикли и реологични свойства на филми от мейбиум на куче, котка, заек и човек. Кучето и котката са подбрани с оглед на близките им до човешката мигателна динамика и стабилност на СФ. Заекът е подбран, точно поради противоположната причина: той има междумигателен период от около 10 минути и стабилността на СФ е 29,4 минути.
- 2.2. Изследване на $\pi(A)$ -изотерми/изоцикли и реологични свойства на филми от цели сълзи на заек и човек. Такова изследване е важно с оглед скорошни [16,17] публикации, че TFLЛ съдържа около 9% амфифилни (полярни) липиди с не-мейбомиев произход, най вероятно идващи от липокалиновия пул във водните сълзи.

- 2.3. Изследване на равновесни и динамични контактни ъгли на SIRC клетки по метода на седящото мехурче след третиране с мукоадхезивни и мукомиметични полимери (HEC, SCS, HPMS, PO12). SIRC линията е избрана, като утвърден модел на роговичен епител в токсикологични изследвания [18-20].
- 2.4. Изследване на равновесни и динамични контактни ъгли на стратифицирана HCEC клетъчна култура по метода на седящото мехурче преди и след третиране с муколитичен агент (неутрофил еластаза). HCEC клетките са подбрани поради данните, че обезсмъртени лимбални корнеални линии експресират мембранно свързани муцини. Като първична линия съставът и структурата на гликокаликса на HCEC следва да са пределно близки до тези на човешкия роговичен епител *in vivo*.
- 2.5. Изследване на влиянието на фармацевтичния агент Diquafosol (P2Y₂ пуринорецепторен агонист), върху скоростта на възстановяване на омокрянето на клетъчна линия HCEC след третиране с неутрофил еластаза.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

I. Материали

- 1. Мейбомиев секрет от куче, котка и заек**
- 2. Цели сълзи от заек**
- 3. Клетъчни линии – SIRC, HSEC**

II. Методи

1. Изследване на омокряемост на повърхности чрез измерване на контактен ъгъл по техниката на седящото мехурче.
2. Измерване на повърхностното налягане на секрет от мейбомиеви жлези.
3. Наблюдение на мейбомиев филм чрез Брюстер-ъглова микроскопия (ВМ)
4. Клетъчно култивиране
5. Колориметричен метод за определяне на преживяемост (МТТ тест) на епителиални клетки от линиите HSEC и SIRC
6. Имунофлуоресцентно маркиране за MUC 16
7. Изследване на наличието на мембранно-асоциирани муцини чрез оцветяване с Rose bengal
8. Методи за анализ на получените резултати
 - Анализ на квази-равновесни компресионни изотерми
 - Анализ на динамичните цикли на компресия/релаксация
 - Анализ на дилатационните реологични свойства по метода на стрес-релаксациите
9. Статистическа обработка на резултатите

РЕЗУЛТАТИ

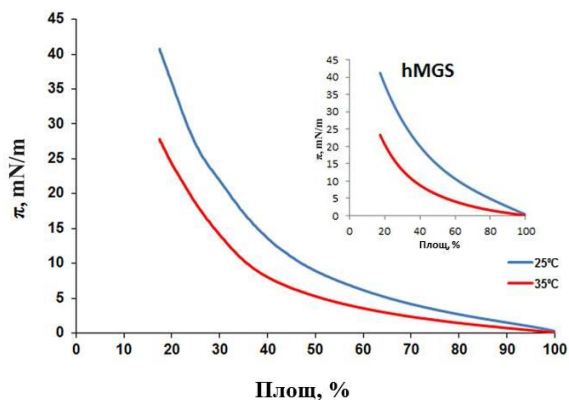
I. Изследване на $\pi(A)$ -изотерми/изоцикли и реологични свойства на филми от мейбиум на животни с мигателна динамика сходна на човешката.

1. Динамични компресионни изотерми на филми от мейбомиев секрет на куче и котка.

Мебомиевите филми от куче, котка и човек, бяха формирани чрез нанасяне на 47 μg MGS върху повърхността на ваничката, т.е., средно по 4.78 $\text{cm}^2/\mu\text{g}$ MGS. Стартовото рязко повишаване на налягането (*lift off*) се наблюдаваше при 4.5-4.7 $\text{cm}^2/\mu\text{g}$ MGS, което е в съответствие с данни от други изследователски групи [24]. Липидомните данни за съотношението на основните компоненти на MGS (восъчни и стеролни естери, триацилглицероли, ОАНФА и др.) позволяват да се апроксимира приблизителното средно молекулно тегло на мейбомиевия липид от ~ 700 kDa и средна площ за молекула от ~ 60 \AA^2 [34]. При проведените експерименти, по-време на цикличната промяна на площта, средната площ за молекула беше променяна между 56 \AA^2 и 9,7 \AA^2 , което показва, че в хода на компресията на MGS могат да бъдат получени филми, съдържащи региони с нарастваща мултислойна дебелина. Такова поведение следва да се очаква, предвид състава на мейбиума, съдържащ по-малко от 10% полярни липиди с все още спорна природа (ОАНФА или фосфолипиди) [5,6,34], локализирани на границата с водната фаза и над 90% неполярни липиди (основно восъци и стеролни естери), разпределени върху полярните липиди и формиращи плътни агрегати.

Типични компресионни изотерми за филми от cMGS и fMGS са представени на Фиг. 1 и 2. Независимо от разликите в биохимичния състав, филмите от cMGS и fMGS показват

сходни характеристики и поведение. И за двата филма (ефектът е по-изразен при cMGS) понижаването на температурата измества изотермите към по-високи стойности на повърхностното напрежение и по-високи стойности на площта, т.е. идентични стойности на π се достигат при по-слаба степен на компресия на филма при температура 25°C, в сравнение с 35°C.



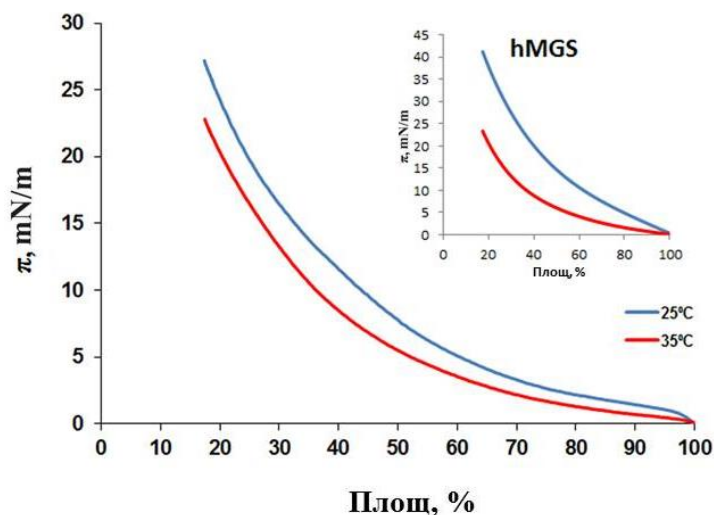
Фигура 1. Компресии $\pi(A)$ -изотерми на cMGS и hMGS (виж вмъкнатата диаграма) филми при 25°C (сини линии) и 35°C (червени линии)¹. Представителните данни за hMGS на тази и следващите фигури са взети от предишни наши изследвания [25-29].

Прави впечатление, че наблюдаваното изместване е много добре изразено при филми от човешки MGS ($\Delta\pi \sim 20\text{mN/m}$) докато за получени и наблюдавани при същите условия fMGS изместването е над два пъти по-ниско ($\Delta\pi < 8 \text{ mN/m}$). Това е в съответствие с физиологичните разлики в структурата на слъзния филм и TFLL в частност, който при котки демонстрира

¹Навсякъде по-нататък е използван същият цвят код за обозначаване на температурата, при която са проведени измерванията.

по-неравномерна дебелина и по-висока хетерогенност (виж Табл. 2 и фигура 5, панел Б). Регистрираната по-ниска мигателна честота при котки, както и съпоставимите стойности на TBUT, са в привидно противоречие с установените *in vitro* показатели на fMGS.

Следва да се отбележи, че в *in vivo* условия, котките (крепускуларни животни) не са подложени в същата степен на риск за развитие на евапоративно сухо око, свързан с фактори на околната среда, като продължително и интензивно излагане на слънчева светлина.

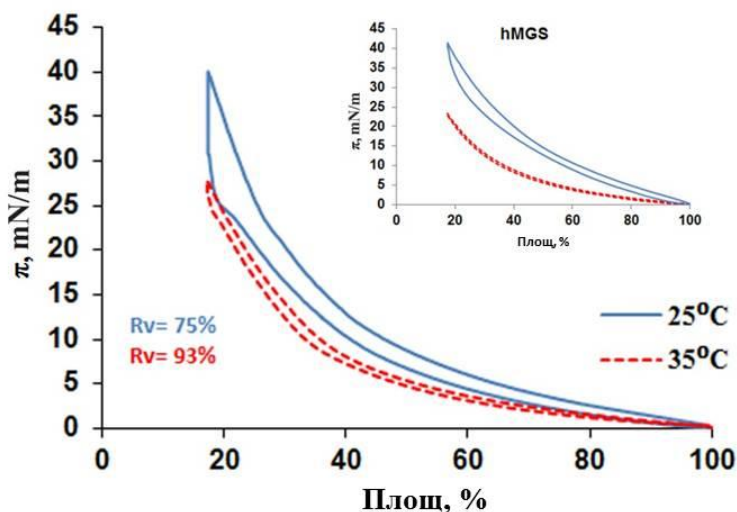


Фигура 2. Компресионни $\pi(A)$ -изотерми на fMGS и hMGS (виж вмъкнатата диаграма) филми при 25 °C и 35 °C.

Независимо от сходното поведение на филмите от cMGS и fMGS, беше наблюдавана значителна разлика в максималните стойности на повърхностното налягане достигано в края на компресията (Фиг. 1 и 2), особено валидно за fMGS.

Интерпретацията на получените данни обаче е затруднена от недостига на публикувани данни върху липидния състав на fMGS и ограничените познания за композиционните различия между животински и човешки мейбомиеви секрети.

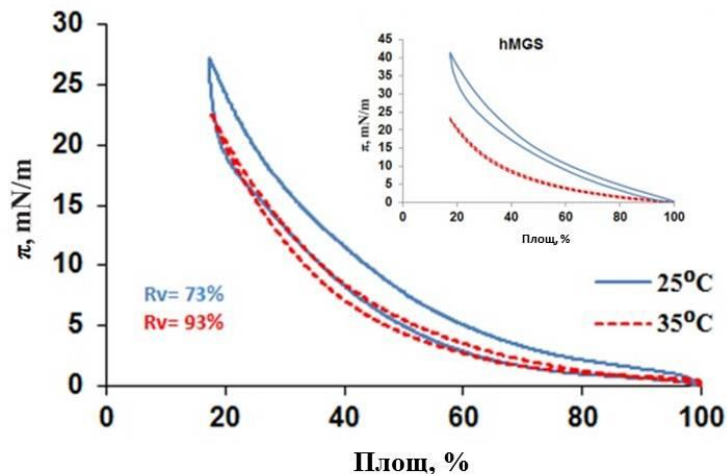
2. Компресионни изоцикли на свиване и разширяване на филми от мейбомиев секрет на куче и котка.



Фигура 3. Компресионни $\pi(A)$ -изоцикли на sMGS и hMGS (виж вмъкнатата диаграма) филми.

Беше наблюдавана много висока обратимост на изотермите при 35°C ($R_v = 93\%$ и за двете проби), докато при охлаждане π/A хистерезиса се увеличава значително и обратимостта се понижава до 75% за sMGS и 72% за fMGS. Получените резултати са в съгласие с предишни наблюдения (виж вметките на Фиг. 3 и 4) върху ефекта на температурата

спрямо позицията и формата на π/A изотерми и изоцикли от човешки мейбомиев секрет [14], както и върху ефекта от термалната предистория на филма спрямо горепосочените параметри [28]. При провежданите експерименти филмите бяха темперирани в продължение на един час за всяка от тестваните температури за да се избегне ефекта на термалната предистория и да се получат идентични стойности на π/A кривите.



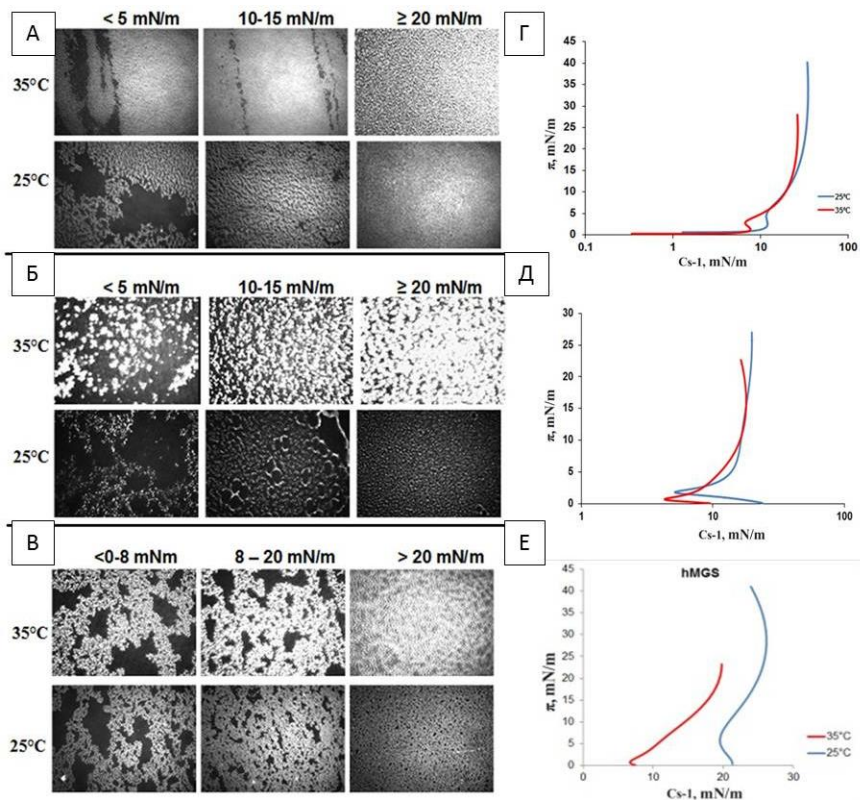
Фигура 4. Компресионни π/A -изоцикли на fMGS и hMGS (виж вмъкнатата диаграма) филми при 25 °C и 35 °C.

3. Изследване на повърхностната морфология на филми от мейбомиев секрет на fMGS и cMGS.

Микрофотографски ВАМ изображения на cMGS и fMGS (Фиг.5) показват наличието на по-тъмни и съответно по-тънки, заедно с по-светли и по-плътни региони, при $\pi < 5$ mN/m, т.е. при повърхностното напрежение, при което бяха наблюдавани инфлексните точки на π/Cs^{-1} зависимостта. Аналогично поведение имат и човешките мейбомиеви филми [26-28,30],

представителни ВAM изображения на които, са показани в панел В на същата фигура. По-тънките, тъмни области започват да се затварят и постепенно изчезват с повишаване на повърхностното налягане. Повишаването на плътността на филмите, корелира с покачване на температурата, както може да се види, при сравнение на микрографиите на cMGS и fMGS при 25⁰C и 35⁰C. Подобно термално поведение имат и филмите от hMGS. Филмите от fMGS показват характерни морфологични различия (по-висока хетерогенност), както и по-ниски максимални стойности на компресионния модул Cs⁻¹.

Зависимостта π/Cs^{-1} (Фиг. 5) показва, че стойността на повърхностния модул π и при двете експериментални температури за cMGS и fMGS филми остава под 50 mN/m, съответствайки на течно-разтегната фаза (liquid expanded layers) според класификацията на Davies и Rideal [24]. Независимо от това при температура 25⁰C се формират по-еластични слоеве, в които стойностите на Cs⁻¹ достигат 35 mN/m (cMGS) и 24 mN/m (fMGS). При всички π/Cs^{-1} криви, инфлексна точка се наблюдава при стойности на повърхностното налягане < 5 mN/m.



Фигура 5. Представителни ВАМ микрографии (720 x 400 μm) от sMGS (А), fMGS (Б) и hMGS филми (В) наблюдавани при посочените температури и стойности на повърхностното налягане. Показана е и зависимостта на компресионния модул, Cs^{-1} , от повърхностното налягане за sMGS (Г), fMGS (Д) и hMGS (Е) при 25°C и 35°C. За всички разглеждани филми и при двете посочени температури се наблюдава инфлексна точка при ниски стойности на повърхностното налягане $\pi < 8\text{-}10$ mN/m.

Подобни форма на кривите и диапазон на стойностите за същата зависимост, бяха наблюдавани и за филми от човешки

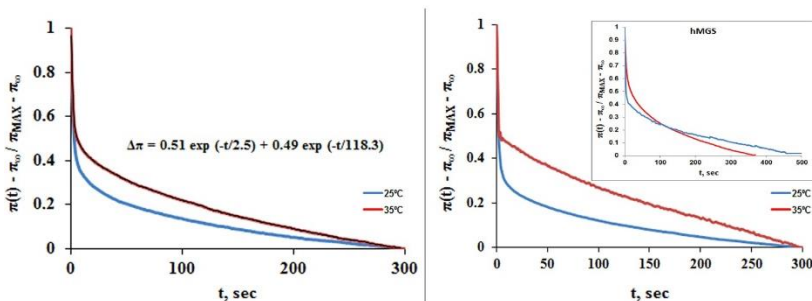
мейбиум [26-28] (виж панел Е на Фиг. 5), но с инфлексна точка при по-високо π (8 - 10 mN/m) за температура 25°C.

4. Изследване на дилатационните реологични характеристики на fMGS и cMGS.

Експериментите са проведени при повърхностно напрежение от 20 mN/m поради две причини:

- за сравнение на нашите данни с предишни реологични изследвания на MGS проведени при идентични стойности на π [13].
- рентгеново дифракционни изследвания показват, че при $\pi > 18$ mN/m филмите от MGS нямат монослойни региони, а представляват мултислой с дебелина характерна за TFL *in vivo* [23].

Типични стрес-релаксационни криви на филми от cMGS и fMGS, както и представителна стрес-релаксация за hMGS са представени на фиг. 6. Кривите на релаксация на повърхностното налягане на различните мейбомиеви филми върху субфаза от PBS са анализирани с уравнение на двойно-експоненциално затихване. И при двете температури филмите от cMGS и fMGS показваха сходно с човешкия мейбиум поведение. Всички стрес-релаксации бяха повторени три пъти, като разликата в стойностите при повторенията не надхвърляше 1,5 процента.



Фигура 6. Типични криви на релаксация на повърхностното налягане в координати $(\pi t - \pi_{\infty}) / (\pi_{\text{MAX}} - \pi_{\infty})$ от t анализирани с уравнение на двойно-експоненциално затихване за филми от cMGS, fMGS и hMGS (виж вмъкнатата диаграма) върху субфаза от физиологичен разтвор. Времето е нормализирано с начало моментът на релаксация. Построена е двойно затихваща експоненциална крива апроксимираща с точност $R^2 = 0,99$ получените данни, а съответстващото ѝ уравнение е показано за cMGS при 35°C.

След рязко, малко по обем свиване на площта на мейбомиевия филм, в него започва структурна реорганизация, съпроводена с молекулна преориентация, адсорбция/десорбция, обратно разтичане на фазовата граница, които протичат до достигане на ново равновесно състояние. Посочените процеси протичат в рамките на две релаксационни времена - бързо релаксационно време, τ_1 , в което се осъществяват предимно еластични процеси и бавно релаксационно време, τ_2 – предимно вискозни. Полученото плато в зависимостта, $\Delta\pi_{\infty}$, е мярка за равновесна еластичност, характеризираща резервната енергия във филма. По този начин отношението $(A_{-1}) \exp(-t|\tau_{-1}) + \Delta\pi_{\infty} / \Delta\pi(t)$, предоставя информация за приноса на еластичността към $\Delta\pi(t)$, докато отношението $(A_{-2} \exp(-t|\tau_{-2})) / \Delta\pi(t)$, дава количествена представа, за протичащите бавни вискозно-доминирани процеси. Наблюдавани бяха две релаксационни времена: бързо, в порядъка $\tau_1 = 1,53 - 2,43 \text{ s}$ и бавно - $\tau_2 = 103,7 - 146 \text{ s}$.

Стойностите на релаксационните времена τ_1 и τ_2 , на константите A_1 и A_2 , както и на отношението между тях, са представени в таблица 4.

Таблица 1. Стойности на релаксационните времена τ_1 и τ_2 , и константите A_1 и A_2 , получени посредством описание на кривите от фиг. 6, чрез зависимост на двойно експоненциално затихване – ($R^2 \geq 0,98$).

Изследван вид	T, °C	τ_1 , sec	τ_2 , sec	A_1	A_2	A_1/A_2
hMGS	25	2,14	206,36	0,60	0,40	1,50
	35	5,00	136,16	0,51	0,49	1,06
cMGS	25	2,43	103,67	0,67	0,33	2,03
	35	2,50	118,34	0,51	0,49	1,06
fMGS	25	1,85	106,69	0,71	0,29	2,44
	35	3,00	146,17	0,52	0,48	1,08

Повишаването на температурата води до понижаване на отношението A_1/A_2 , като по-ниската температура се отразява по-сериозно върху реологичното поведение на животински мейбомиеви филми, при които отношението се повишава, за сметка еластичните процеси.

5. Дискусия

Проведените изследвания демонстрираха известни разлики във физиологичните свойства на кучешки и котешки мейбомиеви филми, на фона на сходното поведение, което като цяло показват. Понижаването на температурата (от 35°C до 25°C) доведе до изместване на изотермите към по-високи стойности на повърхностното напрежение при cMGS и fMGS, с

ефект прогресиращ със степента на компресия на филма; еднакви стойности на π бяха достигани при по-голяма повърхностна площ при 25°C отколкото при 35°C. Също така, при температура 35°C, дебелината на филма се увеличаваше, както може да се види по увеличаването на интензитета на приложените ВАМ микрографии (Фиг. 5). Подобно поведение беше наблюдавано *in vitro* и за човешки мейбиум (виж вметките на фигури 14 -17 и панел Е на фигура 5) и за восъчни естери [17,25-28]. Клинични наблюдения извършени с помощта на специални очила, в които въздухът в контакт с очната повърхност се изолира от външната среда, също показват корелация между формирането на по-дебел TFL и повишаване на температурата [7]. Резултатът е противоположен на очакваното за липидни монослое (при които охлаждането обикновено води до кондензация и необходимост от компресия на филма до по-малка площ за достигане на определена стойност на π), но корелира добре с данните за структурата на мейбомиевите филми.

Интерпретацията на промените в $\pi(A)$ -изотермите при 25°C и 35°C корелира значително с очакваните температурно-индуцирани изменения в разтворимостта на полярните липиди в обема на масления слой и адсорбцията им към водната повърхност. Мейбиумът формира мултислоеве от полярни липиди, разположени на водната повърхност, и „маслена шапка“ от неполярни липиди върху тях. При 35°C повечето неполярни липиди са стопени и масленият слой може да се разглежда като липофилна течност с разпръснати в нея липидни кристални структури. В подобни системи този маслен слой служи като разтворител или резервоар за полярните липиди. Изменения в температурата биха променили разпределението на полярните липиди между „маслената шапка“ и фазовата граница липиден

филм/субфаза, като понижаването на температурата би подпомогнало позиционирането на липидите в масления слой. Тази хипотеза е в съгласие с изместването на изотермите към по-високи площи при еквивалентни повърхностни налягания за сMGS, и за fMGS, при $\pi > 10 \text{ mN/m}$ (т.е. при повърхностни налягания, при които мултислойната структура е доминираща в мейбомиевия филм). Независимо от това, други фактори, като специфични взаимодействия между полярни и неполярни липиди, изменения в структурата и консистенцията на масления слой (от маслено-подобна течност при 35°C до набогатена с кристални агрегати фаза с понижени свойства на разтворител при 25°C) и др., също допринасят за наблюдаваните ефекти.

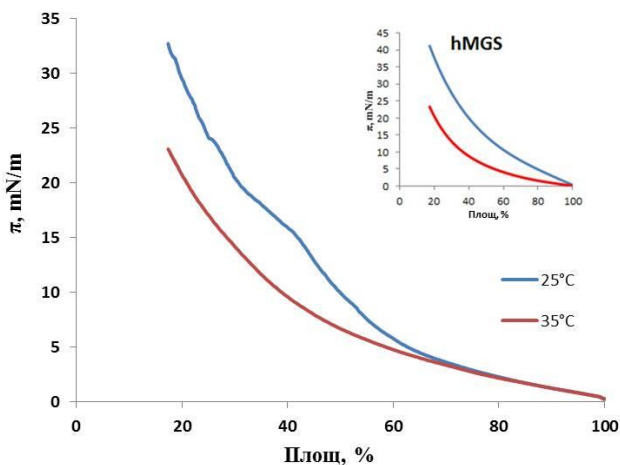
Реологичните свойства на сMGS и fMGS също до голяма степен съвпадат с тези на човешкия мейбиум, като в по-голяма степен това се отнася за филми от мейбомиев секрет на куче. И за двата разглеждани мейбиума при 25°C преобладават предимно еластичните процеси ($A1/A2 > 2$) докато при температура от 35°C приносят на еластичните и вискозни процеси беше почти еднакъв ($A1/A2 = 1,04 - 1,07$). Подобно поведение на мейбомиевите липиди като цяло, може да бъде обяснено с по-високата степен на топене на липидните ацилни вериги при повишаване на температурата, водещо до повишена дифузионна активност на молекулите и оттам до по-голяма възможност за участие във фазови преходи и енергетично дисипативни процеси.

II. Изследване на $\pi(A)$ -изотерми/изоцикли и реологични свойства на филми от мейбиум на животни с мигателна динамика различна на човешката.

Поради големият опит в употребата му като опитно животно, големият размер на очната повърхност в сравнение с

гризачите и по-близкото филогенетично родство до човека, заекът е сочен като подходящо моделно животно за целите на транслационната медицина [46]. Различията в анатомичната структура на лакрималната му единица, по-високият осмоларитет на слъзния филм, и най-вече коренно различната мигателна динамика и стабилност на слъзния филм, го правят привлекателен обект на изследване, с оглед нов подход към разбиране на механизмите на DES и намиране на ефективно лечение.

1. Динамични компресионни изотерми на филми от мейбомиев секрет на заек.



Фигура 7. Компресионни $\pi(A)$ -изотерми на rMGS и hMGS (виж вмъкнатата диаграма) филми при 25 °C и 35 °C.

Аналогично на експериментите с останалите разглеждани видове, мейбомиевите филми от заек, бяха формирани чрез нанасяне на 47 μg MGS върху повърхността на ваничката, т.е., средно по 4.78 $\text{cm}^2/\mu\text{g}$ MGS. Беше наблюдаван подобен ефект от

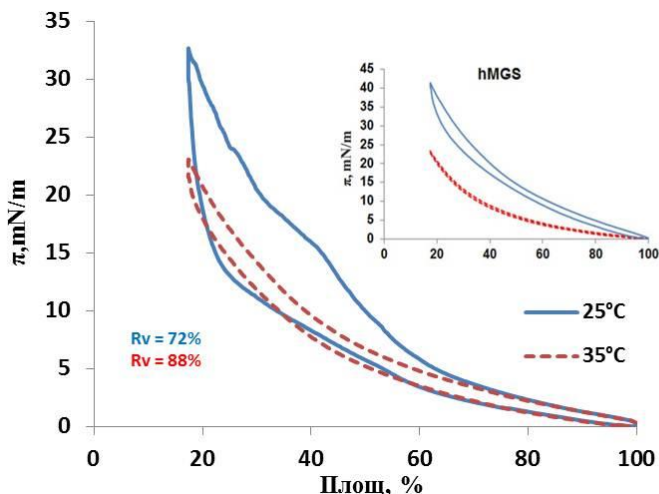
понижението на температурата, т.е. повишаване на π и понижаване на компресионната площ, необходима за достигане на еквивалентни стойности на повърхностното напрежение. Следва да се отбележи по-високата устойчивост на температурни изменения на rMGS, демонстрирана от паралелния ход на изотермите при 25°C и 35°C в хода на компресията до свиване на площта с 38% от първоначалната (Фиг. 7).

2. Компресионни изоцикли на свиване и разширяване на филми от мейбомиев секрет на заек.

Филмите от rMGS, показаха същата тенденция към повишаване на хистерезиса кривите от π/A -изоцикли с понижаване на температурата, наблюдавана и при другите изследвани видове. Като цяло обратимостта при филми, формирани от заешки мейбиум беше по-ниска ($R_v = 88\%$ за температура 35°C и $R_v = 72\%$ за температура от 25°C) от разгледаните филми от човешки, кучешки и котешки мейбомиев секрет (Фиг. 8).

Както и при експериментите с sMGS и fMGS беше установена висока устойчивост към молекулна миграция от повърхността към водната субфаза – позицията и формата на π/A бримките останаха непроменени в продължение на 50 последователни циклични изменения на площта (данните не са приложени). Бяха проведени и контролни експерименти с високо количество мейбиум (до 70 μg) депонирано във въздуха на повърхността на ваничката, както и с максимална компресия на филма до много ниски стойности на повърхностната площ (~5% от началната площ и стойности на π до 50 mN/m) без да бъде наблюдаван колапс. Този резултат потвърждава редица предишни наблюдения за неколабируемата природа на човешки

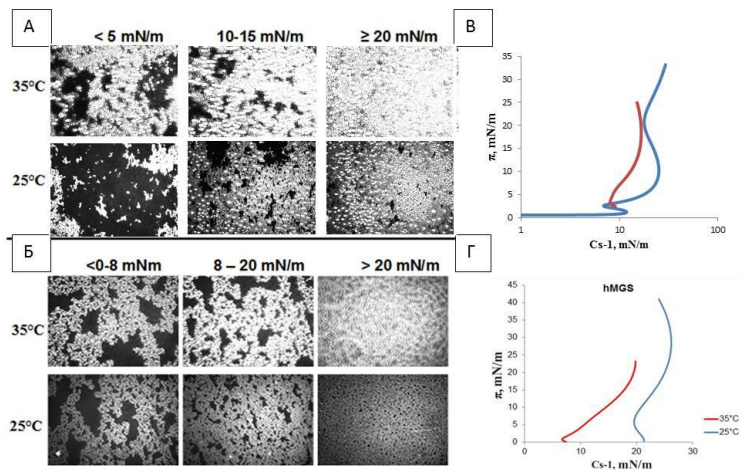
и животински мейбомиеви филми, формирани на въздушно-водната граница [12, 14,24,25-28,30].



Фигура 8. Компресионни $\pi(A)$ -изоцикли на gMGS и hMGS (виж вмъкнатата диаграма) филми при 25 °C и 35 °C.

3. Изследване на повърхностната морфология на филми от gMGS.

Повърхностната морфология на филми от заешки мейбомиев секрет, беше изследвана, чрез наблюдение под ъгъла на Брюстер. Беше установена хетерогенна структура, включваща тъмни и светли ивици, които динамично променят размера и площта си при компресия. Приложените микрографии (Фиг. 9) показват по-сериозна степен на вариации в интензитета на получените изображения при температура 25°C.

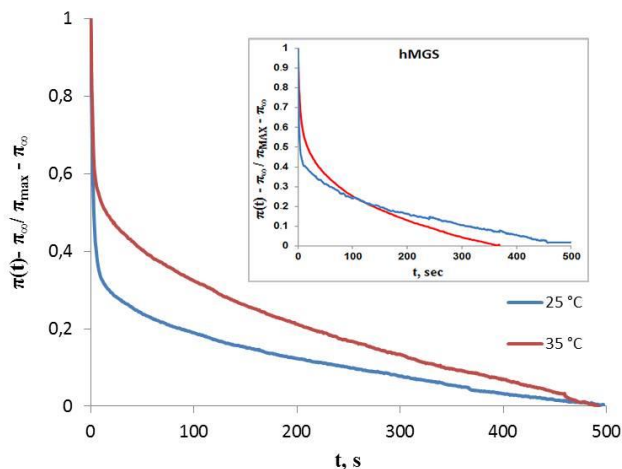


Фигура 9. Представителни ВАМ микрографи (720 x 400 μm) от rMGS (А) и hMGS филми (Б) наблюдавани при посочените температури и стойности на повърхностното налягане. Показана е и зависимостта на компресионния модул, Cs^{-1} , от повърхностното налягане за rMGS (В) и hMGS (Г) при 25°C и 35°C. За всички разглеждани филми и при двете посочени температури се наблюдава инфлексна точка при ниски стойности на повърхностното налягане $\pi < 8\text{-}10$ mN/m.

Вижда се, че при компресия и стойности на π над 20mN/m все още има тъмни, по-тънки зони, за разлика от микрографиите при 35°C, отличаващи се с по-плътна и униформна структура. В зависимостта π/Cs^{-1} , беше наблюдавана инфлексна точка при $\pi < 5\text{mN/m}$, като отново, при температура 25°C бяха регистрирани по-високи стойности.

4. Изследване на дилатационните реологични характеристики на филми от rMGS.

Експериментите са проведени при повърхностно налягане от 20 mN/m, поради посочените в точка I.4 причини и за съпоставимост с получените за котки и кучета резултати.



Фигура 10. Типични криви на релаксация на повърхностното налягане в координати $(\pi(t) - \pi_0) / (\pi_{\max} - \pi_0)$ от t анализирани с уравнение на двойно-експоненциално затихване за филми от rMGS и hMGS (виж вмъкнатата диаграма) върху субфаза от физиологичен разтвор. Времето ос е нормализирана с начало моментът на релаксация.

Процесите на реорганизация, адсорбция и десорбция, както и структурните промени настъпващи при спонтанното достигане на ново равновесие след малка стъпкова компресия на филма, са описани съгласно модела на Максвел, аналогично на разгледаните вече в точка I.4. Наблюдавани бяха две релаксационни времена: бързо, $\tau_1 = 2,34 - 2,49$ s и бавно, $\tau_2 = 195,26 - 204,90$ s, като отношението между константите, отговарящи за приноса на еластичната и вискозната компонента в процеса на релаксация е по-равномерно разпределено при по-високата температура ($A_1/A_2 = 1,13$), докато при по-ниската температура е изтеглено в полза на еластичните-доминираните процеси ($A_1/A_2 = 2,03$). Тези данни не се отличават съществено от показателите на човешкия, котешкия и кучешкия мейбомиев

секрет, което е в контраст с различната мигателна динамика на посочените видове.

5. Дискусия.

Както компресионните изотерми и изоцикли, регистриращи повърхностните свойства на мейбомиевия секрет, така и морфологията на наблюдаваните филми от rMGS, не се отличават съществено от тези на разгледаните филми от sMGS и fMGS. По отношение на реологичните свойства също не беше регистрирана сериозна разлика в процесите на реорганизация на филма при промяна на температурата. Съвкупността от тези резултати показва, че значителните разлики в стабилността на слъзния филм при заек (TBUT = 29,4±3,4 **минути**, спонтанни мигателни движения веднъж на 10 минути [15]) се дължат на други компоненти на слъзния филм.

Освен физиологичните различия, като повишен осмоларитет на слъзния филм и сравнително тясна граница на рН, не трябва да се пренебрегва и чисто анатомичните разлики, заключаващи се в наличието на допълнителна структура (Хардериевата жлеза), допринасяща за формиране на слъзната секреция.

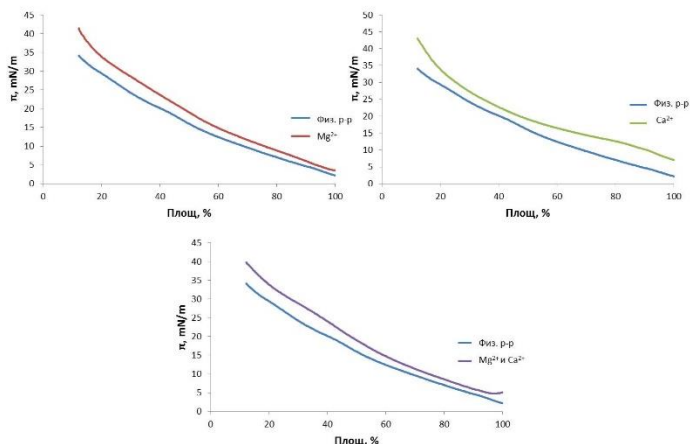
III. Изследване на повърхностни характеристики и реологични свойства на филми от цели слъзи на заек в присъствие на двувалентни йони

Осмоларитет на слъзния филм, често се разглежда като един от най-достоверните маркери за диагностика на синдрома на сухото око. Неговото повишаване, за сметка на повишаването на концентрацията най-вече на двувалентни катиони, води до понижаване на повърхностното налягане на TFLL (*in vitro*) и нарушаване на стабилността на слъзния филм

[14]. Получените резултати от изследване на gMGS, както и физиологично по-високият осмоларитет на слъзите му, бяха отправна точка за извършване на експеримент с цели сълзи от заек.

1. Динамични компресионни изотерми на филми от цели сълзи на заек.

Сълзите, събрани по максимално щадящ за експерименталните животни начин, бяха в достатъчен обем за нанасяне на неразредена проба от 10 μ l върху ваничка с площ 80cm². Като субфаза беше използван физиологичен разтвор (свободен от Ca²⁺ и Mg²⁺ йони), в който последните бяха прибавяни по отделно и заедно, до достигане на физиологична концентрация за заек - 0,75mM/l и 1,13mM/l, съответно. За контрола беше използван само физиологичен разтвор. Експериментите бяха извършвани при температура 35°C, считана за физиологично релевантна температура на корнеалната повърхност [21]. Резултатите, представени графично на фиг. 11, показват значително по-високи стойности на π , при добавяне на двувалентни йони в субфазата. Най-изразен е ефектът при добавяне на Ca²⁺, а добавянето на магнезиеви и калциеви йони едновременно не води до очаквания кумулативен ефект.



Фигура 11. Компресионни $\pi(A)$ -изотермина цели сълзи от заек с добавка в субфазата на двувалентни магнезиеви (А), калциеви (Б) и комбинация от двата (В) йони. За контрола е използван физиологичен разтвор.

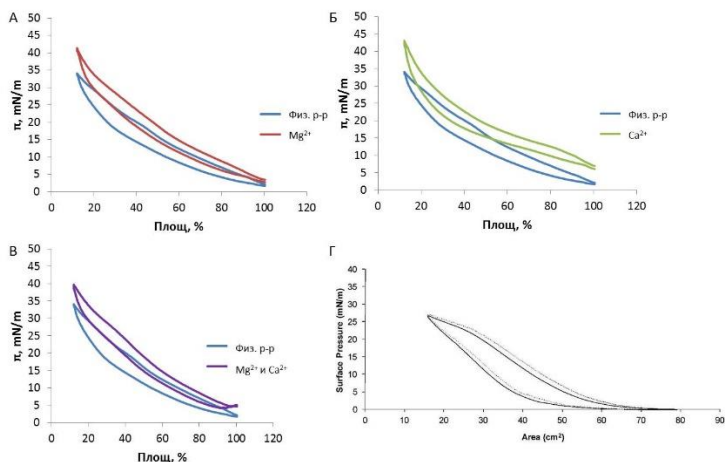
Сравнение с изотермите от чист γ MGS, показва по-високи стойности на повърхностното налягане, като разликата е от порядъка на 10mN/m. Този резултат показва наличието на допълнителни повърхностно активни вещества с не-мейбомиев произход, постъпващи на границата TFLL/водна фаза.

2. Компресионни изоцикли на свиване и разширяване на филми от цели сълзи на заек.

На фиг. 12 са представени резултати от последователни цикли на свиване и разширяване на филми от цели сълзи от заек, в присъствие и отсъствие на двувалентни катиони.

Изследванията са извършени при температура 35°C, а представените данни са от 10 последователни изоцикъла, с вариация между стойностите под 2%. За сравнение са приложени данни от изследване на човешки сълзи при същите

условия и температура. Хистерезисът на бримките показва пониски стойности на обратимост в сравнение с тези на чистия rMGS, което е индикация за по-бавната реорганизация на целите сълзи, вероятно поради наличието на по-голямо количество амфифилни липиди на фазовата граница.



Фигура 12. Компресийни $\pi(A)$ -изоцикли на цели сълзи от заек в присъствие на дивалентни магнезиеви (панел А), калциеви (панел Б) и комбинация от двата (панел В) йони. За контрола е използван физиологичен разтвор ($R_v = 75\%$), а добавянето на Mg^{2+} , Ca^{2+} или комбинацията им повишава обратимостта ($R_v = 82\%$). Компресийни $\pi(A)$ -изоцикли на цели сълзи от човек (панел Г)² – с пунктир е отбелязано добавянето на дивалентни йони.

Отсъствието на дивалентни йони приближава стойностите на R_v , до физиологично нормалните за човешки сълзи (виж панел Г, Фиг.12). Нормалната концентрация на Mg^{2+} и Ca^{2+} йони в човешкия TF е съответно 0,39mM и 0,36mM.

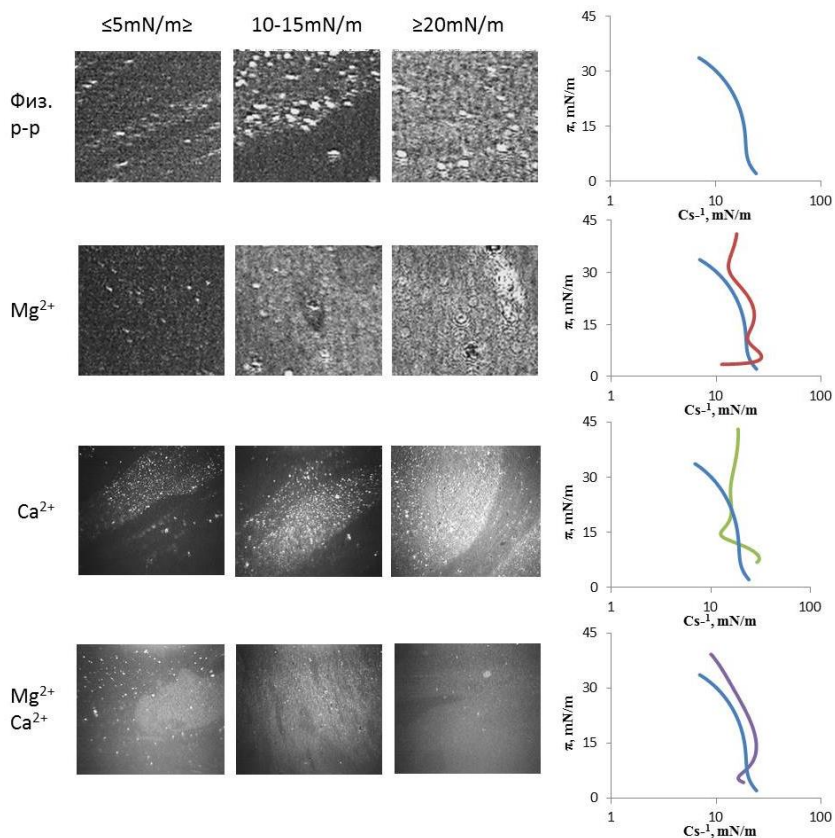
² Фигурата от панел Г е взета от Wei XE et al. (2012) [12]. Резултатът е потвърден от нас с контролен експеримент.

Повишаването на тази концентрация до нормалната за заешките сълзи моларна концентрация от 1,13mM и 0,75mM не доведе до почти никаква промяна в обратимостта на филма в проведения от нас контролен експеримент. Този резултат показва отсъствието на обект за взаимодействие на излишъка от катиони, какъвто биха били отрицателно заредените фосфатни групи в главите на фосфолипидите или други амфифилни липиди [21].

3. Изследване на повърхностната морфология на филми от цели сълзи от заек.

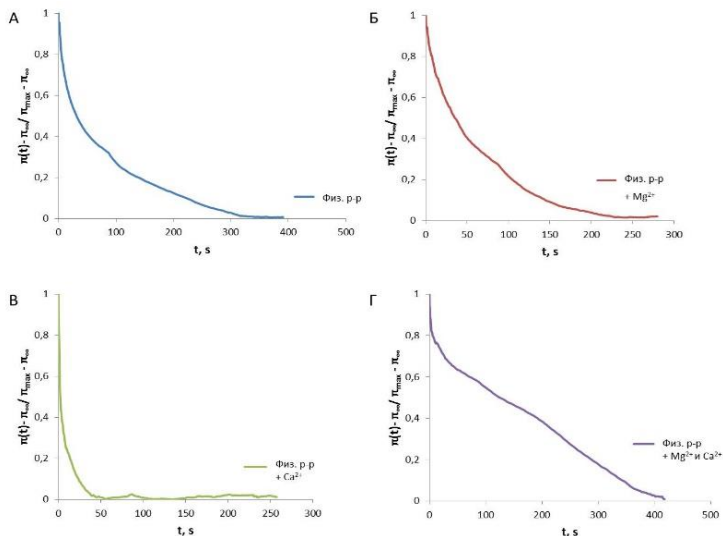
Повърхностната морфология на цели сълзи от заек, показва картина на по-хомогенни и по-големи по размер светли и тъмни зони, които при стойности на $\pi > 20\text{mN/m}$ се затварят, образувайки плътен слой с униформна дебелина. Добавянето на двувалентни катиони и особено на калций, измества инфлексната точка в π/Cs^{-1} зависимостта, към по-високи стойности на π , отразявайки по-комплексната реорганизация на филма (Фиг. 13).

Добавянето на двувалентни йони увеличава общия интензитет на сигнала и същевременно „изглажда“ пиковите характерни за хетерогенните зони. Това вероятно корелира с пораномерното разпределение на отрицателно заредените анионни липиди на границата TFL/водна фаза.



Фигура 13. Представителни ВАМ микрографии (720 x 400 μm) на цели слъзи от заек в присъствие на двувалентни Mg^{2+} , Ca^{2+} и комбинация на двата йони, наблюдавани при посочените стойности на повърхностното налягане и $t = 35^\circ\text{C}$. Показана е и зависимостта на компресионния модул, Cs^{-1} , от повърхностното налягане при същата температура.

4. Изследване на дилатационните реологични характеристики на филми от цели слъзи от заек.



Фигура 14. Типични криви на релаксация на повърхностното налягане в координати $(\pi(t) - \pi_{\infty}) / (\pi_{\max} - \pi_{\infty})$ от t анализирани с уравнение на двойно-експоненциално затихване за филми от цели слъзи от заек върху субфаза от физиологичен разтвор (А) и в присъствие на двувалентни магнезиеви (Б), калциеви (В) и комбинация от двата (Г) йони.

Типични стрес-релаксационни криви на филми от цели заешки слъзи в присъствие и отсъствие на двувалентни йони са показани на фиг. 14.

Първичните данни са описани чрез зависимост на двойно-експоненциално затихване. Резултатите показват, че добавянето на двувалентни йони уравнива приноса на еластичните и вискозните процеси към реорганизацията на филма, настъпваща след рязко минимално изменение на площта му.

Данните за числените стойности на бързите и бавните релаксационни времена и на константите A_1 и A_2 , са

представени в таблица 5, като са добавени и съответните стойности за чист rMGS.

Отсъствието на двувалентни йони повишава отношението A_1/A_2 , с фактор близък до получения при понижаване на температурата на чистия rMGS. Добавянето на двувалентни катиони придава на процеса на релаксация характерното разпределение на еластични и вискозни процеси, описано при мейбомиев филм от разглежданите видове.

Таблица 2. Стойности на релаксационните времена τ_1 и τ_2 , и на константите A_1 и A_2 , получени посредством описание на кривите от фиг. 14, чрез зависимост на двойно експоненциално затихване ($R^2 \geq 0,967$).

	T, °C	τ_1 , sec	τ_2 , sec	A_1	A_2	A_1/A_2
NaCl (1,5M)	35	7,87	112,86	0,67	0,32	2,09
+ Mg ²⁺ (1,13mM)	35	4,96	307,95	0,58	0,42	1,38
+ Ca ²⁺ (0,75mM)	35	1,11	143,76	0,52	0,48	1,08
+ Ca ²⁺ и Mg ²⁺	35	1,02	204,88	0,65	0,35	1,85
rMGS	35	2,34	204,90	0,53	0,47	1,13
rMGS	25	2,49	195,26	0,65	0,32	2,03

5. Дискусия

За разлика от разглежданите досега повърхностни и реологични свойства на мейбомиев секрет на животните с близка до човешката мигателна динамика, целите сълзи от заек, показват характерна специфика. При сравнение между заешки и човешки цели сълзи, се вижда че първите се влияят значително от осмоларитета на водната субфаза. На първо място, това

влияние се отразява в понижаването на максималното повърхностното налягане в наблюдаваните компресионни изотерми, което се наблюдава в отсъствие на Ca^{2+} и Mg^{2+} . Ефектът на повишаване на π е най-значим при добавяне на калциеви йони до физиологично релевантната концентрация за заешки сълзи. Същевременно нито добавянето, нито отнемането на двувалентни йони, оказва ефект върху поведението на човешки цели сълзи [12]. Предложеният механизъм за функцията на катионите във водната фаза на слъзния филм, касае тяхното взаимодействие с анионни или амфифилни липиди, и с основни протеини като липокалина, което води до стабилизиране на слъзния филм [47]. Различия в един от основните класове амфифилни липиди – ОАНФА, са наблюдавани както в количествено, така и в качествено отношение. Мас-спектрометричен анализ показва, че докато кучешките ОАНФА са много близки до човешките по дължина и степен на ненаситеност, за заешките е установено, че са по-наситени [8].

Ефектът върху хистерезиса при изоциклите на заешки сълзи, показва значително повишаване на обратимостта (от 75% до 82%), при добавяне на двувалентни катиони, което все пак е далеч от обратимостта на филми от чист rMGS ($R_v = 88\%$ при същата температура) и hMGS. Този резултат се съгласува добре с предишни изследвания, обвързващи динамиката на $\pi(A)$ зависимостта при човешки сълзи по-скоро с ефекта на водната фаза и съдържащите се в нея протеини, отколкото с участието на мейбомиевите липиди [9].

Дилатационната реология на филми от цели сълзи, сравнена с тази на филми от rMGS, показва съществена прилика между резултатите получени в отсъствие на двувалентни катиони и тези при понижаване на температурата под

физиологично установената. И в двата случая, коефициентът на разпределение A_1/A_2 се повиши за сметка на по-значителен принос на еластичните процеси в реорганизацията на филма. Тези прилики показват, че за разлика от човека, двувалентните катиони са важен компонент за нормалната стабилност на TF при заек. Тази разлика, наред с различния композиционен състав на слъзния филм, съдържащ повишено количество амфифилни липиди, може да е от ключово значение за създаването на изкуствена, бионаподобяваща реплика на нов клас изкуствени сълзи, способни да поддържат стабилността на слъзния филм за по-дълго време.

IV. Взаимодействие на хидрофилни полимери с епителиални клетъчни линии

Употребата на вискозни полимерни добавки подобрява ефективността на изкуствените сълзи, като способства разпространето им и адхезията им към мукозния слой на очната повърхност. Този ефект се дължи на подобряване на омокряемостта на увредената повърхност на корнеалния епителиален клетъчен слой. Независимо от това, пациентите показват лимит на толерантност спрямо вискозни офталмологични състави, отвъд който могат да се наблюдават симптоми като замъглено зрение, рефлекторно мигане и затруднение в клепачните движения [31], поради това терапевтичните концентрации на тези добавки не могат да надвишават емпирично установените граници. Целта на проведените експерименти, беше да се установи ефективността на действие на омокрящи агенти върху клетки с обратимо увредена повърхност.

Първоначално беше изследвана група от 9 полимера и повърхностно активни вещества, включваща различни

модификации на хидрокси-пропил метил-целулоза, хидрокси-етил целулоза и полоксамери.

Четири хидрофилни полимера, хидроксиетил целулоза (HEC), хидроксипропил метил-целулоза или хипромелоза (HPMC), натриев хондроитин сулфат (SCS) и полиоксоетилен-полиоксопропилен гликол (полоксамер 12* - PO12*³), бяха избрани за проверка на ефекта върху омокряемостта на адхезивната корнеална епителиална линия SIRC.

Таблица 3. Основни характеристики на използваните полимери и експериментал-ни концентрации.

Име	CAS номер	Средно M _w	Използвани концентрации (%)	Производител
HEC	71888-87-4	1 000 000	0.01, 0.10, 0.20, 0.40, 0.60	Sigma-Aldrich
HPMC	9004-65-3	75 000	0.01, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40	Sigma-Aldrich
SCS	9082-07-9	500	0.01, 0.05, 0.10, 0.30, 0.50	Plantsman Ltd.
PO12*	9003-11-6	12688	0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.10	BASF

Данни за използваните съединения, както и техните обичайни концентрации, при употребата им в състава на препарати за третиране на DES, са представени в таблица 6.

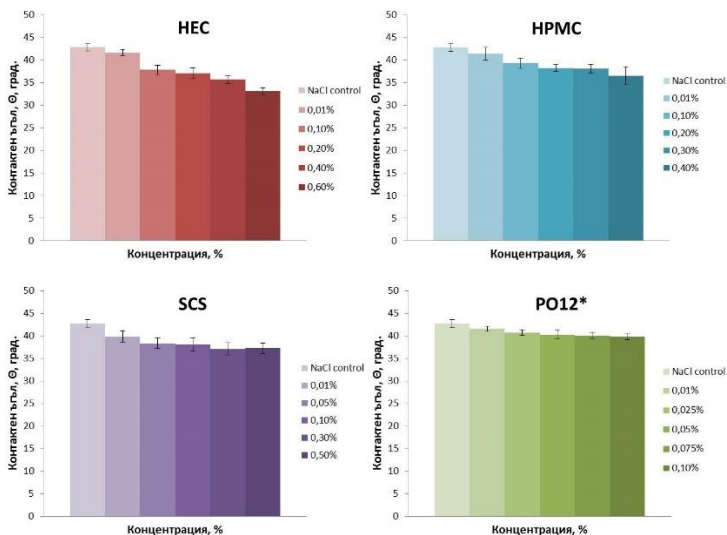
Симулирането на увреждане на корнеалните епителиални клетки, беше осъществено посредством излагането им на топъл, сух въздушен поток [32] за три минути, при което равновесният

³ Процентното съдържание на полиоксоетилен обозначавано с последната цифра на индекса на полоксамера, е предмет на конфиденциална търговска информация на Rohto Pharmaceutical Co., Osaka, Japan и ще бъде обозначавано в текста и фигурите със звезда (*).

контактен ъгъл, формиран на границата между въздушно мехурче и потопени в буфериран физиологичен разтвор покривни стъкла, покрити с конфлуентен монослой от SIRC клетки, се повиши от 30-33 градуса до 42-43 градуса (индикация за намаляване на омокряемостта). Този вид увреждания, заедно с последващото възстановяване на увредената клетъчна повърхност, могат да служат като моделна система на евапоративно сухо око, пригодена за изпитания на терапевтичните възможности на офталмологични препарати.

За всяка концентрация на изследвания полимер, бяха измерени последователно равновесния, настъпващия и отстъпващия контактен ъгъл, посредством аксисиметричен анализ на седящо въздушно мехурче.

1. Влияние на хидрофилни полимери (HEC, HPMS, SCS, PO12*) върху равновесния контактен ъгъл, формиран между седящо мехурче и повърхност покрита с увредени чрез експозиция на въздух SIRC клетки.



Фигура 15. Зависимост на равновесния контактен ъгъл θ_e (формиран между седящо въздушно мехурче и повърхност, покрита с увредени SIRC клетки) от концентрацията на използваните полимери. За контрола е използван буфериран физиологичен разтвор. Намаляването на контактният ъгъл, корелира с по-малък контактен радиус на хидрофобното мехурче и съответства на по-добра омокряемост.

Данните от измерванията на равновесния контактен ъгъл показват значително по-добра способност за възстановяване на омокрянето от страна на HEC спрямо HPMS, PO12 и SCS. В рамките на фармацевтично допустимите концентрации HPMS успява да поддържа ниски контактни ъгли (съответно по-добра омокряемост на клетъчната повърхност). Зависимостта на

равновесния контактен ъгъл от концентрацията на изследваните полимери е представена в таблица 7.

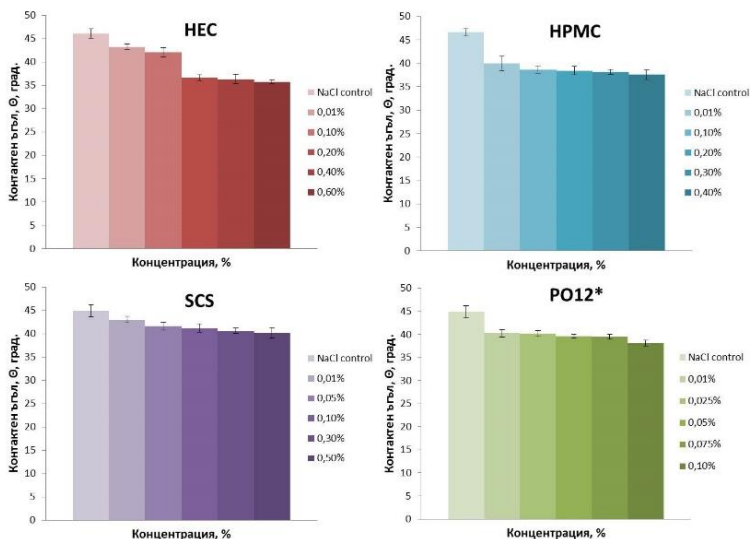
Таблица 4. Зависимост на равновесния контактен ъгъл от вида и концентрацията на изследваните полимери.

Име	HEC	HPMC	SCS	PO12*
	Среден контактен ъгъл [градуси]			
Концентрация[%]				
(контрола) 0.000	40.79	40.19	40.19	41.63
0.010	40.20±0.08	38.46±0.07	39.23±0.09	41.49±0.06
0.025	-	-	-	40.19±0.08
0.050	-	-	38.56±0.08	39.10±0.08
0.075	-	-	-	37.46±0.07
0.100	36.49±0.04	38.39±0.07	38.51±0.04	36.37±0.07
0.200	35.33±0.05	38.04±0.13	-	-
0.300	-	36.32±0.12	38.17±0.06	-
0.400	35.23±0.16	35.51±0.05	-	-
0.500	-	-	34.83±0.15	-
0.600	33.11±0.22	-	-	-

Както се вижда от показаните графично данни (Фиг.15) HEC показва най-добри възможности за поддържане на ниски стойности на равновесния контактен ъгъл при широк набор от концентрации. Терапевтичната ширина на PO12* е значително по-малка, както и способността му да възстановява омокряемостта на увредената клетъчна повърхност. SCS поддържа сравнително добра омокряемост само при най-високата допустима концентрация.

2. Влияние на хидрофилни полимери (HEC, HPMC, SCS, PO12*) върху настъпващия контактен ъгъл, формиран

между седящо мехурче и повърхност покрита с увредени чрез експозиция на въздух SIRC клетки.



Фигура 16. Зависимост на настъпващия контактен ъгъл θ_a (формиран между свиващо се въздушно мехурче и повърхност, покрита с увредени SIRC клетки) от концентрацията на използваните полимери. За контрола е използван буфериран физиологичен разтвор.

Настъпващият контактен ъгъл е измерен чрез плавна промяна на обема на мехурче въздух (хидрофобна среда), така че контактният радиус му радиус да намалява от 0,6 до 0,3mm.

Проследена е промяната в контактния ъгъл, формиран между повърхността на епителиалните клетки, върху които е въздействано с четирите изследвани полимера. Получените стойности са сравнени с контрола, при която е използван само физиологичен разтвор.

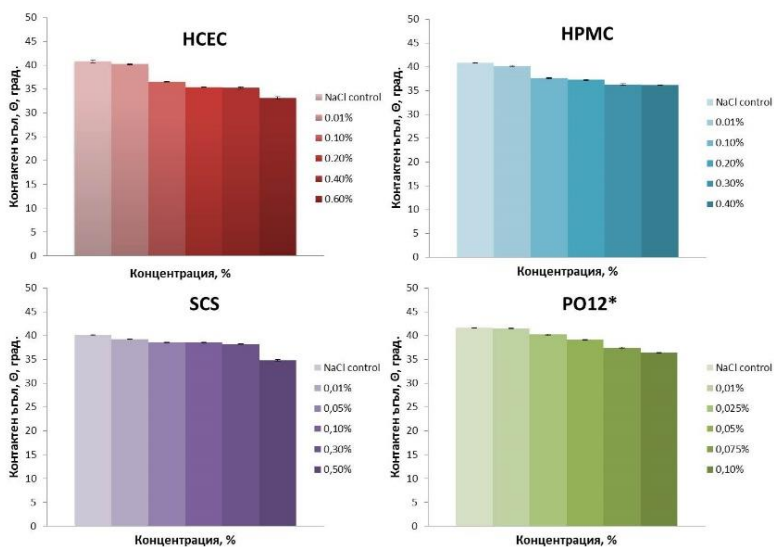
Резултатите, представени на фиг. 16, показват най-голям градиент в стойностите на ъгъла, т.е. най-голяма промяна в омокряемостта на подложката, при HEC и HPMS, като ефектът

при хипромелозата е забележим още при най-ниското разреждане. При SCS и PO12* промяната в контактния ъгъл е малка, и не нараства чувствително с повишаване на концентрацията в рамките на терапевтично допустимите стойности. Това показва по-слабата им способност да подобряват омокряемостта на клетъчната повърхност.

3. Влияние на хидрофилни полимери (HEC, HPMC, SCS, PO12*) върху отстъпващия контактен ъгъл, формиран между седящо мехурче и повърхност покрита с увредени чрез експозиция на въздух SIRC клетки.

Отстъпващият контактен ъгъл беше измерван, като показател за устойчивост на клетъчната повърхност, спрямо разширяването на контактния радиус на мехурче с хидрофобна среда (въздух). По-ниските стойности на този ъгъл, корелират с по-малък контактен радиус, следователно и по-малка площ на хидрофобната среда, т.е. по-добра омокряемост.

Стойностите бяха отчитани при плавно увеличаване на контактния радиус на мехурчето от 0,3 до 0,6mm.



Фигура 17. Зависимост на отстъпващия контактен ъгъл θ_c (формиран между разширяващо се въздушно мехурче и повърхност, покрита с увредени SIRC клетки) от концентрацията на използваните полимери. За контрола е използван буфериран физиологичен разтвор.

И този показател дава предимство на HEC спрямо останалите изследвани фармацевтични агенти, както се вижда от данните, представени на фиг. 17. Останалите полимери също показват дозо-зависимо повлияване на омокряемостта, с изключение на SCS, който е сигнификантно ефективен само при най-високата терапевтична концентрация.

4. Дискусия

Проведените изследвания показаха релевантността на използването на гониометрични методи за оценка на омокряемостта на клетъчни линии. Получените от нас данни, кореспондират с *in vitro* експерименти използващи енуклеирана очна ябълка от заек и говедо [62]. Макар използващ максимално

близка до *in vivo* условията система, този метод има своите ограничения, свързани и с новите насоки за максимално ограничаване на извършването на терминални експерименти с опитни животни. Експериментите върху имортализирани или първични корнеални клетъчни линии, са добър аналог на посочената моделна система и дават възможност да се проучат базовите взаимодействия между фармакологични агенти и клетъчната повърхност, по напълно възпроизводим и коректен начин. Друг положителен аспект на работата с клетъчни линии е по-коректното измерване на контактни ъгли, което не се влияе от естествената кривина на очната ябълка.

Получените резултати, показаха по-доброто омекрящо действие на високомолекулни полимери, като HEC и HPMS, чиято способност да адхезират върху клетъчната повърхност и да я хидратират, задържайки водни молекули, рефлектира в по-голямата промяна на средните стойности на измерените контактни ъгли. Отношението на изменението на динамичните контактни ъгли към промяната на контактния радиус, което е мярка за хетерогенността на изследваната повърхност, също показва по-ниски вариации при изследваните гореспоменатите полимери (данните не са показани), спрямо PO12* и SCS. Последният, като основен компонент в екстацелуларния матрикс играе важна роля в осигуряване на структурна здравина и нормална функция на ставните повърхности [49], но сулфатните групи (отговорни до голяма степен за електростатичното отблъскване, което допринася за резистентността на ставния хрущял към компресия) вероятно не осигуряват същият адхезивен ефект, като хидроксилните групи в HEC и HPMS. Доскоро считани за инертни носители на лекарства, поради способността им да формират мицели, поллоксамерите всъщност оказват ефект върху микровискозитета

на клетъчната повърхност, чрез интеграция в клетъчната мембрана, предимно когато не са в полимерната си форма [50]. Експериментите бяха провеждани при температура 25°C, считана за стандартна стайна температура, която обаче е над критичната температура за мицелообразуване (СМТ) за разглежданите концентрации [51]. При това положение, PO12*, вероятно проявява склонност да формира мицели, вместо да адхерира към клетъчната повърхност, което е възможно обяснение за демонстрираната по-ниска степен на омокряемост.

V. Взаимодействие на терапевтични агенти с епителиални клетъчни линии

Въпреки че етиологията на DES не е напълно изяснена, има сериозни данни, потвърждаващи значението на присъствието на трансмембранните муцини MUC1, MUC4 и MUC16 за формиране на стабилен слъзен филм [2,10,35], както и данни за промяна в нивата на секреторните гел-формиращи муцини (като MUC5AC), корелираща с времето прекарано пред визуални дисплеи [4,36].

Една от основните трудности при изследванията в тази област е липсата на подходяща *in vitro* система, която да предоставя адекватен модел на човешкия корнеален епителиален клетъчен слой с нативен гликокаликс. Причината за това е, че при повечето клетъчни линии от корнеален епител нивата на експресия на мембранно-асоциирани муцини са сравнително ниски [37]. За да изследваме приноса на мембранно-асоциираните муцини към омокряемостта на роговичната повърхност подбрахме човешка корнеална епителиална линия.

В литературата има данни, че при индуциране на стратификация в клетъчна култура от трайната лимбална епителиална линията HCLE, е наблюдавано увеличаване на

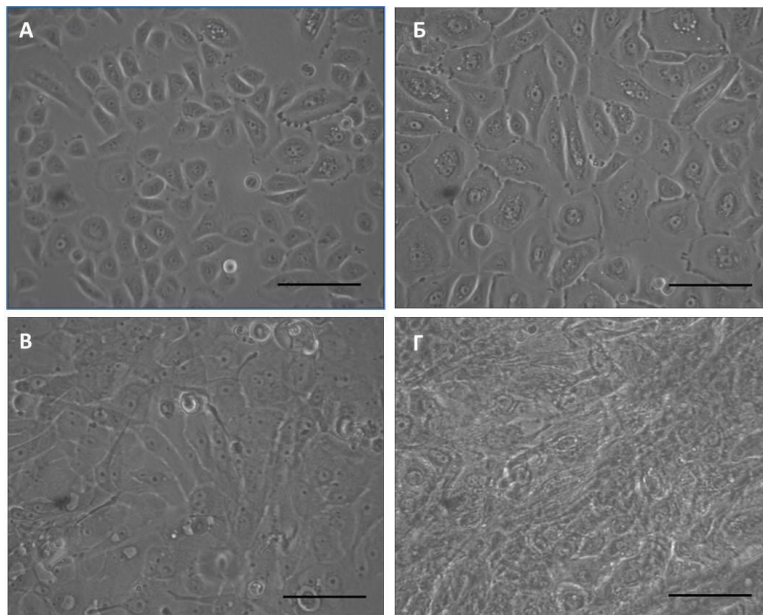
експресията на мембранно-асоциираните муцини и в частност на MUC16 [2]. Усилията ни бяха фокусирани върху изследването на приноса на мембранно-асоциираните муцини към омокряемостта на клетките формиращи очната повърхност. Спряхме се на първичната корнеална епителиална клетъчна линия – HCEC, която при различни експериментални условия, доказано експресира мембранно-асоциирани муцини и в частност MUC16 [38]. Използваният протокол за стимулиране на експресия е описан в глава *Материали и методи*, точка II.3.2 и е адаптиран по протокол за стратифициране на линия от човешки лимбални корнеални епителиални клетки [37].

Като метод за установяване на наличието на стратифицирани клетъчни участъци, експресиращи MAM, беше използвано оцветяване с 0,1% разтвор на Роз Бенгал, при което клетките се багрят в наситено розово с интензитет, обратно-пропорционален на наличието на MAM и се наблюдават със светлинен микроскоп. За допълнително потвърждение на наличието на MAM, беше приложено и имунофлуоресцентно белязване на клетките с антитяло срещу епитопа OC125 на молекулата на MUC16.

Чрез серия от експерименти беше изследвана ролята на MAM в протекцията на корнеалната повърхност и връзката между омокряемостта на роговичен епител и наличието на интактен муцинов слой. Беше проучено и въздействието на офталмологичен лекарствен агент от нов клас, спрямо експресията на MUC16 и свързаните с нея ефекти върху очната повърхност.

1. Оптимизиране на протокол за получаване на стратифицирана култура от пълвична човешка корнеална епителиална линия (HCEC).

На базата на предишни проучвания върху експресия на муцини в обезсмъртени човешки клетъчни линии - HCE (корнеална епителиална линия) и HCLE (лимбална корнеална епителиална линия) [37,38] беше адаптиран протокол за стратификация на първична корнеална епителиална линия – HCEC (*ThermoFisher ScientificInc.*). Последната беше избрана, като максимално добре пресъздаваща и близка до *in vivo* характеристиките на нормалната човешка очна повърхност. След образуване на плътен монослой, безсерумната културалната среда беше подменяна със среда суплементирана с фетален телешки серуми човешки епидермален растежен фактор. Това превключване на средата води до стратифициране на културата и стимулира експресията на MAM при други човешки корнеални линии [38]. Протоколът за култивиране и стимулиране на клетките към стратификация е описан в глава *Материали и методи*, точка II. 3.



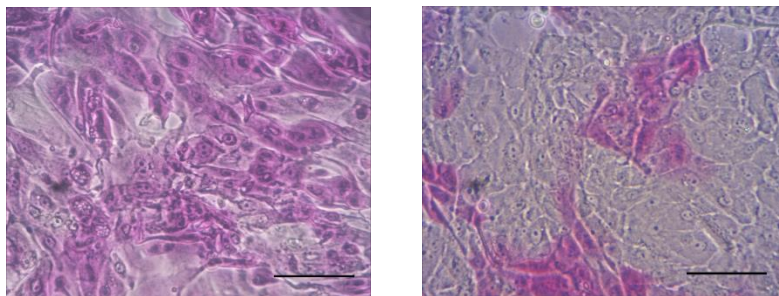
Фигура 18. Фазово-контрастни изображения на клетки от линията НСЕС: субконфлуентна култура (А), 100% конфлуентен монослой (Б), втори ден след достигане на конфлуентност (В) и седми ден след достигане на конфлуентност (Г). Увеличение 100х, маркер – 100µм.

Морфологията на клетките беше проследена, чрез фазово-контрастна светлинна микроскопия, а динамиката на експресията на мембранно-асоциирани муцини чрез оцветяване с Роз Бенгал, и имунофлуоресценто белязване по епитопа ОС125 на молекулата на MUC16. Клетките бяха култивирани в рамките на период от 12 дни след достигане на 100% конфлуентен монослой, като най-добри резултати получихме за 7 дневна култура. На фигура 18 са представени типични фазово-контрастни изображения на НСЕС линията на различни етапи от култивирането, заснети на инвертен микроскоп.

Наблюдават се клетки с типична епителиална морфология (Фиг. 18 А и Б). След превключване на средата границите между отделните клетки стават трудно различими, поради постепенното стратифициране на културата. На седми ден след превключване на средата (Фиг. 18, Г) се наблюдава дебел клетъчен слой с ясно видимо припокриване на клетъчни ядра, показващо наличието на стратификация.

2. Изследване на пермеабилитета за Роз Бенгал на клетки от стратифицирана култура от линията НСЕС.

Наблюдение на проникването на Роз Бенгал, беше извършено преди стратифицирането на клетките (при което се оцветява цялата клетъчна повърхност – резултатът не е показан), както и след смяна на безсерумната културална среда, със съдържаща серум и суплементирана с епидермален растежен фактор. Наличието на стратифицирани зони изключващи муцина беше проследено на втория и на седмия ден от достигането на конfluентност (съответно от смяна на средата) и показва прогресивно увеличаване на площта на тези зони (виж Фиг. 19). Още на втория ден след стратификация се забелязват овални зони, с диаметър около 100µm (отговарящи на групи от по 2 до 3 клетки), които прогресивно нарастват и се сливат. На седмия ден багрилото прониква само в останалите нестратифицирани участъци, очертавайки ясни, добре обособени обширни области от неочетени клетки.



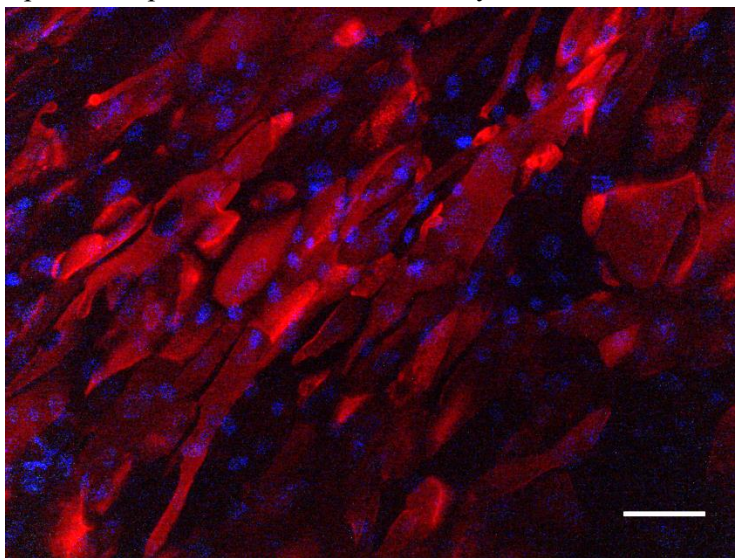
Фигура 19. Стратифицирана култура от НСЕС клетки на втори (ляво) и седми (дясно) ден от стратификация, оцветени с Роз Бенгал. Увеличение 100х, маркер – 100µм.

На базата на получените резултати, както и на изследвания на други автори [2], експериментите по имунофлуоресцентно белязване бяха извършени на седмия ден след превключването на средата за култивиране.

2. Доказване на наличието на MUC16 в клетки от първична корнеална епителиална линия НСЕС, чрез имунофлуоресцентно белязване.

Клетките бяха фиксирани и наблюдавани на седмия ден след превключване на средата. На фиг. 20 е показана типична микрофотография на стратифицираната НСЕС култура, в която ясно се вижда равномерно разпределен сигнал, предполагащ локализация на търсения епитоп OC125 по клетъчната повърхност. Показаното изображение представя комбиниран образ на търсения сигнал и сигнала от белязаните с DAPI ядра. Големият брой, близкото разположение и частичното припокриване на много от ядрата, е ясен белег за наличието на много клетъчни слоеве, както може да се очаква при стратифицираната култура. Клетките, позитивни по OC125

епитопа на MUC16, показват ясно очертани граници, продълговата, разстлана форма, която отговаря на типична морфология на корнеален епител и са много по-малко на брой от визуализираните ядра. Те формират обособени, плътни групи, разделени от области, в които почти отсъства позитивен сигнал, но се различават оцветените с DAPI ядра. Това показва, че MUC16 не се експресира униформно във всички клетки в стратифицираната култура, а вероятно само в най-повърхностно разположените клетки в мултислойните зони.



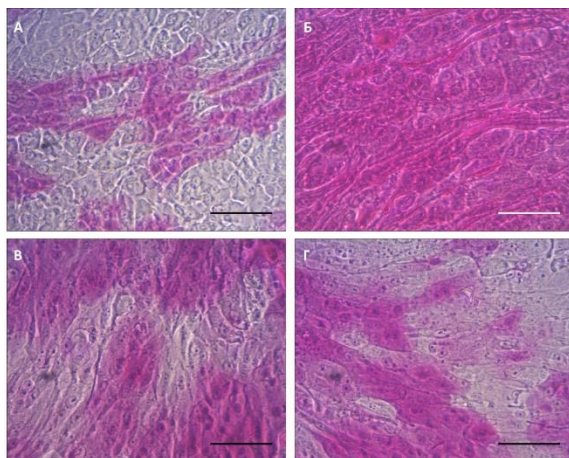
Фигура 20. Стратифицирана култура от НСЕС клетки, маркирани с антитяло срещу MUC16. Комбинирано изображение с оцветяване на ядрата с DAPI. Увеличение 200x, маркер – 50µм.

3. Изследване на възстановяването на експресията на MUC16 , след третиране с муколитичен агент (неутрофил-еластаза) в отсъствие и присъствие на Diqafosol.

За изясняване на значението на мембранно-асоцираните муцини за формирането на стабилна водна част на слъзния филм и поддържането на нормална омокряемост на корнеалната повърхност, стратифицирана корнеална линия НСЕС, беше третирана с муко-ексцизионният агент неутрофил-еластаза (*Enzo Life Sciences, Inc.*, NY, САЩ). Неутрофил-еластазата (NE) изрязва екстрацелуларната част на MUC16, (но не и на MUC1 или MUC4) като се асоциира със SEA повторите на муциновата молекула [2]. Клетките бяха инкубирани с неутрофил-еластаза (5µг/мл) в продължение на 30 минути, след което беше изследвана степента на проникване на Роз Бенгал (кореспондираща с нивата на MAM) и наличието и интензитета на флуоресцентен сигнал от епитопа OC125 на MUC16. Бяха проследени разликите в степента на възстановяване на омокряемостта в присъствие и отсъствие на Diqafosol (DQS) - агонист на P2Y₂ рецептора, който активира продукцията на сълзи и секреторни муцини.

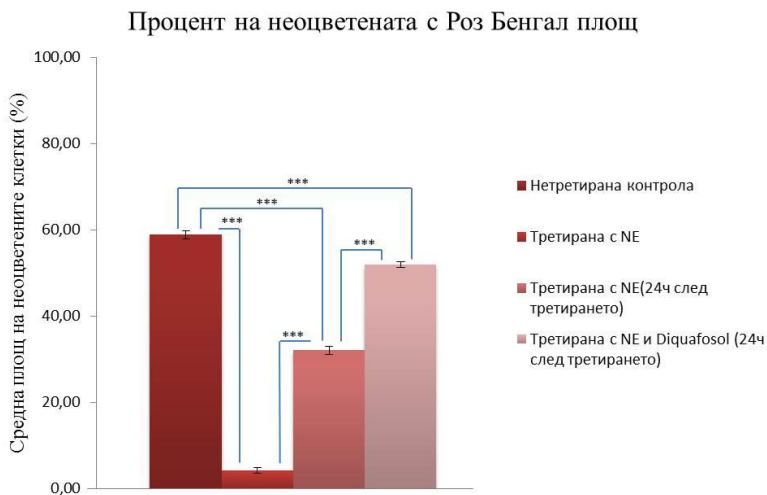
➤ Оцветяване с Роз Бенгал

Проницаемостта на клетките за Rose Bengal беше сравнена при интактни и третирани с NE стратифицирани НСЕС клетки (Фиг. 21).



Фигура 21. Стратифицирана култура от HCE7клетки, оцветени с Роз Бенгал. *А.* Нетретирана контрола. *Б.* Третирани с неутрофил-еластаза клетки (1час след третирането). *В.* Третирани с неутрофил-еластаза клетки (24часа след третирането). *Г.* Третирани с неутрофил-еластаза и непосредствено след това с Diqafosol клетки (24часа след третирането). Увеличение 100х, маркер – 100µм

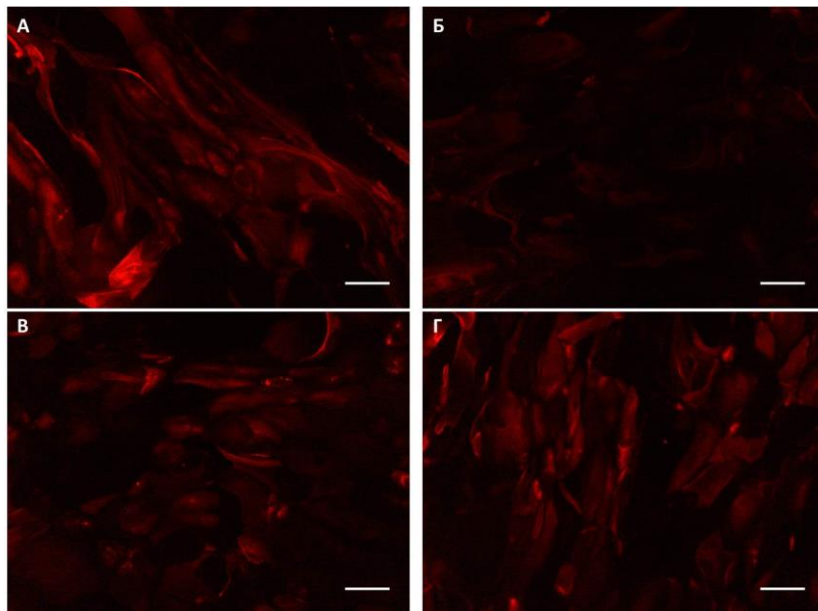
Нивото на оцветяване кореспондира с нивото на ексцизия на муцините. Непосредствено след третирането с NE пермеабилитетът на клетките за багрилото се повишава, като въздействието му постепенно се неутрализира за период от 24 часа, поради частично възстановяване на муцините в гликокаликсия слой. Процентът на клетките в неочетената площ (предпазени от проникване на багрилото, благодарение на наличието на MAM) е установен посредством софтуерно калкулиране на интензитета на сигнала (FIJI), а данните са представени графично на фигура 22.



Фигура 22. Процент на клетки, проницаеми за Роз Бенгал, след въздействие с муколитичен агент (неутрофил-еластаза) в присъствие и отсъствие на Diquafosol.

➤ Имунofлуоресцентно маркиране с OC125 анти-MUC16 Аб

Нивата на повърхностно асоцииран MUC16 бяха проследени посредством имунofлуоресцентно белязване и сравнение на интензитета на получения сигнал в третираните с NE и спонтанно възстановяващи се HSEC клетки, както и в такива, третираните с DQS, непосредствено след демуцинизиращата процедура. Резултатите (Фиг. 23), показаха силно намаляване на характерните зони на визуализация след третирането и съизмеримо възстановяване на 24ия час при спонтанно възстановяващи се и третираните с DQS клетки.



Фигура 23. Стратифицирана култура от HCEC клетки, маркирани с антитяло срещу MUC16. *А.* Не третирана контрола. *Б.* Третирани с неутрофил-еластаза клетки (1 час след третирането). *В.* Третирани с неутрофил-еластаза клетки (24 часа след третирането). *Г.* Третирани с неутрофил-еластаза и непосредствено след това с Diquafosol клетки (24 часа след третирането). Увеличение 200х, маркер – 50µм

За определяне на степента на ефективност при стимулиране на експресията на MUC16 от DQS получените флуоресцентни изображения бяха анализирани количествено с FIJI. Програмата позволява изчисляване на яркостта на пикселите от изображението и съответно сумира стойностите за всяко изображение. Данните от количествения анализ на сигнала са представени на фигура 24.



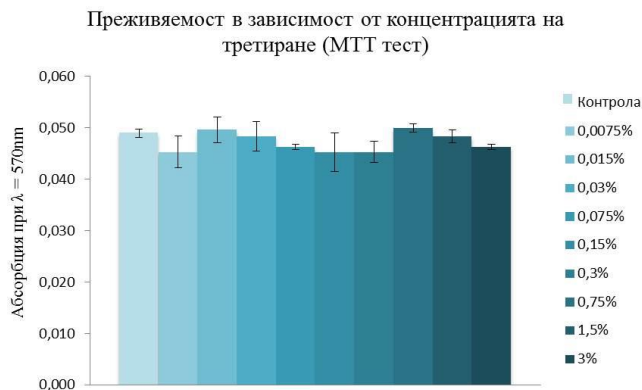
Фигура 24. Средна стойност на флуоресцентния сигнал, сумиран от по пет изображения за всяка серия.

Вижда се, че има статистически значимо ($p < 0,001$) увеличение на интензитета на сигнала (кореспондиращ с наличието на MUC16), при третираните с DQS клетки спрямо спонтанно възстановяващите се. Това показва, че препаратът стимулира експресията не само на секреторните, а и на мембранно асоциираните муцини и е в корелация с клинични данни, потвърждаващи ефективността му при пациенти [52].

4. Определяне преживяемостта на клетките, след третиране със серийни разреждания на Diquafosol в диапазона от 0,0075% до 3%

Преживяемостта на стратифицирана HCEC клетъчна линия при третиране с вариращи концентрации на Diquafosol беше проверена с МТТ тест за девет различни концентрации, до достигане на клиничната концентрация в комерсиално достъпните офталмологични състави (3%). Клетките бяха инкубирани в продължение на пет минути, което превишава

значително нормалното време за експозиция на очната повърхност към препарата.



Фигура 25. Преживяемост на клетки от HCEC линия, след третиране с нарастващи концентрации Diquafosol, в продължение на 5 минути. Преживяемостта при третиране с нито една от посочените концентрации не се различава сигнификантно от контролата ($P > 0,05$), тест на Dunnett.

Независимо от това не беше установено сигнификантна разлика в преживяемостта спрямо нетретираната контрола при нито една от използваните концентрации (Фиг. 25).

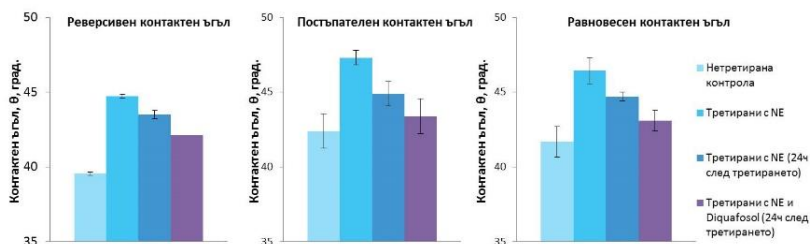
5. Измерване на омокряемостта на клетъчен слой от HCEC линия, чрез метода на седящото мехурче.

Способността на мембранно-асоциираните муцини да задържат водни молекули, се дължи на гликозилирането на екстрамембранните им участъци.

Омокряемостта на стратифицирана култура от HCEC клетки (доказано експресиращи MAM), култивирани върху адхезивни покривни стъкла, беше изследвана по метода на аксисиметричен анализ на седящо мехурче. Контактните ъгли, измерени при мехурче с постоянен обем (равновесен ъгъл), разширяващо се (отстъпващ ъгъл) и намаляващо (настъпващ

ъгъл), бяха измерени и сравнени за нетретираните клетки, клетки третираните с муко-ексцизионен агент (NE), които се възстановяват спонтанно и клетки третираните с NE и DQS. Резултатите, представени на фигура 26, показваха повишаване на средните стойности на измерените контактни ъгли, регистрирано 1 час след третирането с NE, като ефектът в значителна степен намалява 24 часа след третирането.

Клетките третираните с DQS, показваха по-добра омокряемост (отразена като по-ниска стойност на контактния ъгъл, формиращ се на границата между клетъчната повърхност, буферирания физиологичен разтвор и хидрофобната среда (въздушно мехурче).



Фигура 26. Средни стойности на отстъпващия, настъпващия и равновесния контактен ъгъл, формиран между седящо мехурче и клетъчната повърхност на НСЕС стратифицирана линия, третирана с NE и Diquafosol.

6. Дискусия.

Ефективен метод за проследяване на промените в омокрянето на корнеалната епителиална повърхност, след третиране с фармацевтични препарати (Diquafosol в частност) са промените в равновесния, настъпващия и отстъпващия контактни ъгли. Установена беше значителна разлика в горните показатели, корелираща с възстановяването на гликокаликсния слой на човешка корнеална епителиална клетъчна линия след

третиране с муко-ексцизионен агент. При това клетките третирани с Diqafosol показаха почти аналогични на нетретираната контрола стойности на контактните ъгли, което се потвърждава и от резултатите от имунофлуоресцентната детекция на MUC16, както и от оцветяването с Роз Бенгал.

В основата на механизма на действие на DQS е Ca^{2+} зависима активация на секрецията на вода и секреторни муцини от корнеалните епителиални клетки и чашковидните клетки в конюнктивата. Предишни изследвания показват същият механизъм на действие за други агонисти на $P2Y_2$ пуриновия рецептор, като аденозин трифосфат (АТР) и уридин 5' трифосфат (УТР) [11,53]. Рецепторът, активира фосфолипаза С, която на свой ред задейства производството на инозитол-3-фосфат. Това води до вътреклетъчно повишаване на концентрацията на калциеви йони, което задейства Ca^{2+} - зависимите хлорни канали. Хлорът се освобождава в екстрацелуларното пространство, увеличавайки водни молекули, а повишените концентрации на калций, са сигнал за транспорт и екзоцитоза на секреторни муцини. Добавянето на хелатен агент, свързващ Ca^{2+} йоните, води до намаляване и на двата ефекта [53].

Очакваният ефект на DQS е обвързан с посочения механизъм, като се разчита и на това, че като димерен аналог, той има по-висока стабилност спрямо тази на АТР и УТР. Освен това се наблюдава и стимулиращ ефект върху експресията на *MUC1*, *MUC4*, и *MUC16*, кодиращи основните мембранно-асоциирани муцини в гликокаликса на корнеалния епител [54].

ОБОБЩЕНИЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Целта на настоящия дисертационен труд беше да обхване възможно най-широка гама от свързаната със синдрома на

сухото око проблематика. Холистичният подход към всяко мултиетиологично заболяване, особено към синдроми засягащи както хора, така и животни, изисква мащабно проучване на редица въпроси, касаещи физиологията и патофизиологията за конкретните разглеждани видове, както и диагностичния подход, включващ конвенционални клинични методи и възможностите за моделиране на заболяването в *in vitro* и *in vivo* моделни системи. Не на последно място стои и въпросът за терапията и търсенето на перспективни методи за лечение. Получените резултати позволяват да се хвърли светлина само върху някои от гореизброените аспекти, като фокусът на изследванията е върху разработването на моделни системи и надеждни методи за оценка на фармакологични препарати за терапия на DES.

Изследванията на мейбомиев секрет от здрави животни с нормален офталмологичен стаус бяха извършени с оглед разпознаването на закономерности, корелиращи с физиологичните им отличия от човека. Мейбомиевите липиди във филми от sMGS и fMGS, показаха висока степен на сродство помежду си и с човешки мейбомиев секрет по отношение на разглежданите показатели: динамични $\pi(A)$ изоцикли, повърхностна морфология и дилатационна реология. Данните за сходната мигателна динамика и стабилност на TF (за куче, котка и човек), съответстваха на получените резултати, демонстриращи подобни повърхностни и вискоеластични свойства, вероятно продиктувани от идентичен механизъм за протекция на очната повърхност, неповлияващ се от междувидовите вариации в състава на MGS. Този резултат би могъл да допринесе за идентифицирането на посочените животни като източник на аналози на hMGS в изследванията на

повърхностните му свойства, както и като животински модели на липид-зависим DES.

В терапевтичен план, резултатите имат значение и за ветеринарната медицина, тъй като сходствата в повърхностните свойства на мейбомиевите липиди, позволява да се имплементират лекарствени стратегии, използвани в хуманната медицина към случаи на сух керато-конюнктивит при кучета и котки.

Поради изобилието на неполярни липиди ($\geq 90\%$) в тях MGS не се разстилат като монослой на въздушно-водната повърхност, а формират дуплексни филми с дебелина от 10 nm до >100 nm, достатъчна за да демонстрират обемни характеристики с два отделни профила, но недостатъчна, за да се повлияват сериозно от гравитационни ефекти [22]. Мейбиумът формира плътни филми и при $\pi \geq 18$ mN/m се счита [23], че тези филми се състоят изцяло от неравни, дебели пластове (с дебелина, съответстваща на 3-8 подредени един върху друг мономолекулни слоеве). Над тези стойности на повърхностното налягане не се наблюдават монослоеви. Формираните дебели пластове се състоят от тънки мономолекулни слоеве от амфифилни полярни липиди от страна на водната повърхност и безструктурна липофилна течна фаза, разположена над тях и насочена към въздуха. Този маслен флуид се състои от неполярни липиди (NPL), които при 35°C са в предимно стопено състояние, но съдържат и течно-подредени кристалисти между тях [13]. В такъв тип системи, липидният слой може да играе ролята на резервоар или разтворител за полярните липиди [39,40]. Те на свой ред биха могли да формират обратни мицели в него [41], които могат да се абсорбират от неговата вътрешност към водната фазова граница

и да се разпределят между фазовата граница и «маслената шапка», съобразно динамиката на промяна на площта на филма.

Количеството на липиди адсорбирано на липидно-водната граница може да бъде пресметнато следвайки стандартното уравнение на Гибс за адсорбцията

$$\Gamma = \frac{1}{RT} * \frac{d\pi}{d\ln C_s} \quad (1),$$

според което то е обратно пропорционално на температурата [40]. Съгласно зависимостта от уравнение 1, понижаването на температурата с десет градуса (от 35 на 25°C) би трябвало да покачи повърхностната концентрация, (Γ) на полярни липиди приблизително 1,4 пъти. Подобни наблюдения за човешки филм са регистрирани в предишни наши изследвания (виж Фиг. 5, панел В) [27] и резултати на други автори [14,23]. Тези допускания се съгласуват добре с промяната на площта на филма (явяваща се мярка за реципрочната стойност $1/\Gamma$) със средно 1,23 (за fMGS) – 1,31 (за cMGS) пъти по-високи стойности при еквивалентни стойности на π . Предположението за повишено преразпределение на полярни и други липидни компоненти в масления слой при по-висока температура, съответно за повишаване на адсорбцията им към водната фазова граница, при понижаване на температурата се поддържа от повишената плътност на MGS филмите (от куче, котка и човек) формирани при температура 35°C. Способността на масленият слой да поема полярните липиди при посочената температура, може да обясни наблюдавания нисък хистерезис на π/A изотермите (висока Rv), ниските стойности на Cs^{-1} и свойството на мейбомиевите филми да не колабират при динамични цикли на свиване/разширяване на повърхностната площ [12,14,24,25-28].

Подобни свойства на MGS имат *in vivo* физиологична релевантност със способността му да поддържа ефективността си на въздушно-слъзната фазовата граница за продължителен период от време, без да се налага непрекъснато суплементиране на секрет от мейбомиевите жлези. Това заключение се подкрепя и от данните за бавния обмен на TFLL, който продължава повече от осем часа в *in vivo* условия [42].

Проучвания от последните години и *in vitro* данни, демонстрират критичното значение на вискоеластичността на липидните филми за стабилността на слъзния филм и за промените му в норма и патология [13,28]. В същото време множество лабораторни изследвания [22,43,44] изнасят данни, че в *in vitro* условия, филмите от MGS и събраните по капилярен път сълзи не предотвратяват в значима степен изпарението на водната компонента на слъзния, поставяйки под съмнение парадигмата за анти-евапоративната роля на мейбомиевите липиди издигната в изследванията на Mishima и Iwata [33, 45].

Сравнителният анализ на повърхностните свойства и характеристики на животински и човешки MGS може да доведе до по-добро разбиране на влиянието на отделни липидни класове върху функциите на мейбиума. Липидният състав на fMGS засега не е проучен в достатъчна степен, но са известни разликите в отношенията между основните липидни класове в човешки и кучешки мейбомиев секрет.

По данни от HPLC и мас-спектрометрични изследвания тези разлики включват модификации в относителното количество восъчни естери, по-голямо присъствие на диестерни компоненти с *m/z* стойност между 900 и 1050 и повишено съдържание на холестерилни естери на OANFA. Вече бяха споменати и разликите в степента на наситеност на ацилните

остатъци именно в този основен клас амфибилни липиди [8], които се наблюдават между hMGS и cMGS от една страна и rMGS, от друга.

Те вероятно допринасят и за наблюдаваните във филми от rMGS по-високи стойности на π , при които започват да се наблюдават температурно обусловени различия в компресионните изотерми.

Беше установено, че посочените различията в състава (особено между восъчните естери), не водят до значителни промени в структурата и свойствата на самите мейбомиеви липиди. Тези данни са в унисон с последни изследвания по темата, сочещи именно тях като главна причина за индивидуалните вариации в състава на човешкия мейбиум [48]. Поради своята висока степен на хидрофобност, восъчните естери се разполагат предимно в „маслената шапка“ на TFLL. По този начин те не допринасят съществено за попълване на липидния състав на границата въздух/TFLL и вероятно са с по-ниска степен на функционална значимост, което позволява по-значителни междувидови и индивидуални различия, без повлияване върху стабилността на нормалния слъзен филм.

Съвкупността от натрупани резултати, касаещи предимно TFLL, хвърля светлина върху въпроси като намиране на адекватна реплика на човешки мейбомиев секрет и наличието на базови сходства в поддържането на стабилността на слъзния филм при сухоземни бозайници, но не даде задоволителен отговор на въпроса за физиологично различното мигателно време, наблюдавано при разгледаните видове. Това ни насочи към съпоставка на цели сълзи от животни с много дълги междумигателни периоди (заяк) и човек.

Освен по-голямото филогенетично родство, по-голямата очна повърхност и несъмнено по-голямата стабилност на

слъзния филм, заекът има и физиологично по-висок слъзен осмоларитет, който при хора е един от диагностичните белези за развитие на DES [1,3]. Установено беше, че промяната в концентрацията на двувалентни калциеви йони, води до промяна както на повърхностните, така и на реологичните свойства на цели сълзи от заек.

Получените от нас резултати показаха, че именно този елемент от физиологичния пъзел обвързва разликите в липидния състав с разликите в динамиката и реорганизацията на слъзния филм.

За разлика от неполярните липиди които са преобладаващи в hMGS и цели сълзи и поради липсата на голяма полярна глава са нечувствителни към йонната сила и рН на водната подложка, амфифилните липиди (застъпени в по-голямо количество в rMGS и цели сълзи) имат големи глави, които са чувствителни към характеристиките на субфазата. Натрупващите се биохимични данни за значително по-голямото разнообразие на полярни липиди в заешките сълзи [55,57], както и за диагностичната стойност на определени фосфолипиди, напр. сфингомиелина [56], могат да намерят обяснение в светлината на разбирането за връзка между липиден състав и йонна концентрация.

Предвид много по-високата стабилност на заешкия СФ *in vivo*, това позволява да се направи предположение, че амфифилните липиди в rMGS и цели сълзи могат да се използват в изкуствени сълзи, които да стабилизират човешкия слъзен филм при DES.

С изключение на анионния димиристоил фосфатидил глицерол ефектът на останалите полярни липиди все още не е характеризирани [55]. Потенциално продължение на изследователската работа в тази насока е да се установи

повърхностните свойства на кой от полярните липиди в цели сълзи от заек са най-чувствителни към присъствие на двувалетни йони и да се изследва взаимодействията на тези подобрани молекулни видове с човешки мейбомиев секрет и цели сълзи, *in vitro* и *in vivo*.

Погледът върху функционалните особености на слъзния филм, не би бил пълен без разглеждане на повърхностния корнеален епител и по-специално – неговият гликокаликс, отговорен за формиране на третия, най-вътрешен слой от слъзния филм. Изборът на моделна система за тази част от нашите изследвания, беше продиктуван от стремежа към осигуряване на максимално близки до физиологичните условия. Работата с енуклеирани очни ябълки, като *in vitro* аналози на нормалната очна повърхност, е свързана с редица ограничения, особено що се касае до изследванията свързани с човек, като не отговаря и на повишаващите се стандарти за хуманно отношение към експерименталните животни. Критерии като достъпност, възпроизводимост, удобство при провеждане на молекулярно-биологични и физико-химични изследвания, ни насочиха към избор на клетъчни линии, като подходящ аналог на горепосочената моделна система. В тази връзка, предпочетохме работа с първична корнеална епителиална линия, при която рискът от потенциална промяна на регулаторно или метаболитно ниво е значително по-малък в сравнение с имортализираните, трайни клетъчни линии.

Към първичната линия НСЕС, успешно беше адаптиран протокол за стратификация и стимулиране на експресията на мембранно-асоциирани муцини, прилаган преди това върху имортализирани човешки корнеални линии. Наличието на мембранно-асоциирани муцини (в частност MUC16), беше потвърдено по два независими метода – проникваемост на

клетъчната повърхност за багрилото Роз Бенгал и имунофлуоресцентна детекция на ОС125 епитопа на MUC16. По този начин беше доказано, че тази моделна система е подходяща за провеждането на експерименти, целящи изясняването на приноса на конкретния трансмембранен муцин, към способността на клетъчната повърхност да задържа водни молекули – нейната омокряемост.

От агентите способни да изрязват МАМ (матриксни металопротеинази – (ММР), N ацетил-цистеин (НАС), TNF- α конвертиращ ензим и др.) беше избран ензимът неутрофил еластаза (NE), поради специфичното му действие върху MUC16 и поради данните че сравнително кратка експозиция на клетките повишава до 5,5 пъти освобождаването на този муцин от клетъчната повърхност при имортализираната корнеална клетъчна линия HCLE [2]. Тъй като се синтезира в полиморфно-ядрени левкоцити (неутрофили), NE може да повлиява на клетките от корнеалния епител и при патофизиологични условия (развитие на бактериален конюнктивит с последваща левкоцитна инфилтрация на очната повърхност). Ролята на металопротеиназите в патофизиологията на DES, е от голям интерес, поради данните за повишаване на активността на ММР9 при пациенти със синдром на сухо око [58], но ефективността ѝ е по-ниска.

Резултатите показаха пряка корелация между степента на омокряне (измерена посредством стойностите на настъпващия, отстъпващия и равновесния контактен ъгъл) и наличието на MUC16, определено косвено чрез протективната му роля спрямо проникването на Роз Бенгал и пряко – по интензитета на флуоресцентния сигнал.

На базата на получените резултати, може да се спекулира върху възможен механизъм за развитие на тежък, ерозивен сух

кератоконюнктивит, като затваряне на порочен цикъл между нестабилност на слъзния филм, повишено изпарение, нарушаване на осмоларитета и последващо повлияване на нивата на секреторните и мембранно-асоциираните муцини, което на свой ред да доведе до нарушване на повърхността на корнеалния епител и индуциране на възпалителен отговор, допълнително нарушаващ стабилността на слъзния филм. Друго заключение, касаещо получените резултати, е потенциалната роля на MUC16, като маркер определящ тежестта на DES и/или ефективността на провежданата терапия. Без протективната му функция спрямо патогенни агенти и десикация на очната повърхност, провеждането на суплементарна терапия с повечето комерсиално-достъпни офталмологични състави, би било неефективно.

Това ни насочи към разглеждането на перспективни лекарствени агенти, които да имат стимулиращ ефект върху омокрянето на корнеалната повърхност, като първа и необходима стъпка в рационална и последователна терапия на DES.

Бяха изследвани взаимодействията на два типа лекарствени средства с корнеалната повърхност – хидрофилни полимери, способни да подобряват омокрянето, като имитират функцията на естествените макромолекули в гликокаликса и нов клас стимулатори на хидратацията на очната повърхност, посредством повишаване на отделянето на вода и секреторни муцини от епителните и чашковидните клетки. Проведените изследвания показаха релевантността на използването на гониометрични методи за оценка на омокряемостта на клетъчни линии. Информацията от измерването на разликата между настъпващия и отстъпващия контактен ъгъл, т.нар. ъглов хистерезис дава представа за микрохетерогенността на

изследваната повърхност, позволявайки да се сравняват клетъчните линии и по-отношение на този показател. Сложната система, фомирана на тройната фазова граница, между клетъчната повърхност, буфера от физиологичен разтвор и хидрофобното мехурче, дава възможност да се отчитат финни междумолекулни взаимодействия, от порядъка на Лондоновите дисперсионни сили, оказващи влияние върху динамичните контактни ъгли [58]. Изследванията на хидрофилни полимери бяха проведени върху стабилна, трайна корнеална епителиална клетъчна линия – SIRC, избрана, като утвърден модел на роговичен епител в токсикологични изследвания [18-20].

Установено беше, че полярни хидрофилни полимери (HEC, HPMS, SCS, PO12) могат да адсорбират към повърхността на клетъчни култури и да подобряват омокрянето им, оценено чрез промяна в равновесния, настъпващия и отстъпващия контактни ъгли. Данните показват, че най-силен е ефектът на високомолекулните полимери и особено на хидрокси-етил целулозата, вероятно за сметка на големия брой групи, способни да формират Н-връзки с молекули от гликокаликса и да адхезират по-силно към клетъчната повърхност, респективно роговицата.

Резултатът е физиологично релевантен и корелира с данните за високата молекулна маса и полианионната структура на сиаловите остатъци в мембранно-свързаните муцини и в секреторния MUC5AC.

Освобождаването на MUC5AC от секреторни везикули, доказано се стимулира от пуринорецепторния агонист Diquafosol – лекарство средство, използвано като 3% офталмологичен състав за лечение на DES. Нашите експерименти потвърдиха наличието на време-зависим механизъм за подобряване на омокрянето на корнелната

повърхност, свързан и с повишаване на наличието на MUC16. Предишни изследвания показват стимулиращия ефект на DQS, върху гените, контролиращи експресията на MAM [54], но бързото повлияване, наблюдавано в *in vitro* условия, вероятно изисква и допълнителен мобилизационен механизъм.

Възможно обяснение за повишената наличност още на 24ия час след прилагането на DQS, е пост-транскрипционната регулация на биосинтезата на MUC16, посредством Notch сигнален път, и по конкретно чрез Notch3 рецептора, за който се знае, че се експресира в недиференцирани и диференцирани трайни корнеални епителиални линии [59]. Известно е, че връзката между екстрацелуларната, рецепторна част на Notch и трансмембранный му сигнален домен се осъществява посредством нековалентно калциево-зависимо взаимодействие и че добавянето на хелаторен агент може да доведе до разпадане на тази връзка и активиране на сигналната субединица [60]. От друга страна, DQS се свързва с пуринорецептор, задействащ фосфолипаза C γ , която активира производството на инозитол - 3 фосфат и последващото повишаване на интрацелуларните нива на калциеви йони, но и може да активира Notch рецептора [61]. Проучването на евентуалното съществуване на такъв механизъм е перспективен предмет на бъдещи изследвания.

Внимателното изучаване на конкретните молекулярни механизми, залегнали в основата на развитието, а оттам и терапията на синдрома на сухото око, е в основата на създаването на адекватни и ефективни лекарствени средства за контрол и лечение на едно сложно, полиетиологично, засягащо хора и животни заболяване.

ИЗВОДИ

Въз основа на получените резултати бяха направени следните изводи:

1. Установено е, че мейбомиевият секрет на човек и животни със сродни физиологични характеристики, като мигателна динамика и стабилност на СФ, показват близки повърхностни свойства. Независимо от разликите в състава на MGS при всички разгледани видове се формират филми с мултислойна дебелина, висока обратимост (R_v) и преимуществено еластични дилатационни реологични свойства. Тези характеристики са във връзка с предполагаемата функция на СФ *in vivo*: да се реорганизира бързо по време на мигане и да стабилизира фазовата граница сълза/въздух спрямо дилатационни деформации (поради капилярни вълни или хидродинамични ефекти) в отворено око.

2. Установено е, че различията в състава на hMGS и cMGS (повишено количество на холестеролни естери на OAHFA, восъчни естери и диестерни компоненти с m/z стойности от 900 до 1050) не оказват съществено влияние върху повърхностната структура и свойства на мейбомиевите филми.

Това позволява да се направи извод, че липидният слой на слъзния филм толерира сериозни вариации в качествения и количествения състав на неполярните липиди без съществена промяна на структурата си. Поради своя силно хидрофобен характер, вероятно тези липиди се разтварят в маслената шапка на ТФЛЛ и не оказват въздействие на фазовата граница между водния и липидния слой.

3. Има съществени разлики в повърхностната структура и свойства на човешки и заешки цели сълзи.

Докато човешките цели сълзи не се повлияват от вида и концентрацията на катиони, оказва се че катионите имат диференциален усилващ ефект (Mg^{2+} и $Ca^{2+} < Mg^{2+} < Ca^{2+}$) върху свойствата на слоеве от заешки цели сълзи. Този резултат показва значителна физиологична корелация с оглед на повишеното съдържание на полярни липиди и по-високият осмоларитет на заешки СФ. За разлика от неполярните липиди които са преобладаващи в hMGS и цели сълзи и поради липсата на голяма полярна глава са по-слабо чувствителни към йонната сила и рН на водната подложка, амфифилните липиди (застъпени в по-голямо количество в rMGS и цели сълзи) имат големи глави, които са чувствителни към характеристиките на субфазата.

Предвид много по-високата стабилност на заешкия СФ *in vivo*, това позволява да се направи предположение, че амфифилните липиди в rMGS и цели сълзи могат да се използват в изкуствени сълзи, които да стабилизират човешкия СФ при DES.

4. Установено е, че полярни хидрофилни полимери (HEC, HPMS, SCS, PO12) могат да адсорбират към повърхността на клетъчни култури и да подобряват омокрянето им, оценено чрез промяна в равновесния, настъпващия и отстъпващия контактни ъгли. Данните показват, че най-силен е ефектът на високомолекулните полимери и особено на хидрокси-етил целулозата, вероятно за сметка на големия брой групи, способни да формират Н-връзки с молекули от гликокаликса и да адхезират по-силно към повърхността на клетъчните линии, респективно роговицата. Резултатът е физиологично релевантен

и корелира с данните за високата молекулна маса и полианионната структура на сиаловите остатъци в мембранно-свързаните муцини и в секреторния MUC5AC.

5. Установена е решаващата роля на мембранно свързания MUC16 за целостта на гликокаликсната бариера (предотвратява проникването на Роз Бенгал) и за омокрянето на стартифицирани клетки, в моделна клетъчна линия HSEC, максимално близка до човешка корнеална повърхност. Третираното с ензима неутрофил-еластаза променя омокряемостта на корнеални епителиални клетки, отразено в повишаване на стойностите на равновесния, настъпващия и отстъпващия контактни ъгли.

6. Третирането с P2Y2 пуринорецепторния агонист Diqafosol възстановява омокрянето на клетки от линията HSEC, обработени с муколитичен агент и стимулира експресията на MUC16. Следователно Diqafosol е ефективно терапевтично средство срещу новодфиренцирания клас сухо око със скъсен период на късане на слъзния филм (short BUT DES), дължащ се на нестабилност на СФ поради локални увреждания в целостта на роговичният гликокаликс, като всички други параметри на СФ са в норма.

ПРИНОСИ

1. Сравнени са повърхностните свойства на мейбомиев секрет и цели слъзи на човек с такива от бозайници с близки и с много различни мигателна динамика и стабилност на СФ. Това позволява да се предположи какви липидни видове на практика не повлияват характеристиките на TFLM и какви амфифилни липиди, дори и в малки концентрации, силно модифицират повърхностните му свойства и стабилността на СФ.
2. Разработен е нов метод за оценка на взаимодействието между корнеални клетъчни линии и агенти, повлияващи структурата на гликокаликса и омокрянето му.
3. Оптимизиран е протокол за получаване на стратифицирана култура от първична човешка корнеална епителиална линия и стимулиране на експресията на мембранно-асоциирани муцини. Въпросната стратифицирана култура, може да намери приложение, като максимално близък до *in vivo* системите модел за изследване на взаимодействието на фармакологични агенти с външната очна повърхност.
4. За първи път количествено е доказана връзката между степента на омокряне на корнеалната клетъчна повърхност и мембранно асоциираните муцини.

ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Tomlinson A et al. *Tear film osmolarity: determination of a referent for dry eye diagnosis*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006 Oct;47(10):4309-15.
2. Blalock TD, et al. *Release of Membrane-associated Mucins from Ocular Surface Epithelia*. Investigative ophthalmology & visual science. 2008;49(5):1864-1871.
3. Farris RL. *Tear osmolarity—a new gold standard?* Adv Exp Med Biol. 1994;350:495-503.
4. Uchino, M., et al., *Dry eye disease and work productivity loss in visual display users: the Osaka study*. Am J Ophthalmol, 2014. 157(2): p. 294-300.
5. Lam SM, et al.(2014) *Extensive characterization of human tear fluid collected using different techniques unravels the presence of novel lipid amphiphiles*. Journal of lipid research 55:289-298
6. Shrestha RK et al.(2011) *Analysis of the Composition of Lipid in Human Meibum from Normal Infants, Children, Adolescents, Adults, and Adults with Meibomian Gland Dysfunction Using 1H-NMR Spectroscopy*. Investigative Ophthalmology & Visual Science 52:7350-7358
7. Arciniega JC et al., *Disruption and Destabilization of Meibomian Lipid Films Caused by Increasing Amounts of Ceramides and Cholesterol Meibomian Lipid Films*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., IOVS, 2013. 54(2): p. 1352-1360.
8. Butovich, I.A., *Tear film lipids*. Exp Eye Res, 2013. 117: p. 4-27.
9. Tragoulias, S.T., et al., *Surface pressure measurements of human tears and individual tear film components indicate that proteins are major contributors to the surface pressure*. Cornea, 2005. 24(2): p. 189-200.
10. Perez BH, Gipson IK (2008). *Focus on Molecules: human mucin MUC16*. Exp Eye Res. 87 (5): 400–1.
11. Jumblatt JE, Jumblatt MM. *Regulation of ocular mucin secretion by P2Y2 nucleotide receptors in rabbit and human conjunctiva*. Exp Eye Res. 1998;67:341–346.
12. Wei XE et al., *Divalent Cations in Tears, and Their Influence on Tear Film Stability in Humans and Rabbits*. Invest. Ophthalmol.Vis.Sci.2012;53(7):3280-3285.
13. Rosenfeld L, et al., *Structural and rheological properties of meibomian lipid*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. 54(4): p. 2720-32.
14. Mudgil, P. and T.J. Millar, *Surfactant properties of human meibomian lipids*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. 52(3): p. 1661-70.
15. Wei XE et al.(2013), *Tear film break-up time in rabbits*. Clin Exp Optom, 96: 70–75.
16. Pucker AD, Haworth KM, *The presence and significance of polar meibum and tear lipids*, Ocul Surf. 2015 Jan;13(1):26-42.
17. Kulovesi P et al., *Surface properties of artificial tear film lipid layers: effects of wax esters*, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014 May 29;55(7):4448-54.

18. Shafaie S et al.. *In Vitro Cell Models for Ophthalmic Drug Development Applications*. BioResearch Open Access. 2016;5(1):94-108.
19. Phillips CA, et al. *Isolation, propagation and neutralization of rubella virus in cultures of rabbit cornea (SIRC) cells*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122: 783-786, 1966.
20. Rhim JS, et al. *Plaque assays of rubella virus in cultures of rabbit cornea (SIRC) cells*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125: 1271-1274, 1967.
21. Efron, N et al., *Ocular surface temperature*. Curr Eye Res, 1989. 8(9): p. 901-6.
22. Cerretani CF et al.(2013) *Water-evaporation reduction by duplex films: application to the human tear film*. Advances in colloid and interface science 197-198:33-57
23. Leiske DL et al. (2012) *Molecular structure of interfacial human meibum films*. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids 28:11858-11865
24. Leiske DL et al. (2010) *The interfacial viscoelastic properties and structures of human and animal Meibomian lipids*. Exp Eye Res 90:598-604
25. Georgiev GA et al.(2010) *Interactions of Meibomian gland secretion with polar lipids in Langmuir monolayers*. Colloids and surfaces B, Biointerfaces 78:317-327
26. Georgiev GA et al.(2012) *Surface chemistry study of the interactions of pharmaceutical ingredients with human meibum films*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 53:4605-4615
27. Georgiev GA et al. (2013) *Surface chemistry study of the interactions of hyaluronic acid and benzalkonium chloride with meibomian and corneal cell lipids*. Soft matter 9:10841-10856
28. Georgiev GA, et al.(2014) *Surface relaxations as a tool to distinguish the dynamic interfacial properties of films formed by normal and diseased meibomian lipids*. Soft Matter 10:5579-5588
29. Ivanova S, et al.(2015) *Surface Properties of Squalene/Meibum Films and NMR Confirmation of Squalene in Tears*. International Journal of Molecular Sciences 16:21813-21831
30. Georgiev, G.A., et al., *Surface chemistry study of the interactions of benzalkonium chloride with films of meibum, corneal cells lipids, and whole tears*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. 52(7): p. 4645-54.
31. Urtti A. *Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev.
32. Moss SE et al. *Prevalence of and risk factors for dry eye syndrome*. Arch Ophthalmol. 2000;118:1264-8.
33. Mishima S et al., *Determination of tear volume and tear flow*. Investigative Ophthalmology, 1966. 5: p. 264-76.
34. Butovich IA et al.(2011) *Comparative HPLC-MS analysis of canine and human meibomian lipidomes: many similarities, a few differences*. Scientific reports 1:24
35. Gipson IK et al. - *Character of ocular surface mucins and their alteration in dry eye disease*, Ocul Surf. 2004 Apr

36. Uchino Yet al. *Alteration of Tear Mucin 5AC in Office Workers Using Visual Display Terminals: The Osaka Study*. JAMA Ophthalmol. 2014;132(8):985-992.
37. GipsonIK, et al. *Mucin gene expression in immortalized human corneal-limbal and conjunctival epithelial cell lines*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003;44:2496–2506.
38. Seo KY, et al., *Regulation of membrane-associated mucins in the human corneal epithelial cells by dexamethasone*. Cornea. 2007 Jul;26(6):709-14.
39. Pichot R, et al. (2013) *Phospholipids at the interface: current trends and challenges*. International journal of molecular sciences 14:11767-11794
40. Shchipunov YA, Kolpakov AF (1991) *Phospholipids at the oil/water interface: adsorption and interfacial phenomena in an electric field*. Adv Coll Interface Sci 35:31-138
41. Wizert A, et al.(2014) *Organization of lipids in the tear film: a molecular-level view*. PloS one 9:e92461
42. Mochizuki, H., et al., *Turnover rate of tear-film lipid layer determined by fluorophotometry*. Br J Ophthalmol, 2009. 93(11): p. 1535-8.
43. Brown SI, Dervichian DG. (1969) *The oils of the meibomian glands: physical and surface characteristics*. Arch Ophthalmol. 82:537–40.
44. Borchman D, et al.(2009) *Factors affecting evaporation rates of tear film components measured in vitro*. Eye Contact Lens, 35:32–7.
45. Iwata S, et al.(1969) *Evapoartion rate of water from the precorneal tear film and cornea in the rabbit*. Invest Ophthalmol. 8:613–9.
46. Bosze, Z. and Houdebine, L.M. (2006) *Application of rabbits in biomedical research: a review*. World Rabbit Sci. 14:1-14.
47. Nagyov´a B, Tiffany JM. *Components responsible for the surface tension of human tears*. Curr Eye Res. 1999;19:4–11.
48. Brown SH, et al.(2016) *Intersubject and Interday Variability in Human Tear and Meibum Lipidomes: A Pilot Study*. The ocular surface 14:43-48
49. Monfort J et al.(2007). *Biochemical basis of the effect of chondroitin sulfate on osteoarthritis articular tissues*. Ann Rheum Dis. 67: 735–740.
50. Bartrakova E.V.; Kabanov A.V. (2008). *Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers*. J. Control. Release. 130 (2): 98–106.
51. Lin Y, Alexandridis P, *Temperature-Dependent Adsorption of Pluronic F127 Block Copolymers onto Carbon Black Particles Dispersed in Aqueous Media*, J. Phys. Chem. B, 2002, 106 (42),pp 10834–10844
52. Shigeyasu C et al., *Diquafosol sodium ophthalmic solution for the treatment of dry eye: clinical evaluation and biochemical analysis of tear*, Jpn J Ophthalmol (2015) 59: 415.
53. Li Y et al., *Rabbit conjunctival epithelium transports fluid, and P2Y2 receptor agonist stimulate Cl⁻ and fluid secretion*. Am J2001;281:C595–602. Physiol.

54. Takaoka-Shichijo Y, Nakamura M. *Stimulatory effect of diquafosol tetrasodium on the expression of membrane-binding mucin genes in cultured human corneal epithelial cells.* J Eye. 2011;28:425–9.
55. Korb D, Sone R, *Are Phospholipids the Critical Ingredient?*, Review of Cornea&Contact lenses, 2012
56. Ham BM et al. *Identification and Comparison of the Polar Phospholipids in Normal and Dry Eye Rabbit Tears by MALDI-TOF Mass Spectrometry.* Investigative ophthalmology & visual science. 2006;47(8):3330-3338.
57. Greiner JV, et al. *Phospholipids in meibomian gland secretion.*, Ophthalmic Res. 1996;28(1):44-9.
58. Chibowski E, *Surface free energy of a solid from contact angle hysteresis*, Advances in Colloid and Interface Science, Volume 103, Issue 2, 25 April 2003, Pages 149-172, ISSN 0001-8686,
59. Xiong L, et al. *Notch Signaling Modulates MUC16 Biosynthesis in an In Vitro Model of Human Corneal and Conjunctival Epithelial Cell Differentiation.* Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2011;52(8):5641-5646.
60. Rand MD et al. *Calcium Depletion Dissociates and Activates Heterodimeric Notch Receptors.* Molecular and Cellular Biology. 2000;20(5):1825-1835.
61. Holderfield MT, Hughes CCW, *Crosstalk Between Vascular Endothelial Growth Factor, Notch, and Transforming Growth Factor- β in Vascular Morphogenesis Circulation Research.* 2008;102:637-652
62. Holly, FJ, Lemp MA, *Wettability and Wetting of Corneal Epithelium*, Exp Eye Res (1971) 11, 239-250

ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

Публикации и забелязани цитирания (без самоцитирания):

1. **P Eftimov**, N Yokoi, V Tonchev, Y Nencheva, GA Georgiev, *Surface properties and exponential stress relaxations of mammalian meibum films*, *European Biophysics Journal*, 2016, стр.1-12, doi:10.1007/s00249-016-1146-x. (IF = 1,444/2016г.)
2. **P Eftimov**, N Stefanova, GA Georgiev, *Dry or wet: membrane associated mucin and the wettability of corneal epithelial cells*, *Science & Technologies*, том:5, брой:1, 2015, стр.61-65
3. **Petar Eftimov**, Nadezhda Stefanova, Zdravko Lalchev & Georgi As. Georgiev - *Effect of hydrophilic polymers on the wettability, static and dynamic, of solid substrate covered by confluent monolayer of air-damaged SIRC cells*, *Biotechnol Biotec Eq.* Volume 29, Issue 2, 2015. (IF = 0,373/2015г.)

✓ Цитирания (1):

Zhijun Shi, Xing Gao, Muhammad Wajid Ullah, Sixiang Li, Qun Wang, Guang Yang, *Electroconductive natural polymer-based hydrogels*, *Biomaterials*, Volume 111, December 2016, Pages 40-54, ISSN 0142-9612, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.09.020>.

Участия в научни форуми:

1. P Eftimov, N Stefanova, Z Lalchev, GA Georgiev, *Effect of hydrophilic polymers on the wettability, static and dynamic, of solid substrate covered by confluent monolayer of air-damaged SIRC cells*, Юбилейна научна конференция с международно участие под надслов „Bioscience - development and new opportunities“ - KLIMENT'S DAYS в Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, 20 - 22 ноември 2013г.
2. P Eftimov, N Stefanova, GA Georgiev, *Dry or wet: membrane associated mucin and the wettability of corneal epithelial cells*, XXV-та международна научна конференция на Съюза на учените в Стара Загора, 4-5 юни 2015г.
3. GA Georgiev, N Yokoi, P Eftimov, N Stefanova, S Ivanova, *Impact of membrane associated mucin and diquafosol on the wettability of human corneal epithelium cell layers*, ARVO Annual Meeting Abstract , 2015