

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.928>

<https://orcid.org/0000-0001-2345-6789>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Vytautas Baranauskas

# Eksperimentinis triušių modelis sausų akių sindromo tyrimams: indukuota Meibomo liaukų disfunkcija

**DAKTARO DISERTACIJA**

Gamtos mokslai,  
Biologija (N 010)

VILNIUS 2026

Disertacija rengta 2019–2023 metais Vilniaus universitete.  
Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba.

**Disertacija ginama eksternu.**

**Mokslinis konsultantas** – dr. Saulius Galgauskas (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010)

Gynimo taryba:

**Pirmininkė** – prof. dr. Daiva Baltriukienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

**Nariai:**

Doc. dr. Mindaugas Mitkus (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010);

Prof. dr. Osvaldas Rukšėnas (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010);

Prof. dr. Vytautė Starkuvienė-Erfle (Heidelbergo universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010);

Prof. dr. Reda Žemaitienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2026 m. birželio mėn. 9 d. 13.30 val. Gyvybės mokslų centras, R401 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7. Vilnius, Lietuva.

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.928>  
<https://orcid.org/0000-0001-2345-6789>

VILNIUS UNIVERSITY

Vytautas Baranauskas

# Experimental Rabbit Model for Dry Eye Syndrome Studies: Induced Meibomian Gland Dysfunction

**DOCTORAL DISSERTATION**

Nature Sciences,  
Biology (N 010)

VILNIUS 2026

The dissertation was prepared between 2019 and 2023 at Vilnius University. The research was supported by Research Council of Lithuania.

**The dissertation is defended on an external basis.**

**Academic consultant** – Dr. Saulius Galgauskas (Vilnius University, Nature Sciences, Biology – N 010).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

**Chairman** – Prof. Dr. Daiva Baltriukienė (Vilnius University, Nature Sciences, Biology – N 010).

**Members:**

Assoc. Prof. Dr. Mindaugas Mitkus (Vilnius University, Nature Sciences, Biology – N 010);

Prof. Dr. Osvaldas Rukšėnas (Vilnius University, Nature Sciences, Biology – N 010);

Prof. dr. Vytautė Starkuvienė-Erfle (Heidelberg University, Nature Sciences, Biology – N 010);

Prof. dr. Reda Žemaitienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 13.30 (hour) on 9 of June 2026 in Room R401 of the Life Science Centre.

Address: Saulėtekis ave. 7. Vilnius, Lithuania

## TURINYS

SANTRUMPOS .....	5
ĮVADAS.....	6
MOKSLINIS NAUJUMAS .....	8
GINAMIEJI TEIGINIAI.....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	10
1.1. Meibomo liaukų anatomicinė vieta ir struktūra .....	11
1.1.1. Histologija .....	12
1.1.2. Sekretijos mechanizmas .....	14
1.1.3. Meibumo sudėtis .....	15
1.1.4. Fiziologinė svarba .....	17
1.1.5. Klinikinė svarba .....	18
1.2. Sausų akių sindromo paplitimas ir poveikis.....	20
1.3. Sausų akių sindromo etiologija .....	21
1.3.1. Aplinkos veiksniai.....	23
1.3.2. Sisteminiai organizmo faktoriai .....	24
1.3.3. Uždegimas .....	25
1.3.4. Kurkumino ir liposomų derinio taikymas sausų akių sindromo gydyme .....	26
1.4. Meibomo liaukų disfunkcija.....	27
1.4.1. Simptomai .....	28
1.4.2. Diagnostika ir kontrolė.....	29
1.4.3. Meibomo liaukos disfunkcijos patofiziologija.....	29
1.5. Ryšys tarp Meibomo liaukų disfunkcijos ir sausų akių sindromo.....	30
1.6. Gyvūnų modeliai tiriant sausų akių sindromą .....	32
1.6.1. Triušių modelių privalumai ir trūkumai .....	34
1.6.2. Etikos principai atliekant tyrimus su gyvūnais .....	35
1.6.3. Žinomi triušių modeliai Meibomo liaukų disfunkcijos tyrimui .....	37

1.7.	Eksperimentiniai sausų akių sindromo tyrimo metodai .....	39
1.7.1.	Eksperimentiniai gyvūnų metodai, naudojami sausų akių sindromo tyrimams .....	39
1.7.2.	<i>In vivo</i> vaizdo gavimo metodai, Meibomo liaukų vertinimui .....	40
1.7.3.	Biomarkeriai sausų akių sindromo sunkumui nustatyti	42
1.8.	Kurkumino ir liposomų taikymas medicinoje .....	44
1.8.1.	Liposomų taikymas medicinoje .....	44
1.8.2.	Kurkumino taikymas Meibomo liaukų disfunkcijos gydyme .....	46
2.	DARBO APIMTIS IR METODOLOGIJA .....	48
2.1.	Tyrimo eiga .....	48
2.2.	Darbo metodologija .....	48
2.2.1.	Meibomo liaukų disfunkcijos sukėlimas suleidus paruoštą Freund'o adjuvantą.....	48
2.2.2.	Sausų akių sindromo sukėlimas ašarų liaukas pašalinus chirurginiu metodu .....	49
2.2.3.	Sausų akių sindromo sukėlimas lašinant Benzalkonio chlorido konservantą .....	50
2.2.4.	Meibomo liaukų disfunkcijos sukėlimas kauterizacijos metodu .....	50
2.2.5.	Liposominis gydymas PFA sukulto MLD metodui.....	50
2.2.6.	Ragenos dažymo fluoresceinu testas.....	51
2.2.7.	Ašarų tūrio testas .....	51
2.2.8.	Ašarų plėvelės plyšimo laikas .....	52
2.2.9.	Teleangiektazijų ir Meibomo liaukų angų kiekybinis vertinimas .....	53
2.2.10.	Histologinių mėginių kokybinis vertinimas.....	54
2.2.11.	Ragenos optinė koherentinė tomografija (OKT) ...	55
2.2.12.	Statistinė duomenų analizė .....	56
3.	REZULTATAI .....	57
3.1.	Ašarų liaukų pašalinimas chirurginiu būdu .....	57
3.2.	Benzalkonio chlorido lašinimo metodas .....	61

3.3. Meibomo liaukų disfunkcija su paruoštu Freundo adjuvantu .66	
3.4. Meibomo liaukų disfunkcija po kauterizacijos.....74	
3.5. Liposominiai preparatai gydant Meibomo liaukų disfunkciją.81	
4. REZULTATŲ APTARIMAS .....91	
IŠVADOS.....104	
REKOMENDACIJOS.....105	
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....106	
SUMMARY .....129	
PADĖKA.....148	
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS .....149	
KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS .....150	
GYVENIMO APRAŠYMAS.....151	

## SANTRUMPOS

AL	–	ašarų liauka
ALR	–	ašarų liaukų rezekcija
APPL	–	ašarų plėvelės plyšimo laikas
A.V.	–	apatinis vokas
BAK	–	Benzalkonio chloridas
DA	–	dešinė akis
HL	–	Harderio liauka
KA	–	kairė akis
OKT	–	optinė koherentinė tomografija
PAS	–	periodinė rūgštis <i>Schiff</i>
PFA	–	paruoštas Freundo adjuvantas
PS-OKT	–	priekinio segmento optinė koherentinė tomografija
SAS	–	sausų akių sindromas
STGD	–	Stargardt liga
TG	–	transgeniniai gyvūnai
TVM	–	trečio voko membrana
V.V.	–	viršutinis vokas

## ĮVADAS

Sausų akių sindromas (SAS) ir Meibomo liaukų disfunkcija (MLD) - vienos dažniausių akių paviršiaus ligų, turinčių didelį poveikį pacientų gyvenimo kokybei (1). Šiuolaikinėje medicinoje šių ligų kontrolė tampa vis aktualesnė, nes šių ligų atvejų skaičius nuosekliai auga. Tai įtakoja ne tik visuomenės senėjimas, bet ir technologinis amžius, kuriame žmonės daug laiko praleidžia prie skaitmeninių ekranų. Nuolatinis ekranų stebėjimas, retesnis mirksėjimas ir ilgos darbo valandos patalpose su dirbtiniu apšvietimu neigiamai veikia ašarų plėvelės būklę ir akis (2). Šie veiksniai skatina MLD ir SAS progresavimą, taip didindami šių ligų paplitimą visame pasaulyje.

Labiausiai paplitusi SAS priežastis yra MLD – sudėtinga ir daugialypė liga, apimanti akių vokų uždegimą, mikrobiologinius pokyčius, odos ligas ir rimtas komplikacijas ragenoje (3). Ši patologinė būklė dažnai siejama su penkiais pagrindiniais patofiziologiniais mechanizmais: akių vokų ir junginės uždegimu, ragenos pažeidimu, mikrobiologiniais pokyčiais, ašarų plėvelės lipidinio sluoksnio pokyčiais bei nestabilumu. Visi šie veiksniai tarpusavyje sąveikauja, sukurdami vadinamąjį „užburto rato“ modelį (4). MLD atveju šis modelis apima mikrobiologinius pokyčius, kurie padidina meibumo (lipidų sluoksnio) lydymosi temperatūrą, sukelia Meibomo liaukų užsikimšimą ir dar labiau skatina uždegimą (5). Tuo tarpu SAS patogenezėje pagrindinę grandį sudaro ašarų plėvelės nestabilumas, sukeliantis hiperosmolariškumą bei akių paviršiaus uždegimą. SAS ir MLD mechanizmai glaudžiai susiję, o jų tarpusavio ryšys dar labiau apsunkina šių ligų kontrolę (6).

Meibomo liaukos (*glandulae tarsales*), esančios akių vokuose atlieka svarbų vaidmenį stabilizuojant ašarų plėvelės garavimą. Šios liaukos gamina lipidus, kurie sudaro ašarų plėvelės paviršinį sluoksnį. Lipidai ne tik apsaugo ašarų plėvelę nuo greito išgaravimo, bet ir užtikrina jos vientisumą bei stabilumą. Tačiau dėl uždegimo ar liaukų užsikimšimo meibumo gamyba sutrinka, o tai lemia ašarų plėvelės nestabilumą ir SAS simptomų progresavimą (7). Šie pokyčiai akivaizdžiai parodo MLD ir SAS glaudų patofiziologinį ryšį.

SAS ir MLD paplitimas pasaulyje priklauso nuo daugybės veiksnių, įskaitant amžių, lytį, gyvenimo būdą ir geografines ypatybes. Azijos šalyse šių ligų paplitimas siekia nuo 46 % iki 70 %, tuo tarpu baltaodžių populiacijose svyruoja nuo 3,5 % iki 20 % (8). Šiuos skirtumus gali lemti skirtingi diagnostiniai kriterijai ir tyrimų metodai. Be to, skaitmeninėje eroje SAS ir MLD paplitimą didina aplinkos tarša, urbanizacija bei netinkami gyvenimo įpročiai.

Tyrimai rodo, kad MLD dažniau diagnozuojama vyresnio amžiaus pacientams, todėl amžius yra vienas svarbiausių rizikos veiksnių – 30 metų ir jaunesniems asmenims MLD nustatoma apie 33 % atvejų, o vyresniems nei 60 metų – net 72 % (9). Šie duomenys rodo, kad senstant visuomenei šių ligų paplitimas ateityje tik didės, todėl būtina kurti naujus diagnostikos ir gydymo metodus, galinčius laiku nustatyti ligą ir užkirsti kelią jos progresavimui.

Šiuolaikinėje medicinoje pažangūs terapiniai sprendimai, tokie kaip biomimetinės liposomos ir nanodalelės, atveria naujas galimybes SAS ir MLD gydymui. Tokie inovatyvūs sprendimai ne tik padeda valdyti ligos simptomus, bet ir tiesiogiai veikia ligos patogenezę, spręsdami pagrindines uždegimines bei struktūrines problemas. Tokie gydymo metodai tampa personalizuoti, todėl jų efektyvumas nuolat didėja.

Atsižvelgiant technologinio amžiaus keliamus iššūkius ir nuolat augantį šių ligų paplitimą, SAS ir MLD diagnostika bei terapija tampa itin svarbios šiuolaikinėje medicinoje. Inovatyvių gydymo metodų kūrimas yra esminis žingsnis, siekiant ne tik pagerinti pacientų gyvenimo kokybę, bet ir sumažinti sveikatos sistemų našta. Šiame kontekste būtina gilinti mokslines žinias apie šias ligas, siekiant ateityje pasiūlyti dar efektyvesnius sprendimus oftalmologijoje.

### Darbo tikslas

Sukurti eksperimentinį sausų akių sindromo modelį triušiuose, su Meibomo liaukų disfunkcija, kuris tiksliai atkartotų pagrindinius patologinius sausų akių sindromo mechanizmus ir etiologinius veiksnius, sudarant sąlygas ikiklinikiniams naujų terapinių preparatų efektyvumo ir saugumo tyrimams.

### Darbo uždaviniai

1. Įvairiais metodais triušių modelyje sukelti Meibomo liaukų disfunkciją .
2. Įvertinti MLD poveikį ragenai ir priediniams akies organams, įskaitant junginę, ašarų liaukas ir vokus.
3. Nustatyti ikiklinikinio modelio pritaikymo galimybes tiriant naujus vaistinius preparatus, skirtus SAS gydymui.

## MOKSLINIS NAUJUMAS

Šis tyrimas yra pirmasis pasaulyje, kuriame naudojant triušių modelį buvo sukeltos Meibomo liaukų disfunkcijos klinikinės pasekmės, imituojančios sausų akių sindromo sukeltus regos organų pokyčius.

Doktorantūros studijos apie MLD triušių modelyje yra naujovė, pasižyminti keliais novatoriškais aspektais, reikšmingai prisidedančiais prie akių ligų tyrimų pažangos. Tyrime pristatomas naujas MLD sukėlimo metodas, naudojant paruoštą Freund'o adjuvantą – anksčiau nenaudotą metodiką, glaudžiai imituojančią uždegiminius procesus, būdingus žmogaus MLD, taip padidinant modelio klinikinę svarbą.

Be to, tyrime buvo nagrinėjamas dvigubas MLD poveikis priediniams akies organams ir ragenai, leidžiantis geriau suprasti tiek trumpalaikius, tiek ilgalaikius būklės padarinius. MLD gydymui buvo panaudoti specialiai sukurti liposominiai preparatai su kurkuminu ir ciklosporinu A. Šis metodas yra naujas, nes stiprios kurkumino priešuždegiminės ir antioksidacinės savybės anksčiau nebuvo taikytos liposomose, skirtose MLD gydymui.

Ši naujovė ne tik siūlo naują gydymo metodą, bet ir patvirtina triušių modelio efektyvumą kaip ikiklinikinį tyrimų įrankį, skirtą įvertinti kuriamų vaistų nuo sausų akių sindromo veiksmingumą, sumažinant atotrūkį tarp laboratorinių tyrimų ir klinikinio taikymo. Doktorantūros darbas integruoja biologijos, biochemijos, farmakologijos ir klinikinės oftalmologijos metodikas, sukuriant daugiadisciplininę (transliacinę) strategiją, kuri pagerina sausų akių sindromo, atsirandančio dėl Meibomo liaukų disfunkcijos, supratimą bei papildomų gydymo galimybių taikymą. Tai sudaro pagrindą būsims gydymo naujovėms, siekiant geresnių gydymo rezultatų.

## GINAMIEJI TEIGINIAI

1. Skirtingai triušių modeliai sukelia sausų akių sindromą ir Meibomo liaukų disfunkciją, atkartoja klininius požymius, kuriuos patiria sergantys žmonės.
2. MLD sukelia trumpalaikius ir ilgalaikius ašarų plėvelės bei kitus akies organų pokyčius, įtakojančius regėjimo kokybę.
3. Sausų akių dirbtinis drėkinimas nesumažina MLD simptomų.
4. MLD triušių modelis, sukurtas naudojant Freund'o adjuvantą - tinkamas naujų preparatų, skirtų Meibomo liaukų disfunkcijos ir sausų akių sindromo bei su tuo susijusio keratokonjunktyvito gydymui, ikiklinikiniams tyrimams.

## 1. LITERATŪROS APŽVALGA

Istoriškai sausų akių sindromas buvo aprašyta įvairiais būdais, atspindinčiais supratimą apie ligos etiologiją ir kontrolę (10). Ankstyviausios nuorodos į simptomus, panašius į sausų akių sindromą, siejamos su senovės civilizacijomis. Senovės graikų gydytojas Hipokratas (apie 460–370 m. pr. Kr.) dokumentavo akių deginimo ir svetimkūnio pojūčius, kuriuos galima interpretuoti kaip ankstyvus sausų akių simptomų aprašymus (11). Viduramžių ir Renesanso laikotarpiais sausų akių simptomų stebėjimas tęsėsi, tačiau dėl pažangių medicinos žinių trūkumo šie aprašymai liko daugiausia anekdotiniai. XVII amžiuje anglų gydytojas Thomas Willis nustatė, kad ašarų liaukos yra esminės ašarų gamybos sudedamosios dalys (12). Willisio darbas tapo pagrindu būsimiems ašarų plėvelės dinamikos ir ašarų gamybos reguliavimo tyrimams. XIX amžiuje sausų akių simptomai buvo dažnai apibūdinami kaip „kseroftalmija“, tačiau visapusiškas pagrindinių SAS priežasčių supratimas dar nebuvo galutinai pasiektas (11).

XX amžiuje žymiai išplėtotas supratimas apie SAS patofiziologiją. Tyrėjai, tokie kaip Maurice'as, Holly ir Bronas, prisidėjo prie trijų sluoksnių ašarų plėvelės koncepcijos sukūrimo, suteikdami naujų įžvalgų apie SAS ir ašarų plėvelės stabilumo mechanizmus (13). 1903 m. Alfredas Schirmeris pristatė Schirmerio testą – pagrindinį diagnostikos įrankį ašarų gamybai įvertinti, leidžiantį kiekybiškai nustatyti ašarų trūkumą, esminį SAS diagnozės aspektą (14). XX amžiaus antroje pusėje mokslininkai dar labiau patobulino SAS klasifikaciją ir patofiziologiją, o sąvoka "keratokonjunktyvitas sicca" įgijo didelę reikšmę medicinos literatūroje.

XXI amžiuje SAS tyrimai labai išsiplėtė. 2007 m. ašarų plėvelės ir akių paviršiaus draugijos (TFOS) sausų akių seminaras (DEWS) ir vėlesni jo atnaujinimai 2017 m., atliko esminį vaidmenį formuojant šiuolaikinį supratimą apie SAS. Šios išsamios ataskaitos suteikė naujų įžvalgų apie klasifikaciją, patofiziologiją ir kontrolę (15).

Šiuolaikiniai tyrimai paskatino sukurti įvairius terapinius metodus, įskaitant dirbtines ašaras, vaistus nuo uždegimo ir naujoviškus gydymo būdus, tokius kaip intensyvios impulsinės šviesos (IPL) terapija (16). Sausų akių sindromo istorinė raida atskleidžia laipsnišką mūsų supratimą apie šią būklę – nuo ankstyvųjų aprašymų senoviniuose tekstuose iki šiuolaikinių tyrimų. Diagnostikos metodų, ašarų plėvelės dinamikos ir gydymo galimybių pažanga pagerino gebėjimą diagnozuoti ir kontroliuoti šią dažnai pasitaikančią regos organų patologinę būklę. Siekiant gauti daugiau įžvalgų ir naujovių SAS srityje, būtina tęsti mokslinius tyrimus.

## 1.1. Meibomo liaukų anatominė vieta ir struktūra

Meibomo liaukos, dar vadinamos kremzlinėmis liaukomis arba meibumo riebalinėmis liaukomis, yra neatskiriama akies paviršiaus dalis (17). Šių liaukų anatomijos ir fiziologijos supratimas yra būtinas siekiant suvokti jų vaidmenį palaikant ašarų plėvelės stabilumą ir funkcionalumą.

Meibomo liaukos yra išsidėsčiusios tankiame jungiamajame kolageniniame audinyje, esančiame viršutiniuose ir apatiniuose akių vokuose (18). Šios kolageno plokštelės, suteikiančios formą ir palaikančios akių vokus, sudaro šių liaukų struktūrinį pagrindą. Viršutiniame voke liaukų skaičius svyruoja nuo 25 iki 40, o apatiniame voke paprastai yra apie 20-30 liaukų. Šis skaičiaus skirtumas gali būti siejamas su individualiais anatomiais skirtumais ir didesniu viršutinio voko dydžiu (19).

Meibomo liaukos yra ilgos, plonos, daugiaskiltelinės, vamzdinės struktūros, išsidėsčiusios statmenai voko kraštui ir besitęsianti nuo kremzlinės plokštelės priekinio paviršiaus giliai į voką (20). Liaukos yra lygiagrečios viena kitai ir tvarkingai išdėstytos eilėmis, primenančiomis fortepijono klavišus. Jų angos atsiveria bendru ištekamuuju latakų laisvame voko krašte, tiesiai už blakstienų, kur išskiriamas riebalinis ašarų plėvelės sluoksnis, itin svarbus normaliam akių funkcionavimui (21).

Pačios liaukos yra pakankamai ilgos: viršutinio voko liaukos paprastai yra ilgesnės, maždaug 5–6 mm, apatinės - šiek tiek trumpesnės, maždaug 2–3 mm ilgio (22). Toks ilgis leidžia sekretinėms ląstelėms gaminti pakankamą ašarų plėvelės lipidinio komponento kiekį. Pailgėjusi liaukų forma yra svarbi jų funkcijai, nes suteikia pakankamai vietos daugybei riebalinių ląstelių, gaminančių meibumą (23).

Meibomo liaukų struktūra yra sudėtinga. Kiekviena liauka susideda iš centrinio latakų ir daugybės acinusų, išklotų stulpiniu liaukiniu epitelium ir mioepiteliocitais. Acinusai - į vynuogės kekę panašios sekretinių ląstelių sankaupos, kuriose susidaro meibumas, vėliau patenkantis į centrinį lataką (žiūrėti 1 pav.). Šis kanalas eina per visą liaukos ilgį ir ištekamuuju latakų atsiveria laisvajame voko krašte (24). Jis išklotas sluoksniuotu plokščiuoju epitelium, kuris artėjant prie angos pasikeičia plonesniu epitelium. Liaukas supa tankus kapiliarų tinklas, aprūpinantis būtinomis maistinėmis medžiagomis, reikalingomis liaukų medžiagų apykaitai (25).

Liaukos nėra vienodai cilindrinės - jos siaurėja link kanalo angos. Manoma, kad šis kūginis dizainas palengvina sklandų meibumo patekimą ant akies paviršiaus (26). Meibumo sekrecija yra nenutrūkstamas procesas, kurio metu po kiekvieno mirksėjimo lipidinis sluoksnis pasklinda virš vandensinio

ašarų plėvelės sluoksniu. Šis procesas yra labai svarbus siekiant sumažinti ašarų garavimą ir išlaikyti stabilią ašarų plėvelę (27).

Išsamus Meibomo liaukų lokacijos ir struktūros supratimas yra svarbus ne tik klinicinei įvairių akių ligų diagnostikai ir gydymui, bet ir siekiant įvertinti sudėtingą žmogaus kūno struktūrą. Tiksliai šių liaukų anatomicinė struktūra pabrėžia jų svarbą normaliam akių funkcionavimui, o bet koks jų funkcijos sutrikimas gali sukelti nemalonų pojūtį ir regėjimo sutrikimus. Meibomo liaukos, nors ir mažos bei dažnai nepastebimos, atlieka esminę funkciją bendrai akies veiklai ir labai prisideda prie regėjimo bei sveikos akies palaikymo.

### 1.1.1. Histologija

Histologiškai Meibomo liaukos pasižymi sudėtinga struktūra, kuri atspindi jų svarbų vaidmenį normaliam akių funkcionavimui. Galinės jų dalys išklotos stulpiniu liaukiniu epiteliumi ir mioepiteliocitais. Liaukų struktūrą sudaro: acinusas, latakėliai ir centrinis latakas, kurie dalyvauja meibumo gamyboje ir išskyrimo (28).

#### **Meibocitai**

Meibocitai yra pagrindiniai Meibomo liaukų funkciniai vienetai. Šios ląstelės, panašios į įprastas riebalines ląsteles, yra sferoidinės formos ir susitelkusios aplink mažus latakus, sudarydamos periferinius acinusus, kurie apibūdina liauką. Meibocitai yra užpildyti lipidų lašeliais, kurie yra meibumo pirmtakai. Kai meibocitai bręsta, šie lipidų lašeliai susilieja ir didėja, palaipsniui užimdami didžiąją ląstelės tūrio dalį. Šių ląstelių gyvavimo ciklas yra nuolatinis - jos susidaro, bręsta ir suyra, kad jų lipidų kiekis patektų į latakų sistemą (28,29). Meibocitų citoplazmoje gausu organelių, susijusių su lipidų sinteze, įskaitant lygųjį endoplazminį tinklą ir mitochondrijas. Šios organelės rodo didelį ląstelių metabolinį aktyvumą. Ląstelių periferijoje esantys mikrogaureliai padidina sekrecijos paviršiaus plotą. Meibocitams pasiekus gyvavimo ciklo pabaigą, vyksta holokrininę sekreciją - visas ląstelės turinys, įskaitant ląstelės membraną, tampa meibumo sudėtine dalimi (29).

#### **Latakų ląstelės**

Latakų ląstelės išklėja vidinius liaukinius latakus, pro kuriuos lipidai iš acinusų pereina į centrinį lataką. Šios ląstelės yra labai svarbios palaikant latakų sistemos vientisumą ir užtikrinant sklandų meibumo tekėjimą. Jos dažniausiai yra kubo arba stulpelio formos ir pasižymi mažesniu lipidų kiekiu citoplazmoje nei meibocitai. Latakų ląstelės taip pat yra atsakingos už bet kokius lipidų sekrecijos pokyčius, kai meibumas praeina per latakų sistemą, koreguodamos jo sudėtį, reaguodamos į įvairius fiziologinius dirgiklius (25).

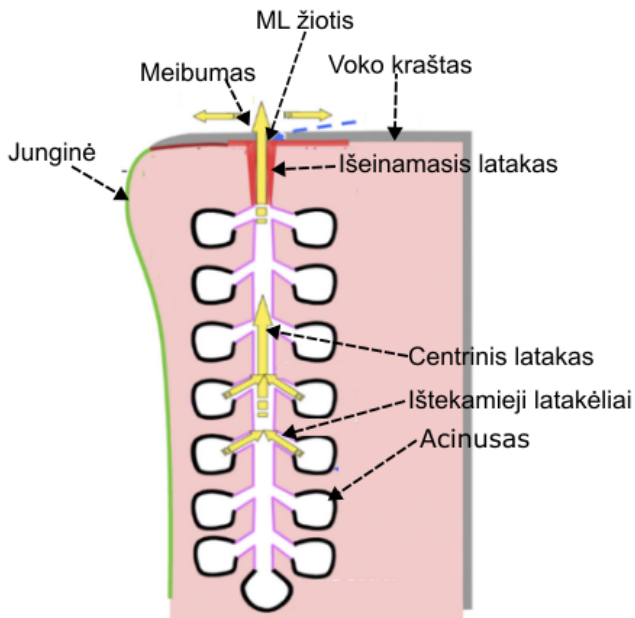
### Centrinis kanalas

Centrinis latakas yra pagrindinis meibumo kanalas, kuriame kaupiasi lipidinis sekretas iš periferinių latakų ir teka link liaukos angos voko pakraštyje. Latakas išklotas sluoksniuotu plokščiu epitelium, kuris paviršiuje plonėja. Centrinio kanalo struktūra pritaikyta kaupti klampią lipidinę medžiagą, o platus spindis palengvina meibumo tekėjimą. Galinėje latakų dalyje dažnai susidaro nedidelis išsiplėtimas, žinomas kaip rezervuaras, kuriame prieš išskiriant kaupiasi meibumas (1,22).

### Kitos struktūros

Meibocitus ir latakų ląstelės supa stroma, sudaryta iš fibroblastų, kolageno skaidulų, kraujagyslių ir nervų. Ši jungiamojo audinio struktūra užtikrina struktūrinį vientisumą bei aprūpina liaukos ląsteles maistinėmis medžiagomis ir nerviniais signalais. Kraujagyslės yra ypač svarbios, tiekiančios riebalų rūgštis bei kitus lipidų sintezei būtinus pirmtakus (25,30).

Meibomo liaukų histologinis sudėtingumas atspindi jų lemiamą vaidmenį palaikant normalią akių funkciją. Koordinuota meibocitų, latakų ir centrinių latakų ląstelių veikla, užtikrina nuolatinę meibumo gamybą bei išskyrimą, būtiną ašarų plėvelės lipidų sluoksniui palaikyti (31). Šiai subtiliai sistemai sutrikus gali atsirasti neigiami akių pakitimai ir ligos, pabrėžiant šių akių struktūrų svarbą mūsų kasdieniame gyvenime.



**Pav. 1.** Scheminis Meibomo liaukos struktūrizuotas vaizdas (24) .

### 1.1.2. Sekretijos mechanizmas

Meibomo liaukų sekretijos mechanizmas yra labai tikslus procesas, būtinas akių paviršiaus funkcionavimui ir stabilumui palaikyti. Meibumas, lipidų turtinga sekretas, gaminamas Meibomo liaukos, akies paviršių pasiekia specialiu procesu, vadinamu holokrinine sekrecija. Šis mechanizmas apima visą ląstelę, skirtingai nei kiti sekretijos metodai, kai išleidžiama tik dalis ląstelės turinio (32).

#### **Holokrininė sekrecija:**

Holokrininės sekretijos metu subrendusios meibocitinės ląstelės, užpildytos lipidų lašeliais, pasiekia savo gyvavimo ciklo pabaigą ir suyra, į liaukos spindį išskirdamos visą turinį, įskaitant ląstelių liekanas ir lipodus (32). Šis procesas užtikrina gausų lipidų mišinį, būtina išoriniam ašarų plėvelės sluoksniui formuotis. Suirusias ląsteles pakeičia naujos ląstelės, susidarančios iš bazinio pirmtakų ląstelių sluoksnio, užtikrinančio nuolatinį meibumo tiekimą (33).

#### **Tekėjimas kanalų sistema:**

Patekęs į spindį, meibumas keliauja per liaukos lataukų sistemą. Tekėjimas prasideda mažais periferiniais kanalais, sujungtais su acinuso ląstelėmis, ir tęsiasi iki centrinio latako. Šiuos kanalus dengiančios ląstelės palaiko tinkamą meibumo tekėjimą, užkertant kelią užsikimšimui ir modifikuodamos lipidų sudėtį bei užtikrinamos ašarų plėvelės poreikius (34). Meibumui tekant, jis kaupiasi centrinio latako galinėje dalyje, dažnai sudarydamas nedidelį išsiplėtimą, vadinamą rezervuaru. Šis rezervuaras veikia kaip kaupimo zona, užtikrinanti pakankamą meibumo kiekį akies paviršiuje (35).

#### **Akių vokų mirksėjimo vaidmuo:**

Paskutinis meibumo sekretijos etapą palengvina akių vokų mirksėjimas. Kiekvienas mirksėjimas daro spaudimą kremzlinėms plokštelėms ir Meibomo liaukoms, išstumdamas susikaupusį meibumą iš liaukos angos voko krašte. Iš čia meibumas pasklinda virš vandeninio ašarų plėvelės sluoksnio, sudarydamas lygų, apsauginį ir stabilizuojantį sluoksnį, neleidžiantį per daug išgaruoti ašaroms ir užtikrina aiškų optinį paviršių (33,35).

#### **Reguliavimas ir kontrolė:**

Meibumo sekrecija nėra pastovus, nekintantis procesas, bet tiksliai reguliuojamas įvairių fiziologinių veiksnių. Neurogeninė kontrolė, ypač parasimpatinė nervų sistema, atlieka svarbų vaidmenį moduluojant sekretijos greitį ir tūrį (36). Hormoniniai pokyčiai, vietiniai citokinai ir net aplinkos

veiksniai, tokie kaip temperatūra ir drėgmė, taip pat gali paveikti sekrecijos procesą (37,38).

### **Sekrecijos mechanizmo svarba:**

Negalima nuvertinti sekrecijos mechanizmo svarbos. Reikalinga tiksli pusiausvyra: per mažas meibumo kiekis sukelia sausų akių simptomus ir galimą akies paviršiaus pažeidimą, o per didelis kiekis gali sukelti liaukų užsikimšimą ir uždegimą – būklę, vadinamą Meibomo liaukų disfunkcija (35). Todėl sveikų akių funkcionavimui labai svarbu suprasti ir išlaikyti tinkamą meibumo sekrecijos pusiausvyrą (39).

Meibomo liaukų sekrecijos mechanizmas yra sudėtingas, daugiapakopis procesas, apimantis holokrininį lipidų išsiskyrimą, transportavimą per latakų sistemą ir pasklidimą akies paviršiuje, kurį palengvina mirksėjimas. Šis gerai suderintas procesas užtikrina ašarų plėvelės stabilumą ir akies paviršiaus sveiką funkcionavimą, pabrėždamas sudėtingą ir dinamišką akių fiziologijos prigimtį.

### 1.1.3. Meibumo sudėtis

Meibumas yra biochemiškai sudėtinga medžiaga, kurio sudėtis būtina ragenos, junginės, vokų ir kitų regos organų sveikam funkcionavimui palaikyti. Kaip įvairių lipidų mišinys, jis prisideda prie ašarų plėvelės apsaugos ir stabilumo. (40). Pagrindiniai meibumo komponentai - vaško esteriai, sterolių esteriai, trigliceridai ir laisvosios riebalų rūgštys, prisidedančios prie unikalių ašarų plėvelės lipidų sluoksnio savybių (41).

#### Vaško esteriai ir sterolio esteriai

Vaško esteriai ir cholesterolių esteriai yra gausiausi meibumo komponentai, sudarantys 40-50 % meibumo dalies (42). Vaško esteriai, sudaryti iš ilgos grandinės riebalų alkoholių, esterintų į riebalų rūgštis, pasižymi nepoliniu pobūdžiu ir reikšmingai prisideda prie meibumo klampumo bei paviršiaus įtempimo savybių. Jie labai svarbūs užkertant kelią greitam ašarų plėvelės vandeninio sluoksnio išgaravimui (43). Sterolių esteriai sudaro 20-25 % meibumo, yra gaunami iš cholesterolio ir kitų sterolių, taip pat atlieka svarbų vaidmenį palaikant lipidų sluoksnio stabilumą ir struktūrą. Šie esteriai prisideda prie ašarų plėvelės plitimo ir atsparumo aplinkos veiksniams (44).

#### Trigliceridai

Trigliceridai sudaro 10-20 % meibumo, susideda iš glicerolio ir trijų riebalų rūgščių molekulių, yra mažiau gausūs nei vaško ir sterolių esteriai, tačiau jie atlieka svarbų vaidmenį ašarų plėvelės savybėms (45). Jie prisideda prie lipidų sluoksnio sklaidymo ir pasklidimo, užtikrindami tolygų akies

paviršiaus padengimą kiekvieno mirksėjimo metu. Riebalų rūgščių trigliceridų sudėtis gali reikšmingai paveikti lydymosi temperatūrą ir, atitinkamai, meibumo pasklidimą kūno temperatūroje (42).

#### Laisvosios riebalų rūgštys

Laisvųjų riebalų rūgščių meibume yra 2-5 %, jos susidaro hidrolizuojant kitus lipidų komponentus. Nors jų kiekis mažesnis, jos daro reikšmingą įtaką meibumo savybėms. Laisvosios riebalų rūgštys gali paveikti ašarų plėvelės lydymosi temperatūrą, klampumą ir net antimikrobinę savybę (45,46). Sočiųjų ir nesočiųjų riebalų rūgščių pusiausvyra gali turėti įtakos lipidų sluoksnio stabilumui ir vientisumui, o didesnė nesočiųjų riebalų rūgščių dalis paprastai siejama su skystesne ir labiau plintančia sekrecija (47).

#### O-acilintos omega-hidroksi riebalų rūgštys (2-5 %)

Šie specializuoti lipidai būdingi tik meibumui ir, kaip manoma, atlieka svarbų vaidmenį palaikant ašarų plėvelės stabilumą ir plitimą akies paviršiuje (48).

#### Cholesterilesteriai (< 1 %)

Tai esteriai, susidarantys iš cholesterolio ir riebalų rūgščių. Nors jų kiekiai mažesni, jie prisideda prie ašarų plėvelės struktūrinių ir funkcinų savybių palaikymo (49)].

#### Poliniai lipidai (< 1 %)

Poliariniai lipidai, įskaitant fosfolipidus ir glikolipidus, meibume yra nedideliais kiekiais, tačiau jie atlieka esminį vaidmenį ašarų plėvelės sąveikoje su vandeniniu sluoksniu ir akies paviršiumi (50).

#### Kintamumas ir individualūs skirtumai

Tiksli meibumo sudėtis gali reikšmingai skirtis tarp individų, priklausomai nuo tokių veiksnių kaip genetika, mityba, amžius ir bendra sveikata. Pavyzdžiui, specifinių riebalų rūgščių suvartojimo su maistu pokyčiai gali pakeisti meibumo riebalų rūgščių sudėtį (51). Įrodyta, kad hormoniniai svyravimai, ypač androgenai, daro įtaką meibumo gamybai ir sudėčiai (52).

#### Funkcinė svarba

Sudėtingas lipidų mišinys meibume atlieka keletą svarbių funkcijų. Formuodamas išorinį ašarų plėvelės sluoksnį, jis apsaugo nuo per didelio vandeninio sluoksnio išgaravimo, taip palaikydamas akies paviršiaus drėgnumą ir užtikrindamas sklandų ragenos laužiamąjį paviršių, būtiną aiškiam matymui (28,35,53). Lipidų sluoksnis taip pat veikia kaip barjeras svetimkūniams ir patogenams, prisidedamas prie akių apsaugos mechanizmų. Be to, lygus ir stabilus lipidų sluoksnis apsaugo nuo ašarų išsiliejimo ant skruosto, užtikrindamas tinkamą ašarų nutekėjimą per ašarų kanalėlius (54,55).

### Klinikinė svarba

Meibumo sudėties supratimas yra labai svarbus diagnozuojant ir gydant įvairias akių ligas. Lipidų sudėties pokyčiai gali sukelti Meibomo liaukos disfunkciją, sausų akių sindromą ir kitus akių paviršiaus sutrikimus (28,37). Meibumo lipidų profilio analizė gali padėti diagnozuoti šias būkles ir pritaikyti tinkamus gydymo metodus, tokius kaip mitybos koregavimas ar specialių akių lašų naudojimas, siekiant atkurti ašarų plėvelės pusiausvyrą ir funkcionalumą (32,56).

Meibumo sudėtis yra įvairialypė ir skiriasi tarp žmonių ar gyvūnų, tačiau jo vaidmuo akių normaliam funkcionavimui yra labai svarbus. Sudėtingas vaško esterių, cholesterolio esterių, trigliceridų ir laisvųjų riebalų rūgščių mišinys veikia sinergiškai, palaikydamas ašarų plėvelės vientisumą, apsaugodamas akies paviršių ir užtikrindamas ryškų bei aiškų regėjimą (57). Šių komponentų ir jų sąveikos supratimas suteikia vertingų įžvalgų apie regos organų fiziologiją ir pagrindą susijusiems sutrikimams kontroliuoti ir gydyti.

#### 1.1.4. Fiziologinė svarba

Meibomo liaukos, nors ir mažos bei dažnai nepastebimos, yra būtinos sveikų akių funkcionavimui ir regėjimo efektyvumui palaikyti. Pagrindinė jų funkcija yra išskirti meibumą, riebalinę medžiagą, kuri būtina ašarų plėvelės stabilumui ir vientisumui užtikrinti (58). Šis vaidmuo yra daugialypis ir turi įtakos įvairiems akių fiziologijos aspektams.

#### Ašaros plėvelės stabilumas

Ašarų plėvelė yra trijų sluoksnių struktūra, kurią sudaro vidinis gleivinis sluoksnis, vidurinis vandeninis sluoksnis ir išorinis lipidų sluoksnis (59). Meibomo liaukos prisideda prie išorinio sluoksnio formavimo. Šis sluoksnis apsaugo nuo greito vandeninio sluoksnio išgaravimo, palaiko ašarų stabilumą ir užtikrina, kad ragena išliktų tolygiai padengta ir pamaitinta (60). Esant nestabiliai ašarų plėvelei, akys tampa jautrios ir formuojasi sausi plotai, sukiantys diskomfortą ir pažeidžiantys akies paviršių (61).

#### Optinis ryškumas

Lygus lipidų sluoksnis, kurį gamina Meibomo liaukos, yra būtinas siekiant išlaikyti skaidrų, laužiantį akies obuolio paviršių (62). Šis sluoksnis išlygina po juo esantį vandeninį sluoksnį, užtikrindamas, kad šviesa į tinklainę patektų tolygiai, be iškraipymo ir netaisyklingos sklaidos. Šio sluoksnio sutrikimas gali sukelti regėjimo pakitimus, tokius kaip vaizdo susilieėjimas ar akinimas, kurie reikšmingai veikia regėjimo aštrumą ir gyvenimo kokybę (63,64).

### Apsauga nuo dirgiklių

Ašarų plėvelės lipidų sluoksniš taip pat veikia kaip barjeras nuo aplinkos dirgiklių, patogenų ir šiukšlių. Neleisdamos šiems pašalinėms medžiagoms patekti į gležną akies paviršių, Meibomo liaukos atlieka svarbų vaidmenį saugant akis nuo infekcijų ir uždegimų (65). Be to, lipidų sluoksniš padeda palaikyti ašarų plėvelės stabilumą esant nepalankioms aplinkos sąlygoms, tokioms kaip vėjas ar sausas oras, kurios priešingu atveju gali pagreitinti ašarų garavimą ir sukelti uždegimą akyse (66).

### Sutepimas

Tinkamas akies obuolio išorinio paviršiaus ir laisvojo voko krašto sutepimas yra būtinas slidžiam vokų judėjimui užtikrinti. Meibumas užtikrina akių vokų sklaidų slydimą akies paviršiumi, nesudirginant ir nepažeidžiant ragenos, o padedant sulaikyti ašaras. Šis sutepimas ypač svarbus dažnai mirksint, pavyzdžiui, skaitant ar žiūrint į ekraną, nes padeda tolygiai paskirstyti ašarų plėvelę akies paviršiuje (50).

### Disfunkcija ir pasekmės

Meibomo liaukų disfunkcija gali sukelti įvairius akies paviršiaus sutrikimus. Dažniausias iš jų - sausų akių sindromas, kuriam būdingi tokie simptomai kaip dirginimas, paraudimas ir regėjimo sutrikimai. MLD lemia ašarų plėvelės nestabilumą, padidėjusį ašarų išgaravimą ir vėlesnį akies paviršiaus uždegimą. Ilgainiui tai gali sukelti lėtinį uždegimą, padidėjusį jautrumą šviesai ir net ragenos paviršiaus pakitimus, turinčius įtakos regėjimui (21,22,28). Be to, Meibomo liaukų funkcionavimui įtakos turi įvairūs veiksniai, įskaitant amžių, hormoninius pokyčius, aplinkos sąlygas ir organizmo būseną (52,67). Šių sveikų liaukų palaikymas yra gyvybiškai svarbus akių funkcionavimui, apsaugai ir bendram regėjimo efektyvumui.

Negalima nuvertinti Meibomo liaukų fiziologinės svarbos. Jos yra būtinos ašarų plėvelės stabilumui, optiniam skaidrumui, apsaugai nuo aplinkos poveikio ir sklaidžiam vokų slydimui akies obuolio išoriniame paviršiuje. Šių liaukų vaidmens ir funkcijos supratimas yra svarbus diagnozuojant ir gydant įvairias akių ligas, pabrėžiant jų reikšmę normaliai akių funkcijai ir regai.

#### 1.1.5. Klinikinė svarba

MLD yra plačiai paplitusi būklė, turinti reikšmingą klinikinę svarbą ir galinti tam tikru gyvenimo laikotarpiu paveikti daugelį žmonių. Jai būdingi meibomo kokybiniai arba kiekybiniai sekrecijos pakitimai, dėl kurių pasireiškia įvairūs regos organų sutrikimai (68). Šių liaukų anatomijos ir

fiziologijos supratimas yra svarbus veiksnys siekiant veiksmingai diagnozuoti ir valdyti su disfunkcija susijusias būkles.

MLD yra pagrindinė išgaruojančios sausų akių priežastis. Šiai būklei būdingas pagreitetęs ašarų plėvelės išgaravimas nei pasipildymas, todėl akys išsausėja, sudirgsta ir jaučiamas diskomfortas. MLD gali labai pabloginti žmogaus gyvenimo kokybę ir sukelti tokius simptomus kaip nuolatinis sausumas, deginimas, niežulys, paraudimas, neryškus matymas ir smėlio jausmas ar svetimkūnio jausmas akyje (69). MLD taip pat gali prisidėti prie blefarito – vokų kraštų uždegimo, dar labiau sustiprinamas diskomfortą ir dirginimą (70).

Siekiant veiksmingai diagnozuoti MLD, būtina suprasti Meibomo liaukų struktūrą ir funkciją. Akių priežiūros specialistai šių liaukų būklei įvertinti įprastai atlieka daugybę tyrimų. Tai apima liaukų angų apžiūra stebint ar nėra užsikimšimų ar netipiškų išskyrų, meibumo kokybės ir kiekio įvertinimą bei akių vokų uždegimo ar struktūrinių pokyčių požymių patikrinimą (71). Pažangūs vaizdo gavimo metodai, tokie kaip meibografija, leidžia vizualizuoti liaukos struktūrą ir įvertinti atrofiją arba morfologinius pokyčius (72).

#### Kontrolė ir gydymas

Meibomo liaukų disfunkcijos gydymas apima daugialypį požiūrį, kuriuo siekiama atkurti normalią Meibomo liaukų funkciją ir palengvinti simptomus. Gydymo strategijos apima šiltus kompresus ir vokų papildomą higieną: šiltų kompresų uždėjimas ant vokų ir švelnus vokų masažas bei higienos užtikrinimas padeda suminkštinti susikaupusį meibumą ir palengvina jo pašalinimą iš liaukos angų (73,74). Dirbtinės ašaros ir lubrikantai gali laikinai palengvinti sausų akių simptomus, papildydami ašarų plėvelę ir pagerindami akies paviršiaus drėgnumą. Įrodyta, kad maisto papildai, turintys omega-3 riebalų rūgščių, pagerina meibumo kokybę ir sumažina sausų akių simptomus (75). Siekiant sumažinti uždegimą ir pagerinti liaukų funkciją, gali būti skiriami antibiotikai, priešuždegiminiai vaistai ar lipidų apykaitą veikiančios medžiagos. (76). Sunkesniais atvejais akių priežiūros specialistas gali atlikti tokias procedūras kaip terminė pulsavimo terapija, intensyvios impulsinės šviesos terapija, išspaudimas rankomis, siekiant pašalinti užsikimšimus ir suaktyvinti liaukų funkciją (77).

#### Prevenција ir profilaktika

Sąmoninga ankstyva intervencija yra labai svarbi siekiant veiksmingai diagnozuoti MLD. Asmenys, ypač priklausantys padidintos rizikos grupėms, pavyzdžiui, vyresnio amžiaus, turintys hormoninių pokyčių arba sergantys tam tikromis sisteminėmis ligomis, turėtų būti supažindinami su MLD požymiais ir simptomais. Reguliarūs akių tyrimai ir komunikacija apie akių

profilaktiką gali padėti anksti nustatyti ir gydyti MLD, užkertant kelią ilgalaikėms komplikacijoms ir išsaugant akių bei regėjimo funkciją (78,79).

Klinikinė Meibomo liaukų disfunkcijos reikšmė yra didžiulė, išliekanti pagrindiniu veiksniu, įtakančiu akių sutrikimus ir ligas. Sveikatos priežiūros specialistai turėtų atkreipti dėmesį į ankstyvus MLD požymius, siekiant veiksmingai diagnozuoti MLD, būtina suprasti Meibomo liaukų struktūrą ir funkciją, laiku nustatyti diagnozę ir pradėti tinkamą gydymą. Diagnostikai gali būti taikomi įvairūs metodai, tokie kaip meibografija, leidžianti vizualizuoti liaukų struktūrą ir įvertinti atrofijos ar morfologinių pokyčių laipsnį. Klinikiniai tyrimai, tokie kaip Meibomo liaukų išspaudimo testas, gali padėti įvertinti sekrecijos kokybę ir kiekį. Taip pat būtina atlikti išsamų akių paviršiaus tyrimą, siekiant nustatyti uždegiminius procesus ar struktūrinius pokyčius. Tinkamai prižiūrint, edukuojant ir gydant, neigiamas MLD poveikis gali būti žymiai lengvesnis ir pagerinti sergančiųjų gyvenimo kokybę.

## 1.2. Sausų akių sindromo paplitimas ir poveikis

Sausų akių sindromas, dar vadinamas *keratoconjunctivitis sicca*, yra plačiai paplitusi liga, kuria serga milijonai žmonių visame pasaulyje (80). Ši būklė išsivysto sutrikus ašarų gamybai ir pakitus ašarų sudėčiai, todėl jos per greitai išgaruoja. Sausų akių sindromas paveikia didelę dalį gyventojų, o ligos sunkumas yra skirtingas (81).

Tikslų sausų akių sindromo paplitimą sunku nustatyti dėl skirtingų diagnostikos kriterijų ir ataskaitų teikimo metodų, tačiau manoma, kad jis paveikia didelę pasaulio gyventojų dalį. Tyrimai rodo, kad skirtingose demografinėse grupėse ir regionuose SAS gali svyruoti nuo 5 % iki daugiau nei 30 % (82,83). Šiam kintamumui turi tokie veiksniai kaip: amžius, lytis, aplinkos sąlygos ir gyvenimo būdas. Pavyzdžiui, vyresnio amžiaus žmonės, dėl natūralaus ašarų gamybos mažėjimo, serga dažniau. Moterims taip pat nustatoma didesnė rizika, galbūt dėl hormonų svyravimų, turinčiu įtaką ašarų gamybai ir stabilumui. Be to, miesto ar sauso klimato gyventojai gali patirti didesnę SAS paplitimą dėl padidėjusio teršalų poveikio ir oro mažo drėgnumo (84,85).

Sausų akių sindromo poveikis žmogaus gyvenimo kokybei gali būti daugialypis. Fiziškai pacientams dažnai pasireiškia tokie simptomai kaip nuolatinis akių sausumas, deginimo ar perštėjimo pojūtis, smėlio ar svetimkūnio jausmas akyse, paraudimas ir regėjimo sutrikimai, pavyzdžiui suprastėjęs regėjimo ryškumas (86). Šie simptomai gali sukelti diskomfortą ir sudirginimą, turintį įtakos kasdieniui veiklai: skaitymui, vairavimui, darbui kompiuteriu ir kitos užduotys, kurioms reikia regėjimo.

Be fizinio diskomforto, SAS gali turėti psichologinių ir socialinių pasekmių. Nuolatiniai ir dažnai varginantys simptomai gali sukelti stresą, nerimą ir depresiją (87). Regėjimo sutrikimai ir sunkumai atliekant kasdienių užduočių taip pat gali sumažinti produktyvumą ir sukelti socialinį atsiribojimą, dar labiau paveikiant asmens psichinę sveikatą ir gyvenimo kokybę.

Ekonominis sausų akių sindromo poveikis yra reikšmingas, apimantis tiek tiesiogines, tiek netiesiogines išlaidas. Tiesioginės išlaidos - susijusios su medicininėmis paslaugomis, diagnozės nustatymu, gydymu ir ligos kontrole, pvz., apsilankymai pas gydytoją, receptiniai vaistai, nereceptiniai tepalai ir kai kuriais atvejais chirurginės intervencijos. Netiesioginės išlaidos atsiranda dėl sumažėjusio produktyvumo darbe, pravaikštų bei neigiamo poveikio žmogaus gebėjimui efektyviai atlikti kasdienę veiklą (4,88).

Keletas rizikos veiksnių prisideda prie SAS paplitimo. Tai apima amžių, lytį, hormoninius pokyčius, autoimunines ligas, tam tikrų vaistų vartojimą, ilgalaikį skaitmeninių ekranų naudojimą bei aplinkos veiksnius, tokius kaip sausas ar užterštas oras (89). Nors kai kurių rizikos veiksnių, tokių kaip amžius ir lytis, pakeisti neįmanoma, kitus galima kontroliuoti koreguojant gyvenimo būdą. Pavyzdžiui, reguliarios pertraukos dirbant prie kompiuterio, drėkintuvų naudojimas sausoje patalpoje, apsauginių akinių nešiojimas lauke ir tinkama bei subalansuota mityba, gali padėti sumažinti SAS riziką (90).

Apibendrinant galima teigti, kad sausų akių sindromas yra plačiai paplitusi akių būklė, turinti reikšmingą poveikį žmonių gyvenimo kokybei ir ekonomikai. Daugiafaktorinis šio sindromo poveikis rodo, kad tiek aplinkos, tiek biologiniai veiksniai turi įtakos paplitimui ir sunkumui. Šių veiksnių supratimas yra svarbus, siekiant veiksmingai taikyti ligos prevenciją ir kontrolę. Kadangi SAS sulaukia vis daugiau dėmesio, tikimasi, kad tai padės atrasti geresnius diagnostikos metodus, taikyti veiksmingesnį gydymą ir ilgainiui sumažins sausų akių sindromo paplitimą bei poveikį žmonėms.

### 1.3. Sausų akių sindromo etiologija

Sausų akių sindromas yra sudėtinga liga, kylanti dėl daugelio tarpusavyje susijusių veiksnių, kuriuos galima suskirstyti į tris pagrindines grupes: ašarų gamybos sutrikimai, ašarų kokybės pakitimai ir aplinkos arba sisteminiai poveikiai (91). Amžius yra vienas pagrindinių veiksnių, nes senstant ašarų gamyba natūraliai mažėja, o akies paviršius tampa jautresnis išsausėjimui (92). Hormoniniai pokyčiai, ypač moterims, turi reikšmingą įtaką SAS - menopauzė, nėštumas bei geriamųjų kontraceptikų vartojimas keičia ašarų plėvelės dinamiką (93). Aplinkos sąlygos daro didelį poveikį ligos eigai:

sausas ar vėjuotas klimatas, oro kondicionavimo ir šildymo sistemos skatina dar didesnę ašarų išgaravimą, todėl padidėja ašarų plėvelės osmoliariškumas ir pažeidžiamas akies paviršius (94). Šiuolaikinėje skaitmeninėje aplinkoje vis didesnę susirūpinimą kelia ilgalaikis kompiuterių ar išmaniųjų telefonų bei kitų skaitmeninių įrenginių naudojimas, kada ilgai žiūrint sumažėja mirksėjimo dažnis, todėl sutrinka ašarų plėvelės pasiskirstymas ir atsinaujinimas. Visi šie veiksniai reikšmingai prisideda prie SAS išsivystymo.

Vaistiniai preparatai, įskaitant antihistamininius vaistus, antidepresantus, beta adrenoblokatorius ir geriamuosius kontraceptikus, gali sumažinti ašarų gamybą arba pakeisti ašarų sudėtį (95). Sisteminės ligos, ypač autoimuniniai sutrikimai, tokie kaip Sjögreno sindromas, reumatoidinis artritas ir vilkligė, gali tiesiogiai paveikti ašarų gamybą ir akių paviršiaus būklę (96). Meibomo liaukų disfunkcija, laikoma pagrindine išgaruojančio SAS priežastimi, formuojasi dėl Meibomo liaukų obstrukcijos, todėl sumažėja ašarų plėvelės lipidų sluoksnis, kuris yra labai svarbus siekiant išvengti greito ašarų išgaravimo (22,28). Mitybos veiksniai, ypač nepakeičiamų riebalų rūgščių, tokių kaip omega-3, trūkumas, taip pat siejamas su SAS, pabrėžiant mitybos vaidmenį palaikant ašarų plėvelės kokybę (97).

Kitas SAS veiksnys yra kontaktinių lęšių dėvėjimas, kuris gali suardyti ašarų plėvelę ir sudirginti akies paviršių (98). Akių operacijos, ypač refrakcijos operacijos, pvz., LASIK (lazerinė in situ keratomilezė), gali sutrikdyti ragenos nervus, atsakingus už ašarų gamybą, ir sukelti SAS (99). Gyvenimo būdo veiksniai, tokie kaip rūkymas ar pasyvus rūkymas, sustiprina akių sausumo simptomus (100). Genetinis polinkis taip pat vaidina svarbų vaidmenį – kai kurie asmenys dėl savo genetinių ypatumų yra jautresni SAS atsiradimui (101).

Psichologinis stresas ir miego sutrikimai taip pat siejami su SAS, galimai dėl jų poveikio sisteminiam uždegimui ir hormonų pusiausvyrai (102,103). Alergija gali paūminti SAS, o alerginis konjunktyvitas sukelia akies paviršiaus uždegimą ir pažeidžia ašarų plėvelę. Akių paviršiaus ligos, įskaitant blefaritą ir konjunktyvitą, gali tiesiogiai pažeisti ašarų plėvelę ir prisidėti prie SAS (104). Galiausiai, oro tarša bei tam tikrų cheminių medžiagų ir dirgiklių poveikis aplinkoje ar darbo vietoje, gali reikšmingai paveikti ašarų plėvelės stabilumą ir akių paviršiaus būklę (105).

Apibendrinant galima teigti, kad sausų akių sindromas yra būklė, kuriai būdingi įvairūs veiksniai, įskaitant su amžiumi susijusius pokyčius, hormoninius svyravimus, aplinkos poveikį, sisteminių ligų sąlygas, gyvenimo būdo pasirinkimą ir kt. Siekiant diagnozuoti, valdyti ir veiksmingai gydyti

DES, būtina suprasti šiuos įvairiapusių veiksnius, nes jie pabrėžia šios paplitusios akių būklės daugiafaktoriinį pobūdį.

### 1.3.1. Aplinkos veiksniai

Aplinkos veiksniai daro tiesioginį poveikį akims, ypač tokiam sutrikimui kaip sausų akių sindromas. Įvairūs išoriniai elementai, tokie kaip drėgmės lygis ir oro kokybė, gali turėti neigiamą poveikį ašarų plėvelės stabilumui ir priekinio akies obuolio segmentui. Šių veiksnių supratimas yra svarbus akių funkcionavimui, siekiant kontroliuoti ir sušvelninti aplinkos poveikį (106).

Drėgmė ore yra vienas svarbiausių aplinkos veiksnių, turinčių įtakos SAS atsiradimui. Esant žemai drėgmei, pvz., dykumos klimato, šildomose arba oro kondicionuojamose patalpose ar dideliame aukštyje, ašarų garavimo greitis didėja (107). Padidėjęs garavimas gali lemti greitesnį ašarų plėvelės sumažėjimą, todėl akys tampa išsausėjusios ir sudirgusios. Priešingai, didelės drėgmės aplinka gali šiek tiek palengvinti SAS simptomus, nes lėtesnis garavimas padeda išlaikyti ašarų plėvelės stabilumą (108).

Oro tarša labai dirgina akis (84). Teršalai, tokie kaip dūmai, smogas ir cheminiai garai, gali tiesiogiai sudirginti akies paviršių, sukelti uždegimą ir diskomfortą (109). Įprastai ore sklindančios kietosios dalelės, gali būti ypač varginančios, nes mažos dalelės gali patekti į akis, sutrikdyti ašarų plėvelę ir sudirginti akį. Ilgalakis užteršto oro poveikis siejamas su padidėjusiu SAS ir kitų akių paviršiaus ligų paplitimu (110).

Vėjas ir tiesioginis oro srautas, pvz., iš ventiliatorių ar oro kondicionavimo angų, gali padidinti ašarų išgaravimą ir sukelti akių paviršiaus džiūvimą (85). Šias sąlygas dažnai patiria asmenys vairuodami atvirais langais, laiką leisdami vėjuotoje aplinkoje arba būdami šalia ventiliacijos angų. Apsisaugojimas nuo tiesioginio oro srauto ir vėjuotos aplinkos vengimas gali padėti sumažinti ašarų plėvelės garavimą (111).

Aukštis dažnai siejamas su mažesniu oro drėgmės lygiu, dėl kurio gali padidėti ašarų išgaravimas ir atsirasti sausų akių simptomų. Be to, didėjant aukščiui, didėja ultravioletinės (UV) spinduliuotės intensyvumas, todėl gali padidėti akių dirglumas ir ašarų plėvelės nestabilumas (112).

SAS gali paveikti aplinkos temperatūros pasikeitimai. Aukšta temperatūra gali skatinti ašarų plėvelės išgaravimą, o šalta temperatūra, ypač vėjuotas oras, gali dar labiau padidinti ašarų išgaravimą ir sukelti dilgčiojimo pojūtį akyse. Patalpų temperatūros reguliavimas bei akių apsauga nuo nepalankių lauko sąlygų gali padėti išlaikyti ašarų plėvelės stabilumą (113).

Sezoniniai pokyčiai taip pat veikia SAS. Pavyzdžiui, žiemą esant sausam orui ir dažnam patalpų šildymui, padidėja ašarų plėvelės išgaravimo riziką.

Priešingai, pavasarį ir vasarą į aplinką gali patekti alergenai, pvz. žiedadulkės, sukeldami akių dirginimą ir pablogindami sausų akių simptomus (114).

Darbuotojų veikla ar gyvenimo sąlygos, kur aplinkoje yra daug dulkių, cheminių medžiagų ar kitų dirgiklių, gali padidinti SAS išsivystymo riziką. Pavyzdžiui, miesto aplinkoje dažnai fiksuojamas didesnis užterštumo lygis ir prastesnė oro kokybė, o tai prisideda prie akių diskomforto ir ašarų plėvelės nestabilumo (115).

Aplinkos veiksniai daro didelę įtaką sausų akių sindromo paplitimui ir sunkumui. Asmenims bei sveikatos priežiūros paslaugų teikėjams būtina juos suprasti siekiant sukurti veiksmingas, riziką mažinančias strategijas. Paprasti pokyčiai, tokie kaip drėkintuvų naudojimas, apsauginių akinių dėvėjimas arba tiesioginio dirginančių medžiagų poveikio vengimas, gali sumažinti riziką. Mūsų nuolat kintančioje aplinkoje aktyvus dėmesys ir priemonės bei sąmoningumas yra itin svarbūs siekiant išlaikyti sveikas akis.

### 1.3.2. Sisteminiai organizmo faktoriai

Sisteminiai veiksniai, įskaitant hormoninius pokyčius ir autoimunines ligas, lemia akių paviršiaus sveikatingumą ir funkcionalumą, ypač paveikdami tokį sutrikimą kaip sausų akių sindromas. Siekiant tinkamai diagnozuoti, kontroliuoti ir gydyti susijusias ligas, būtina suprasti, kaip šie vidiniai veiksniai veikia akis.

Hormonai daro didelę įtaką ašarų ir Meibomo liaukų funkcijai, kurie būtini palaikyti pilnavertę ašarų plėvelę. Hormonų, ypač estrogenų ir androgenų, lygio svyravimai gali paveikti ašarų gamybą ir kokybę. Hormoniniai pokyčiai brendimo metu gali turėti įtakos ašarų plėvelės stabilumui, nors poveikis gali būti individualus (116). Dėl hormonų svyravimų nėštumo metu daugeliui moterų pastebimi ašarų gamybos pokyčiai ir sausų akių simptomai (117). Moterys po menopauzės yra jautresnės SAS, nes sumažėjęs androgenų kiekis turi įtakos Meibomo liaukų funkcijai, todėl sumažėja lipidų sluoksnio kokybė ir padidėja ašarų išgaravimas (118,119). Pakaitinė hormonų terapija buvo siejama su didesniu SAS paplitimu, nors ryšys sudėtingas ir nevisai aiškus (120). Hormoniniai kontraceptikai gali pakeisti lytinių hormonų pusiausvyrą, paveikti ašarų gamybą ir prisidėti prie sausų akių simptomų (121).

Autoimuninės ligos gali paveikti akis, pažeisdamos liaukas ir audinius, susijusius su ašarų gamyba bei reguliavimu. Sjögreno sindromas, autoimuninis sutrikimas, tiesiogiai pažeidžia akis. Šis sindromas paveikia drėgmę gaminančias kūno liaukas, įskaitant ašarų liaukas, atsakingas už ašarų gamybą. Dėl to žymiai sumažėja ašarų kiekis ir kokybė, o tai sukelia sunkius

sausų akių simptomus (122). Reumatoidinis artritas dažnai siejamas su Sjögreno sindromu, taip pat gali paveikti akis ir sukelti SAS. Šių ligų uždegiminiai procesai gali tiesiogiai paveikti akies paviršių bei ašaras gaminančias liaukas (123). Sistemine raudonoji vilkligė dėl bendro uždegiminio poveikio gali sukelti įvairių akių problemų, įskaitant SAS (124). Skyd liaukės sutrikimai, tokie kaip Greivso liga, gali pakeisti akies anatomiją ir funkciją, sutrikdyti ašarų plėvelės stabilumą ir sukelti SAS (125).

Kai kurios kitos sisteminės priežastys gali paveikti SAS vystymąsi ir sunkumą. Diabetu sergantiems asmenims dažnai pasireiškia SAS dėl autonominės neuropatijos, paveikiančios nervus, kontroliuojančius ašarų sekreciją (126). Vitaminas A ir D yra būtini sveikam akių paviršiui, jų trūkumas gali sukelti sausų akių simptomus (127,128). Tam tikri sisteminiai vaistai, įskaitant antihistamininius vaistus, antidepresantus ir kai kuriuos vaistus nuo kraujospūdžio, gali sumažinti ašarų gamybą arba pabloginti ašarų kokybę (129).

Sisteminiai veiksniai, tokie kaip hormoniniai pokyčiai ir autoimuninės ligos, daro didelę įtaką akims ir skatina sausų akių sindromo atsiradimą. Šiuos veiksnius būtina suprasti, kad gydytojai ir pacientai galėtų sukurti veiksmingas kontrolės ir gydymo strategijas. Asmenims, patiriantiems sausų akių simptomus, būtinas visapusiškas požiūris, atsižvelgiant į bendrą sveikatą ir akių priežiūrą. Gydymas gali apimti sisteminius vaistus, hormonų terapiją, mitybos pokyčius ir lokalizuotą akių gydymą, pavyzdžiui naudojant dirbtines ašaras ar priešuždegiminius lašus. Kontroliuojant SAS, holistinis požiūris į bendrą paciento sveikatą ir sisteminę sąlygą yra ne tik naudingas, bet ir būtinas.

### 1.3.3. Uždegimas

Uždegimas yra pagrindinis sausų akių sindromo atsiradimo ir paūmėjimo veiksnys. Jis trikdo ašarų gamybą, nes uždegiminiai citokinai ir mediatoriai tiesiogiai veikia ašarų liaukas, sumažindami ašarų plėvelės vandeninį sluoksnį, sukeldami sausų akių požymius (130). Uždegimas taip pat paveikia Meibomo liaukas, todėl kinta arba mažėja meibumo, kuris būtinas ašarų išgaravimui užkirsti, lipidinio sluoksnio gamyba, sukeldami akių sausumą (19). Be to, uždegiminiai mediatoriai gali pažeisti akies paviršiaus ląsteles, sukeldami uždarą ciklą, kai pažeidimas skatina uždegimą ir audinių pažeidimą (131). Priešingai, uždegimas taip pat yra SAS pasekmė. Dėl ašarų plėvelės nestabilumo, atsirandančio dėl nepakankamo kiekio ar kokybės, akies paviršius gali išsausėti ir sudirgti, sukeldamas uždegiminį atsaką (132). Sausos sąlygos ir padidėjęs akies paviršiaus osmoliariškumas gali paveikti

ląsteles, sukeliančias uždegimo mediatorius ir pritraukiančias uždegimines ląsteles. Kartais organizmo imuninis atsakas į sudirgusias ar pažeistas akies paviršiaus ląsteles tampa pernelyg aktyvus, sukeldamas lėtinį uždegimą ir progresuojančią žalą (133). Lėtinis uždegimas, būdingas sunkiam ar ilgalaikiam SAS, lemia nuolatinį ašarų ir Meibomo liaukų, junginės ir ragenos pokyčius, pablogina akių sausumo simptomus ir apsunkina gydymą. Jis taip pat gali sukelti neurogeninį uždegimą, kuris pažeidžia akies paviršiaus nervus ir padidina jautrumą, skausmą ir sausumo pojūtį (134). SAS uždegimo gydymas yra labai svarbus. Priešuždegiminiai vaistai, tokie kaip kortikosteroidai ar kiti akių lašuose vartojami priešuždegiminiai preparatai, gali sumažinti ir palengvinti uždegimą (135). Imunomodulatoriai, tokie kaip ciklosporinas ar lifitegrastas, slopina imuninį atsaką, mažina uždegimą, gerina ašarų gamybą ir akių paviršiaus būklę (136,137). Gyvenimo būdo ir mitybos korekcijos, įskaitant omega-3 riebalų rūgščių ir kitų priešuždegiminių maistinių medžiagų vartojimas, gali padėti sumažinti sisteminį uždegimą ir palengvinti SAS simptomus (138).

Veiksmingam SAS kontrolei ir gydymui būtina uždegimo vaidmenį suprasti tiek kaip ligos priežastį, tiek kaip ir pasekmę. Veiksmingas uždegimo valdymas gali nutraukti uždegimo ir audinių žalos ciklą, taip palengvindamas būklę milijonams žmonių, kenčiančių nuo šio lėtinio ir dažnai varginančio sindromo.

#### 1.3.4. Kurkumino ir liposomų derinio taikymas sausų akių sindromo gydyme

Kurkuminas – junginys, gaunamas iš ciberžolės augalo, o liposomos – tam tikros rūšies mikroskopinės lipidinės pūslelės, naudojamos vaistinių medžiagų tiekimui, sulaukė nemažo susidomėjimo gydant sausų akių sindromo sukeltą uždegimą. Šis susidomėjimas kilo dėl kurkumino priešuždegiminių savybių ir liposomų potencialiai geresnio medžiagų pristatymo ir veiksmingumo.

Kurkuminas, chemiškai žinomas kaip 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dionas, pasižymi priešuždegiminiu, antioksidaciniu, priešnavikiniu ir kitu biologiniu poveikiu (139). Tai populiarus Indijos prieskoninė ciberžolė, priklausanti imbierinių šeimai, kurios veiklioji medžiaga - kurkuminoidas. Priešuždegiminis ir antioksidacinis poveikis pasireiškia dėl gebėjimo slopinti įvairias molekules, atliekančias svarbų vaidmenį uždegimo procesuose, pvz., citokinus ir fermentus, tokius kaip COX-2 (140). Sergant SAS, uždegimas akies paviršiuje ir ašaras išskiriančiose liaukose prisideda prie ligos simptomų ir progresavimo. Mažindamas šį uždegimą, kurkuminas gali padėti sumažinti diskomfortą bei

audinių pažeidimus, susijusius su SAS. Tyrimai rodo, kad kurkuminas geba sumažinti uždegiminių žymenų ekspresiją ir slopinti uždegiminių citokinų gamybą akių ląstelėse, taip atskleidamas savo terapinį potencialą (141). Nepaisant daug žadančių savybių, geriamas kurkuminas pasižymi mažu tirpumu ir prastu biologiniu prieinamumu (142). Tai reiškia, kad jis sunkiai absorbuojamas į kraujotaką ir negali veiksmingai pasiekti tikslinių akies audinių. Siekiant tai pakeisti, mokslininkai tiria įvairius kurkumino tiekimo gerinimo metodus, vienas iš jų - liposomų taikymas (143).

Liposomos yra mažos, sferinės pūslelės, sudarytos iš dvigubo fosfolipidų sluoksnio (144). Jos gali įkapsuliuoti įvairių tipų vaistines medžiagas, apsaugodamos jas nuo skilimo ir pagerindamos jų patekimą į konkrečius audinius (145). Naudojant akims, liposomos pasižymi palankiomis savybėmis, nes gali būti sukurtos taip, kad pailgintų vaisto sąlytį su akimis ir pagerintų jo prasiskverbimą į akies audinius (146). Kurkumino atveju įkapsuliuojimas į liposomas gali žymiai pagerinti jo tirpumą, stabilumą ir biologinį prieinamumą (147). Tai reiškia, kad didesnis vaisto kiekis galės pasiekti akies paviršių, todėl gali sustiprėti jo gydomasis poveikis.

Kurkumino turinčių liposomų taikymas yra perspektyvus požiūris į SAS gydymą. Šios liposomos gali būti lašinamos akių lašų pavidalu, nes tai yra tiesioginis ir tikslinis būdas akims suteikti kurkumino priešuždegiminį poveikį. Be to, liposomos pagerina kurkumino tiekimą, gali tiek sutepti paviršių, o tai dar labiau palengvina sausų akių simptomus. Nors šio metodo tyrimai tęsiasi, rezultatai parodė, kad kurkumino pripildytos liposomos gali sumažinti akių audinių uždegimo požymius ir prisidėti atkuriant sveikesnę ašarų plėvelę (148). Mažindamas uždegimą, šis metodas gali padėti sušvelninti SAS simptomus, pagerinti pacientų savijautą ir padėti sulėtinti ligos progresavimą.

Sausų akių sindromo uždegimo gydymas kurkuminu ir liposomomis yra nauja tyrimų sritis, žadanti pagerinti šia liga sergančiųjų gyvenimo kokybę. Sujungus stiprų priešuždegiminį kurkumino poveikį su sustiprintu liposomų tiekimu, šiuo metodu siekiama tiesiogiai paveikti uždegimą, kuris prisideda prie SAS, ir gali suteikti naują veiksmingą gydymo būdą. Kaip ir taikant bet kurį naują gydymo metodą, būtina atlikti išsamesnius klinikinius tyrimus, siekiant visiškai įvertinti kurkumino turinčių liposomų veiksmingumą, saugumą bei nustatyti geriausias praktikas gydant SAS.

#### 1.4. Meibomo liaukų disfunkcija

Meibomo liaukų disfunkcija dažnai yra lėtinė būklė, paveikianti akių vokų Meibomo liaukas (24). Šios liaukos gamina meibumą – riebalinę

medžiaga, kuri sudaro išorinį ašarų plėvelės sluoksnį ir neleidžia išgaruoti apatiniam vandeniniam sluoksniui. MLD pasižymi pakitusia meibumo sekrecija dėl jo kokybės ar kiekio pokyčių. Funkcijos sutrikimas gali lemti išgaruojantį sausų akių sindromą, sukeltą diskomfortą akyse bei regos sutrikimus (20). MLD apibrėžiama kaip lėtinė difuzinė Meibomo liaukų anomalija, kuriai dažniausiai būdinga latakų obstrukcija ir (arba) kokybiniai/kiemybiniai liaukų sekrecijos pokyčiai. Dėl šių pokyčių gali sutrikti ašarų plėvelės struktūra, pasireikšti akių dirginimo simptomai, kliniškai matomas uždegimas ir priekinio akies obuolio susirgimas (28).

#### 1.4.1. Simptomai

Pagrindinė MLD savybė yra pakitusi meibumo kokybė. Sergantiems MLD, meibumas dažnai tampa tirštesnis ir klampesnis. Dėl šių sudėties pokyčių jis mažiau veiksmingai stabilizuoja ašarų plėvelę, todėl padidėja ašarų išgaravimas ir atsiranda sausų akių simptomų. Pakitęs sekretas, kai išsiskiria iš liaukų, gali atrodyti drumstas, granuluotas arba panašus į dantų pastą (149). Kita svarbi ir pakankamai dažnai pasitaikanti MLD savybė yra Meibomo liaukų angų obstrukcija (150). Ji gali atsirasti dėl sutirštėjusio meibumo, uždegimo ar kitų veiksnių. Obstrukcija sutrikdo tinkamą meibumo sekreciją, kuri padengtų akies paviršių, todėl pasireiškia ašarų plėvelės nestabilumas ir sausų akių sindromo simptomai (151).

Esant MLD gali sumažėti Meibomo liaukų funkcija. Laikui bėgant ši būklė gali sukelti meibumą gaminančių ląstelių atrofiją ir ML degeneraciją (152). Dėl to sumažėja bendras meibumo gamybos kiekis, padidėja ašarų plėvelės nestabilumas ir sausų akių simptomai. Nefunkcionuojančias liaukas galima įvertinti naudojant diagnostinius vaizdavimo metodus, tokius kaip meibografija (153).

Ašarų plėvelės nestabilumas susiformuoja sutrikus meibumo sekrecijai: ašarų plėvelės lipidų sluoksnis tampa nepilnavertis, todėl vandeninis sluoksnis greičiau išgaruoja. Dėl to susidaro nestabili ašarų plėvelė, negalinti tinkamai apsaugoti akies paviršiaus, sukelti sausumą, dirginimą ir kitus simptomus, susijusius su sausų akių sindromu (154). Sergantieji MLD dažnai patiria tokius simptomus kaip smėlio pojūtis, deginimas, niežulys, paraudimas ir sausumo jausmas akyse. Šie simptomai gali sustiprėti aplinkoje, skatinančioje ašarų išgaravimą, pvz., vėjuotoje ar sausoje aplinkoje, esant dūmams, ilgalaikio žiūrėjimo į ekranus metu (155,156).

Ašarų plėvelės nestabilumas gali lemti kintantį regėjimo ryškumą, o dienos eigoje simptomai dažnai blogėja. Tai susiję su nepilnaverčiu ir

nepakankamu lipidų sluoksniu ašarų plėvelės paviršiuje, paveikiančiu akies refrakcijos paviršių (157).

#### 1.4.2. Diagnostika ir kontrolė

MLD diagnozė patvirtinama atlikus išsamų akių tyrimą, apimančią paciento anamnezę, simptomus ir nuodugną akies voko krašto, Meibomo liaukos angų ir meibumo ekspresijos kokybės įvertinimą. Diagnostinis vaizdavimas, pvz., meibografija, leidžia įvertinti liaukos struktūrą ir degeneraciją (158). Kontrolė dažniausiai orientuota į simptomų palengvinimą ir normalios Meibomo liaukų funkcijos atkūrimą (78). Gydyto galimybės apima šiltus kompresus, akių vokų masažą ir valymą, dirbtines ašaras, omega-3 riebalų rūgščių vartojimą bei vaistus, mažinančius uždegimą arba gerinančius meibumo kokybę (152,159). Sunkesniais atvejais, siekiant pašalinti kamščius ir stimuliuoti liaukos funkciją, gali būti rekomenduojama terminė pulsavimo terapija (77).

Meibomo liaukų disfunkcija yra dažna būklė, turinti reikšmingą poveikį akių komfortui ir sveikatai. Jai būdingi meibumo kokybės pokyčiai, liaukų obstrukcija ir susilpnėjusi funkcija, dėl kurios formuojasi ašarų plėvelės nestabilumas ir sausų akių simptomai. MLD supratimas, diagnozavimas ir tinkama kontrolė yra būtini siekiant išlaikyti sveikas akis bei pagerinti sergančiųjų gyvenimo kokybę.

#### 1.4.3. Meibomo liaukos disfunkcijos patofiziologija

Meibomo liaukų disfunkcijos patofiziologija yra sudėtinga ir daugialypė, apimanti įvairius struktūrinius ir funkcinis Meibomo liaukų pokyčius. Šie pokyčiai sutrikdo normalią liaukų funkciją, dėl ko pasikeičia gaminamo meibumo kiekis ir kokybė, o tai paveikia ašarų plėvelę ir išorinį regos organų funkcionalumą.

Vienas iš pagrindinių MLD patofiziologijos sutrikimų yra ML latakų obstrukcija. Ji dažnai susiformuoja dėl latakų epitelio hiperkeratinizacijos, kai kanalus dengiančios ląstelės pakinta ir išplinta. Šio proceso metu latakų sienelės sustorėja, o liaukų angos susiaurėja arba užsikemša (25). Kai kanalai yra užblokuoti, meibumas negali būti efektyviai išsiskirti, todėl jis kaupiasi liaukoje. Užsistovėjęs meibumas tampa klampesnis ir keičia savo sudėtį, dar labiau sustiprindamas užsikimšimą (47).

Sergant MLD, meibumo kokybė dažnai pakinta, tampa klampesnė ir uždegiminė. Lipidų sudėties pokyčiams būdingas padidėjęs sočiųjų ir nesočiųjų riebalų rūgščių santykis bei cholesterolio esterų padidėjimas (160).

Dėl šių pokyčių meibumas tampa klampesnis ir labiau linkęs sukietėti kanaluose, taip prisidedant prie obstrukcijos ir sąstingio (161). Pakitęs meibumas gali turėti įtakos ašarų plėvelės stabilumui, nes jis mažiau efektyviai apsaugo nuo garavimo ir palaiko lygų optinį paviršių.

Uždegimas gali būti MLD priežastis ir pasekmė. Meibumo obstrukcija ir sąstingis gali skatinti bakterijų kolonizaciją, o bakterijų lipazės poveikyje susidaranti laisvosios riebiosios rūgštys gali sukelti vietinį uždegiminį atsaką akies vokuose ir akies paviršiuje (162). Be to, mechaninis įtempis ir hipoksija užblokuotose liaukose skatina citokinų bei matricos metaloproteinazių išsiskyrimą, didindami uždegimą ir audinių pažeidimą (163).

Lėtinė obstrukcija ir uždegimas gali sukelti ML infarktą ir iškritimą. Ligai progresuojant, sumažėja ascinusų ląstelių, atsakingų už meibumo gamybą, dydis ir skaičius. Dėl to mažėja bendras liaukos tūris ir sumažėja meibumo sekrecija (33). Vaizdo gavimo metodai, tokie kaip meibografija, atskleidžia šį liaukos degeneraciją pažengusiais MLD atvejais (164). Funkcinio liaukos audinio praradimas dar labiau sustiprina sausų akių simptomus ir dažnai yra susijęs su ligos sunkumu.

Ašarų plėvelės stabilumas labai priklauso nuo lipidų sluoksnio, kurį gamina Meibomo liaukos. Sergant MLD, sumažėjęs meibumo kiekis ir pakitusi sudėtis lemia pažeistą lipidų sluoksnį. Dėl to padidėja ašarų išgaravimas, susiformuoja ašarų plėvelės nestabilumas ir hiperosmoliariškumas. Sutrikusi ašarų plėvelės homeostazė gali sudirginti akies paviršių ir sukelti uždegimą bei audinių pažeidimo ciklą (59).

MLD patofiziologijai būdingas liaukų obstrukcijos ciklas, pakitusi meibumo sudėtis, uždegimas ir liaukų degeneracija. Šie pokyčiai daro reikšmingą poveikį ašarų plėvelei ir akies paviršiui, pasireiškiančiam sausų akių ligų sindromo simptomais ir požymiais. Šių pagrindinių mechanizmų supratimas yra labai svarbus kuriant tikslinius gydymo metodus, galinčius nutraukti MLD ciklą ir suteikti pagalbą tiems, kuriuos ši liga paveikė.

#### 1.5. Ryšys tarp Meibomo liaukų disfunkcijos ir sausų akių sindromo

Meibomo liaukų disfunkcija ir sausų akių sindromas yra glaudžiai susiję, dažnai pasireiškia kartu ir daro įtaką viena kitai. MLD yra pagrindinė SAS priežastis ypač išgaruojančio potipio atveju (165). Šių dviejų sutrikimų sudėtingo ryšio supratimas yra labai svarbus diagnozuojant, kontroliuojant ir gydant.

MLD pasireiškia sutrikusiu Meibomo liaukų išskyrimu – liaukų, gaminančių meibumą, lipidinę medžiagą, sudarančią išorinį ašarų plėvelės sluoksnį. Šis lipidų sluoksnis yra labai svarbus siekiant išvengti greito ašarų plėvelės vandeninio sluoksnio išgaravimo ir palaikyti akių paviršiaus

sveikatingumą. SAS yra daugiafaktorinė ašarų ir akies paviršiaus liga, sukianti diskomfortą, regos sutrikimus ir ašarų plėvelės nestabilumą bei galimą akies paviršiaus pažeidimą. Jai būdinga nepakankama ašarų gamyba (sausas akis) arba per didelis ašarų išgaravimas (išgaruojanti sausa akis), pastarąją dažniausiai sąlygoja MLD (166).

MLD kontekste dažnai sutrinka meibumo kokybė ir kiekis. Kai meibumas yra per tirštas, nepakankamas arba pakinta jo sudėtis, jis negali veiksmingai suformuoti stabilios ašarų plėvelės lipidinio sluoksnio. Dėl to vandeninis ašarų plėvelės sluoksnis išgaruoja greičiau nei turėtų ir susiformuoja išgaruojantis sausų akių sindromo potipis. Šiai būklei būdinga: trumpas ašarų plėvelės plyšimo laikas (APPL), padidėjęs ašarų plėvelės osmoliariškumas ir akių paviršiaus pažeidimai, atsiradantys dėl akies paviršiaus išsausėjimo (167).

MLD ir SAS dažnai pasireiškia tokiais simptomais kaip akių dirginimas, sausumas, smėlio pojūtis, paraudimas, sumažėjęs vaizdo ryškumas ir jaučiamas akių nuovargis. Šie simptomai dažnai sustiprėja aplinkoje, skaninančioje ašarų išgaravimą, pvz., vėjuotoje, sausoje ar dūmų prisotintoje aplinkoje, arba dėl ilgalaikio žiūrėjimo į ekranus (168).

Ryšys tarp MLD ir SAS yra dvikryptis. MLD ne tik lemia išgaruojantį akių sausumą, bet ir dėl to susidarantis akių paviršiaus sausumas bei uždegimas gali dar labiau pabloginti MLD, sukuriant užburtą ratą. Lėtinis SAS uždegimas gali skatinti progresuojančią Meibomo liaukų obstrukciją ir disfunkciją (166).

Diagnozuojant ryšį tarp MLD ir SAS dėl sausumo ir pažeidimo požymių, būtina atlikti išsamų klinikinį įvertinimą, apimančią Meibomo liaukų struktūros ir funkcijos tyrimą, meibumo kokybės ir kiekio įvertinimą, ašarų plėvelės plyšimo laiko matavimą bei akies paviršiaus būklės įvertinimą. Vertingos informacijos gali suteikti tokie įrankiai kaip meibografija, skirta vizualizuoti Meibomo liaukas, bei ašarų plėvelės osmoliariškumo testai (169).

MLD ir SAS gydymas paprastai apima daugialypį požiūrį, siekiant palengvinti simptomus, atkurti normalią Meibomo liaukos funkciją ir stabilizuoti ašarų plėvelę.

Kadangi MLD ir SAS yra tarpusavyje susijusius, gydymas sprendžiant tik vieną būklę ir neatsižvelgiant į kitą, gydymas gali būti neveiksmingas ir simptomai liks nepakitę (170,171). Veiksmingam ir ilgalaikiam palengvėjimui būtinas išsamus požiūris, skirtas pašalinti pagrindinę Meibomo liaukų disfunkciją ir su ja susijusius sausų akių simptomus.

Santykis tarp MLD ir SAS yra kompleksiškas ir glaudžiai persipynęs. MLD yra pagrindinė išgaruojančios sausos akies priežastis, o šios dvi sąlygos

gali viena kitą sustiprinti. Šio ryšio supratimas yra labai svarbus kuriant veiksmingą gydymo strategiją, sprendžiančią tiek pagrindinę Meibomo liaukų disfunkciją, tiek sausų akių simptomus.

### 1.6. Gyvūnų modeliai tiriant sausų akių sindromą

Gyvūnų modeliai yra itin svarbūs siekiant suprasti Meibomo liaukų disfunkcijos ir sausų akių sindromo patofiziologiją, bei kuriant ir vertinant galimus gydymo būdus. Šie modeliai imituoja įvairius žmogaus MLD ir SAS aspektus, suteikdami vertingų įžvalgų apie ligos mechanizmus ir padeda įvertinti naujų gydymo būdų veiksmingumą bei saugumą (172). Nors nei vienas gyvūnų modelis tiksliai neatkartoja žmogaus būklės, tačiau keli modeliai padėjo geriau suprasti šias sudėtingas ligas.

**Pelių modeliai.** Pelės dažniausiai naudojamos MLD ir DES tyrimams dėl jų genetinio panašumo į žmogų, lengvo veisimo ir daugybės genetiškai modifikuotų linijų.

Senstant pelėms natūraliai vystosi Meibomo liaukų atrofija ir disfunkcija, todėl jos yra ypač tinkamas modelis nagrinėjant su amžiumi susijusį MLD ir SAS. Tyrėjai stebi ašarų plėvelės ir Meibomo liaukų morfologijos pokyčius, vykstančius pelėms senstant (154). Tam tikros pelių padermės buvo genetiškai modifikuotos, kad būtų pašalinti specifiniai genai, susiję su lipidų metabolizmu, uždegimu ar Meibomo liaukų funkcija. Pavyzdžiui, pelėms, kurių organizme trūksta sterolių reguliuojančius elementus surišančių baltymų (SREBP), pasireiškia simptomai, panašūs į žmogaus MLD, leidžiantys įvertinti lipidų metabolizmo eigos vaidmenį ligos vystymesi. (173). Tyrėjai pelėms MLD ir SAS gali sukelti įvairiais eksperimentiniais metodais, pavyzdžiui:

- švirksčiant medžiagas, blokuojančias Meibomo liaukos kanalus;
- veikiant jas džiovinančiam stresui (pvz., sauso oro srautas);
- naudojant vietinius vaistus, veikiančius ašarų gamybą (174).

**Triušių modeliai.** Triušiai yra dar vienas dažniausiai naudojamų gyvūnų modelių, dėl akių dydžio, kuris palengvina klinikinius stebėjimus ir procedūras. Jų Meibomo liaukos ir ašarų plėvelė yra panašios į žmogaus, todėl yra naudingos tiriant MLD ir SAS. Triušiams MLD gali būti sukeltas keliais būdais:

- dieta (pvz., dieta su dideliu cholesterolio kiekiu, siekiant sukelti lipidų pokyčius);
- hormoninėmis manipuliacijomis;
- tiesiogine Meibomo liaukų angų obstrukcija (175).

Mokslininkai gali sutrikdyti triušio ašarų plėvelę vietiškai, naudojant dirgiklius ar kitas chemines medžiagas, sukurdami būseną, panašią į SAS ir tokiu būdu vertinti drėkinimo priemonių taikymo ir priešuždegiminių vaistų veiksmingumą (176).

**Žiurkių modeliai.** Žiurkės rečiau naudojamos MLD ir SAS tyrimams, tačiau jos vis tiek suteikia vertingų įžvalgų, ypač nagrinėjant neurogeninį uždegimą ir hormoninį poveikį Meibomo liaukų funkcijai. Panašiai kaip ir pelės, žiurkės gali būti veikiamos džiovinančio streso arba vaistais, veikiančiais ašarų sekreciją, siekiant sukelti būseną, panašią į SAS (177,178). Atsižvelgiant į žinomą androgenų įtaką Meibomo liaukų funkcijai, mokslininkai tyrė androgenų trūkumo bei papildų poveikį žiurkėms, siekiant suprasti, kaip hormonai veikia MLD ir SAS (37).

**Šunų modeliai.** Šunims natūraliai gali išsivystyti sausų akių būklė, o kai kurios veislės yra linkusios į MLD ir SAS, todėl jie yra vertingas pavyzdys nagrinėjant natūralų ligos progresavimą ir vertinant naujus gydymo metodus. Kai kurioms šunų veislėms, tokioms kaip kokerspanieliai, natūraliai pasireiškia MLD ir SAS. Šių veislių stebėjimas padeda geriau suprasti genetinius ir aplinkos veiksnius, prisidedančius prie ligos vystymosi (179). Tyrėjai taip pat gali sukelti SAS šunims, naudojant vietinius vaistus arba sisteminius indukcijos būdus, kurie mažina ašarų gamybą (180).

**Nežmogiųjų primatų modeliai.** Nežmogiųjų primatų akių anatomija ir fiziologija labiausiai panaši į žmogaus, todėl jie yra neįkainojamas tyrimų modelis nagrinėjant SAS. Tačiau jų naudojimas yra ribotas dėl etinių sumetimų, didelių sąnaudų ir sudėtingo tvarkymo. Kaip ir kiti gyvūnai, nežmogiūnai primatai gali būti veikiami aplinkos streso arba jiems gali būti atliekamos chirurginės procedūros, siekiant sukelti SAS ir ištirti jo mechanizmus bei gydymą (181).

Kruopščiai parenkant ir derinant įvairius gyvūnų modelius, mokslininkai gali išsamiai suprasti MLD ir SAS bei kurti veiksmingas strategijas, padedančias kovoti su šiomis paplitusiomis ir sekinančiomis būklėmis. Nors gyvūnų modeliai yra neįkainojami akių ligų tyrimuose, jų taikymas yra ribtas. Nė vienas modelis negali visiškai atkartoti visų žmogaus sausų akių aspektų, todėl vertinant rezultatus būtina atsižvelgti į akių anatomijos, ašarų sudėties ir imuninio atsako skirtumus. Modelio pasirinkimas priklauso nuo konkretaus tiriamos ligos aspekto. Moksliniams tyrimams tobulėjant, gyvūnų modeliai nuolat tobulinami ir derinami su kitais tyrimo metodais, siekiant visapusiškai suprasti MLD ir SAS, kas leidžia efektyviau gydyti ir kontroliuoti šias sudėtingas ir plačiai paplitusias ligas.

### 1.6.1. Triušių modelių privalumai ir trūkumai

#### Triušių modelių privalumai

Triušiai turi anatomiškai didesnes akis nei kiti įprasti laboratoriniai gyvūnai, tokie kaip pelės ar žiurkės. Didesnis akies paviršius leidžia lengviau atlikti tyrimus, vizualizuoti ir paimti mėginius, o tai yra svarbu atliekant išsamius oftalmologinius tyrimus (31). Didesnis akies dydis taip pat palengvina chirurgines manipuliacijas ir gydymo taikymą, kurie būtų per sudėtingi mažesniems laboratoriniams gyvūnams. Triušių ašarų plėvelės sudėtis, nors ir nėra identiška, tačiau yra panašesnė į žmogaus nei daugelio kitų gyvūnų. Šis panašumas leidžia tiksliau įvertinti, kaip gydymas gali paveikti žmogaus akis, ypač dėl vaistų įsiskverbimo į akies audinius ir ašarų dinamikos (175). Triušius paprastai lengva prižiūrėti ir išlaikyti. Jie yra didesni ir paklusnesni nei graužikai, todėl juos lengviau fiksuoti atliekant pasikartojančias procedūras, tokias kaip akių lašų lašinimas ar akispūdžio bei ašarų kiekio matavimas. Nors triušių išlaikymas brangesnis nei mažesnių graužikų, jie vis tiek išlieka gana ekonomiškai, ypač lyginant su didesniais žinduoliais, pavyzdžiui, šunimis ar nežmoginiais primatais. Be to, triušiai greitai dauginasi ir turi trumpą nėštumo laikotarpį, todėl galima greitai sugeneruoti tyrimui reikalingas grupes. Triušiai ilgą laiką buvo naudojami oftalmologiniams tyrimams, todėl sukaupta daug duomenų ir sukurtos metodikos, kurios neįkainojamos kuriant ir interpretuojant naujus tyrimus.

#### Triušių modelių trūkumai

Nepaisant kai kurių panašumų, vis dar yra reikšmingų skirtumų tarp triušio ir žmogaus akių. Pavyzdžiui, triušiai turi trečiąją voką, kurio žmonės neturi, o jų mirksėjimo dažnis skiriasi, kas gali turėti įtakos ašarų plėvelės dinamikai. Šie skirtumai gali paveikti ligos vystymąsi ir atsaką į gydymą, apribodami rezultatų palyginamumą su žmonėmis (182). Skirtingai nei pelių, trūksta genetiškai modifikuotų triušių modelių. Gebėjimas išmušti arba per daug išreikšti specifinius genus yra svarbus įrankis, leidžiantis suprasti ligos mechanizmus ir išbandyti personalizuotas terapijas. Šių įrankių trūkumas gali apriboti galimų molekulinų ir genetinių tyrimų gylį triušių modeliuose (172). Nors visi tyrimai su gyvūnais turi būti pagrįsti etikos leidimais, didesnių gyvūnų naudojimas dažnai reikalauja griežtesnės kontrolės nei mažesnių. Tyrėjai turi kruopščiai pagrįsti triušių naudojimą ir užtikrinti, kad visi tyrimai būtų atliekami siekiant sumažinti skausmą ar kančią ir maksimaliai padidinti gautą mokslinę vertę. Nors triušiai paprastai yra paklusnūs, jie gali patirti stresą, kuris gali turėti įtakos akių parametrams ir tyrimo rezultatams. Siekiant

sumažinti stresą ir jo poveikį rezultatams, labai svarbu tinkamai prižiūrėti gyvūnus, pratinti prie rankinio fiksavimo ir užtikrinti aklimatizacijos laikotarpį (183). Triušiai yra linke į tam tikras ligas ir būkles, kurios paprastai nepaveikia žmonių, pavyzdžiui, pastereliozė ar dantų problemos. Šios aplinkybės gali apsunkinti triušių kolonijų priežiūrą ir sveikatą bei gali turėti įtakos tyrimų rezultatams (184).

Triušių modeliai yra vertingas įrankis SAS ir MLD tyrimuose, užtikrinantis pusiausvyrą tarp fiziologinės svarbos ir naudingumo. Dėl didesnio akių dydžio ir panašesnės ašarų plėvelės sudėties jie ypač tinkami akių paviršiaus ir ašarų plėvelės tyrimams. Tačiau mokslininkai privalo atsižvelgti į anatominius ir fiziologinius skirtumus tarp triušio ir žmogaus akių, taip pat į kitus triušio modelio trūkumus. Šių veiksnių supratimas ir įvertinimas yra svarbūs siekiant sukurti patikimus tyrimus ir tiksliai interpretuoti rezultatus.

#### 1.6.2. Etikos principai atliekant tyrimus su gyvūnais

Etiniai reikalavimai eksperimentuose su gyvūnais, naudojamais moksliniams tyrimams, yra svarbūs siekiant užtikrinti humanišką elgesį. Šie reikalavimai grindžiami tiek moraline prievole gerbti visas gyvas būtybes tiek ir supratimu, kad gyvūnai gali patirti skausmą ir kančią. Eksperimentų su gyvūnais etinė sistema remiasi įvairiais principais ir taisyklėmis, kuriomis siekiama sumažinti žalą ir užtikrinti, kad gyvūnų naudojimas būtų pagrįstas ir vertingas (185).

#### **3R principas**

Trijų R koncepcija (pakeitimas, sumažinimas ir pagerinimas) sudaro etikos pagrindą eksperimentuose su gyvūnais.

- ❖ **Pakeitimas (replacement):** tyrėjai raginami, kiek įmanoma, gyvūnų naudojimą pakeisti alternatyviais metodais. Tai gali apimti *in vitro* metodus (pvz., ląstelių kultūras), kompiuterinį modeliavimą arba mažiau jautrių organizmų naudojimą, jei visiškai pakeisti neįmanoma.
- ❖ **Sumažinimas (reduction):** tyrėjai turėtų eksperimentus planuoti taip, kad siekiant pasiekti tikslus prireiktų naudoti kuo mažiau gyvūnų. Dažnai tai reiškia statistinių metodų taikymą, užtikrinant tyrimo patikimumą ir galimybę nustatyti reikšmingą poveikį naudojant minimalų gyvūnų skaičių.

- ❖ **Pagerinimas (refinement):** šiuo principu siekiama modifikuoti procedūras taip, kad sumažėtų skausmas, kančią ir baimę bei pagerėtų gyvūnų gerovė. Tai apima geresnį nuskausminimą, laikymo sąlygų gerinimą ir mažiau invazinių metodų taikymą (186).

### **Nacionalinės etikos peržiūros tarnybos**

Daugelis institucijų ir šalių reikalauja, kad etikos vertinimo tarnyba peržiūrėtų ir patvirtintų bet koki tyrimų projektą, susijusį su gyvūnais. JAV tokia tarnyba dažnai vadinama „Animal Care and Use Committee (IACUC)“ ar panašiai (187). Jų tikslas yra peržiūrėti ir patvirtinti bet koki su gyvūnais susijusių tyrimų projektą. Šiose komisijose vertinami moksliniai tyrimo privalumai, gyvūnų naudojimo būtinybė, tyrimams reikalingas gyvūnų skaičius ir procedūros, užtikrinančios gyvūnų gerovę. Lietuvoje šia veikla užsiima Lietuvos bandomųjų gyvūnų naudojimo etikos komisija prie Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos (188).

### **Teisinės ir reguliavimo sistemos**

ES valstybėse, JAV ir kitose šalyse galioja įstatymai ir teisės aktai, reglamentuojantys eksperimentus su gyvūnais. Dažnai reikalaujama, kad mokslininkai turėtų licencijas, būtų nustatyti gyvūnų laikymo ir priežiūros standartai bei vykdomi reguliarūs įstaigų patikrinimai. Lietuvoje vadovaujamosi Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES (189), taip pat Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus įsakymu, reglamentuojančiu mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimus (190). Tyrėjai privalo gerai išmanyti šias taisykles ir jų laikytis.

### **Gyvūnų naudojimo pagrindimas**

Tyrėjai privalo pagrįsti gyvūnų naudojimą savo tyrime. Tai reiškia, kad reikia įrodyti, jog tyrimas yra mokslškai pagrįstas, įgytos žinios reikšmingai prisidės prie problemos supratimo ir nėra įmanomų alternatyvių metodų tiems patiems tikslams pasiekti (190).

### **Skausmo ir kančios sumažinimas**

Tyrėjai yra etiškai įpareigoti sumažinti gyvūnų patiriamą skausmą ir kančią. Tai apima tinkamų anestetikų ir analgetikų naudojimą, procedūrų sukūrimą taip, kad jos būtų kuo mažiau invazinės, užtikrinant, kad gyvūnus prižiūrintis personalas būtų tinkamai apmokytas ir kompetentingas.

### **Pastabos dėl gyvūnų eutanazijos**

Sprendimai dėl tiriamųjų gyvūnų gyvenimo pabaigos turėtų būti priimami atsižvelgiant į jų gerovę. Eutanazija, jeigu ji būtina, turėtų būti

atliekama kuo humaniškiau, naudojant metodus, kurie laikantis etikos reikalavimų, sukeliančius mažiausiai streso ir skausmo (189).

### **Švietimas ir mokymas**

Visi darbuotojai, dalyvaujantys gyvūnų tyrimuose, privalo gauti tinkamą išsilavinimą ir mokymą, kad suprastų etikos klausimus bei kompetentingai prižiūrėtų gyvūnus. Tai padeda užtikrinti, kad su gyvūnais būtų elgiamasi pagarbiai ir humaniškai (189).

### **Skaidrumas ir atskaitomybė**

Tyrėjai turi laikytis skaidrumo principų naudodami gyvūnus moksliniams tyrimams. Tai reiškia, kad rezultatai turi būti skelbiami, prieinami ir suprantami, o tyrėjai turi būti atsakingi už etinių reikalavimų laikymąsi darbo metu su laboratoriniais gyvūnais.

### **Bendradarbiavimas**

Labai svarbu įtraukti visuomenę šviečiant apie etinius aspektus ir priemones, kurių imamasi atliekant tyrimus, siekiant užtikrinti gyvūnų gerovę. Tai padeda kurti pasitikėjimą ir supratimą apie atliekamo darbo svarbą ir jo etinį pobūdį (191).

Eksperimentų su gyvūnais etiniai aspektai yra sudėtingi ir daugialypiai, todėl būtina kruopščiai suderinti mokslo žinių pažangą ir naudojamų gyvūnų gerovę. Etikos principų ir taisyklių laikymasis užtikrina, kad gyvūnų naudojimas būtų pagrįstas, jų gerovei teikiant pirmenybę, o atliekami tyrimai būtų aukščiausios kokybės ir reikšmingumo. Tobulėjant mokslo supratimui ir visuomenės vertybėms, kinta ir su gyvūnų tyrimais susijusi etika, atspindinti nuolatinį įsipareigojimą humaniškam ir atsakingam mokslui.

#### **1.6.3. Žinomi triušių modeliai Meibomo liaukų disfunkcijos tyrimui**

Meibomo liaukų disfunkcijos sukėlimas triušių modeliuose yra svarbus oftalmologinių tyrimų aspektas, suteikiantis vertingų įžvalgų apie šios būklės patofiziologiją, progresavimą ir galimus gydymo būdus. Tokiems tyrimams triušiai dažnai pasirenkami dėl akių dydžio ir panašumo į žmogaus akies paviršių.

Atsižvelgiant į žinomą hormonų, ypač androgenų, vaidmenį Meibomo liaukų funkcijai, kai kurie mokslininkai triušiams sukėlė MLD reguliuojant hormonų lygį. Tyrėjai taikė antiandrogenines medžiagas arba keitė hormonų pusiausvyrą, siekdami imituoti MLD hormoninę etiologiją. Šių tyrimų rezultatai rodo, kad dėl hormonų pusiausvyros keitimo kinta Meibomo liaukų morfologija ir funkcija, panašiai kaip ir žmogaus MLD, įskaitant liaukų atrofiją ir lipidų sekrecijos pokyčius (192).

Didelio kiekio riebalų dietos buvo taikomos siekiant sukelti hiperlipidemiją, o vėliau MLD triušių modeliuose. Šie tyrimai suteikė vertingų įžvalgų apie tai, kaip sisteminės lipidų anomalijos gali paveikti Meibomo liaukų funkciją. Triušiams, šeriamiems daug riebalų turinčia dieta, dažnai nustatomi Meibomo liaukų lipidų pokyčiai, padidėja klampumas ir pakinta lipidų sudėtis. Panašūs pokyčiai nustatomi ir MLD sergantiems žmonėms (178).

Mechaninė Meibomo liaukų angų obstrukcija yra dar vienas metodas, taikomas MLD disfunkcijai sukelti. Šiuo metodu Meibomo liaukų angos tiesiogiai užkemšamos atliekant kauterizaciją, taip atkuriant tam tikras žmogui pasitaikančias sąlygas. Šie modeliai atskleidė, kad liaukų angų užkimšimas sukelia MLD būdingus pokyčius, įskaitant liaukų išsiplėtimą, acinusų atrofiją ir padidėjusius uždegiminius žymenis (176).

Kai kurie mokslininkai triušio akims panaudojo dirginančias medžiagas, siekiant sukelti uždegimą ir Meibomo liaukų disfunkciją. Tam buvo taikomi plovikliai ir konservantai (Benzankolio chloridas), kurie, kaip žinoma, dirgina akies paviršių. Nors šie modeliai labiau atspindi ūminį dirginimą ir uždegimą nei lėtinį MLD, jie suteikė vertingos informacijos apie uždegiminius mechanizmus ir akių paviršiaus pokyčius, atsirandančius reaguojant į dirgiklius (193).

Atliekant šiuos tyrimus, galima daryti kelias nuoseklias išvadas. Sukeltas triušių MLD modelis sukelia Meibomo liaukų struktūros ir funkcijos bei ašarų plėvelės stabilumo ir akių paviršiaus sveikatingumo pokyčius, kurie atspindi daugelį žmogaus MLD aspektų. Šie modeliai padėjo išsiaiškinti, kaip tokie veiksniai kaip hormonai, dieta ar mechaniniai veikimo principai prisideda prie MLD vystymosi ir progresavimo.

Tačiau modeliai turi ir trūkumų. Nė vienas jų pilnai neatkartoja visų žmogaus MLD aspektų, todėl vertinant rezultatus būtina atsižvelgti į triušio ir žmogaus akių anatomijos bei fiziologijos skirtumus. Be to, daugelyje modelių daugiausia dėmesio skiriama ūmiam MLD sukėlimui, o tuo tarpu žmonėms MLD dažnai yra lėtinė būklė, besivystanti per ilgą laiką. Todėl, nors šie modeliai yra neįkainojami siekiant suprasti tam tikrus MLD aspektus, jie paprastai naudojami kartu su kitomis tyrimų formomis.

## 1.7. Eksperimentiniai sausų akių sindromo tyrimo metodai

### 1.7.1. Eksperimentiniai gyvūnų metodai, naudojami sausų akių sindromo tyrimams

Sausų akių sindromo tyrimai su gyvūnais apima skirtingus eksperimentinius metodus, skirtus imituoti ligos simptomus ir pagrindinius mechanizmus. Šie metodai yra būtini siekiant suprasti SAS patofiziologiją, nustatyti galimus gydymo tikslus ir įvertinti gydymo efektyvumą.

**Aplinkos metodai**, dažniausiai naudojami sukelti SAS, kuriais sukuriama sąlyga, skatinančios ašarų išgaravimą ir akių paviršiaus išsausėjimą. Gyvūnai laikomi kameroje, kurioje reguliuojama drėgmė, temperatūra ir oro srautas, siekiant sukurti sausėjančią aplinką. Žema drėgmė ir padidėjęs oro srautas imituoja padidinto garavimo dirgiklius, kuriuos sausoje aplinkoje patiria asmenys, sergantys SAS (194). Tiesioginis vėjo arba ventiliatorių poveikis gali padidinti ašarų išgaravimą ir sukelti į SAS panašių simptomų atsiradimą (195).

**Farmakologiniai metodai**, kai įvairūs vaistai naudojami siekiant sumažinti ašarų gamybą arba pažeisti akies paviršių. Anticholinerginiai vaistai, tokie kaip atropinas arba skopolaminas, gali sumažinti ašarų sekreciją, tiek juos vartojant sistemiškai arba lokaliai, todėl gali išsivystyti SAS (196). Ploviklių ar konservantų naudojimas gali pažeisti akies paviršių ir ašarų plėvelę. Šios medžiagos dažnai veikia pažeisdamos ragenos ir junginės epitelį arba pakeisdamos ašarų plėvelės lipidinį sluoksnį (197).

**Chirurginiai metodai** apima fiziškai struktūrų, susijusių su ašarų gamyba arba drenavimu, pakeitimą. Ašarų liaukų pašalinimas arba blokavimas gali sumažinti vandeninės ašarų plėvelės dalies susidarymą ir sukelti SAS. Meibomo liaukų latakų užsikimšimas gali sukelti Meibomo liaukų disfunkciją, kuri yra svarbi išgaruojančios sausos akies priežastis (198).

**Hormoniniai metodai** atliekami atsižvelgiant į žinomą hormonų įtaką ašarų gamybai ir akių paviršiaus sveikatai. Hormoninis reguliavimas yra dar vienas būdas sukelti SAS. Androgenai atlieka apsauginį vaidmenį akių paviršiaus sveikatai, todėl jų kiekio mažinimas kastruojant arba naudojant specifinius inhibitorius gali sukelti SAS (198). Padidėjęs estrogeno kiekis buvo siejamas su SAS, o estrogenų vartojimas gyvūnų modeliuose gali sukelti sausų akių simptomus (199).

**Genetiniai metodai** apima genetiškai modifikuotus gyvūnus, naudojamus tiriant specifinių genų įtaką SAS. „Knockout“ arba transgeniniai gyvūnai (TG), kurių pakeistas genomas dalyvauja ašarų gamyboje, sukelia

akių paviršiaus pokyčius ar uždegimus, bei gali išsivystyti SAS. Šie metodai padeda išsiaiškinti šių genų vaidmenį SAS patofiziologijoje ir gydyme (200).

**Dietiniai metodai**, dieta gali turėti įtakos akims ir ašarų gamybai, todėl specialios dietos taikymas yra efektyvus būdas sukelti SAS. Nepakeičiamų riebalų rūgščių trūkumas: dietose, kuriose trūksta nepakeičiamųjų riebiųjų rūgščių, ypač omega-3 riebiųjų rūgščių, gali sukelti pokyčių ašarų plėvelės lipidų sluoksnyje ir išprovokuoti SAS (201).

Renkantis eksperimentinį SAS tyrimo metodą, mokslininkai turi atsižvelgti į kelis veiksnius. Pasirinktas metodas turėtų sukelti tokią SAS formą, kuri kuo tiksliau atspindėtų žmogaus simptomus ir patologiją. Metodas turėtų būti pakartojamas ir lengvai kontroliuojamas, užtikrinant visų tyrimų nuoseklius rezultatus. Visos procedūros su bandomaisiais gyvūnais turi atitikti etikos gaires, sukelti minimalią kančią bei skausmą. Eksperimentiniai metodai tiriant sausų akių sindromą su gyvūnais yra įvairūs, kiekvienas suteikia unikalių įžvalgų apie ligos mechanizmus ir galimus gydymo būdus. Tęsiant tyrimus, šių metodų tobulinimas ir naujų kūrimas greičiausiai suteiks dar gilesnių įžvalgų apie SAS.

#### 1.7.2. *In vivo* vaizdo gavimo metodai, Meibomo liaukų vertinimui

*In vivo* vaizdo gavimo metodai pakeitė Meibomo liaukų disfunkcijos vertinimą ir supratimą, siūlydami neinvazinį būdą vizualizuoti Meibomo liaukų struktūrą ir funkcijas gyvuose organizmuose. Šie metodai tapo nepakeičiamomis priemonėmis tiek moksliniuose tyrimuose, tiek klinikinėje praktikoje diagnozuojant MLD, stebint ligos progresavimą ir vertinant gydymo veiksmingumą (202).

Meibografija yra plačiausiai naudojama vaizdo gavimo technika, sukurta specialiai Meibomo liaukų vizualizacijai. Ji suteikia detalius liaukų struktūros vaizdus ir padeda įvertinti liaukų išskritimą, latakų išsiplėtimą ir liaukų atrofiją (203).

##### Transiliuminacinė meibografija:

Šis metodas remiasi šviesos nukreipimu per akies voka, kad būtų apšviestos Meibomo liaukos. Dėl šviesos liaukos atrodo kaip tamsios besišakojančios struktūros prieš apšviestą voko audinį. Tai galima atlikti naudojant infraraudonųjų spindulių šviesą ir specializuotą kamerą (204,205).

##### Nekontaktinė meibografija:

Tai pažangesnė technika, kurioje infraraudonųjų spindulių vaizdavimas leidžia vizualizuoti Meibomo liaukas be fizinio kontakto su akies voku. Tai patogiau pacientams ir leidžia išsamiau ištirti liaukų morfologiją (206).

### Optinė koherentinė tomografija (OKT):

OKT yra neinvazinė vaizdo gavimo technika, naudojanti šviesos bangas akies struktūrų skerspjūvio vaizdams gauti. MLD kontekste OKT leidžia įvertinti Meibomo liaukų morfologiją ir struktūrą, pateikdama išsamius Meibomo liaukų ląstelių ir latakų vaizdus (207).

### Priekinio segmento OKT:

Šis versija yra specialiai sukurta priekinei akies obuolio daliai vizualizuoti, įskaitant akių vokus ir Meibomo liaukas. Jis gali pateikti didelės raiškos vaizdus ir yra ypač naudingas vertinant liaukos gylį, ilgį ir bendrą struktūrą (208).

### Infraraudonųjų spindulių vaizdavimas:

Infraraudonųjų spindulių vaizdavimas naudojamas siekiant vizualizuoti Meibomo liaukas nesukeliant diskomforto, kurį sukelia ryški šviesa. Jis dažnai naudojamas kartu su kitais metodais, pvz.: meibografija arba OKT, siekiant pagerinti liaukų matomumą ir įvertinti jų funkcinę būklę (209).

### Dinaminis infraraudonųjų spindulių vaizdavimas:

Šis metodas ne tik vizualizuoja liaukas, bet ir leidžia įvertinti jų funkcinę būklę, analizuodamas ašarų plėvelės lipidų sluoksnio temperatūros pokyčius mirksėjimo metu. Tai suteikia galimybę geriau suprasti lipidų sluoksnio dinamiką ir funkcinę liaukų būklę (210).

### Konfokalinė mikroskopija:

Konfokalinė mikroskopija suteikia didelės raiškos Meibomo liaukų vaizdus ląstelių lygmenyje. Tai ypač naudinga vertinant ląstelių pokyčius liaukose ir aplinkiniuose audiniuose (211).

### *In Vivo* lazerinė skenuojanti konfokalinė mikroskopija:

Šis metodas naudoja fokusuotą lazerio spindulį, siekiant gauti aukštos raiškos Meibomo liaukų vaizdus. Tai leidžia detaliai įvertinti Meibomo liaukų ląsteles, latakus ir aplinkinius audinius, suteikia išvalgų apie ląstelių ir tarpląstelinius pokyčius, susijusius su MLD (212,213).

### Ultragarsinė biomikroskopija (UBM):

UBM naudoja aukšto dažnio ultragarso bangas, siekiant vizualizuoti akies obuolio priekinio segmento struktūras, įskaitant Meibomo liaukas. Jis suteikia išsamius liaukos struktūros vaizdus ir leidžia įvertinti liaukų dydžio, formos bei audinių tankio pokyčius (214).

Renkantis vaizdo gavimo metodą Meibomo liaukų įvertinimui, svarbu atsižvelgti į kelis veiksnius:

Rezoliucija ir detalės. Didelės raiškos metodai suteikia išsamesnius vaizdus, kurie yra ypač svarbūs siekiant įvertinti subtilius liaukų pokyčius.

Patogumas. Nekontaktiniai ir mažiau invaziniai metodai paprastai yra patogesni pacientams ir leidžia atlikti lengvesnį ir dažnesnį vertinimą.

Prieinamumas ir kaina. Kai kuriems metodams reikalinga specializuota ir brangi įranga, kuri gali būti prieinama ne visose mokslinėse struktūrose (215).

*In vivo* vaizdo gavimo metodai žymiai pagerino galimybę įvertinti Meibomo liaukas, suteikdami svarbių išvalgų apie šių liaukų struktūrą ir funkcijas. Šie metodai pagerino vertinant MLD diagnozę ir atliekant kontrolę, padėjo pritaikyti tinkamą gydymo metodą ir stebėti ligos progresavimą. Tobulėjant technologijoms, galime tikėtis, kad šie vaizdo gavimo metodai taps dar sudėtingesni ir suteiks gilesnių išvalgų apie MLD ir toliau gerins diagnostiką.

### 1.7.3. Biomarkeriai sausų akių sindromo sunkumui nustatyti

Biomarkeriai - išmatuojami biologiniai ar ligos rodikliai, kurie yra itin svarbūs diagnozuojant ligas, vertinant jų sunkumą bei progresavimą arba atsaką į gydymą (216). Sausų akių sindromo atveju ypač svarbu nustatyti patikimus biologinius žymenis, siekiant geriau suprasti daugiafaktorinius ligos pobūdžius ir pritaikyti individualizuotas gydymo strategijas. Ašarų plėvelės osmoliariškumas laikomas vienu svarbiausiu ir dažniausiai naudojamu sausų akių sindromo biomarkerių. Jis parodo ašarų plėvelėje ištirpusių medžiagų koncentraciją, ypač kai sutrikęs ašarų garavimo procesas. Padidėjęs osmoliariškumas gali sukelti regos organų išorinio segmento epitelio pažeidimą, uždegiminių mediatorių išsiskyrimą ir uždegiminio ciklo progresavimą. Ašarų osmoliariškumo matavimas yra svarbus diagnostinis įrankis, leidžiantis patvirtinti SAS buvimą bei įvertinti jo sunkumo laipsnį (217).

Vertinant SAS, būtina įvertinti tiek ašarų gamybos kiekį, tiek ašarų plėvelės kokybę.

**Širmerio testas.** Šis testas skirtas ašarų sekrecijai įvertinti, į apatinio voko maišelį įdedant filtravimo popieriaus juostelę. Drėgmės kiekis matuojamas per nustatytą laiką, o mažesnis popieriaus sudrėkimas rodo sumažėjusį ašarų susidarymą (218).

**Ašarų plėvelės plyšimo laikas (APPL).** APPL naudojamas ašarų plėvelės stabilumui įvertinti. Į ašarų plėvelę įlašinama dažų ir po mirksėjimo matuojamas laikas iki pirmos sausos dėmės atsiradimo.

Trumpesnis APPL rodo mažesnę ašarų plėvelės stabilumą ir siejamas su sunkesne SAS forma (219).

Akies obuolio išorinio paviršiaus ir priedinių akies organų pakitimai gali rodyti SAS sunkumo laipsnį.

**Ragenos ir junginės dažymas.** Dažydami akies paviršių dažais, tokiais kaip fluoresceinas, lisamino žalias arba bengalo rožinė, siekiama parodyti pažeistas vietas. Dažymo pobūdis ir išplitimas gali padėti suprasti SAS sunkumą ir tipą.

**Konjunktyvos atspaudų citologija.** Šis metodas apima ląstelių surinkimą nuo junginės paviršiaus, leidžiantį analizuoti ląstelių morfologijos pokyčius, uždegiminius žymenis bei taurinių (Gobleto) ląstelių tankį. Šių parametrų pokyčiai gali rodyti DES sunkumą (220).

Uždegimas yra vienas pagrindinių SAS komponentų, todėl jo mastui įvertinti galima matuoti įvairius žymenis.

**Matricos metaloproteinazės (MMP).** MMP-9 yra akių paviršiaus uždegimo biomarkeris. Padidėjęs MMP-9 koncentracija ašarose siejamas su sunkesne SAS forma (221).

**Citokinai ir chemokinai.** Padidėjęs priešuždegiminių citokinių (pvz., IL-4, IL-13, TNF-alfa) ir chemokinių kiekis ašarų plėvelėje rodo didesnę SAS sunkumą. Šios molekulės atlieka svarbų vaidmenį skatinant uždegimą ir akių pažeidimus (222).

Molekulinės biologijos pažanga leido nustatyti keletą potencialių biomarkerių genetiniame ir proteominiame lygmenyse.

**mRNR ekspresija.** Specifiniai mRNR ekspresijos pokyčiai akies paviršiaus ląstelėse gali būti naudojami kaip SAS biomarkeriai. Pavyzdžiui, pakitusi mucinų, atliekančių svarbų vaidmenį palaikant sveiką ašarų plėvelę, ekspresija gali rodyti SAS sunkumo laipsnį (223).

**Proteominė analizė.** Pažangūs metodai, tokie kaip masės spektrometrija, gali nustatyti ir kiekybiškai įvertinti ašarų plėvelėje esančius baltymus. Tam tikrų baltymų, pavyzdžiui (laktoferinas, MUC5AC) koncentracijos pokyčiai gali būti laikomi ligos buvimo ir sunkumo biologiniais žymenimis (224).

Pažangūs vaizdinimo metodai gali suteikti biologinius žymenis SAS sunkumo įvertinimui.

**Meibografija.** Meibomo liaukų morfologijos pakitimai, tokie kaip liaukų išskritimas ar sutrumpėjimas, gali būti kiekybiškai įvertinti ir naudojami kaip SAS ir MLD biomarkeriai (164,205).

**Priekinio segmento optinė koherentinė tomografija (PS-OCT):** PS-OCT leidžia vizualizuoti ir kiekybiškai įvertinti akies paviršiaus bei ašarų plėvelės pokyčius, suteikdama papildomų biologinių žymenų SAS ir MLD sunkumui įvertinti (225)

Biomarkeriai, skirti įvertinti SAS ir MLD sunkumą, yra įvairūs, atspindintys sudėtingą ir daugiakartinį ligos pobūdį. Jie apima klinikinius ašarų gamybos ir akies paviršiaus pažeidimo įvertinimus, molekulinius uždegimo žymenis ir akies paviršiaus pokyčius. Tęsiant tyrimus, tikėtina bus nustatyta daugiau biomarkerių, kurie pagerins gebėjimą veiksmingai diagnozuoti, vertinti ir gydyti SAS. Šių biomarkerių supratimas ir taikymas gali prisidėti sukuriant labiau individualizuotas ir veiksmingesnes kontrolės strategijas asmenims, kenčiantiems nuo šios paplitusios ir dažnai sekinančios akių būsenos.

## 1.8. Kurkumino ir liposomų taikymas medicinoje

### 1.8.1. Liposomų taikymas medicinoje

Liposomos yra sferinės pūslelės, sudarytos iš vieno ar daugiau dvisluoksnių fosfolipidų, supančių vandeninę šerdį. Nuo jų atradimo septintajame dešimtmetyje liposomos buvo plačiai tiriamos ir taikomos medicinoje dėl unikalių savybių, kurios leidžia jas veiksmingai naudoti vaistų transportavimui (226). Jų taikymo spektras gan platus – nuo vėžio terapijos iki vakcinų kūrimo, ir jos išlieka nanomedicinos tyrimų objektu.

**Vaistų transportavimo sistemos.** Liposomos gali įkapsuluoti tiek hidrofilinius vaistus savo vandeninėje šerdyje, tiek hidrofobinius vaistus lipidų dvisluoksnyje, todėl jos yra universalios įvairių medžiagų vaistų pernašos sistemos (227,228). Vienas iš svarbiausių liposomų pranašumų yra gebėjimas pernešti vaistus tiesiai į ligos židinį, taip sumažinant sisteminę šalutinį poveikį. Tai ypač svarbu gydant vėžį, kai liposomos gali būti sukurtos taip, kad nukreiptų vaistus į konkrečias naviko ląsteles, sumažinant chemoterapinių medžiagų toksiškumą sveikoms ląstelėms (229). Liposomos taip pat gali užtikrinti reguliuojamą vaistų išsiskyrimą, palaikant pastovią

koncentraciją per tam tikrą laikotarpį, kas svarbu norint palaikyti terapinį lygį ir sumažinti dozavimo dažnumą (230). Be to, liposomos gali apsaugoti biologinius vaistus, tokius kaip peptidai ir nukleino rūgštys, nuo skilimo kraujyje, padidindamos jų stabilumą ir veiksmingumą (231).

**Vėžio terapija.** Liposomos plačiai naudojamos įvairių vėžio formų gydymui. Jos gali pagerinti terapinį priešvėžinių vaistų indeksą, didindamos vaistų tirpumą, mažindamos vaisto skaidymą ir nespecifinį pasiskirstymą bei didindamos vaistų kaupimąsi naviko vietoje (232). Vienas pirmųjų FDA patvirtintų liposominių vaistų buvo Doxil - doksorubicino formulė, inkapsuluota į liposomas, skirta kiaušidžių vėžiui ir su AIDS susijusiai Kapoši sarkomai gydyti. Liposominė formulė sumažina su doksorubicino sukeltą kardiotoksiškumą, išlaikydama priešvėžinį veiksmingumą (233). Daug kitų liposominių preparatų tiriami klinikiniuose tyrimuose, siekiant nustatyti jų efektyvumą įvairioms vėžio formoms, įskaitant krūties vėžį, plaučių vėžį ir leukemiją (234).

**Infekcinės ligos.** Liposomos gali padidinti infekcinių ligų gydymo veiksmingumą pagerindamos vaistų tirpumą, apsaugodamos juos nuo priešlaikinio skilimo ir nukreipdamos tiesiai į užkrėstas ląsteles ar audinius (235). Liposominių priešgrybelinių ir antibakterinių medžiagų formulės buvo sukurtos siekiant veiksmingai gydyti sunkias infekcijas, ypač tais atvejais, kai patogenai yra atsparūs įprastiniam gydymui (236). Liposomos taip pat naudojamos kaip adjuvantai vakcinose, nes jos sustiprina imuninį atsaką į antigeną. Jos gali tiesiogiai pernešti antigenus imuninės sistemos ląstelėms ir būti suprojektuotos taip, kad skatintų stiprų ir tikslių imuninį atsaką (237).

**Oftalmologinis panaudojimas.** Liposomų taikymas oftalmologijoje yra labai svarbi sritis, ypač gydant tokias ligas kaip sausų akių sindromas ir Meibomo liaukų disfunkcija (238). Liposomos gali pagerinti akims skirtų vartojamų vaistų biologinį prieinamumą ir efektyvumą. Jos užtikrina ilgesnį vaistų išsilaikymą ant akies paviršiaus, pagerina ragenos įsiskverbimą ir apsaugo vaistus nuo priešlaikinio skilimo (147). Be to, liposomos gali būti sukurtos taip, kad vaistai būtų pernešami į užpakalinį akies obuolio segmentą – sritį, kurią sunku pasiekti naudojant įprastus vaistų tiekimo būdus (239).

**Genų terapija ir RNR pernešimas.** Liposomos buvo iširtos kaip genų terapijos pernašos sistemos, nes gali pernešti genetinę medžiagą, pvz., DNR arba RNR, į ląsteles, siekiant gydyti genetines ligas arba modifikuoti genų ekspresiją. Liposomos gali inkapsuluoti mažas trukdančias RNR (siRNR) ir pernešti jas į ląsteles, kad būtų slopinama specifinių genų, dalyvaujančių ligos procesuose, ekspresija (240). CRISPR-Cas pristatymas: tyrėjai taip pat tiria

liposomų taikymą CRISPR-Cas sistemos pristatymui, siekiant tikslinio genų redagavimo (241).

Liposomų taikymas medicinoje yra reikšminga pažanga vaistų pernešimo ir nanomedicinos srityse. Dėl gebėjimo įkapsuliuoti įvairias terapines medžiagas, nukreipti jas į konkrečius audinius ar ląsteles bei kontroliuojamo vaistų išsiskyrimo, liposomos yra labai universalios ir veiksmingos. Tęsiant mokslinius tyrimus, jų taikymas medicinoje plečiasi, suteikdamas naujų galimybių gydyti sudėtingas ligas. Tobulėjant liposomų dizainui ir funkcionalumui, jų vaidmuo medicinoje didės, todėl bus sukurtos veiksmingesnės ir individualizuotos gydymo strategijos.

### 1.8.2. Kurkumino taikymas Meibomo liaukų disfunkcijos gydyme

Kurkuminas, ciberžolėje esantis biologiškai aktyvus junginys, buvo plačiai ištirtas dėl jo priešuždegiminių, antioksidacinių ir antimikrobinių savybių. Dėl šių savybių jis laikomas perspektyviu kandidatu gydyti įvairias ligas, įskaitant Meibomo liaukų disfunkciją. Tačiau terapinį kurkumino taikymą riboja jo prastas tirpumas, mažas biologinis prieinamumas ir greitas sisteminis metabolizmas (242). Siekiant įveikti šiuos iššūkius, mokslininkai pasitelkė pažangias vaistų pernašos sistemas, tokias kaip liposomos, norint padidinti kurkumino veiksmingumą gydant MLD (243,244).

#### **Kurkumino terapinis potencialas sergant MLD:**

- **Priešuždegiminės savybės.** Lėtinis uždegimas vaidina svarbų vaidmenį MLD patofiziologijoje. Nustatyta, kad kurkuminas slopina priešuždegiminių citokinų ir mediatorių, tokių kaip TNF-alfa, IL-1 ir IL-6, gamybą bei mažina fermentų, tokių kaip COX-2 ir LOX, dalyvaujančių uždegiminiuose procesuose, aktyvumą (245). Mažindamas uždegimą, kurkuminas gali palengvinti MLD simptomus ir užkirsti kelią tolesniam Meibomo liaukų pažeidimui.
- **Antioksidacinis aktyvumas.** Oksidacinis stresas yra dar vienas veiksnys, prisidedantis prie MLD vystymosi ir progresavimo. Stiprus kurkumino antioksidacinis poveikis gali neutralizuoti laisvuosius radikalus ir sumažinti oksidacinę žalą regos organų išoriniam paviršiui ir Meibomo liaukoms (246).
- **Antimikrobinis poveikis.** MLD dažnai siejamas su bakterijų pertekliumi ant akių vokų ir pakitusia meibomo sudėtimi, kas gali sukelti infekciją ir

uždegimą. Kurkumino antimikrobinis poveikis gali padėti kontroliuoti bakterijų populiaciją ir sumažinti infekcijos riziką (247).

### **Liposomos kaip kurkumino pernašos sistema:**

- Liposomos yra sferinės pūslelės, sudarytos iš fosfolipidų dvisluoksnių, kurios gali įkapsuliuoti hidrofobines medžiagas, tokias kaip kurkuminas, didindamos jų tirpumą ir stabilumą vandeninėje aplinkoje. Tai padidina kurkumino biologinį prieinamumą, kai jis vartojamas tiek lokaliai, tiek sistemiškai (248).
- Liposomos gali būti sukurtos taip, kad būtų nukreiptos į konkrečius audinius ar ląsteles, leidžiant kurkuminui tiesiogiai pasiekti Meibomo liaukas ir akies paviršių. Šis tikslingas pristatymas gali padidinti terapinį kurkumino efektyvumą ir sumažinti galimą sisteminių šalutinių poveikių (249).
- Liposomos užtikrina kontroliuojamą inkapsuliuotų vaistų išsiskyrimą, ilgiau palaiko terapinę kurkumino koncentraciją ir sumažina dažno dozavimo poreikį (250).

## 2. DARBO APIMTIS IR METODOLOGIJA

### 2.1. Tyrimo eiga

#### Tyrimo metodai:

- ✓ Meibomo liaukų disfunkcija su paruoštu Freundo adjuvantu.
- ✓ Sausų akių sindromo sukėlimas ašarų liaukas pašalinus chirurginiu metodu
- ✓ Benzalkoniumo chloridą (BAK)
- ✓ Meibomo liaukų disfunkcija po kauterizacijos
- ✓ Liposominio kurkumino poveikis sukėlus Meibomo liaukų disfunkciją su paruoštu Freundu adjuvantu.

#### Tyrimo objektas:

- ✓ Naujosios Zelandijos Baltieji triušiai 12 savaičių amžiaus, patinai.
- ✓ Olandijos mažieji triušiai 12 savaičių amžiaus, patinai.

#### Tyrimo vieta:

- ✓ Vilniaus Universitetas, Gyvybės mokslų centras, vivariumas

Tyrimams atlikti iš Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos gauti leidimai atlikti bandymo su gyvūnais projektą G2-95 (2018 12 12) ir G2-213 (2022 06 10).

### 2.2. Darbo metodologija

#### 2.2.1. Meibomo liaukų disfunkcijos sukėlimas suleidus paruoštą Freundu adjuvantą

Eksperimentiniam MLD modeliui sukurti buvo naudojamas paruoštas Freundu adjuvantas (PFA), kuriame yra lizuotų liofilizuotų *Mycobacterium* ląstelių (Sigma Aldrich, JAV). Adjuvantas triušiams buvo suleistas į laisvąjį voko kraštą, taikant bendrąją anesteziją, kuri atlikta sušvirkščiant į raumenis ketamino (25 mg/kg; Ketamidol 10%, 10 ml, Richter Pharma, AT) ir medetomidino (0,375 mg/kg; Sedator, 1 mg/ml, 10 ml, Eurovet Animal Health B.V., NL). Skausmui malšinti buvo naudojami opioidiniai akių lašai (Oftan Obucain, 4 mg/ml, Santen, Tampere, Suomija).

PFA (30–50 µl) buvo suleista su 1 ml švirkštu į dešinės akies (DA) vidinės, vidurinės ir išorinės srities viršutinio voko kraštą. Prieš suleidimą buvo įsitikinta, kad gyvūnas yra pilnai anestezuotas. Adata statmenai voko

kraštui šalia Meibomo angos buvo įvesta apie 3 mm, kur suleistas numatytas PFA kiekis. Tuo pačiu metodu į kairiosios akies (KA) viršutinio voko tas pačias sritis buvo sušvirškstas atitinkamas kiekis (30-50 µl) fiziologinio tirpalo (NaCl 0,9%). Dešinė akis buvo naudojama kaip indukuota grupė, o kairioji akis – kaip kontrolinė grupė.

#### 2.2.2. Sausų akių sindromo sukėlimas ašarų liaukas pašalinus chirurginiu metodu

Ašarų liaukų rezekcija (ALR) buvo atlikta siekiant sukelti sunkesnę sausų akių sindromo formą. Šio metodo metu buvo pašalinta trečiojo voko membrana (TVM), Harderio liauka (HL) ir pagrindinė ašarų liauka (AL). Procedūra buvo atlikta abiejose akyse.

Operacija vyko triušiams esant bendrojoje anestezijoje. Anestezijos indukcijai į raumenis buvo sušviršksta ketamino (25 mg/kg; Ketamidor 10%, 10 ml, Richter Pharma, AT) ir medetomidino (0,375 mg/kg; Sedator 1 mg/ml, 10 ml, Eurovet Animal Health B.V., NL). Anestezija visos operacijos metu buvo palaikoma ketamino ir medetomidino deriniu. Skausmo kontrolei buvo naudojamas buprenorfinas (0,03 mg/kg; Sol. Bupaq, daugiadozis 0,3 mg/ml, 10 ml, Richter Pharma, JK).

Prieš operaciją periokulinėje srityje kailis buvo pašalintas skutant. Kas 15 minučių buvo stebima širdies ir kvėpavimo sistemos būklė naudojant pulso oksimetrą (PM60A, Kinija), taip pat tikrinami refleksai. Chirurginis laukas buvo dezinfekuotas 5% betadino tirpalu (Sol. Betadine 1 ml/10 mg, Egis, HN).

TVM buvo pašalinta perpjovus ją ties pagrindu. HL buvo pašalinta per tarpą, susidariusį tarp vidurinio tiesiojo raumens ir priekinės akiduobės sienelės, per ekscizinę žaizdą po TVM nupjovimo. Liauka pašalinta visiškai. Hemostazė pasiekta švelniai spaudžiant akies obuolį hemostatine kempinėle.

Toliau atliktas linijinis pjūvis išilgai apatinio ir šoninio akiduobės lanko, per kurį pašalintos pagrindinės infraorbitalinės, temporalinės ir intraorbitalinės AL skiltys. Po to orbitos pertvara ir odos žaizda buvo užsiūtos atskirai, naudojant 4-0 poliglikano siūlus.

Po operacijos chirurginės žaizdos srityje tris kartus per dieną 7 dienas buvo lašinami Maxitrol (5 ml, Alcon, Puurs, Belgija) akių lašai. Profilaktikai po oda vieną kartą per parą 3 dienas buvo švirškščiamas enrofloksacinas (15 mg/kg; Enroksilis 50 mg/ml, KRKA, SL).

Tyrimas buvo atliktas Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro vivariumo operacinėje.

### 2.2.3. Sausų akių sindromo sukėlimas lašinant Benzalkonio chlorido konservantą

Benzalkonio chloridas (BAK) naudojamas ragenos epitelio pažeidimui sukelti ir junginės Gobleto ląstelių kiekiui sumažinti. Panaši žala pastebima žmonėms, sergantiems sausų akių sindromu, nes BAK yra dažniausiai naudojamas akių lašų konservantas.

Eksperimente BAK (Sigma Aldrich, JAV) buvo gautas kaip 10% tirpalas, kuris vėliau praskiestas fiziologiniu tirpalu, siekiant paruošti 0,1% koncentracijos tirpalą. Paruoštas 0,1% BAK tirpalas su pipete buvo lašinamas į abi akis po 60 µl du kartus per dieną visą tyrimo laikotarpį. Tarp lašinimų buvo laikomasi 12 val. intervalas.

### 2.2.4. Meibomo liaukų disfunkcijos sukėlimas kauterizacijos metodu

Siekiant pagrįsti metodo tinkamumą eksperimentiniam sausų akių sindromo modeliui, orientuotam į Meibomo liaukų disfunkcijos tyrimus – buvo atliktas Meibomo liaukų kauterizacijos metodas. Taip gauti rezultatai buvo vertinti su kitais SAS ir MLD triušių modeliais. Kauterizacija vyko triušiams esant bendrojoje anestezijoje. Anestezijos indukcijai į raumenis buvo sušvirškšta ketamino (25 mg/kg; Ketamidol 10%, 10 ml, Richter Pharma, AT) ir medetomidino (0,375 mg/kg; Sedator 1 mg/ml, 10 ml, Eurovet Animal Health B.V., NL). Anestezija visos procedūros metu buvo palaikoma ketamino ir medetomidino deriniu. Skausmo kontrolei buvo naudojamas buprenorfinas (0,03 mg/kg; Sol. Bupaq, daugiadozis 0,3 mg/ml, 10 ml, Richter Pharma, JK). Triušiu giliai įmigus, su elektroskauteriu, pridegintos Meibomo liaukų angos. Kauterizacija buvo atlikta dešinės akies viršutiniame ir apatiniame voke. Siekiant apsaugoti nuo infekcijos, po procedūros 3 dienas į akis buvo lašinti akių lašai su antibiotikais.

### 2.2.5. Liposominis gydymas PFA sukkelto MLD metodui

MLD buvo sukelta naudojant PFA metodą, kuris aprašytas anksčiau. Praėjus 3 savaitėms nuo PFA suleidimo, indukuotos akys buvo gydomos trimis liposominiais preparatais, specialiai sukurtais Nacionalinio vėžio instituto (NVI) specialistų. Gydymui buvo naudojami liposominiai preparatai su kurkuminu, ciklosporinu A ir be veikliosios medžiagos. Siekiant įvertinti preparatų veiksmingumą eksperimento metu gydymo pradžios laikas pasirinktas 21 eksperimento dieną. Eksperimento planas pavaizduotas 31 paveiksle. Preparatai buvo lašinami su pipete į indukuotą dešinę akį (DA) po

25 µl 2 kartus per dieną. Tarp lašinių buvo laikomasi 12 val. intervalas. Tuo pačiu metu ir metodu fiziologinis tirpalas (25 µl) kaip kontrolinė priemonė buvo lašinamas į kairę akį (KA). Gydymas vyko 10 dienų.

### 2.2.6. Ragenos dažymo fluoresceinu testas

Ragenos dažymo fluoresceinu testas leidžia įvertinti ragenos epitelio gyvybingumą ir nustatyti pažeistas akies paviršiaus epitelio sritis. Ragenos paviršiui nudažyti buvo naudojamos natrio fluoresceino oftalmologinės juostelės U.S.P. Prieš tyrimą gyvūnas buvo trumpam fiksuojamas ir anestezuojamas. Juostelės galiukas buvo sudrėkinamas vienu lašu sterilaus 0,9 % NaCl tirpalo, kad būtų suaktyvinta dažo difuzija, tačiau vengiant perteklinio skiedimo. Juostelės galiukas trumpam (1-2 s) buvo įdedamas į apatinį junginės maišelį, nepaliekiant ragenos. Akis kelis kartus užmerkiama, kad dažai tolygiai pasiskirstytų ašaros plėvelėje ir ragenos paviršiuje. Praėjus 2 – 3 min po aplikacijos, akies paviršius buvo apšviečiamas stereomikroskopo kobalto mėlynos šviesos šaltinio pagalba. Buvo vertinamos šios ragenos sritys: centrinis epitelis, vidurinė periferinė zona ir kraštinė zona. Po to akies paviršius buvo tiriamas stereomikroskopu (Leica M165 FC, Vokietija) ir dokumentuojamas skaitmenine kamera (Leica DMC6200, Vokietija). Vizualiai buvo identifikuojamos fluoresceinu dažymosi sritys – taškinis (punktatinis) dažymasis, susiliejančios erozijos ar difuzinis pažeidimas. Naudojant vienodas ekspozicijas visuose tiriamosios grupės gyvūnuose, siekiant užtikrinti kokybinio palyginimo galimybę. Visoms akims buvo gautas bent vienas reprezentatyvus vaizdas esant standartiniam didinimui.

### 2.2.7. Ašarų tūrio testas

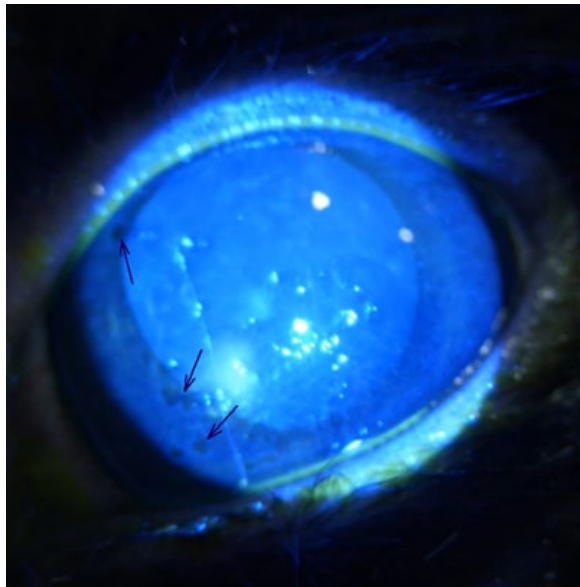
Ašarų tūrio matavimo testas yra standartizuotas kiekybinis metodas, leidžiantis įvertinti bendrą ašarų sekreciją – tiek refleksinę (sukeltą mechaninio dirgiklio), tiek bazinę. Ašarų gamybos kiekis buvo įvertintas naudojant Schirmer ašarų testo oftalmologines juosteles (Optitech Eyecare, Indija). Šiame tyrime taikytas Schirmer I testas be anestezijos, kuris atspindi bendrą ašarų sekreciją, apimančią pagrindinių ir papildomų ašarų liaukų funkciją bei refleksinį atsaką į mechaninį juostelės dirgiklį. Standartizuota filtravimo popieriaus juostelė, įstatyta į junginės maišelį, sugeria ašarų skystį kapiliarinės absorbcijos principu – drėgmė plinta juostele proporcingai ašarų tūriui ir sekrecijos greičiui, todėl sudrėkintas ilgis milimetrais tiesiogiai koreliuoja su ašarų gamybos intensyvumu per nustatytą laiką. Triušiai buvo švelniai fiksuoti medžiaginiu apdangalu, kad negalėtų judėti, tačiau galva liko

laisva. Prieš tyrimą gyvūnui buvo leidžiama aklimatizuotis fiksavimo padėtyje 1–2 minutes. Schirmer juostelė sulenkama ties standartine 5 mm žyme. Sulenkta galiukas buvo atsargiai įstatomas į apatinio voko vidurinę trečdaliao dalį, ties junginės maišeliu, vengiant tiesioginio kontakto su ragena, kadangi mechaninis ragenos dirginimas sukelia intensyvių refleksinių ašarojimą. Juostelė buvo laikoma voko ir akies obuolio kontakto zonoje, nesukeliant papildomo spaudimo. Tiksliai po juostelės įstatymo buvo paleidžiamas chronometras. Siekiant sumažinti sekrecijos svyravimus tyrimo metu gyvūnas buvo laikomas ramioje, pastovaus apšvietimo aplinkoje, minimaliai dirginama rega bei klausa. Stebima, kad juostelė neišslystų ar nepersikeltų ekspozicijos metu. Po 60 sekundžių juostelė atsargiai buvo ištraukta iš junginės maišelio. Sudrėkintas ilgis įvertintas nedelsiant, kol drėgmė dar neišgaravo, matuojant nuo sulenkimo žymės iki drėgnos zonos priekinio krašto milimetrų tikslumu. Kiekvienas matavimas buvo atliktas tris kartus, o nesušlapusios juostelės buvo laikomos nesuskaičiuojamomis. Kiekvienai akiai buvo atliekami trys nepriklausomi matavimai su ne mažesniu kaip 5 minučių pertrauka tarp matavimų, kad ašarų liaukos būtų atsigavusios ir sumažėtų ankstesnio mechaninio dirginimo įtaka. Galutinis kiekvienos akies Schirmer testo rezultatas buvo apskaičiuotas kaip trijų matavimų aritmetinis vidurkis (mm/min).

#### 2.2.8. Ašarų plėvelės plyšimo laikas

Ašarų plėvelės plyšimo laikas (APPL) (angl. Tear Film Break-Up Time, TFBUT) yra standartizuotas klinikinis rodiklis, atspindintis ašarų plėvelės stabilumą ir jos gebėjimą išlaikyti tolygų, nepertraukiamą sluoksnį ant ragenos epitelio paviršiaus tarp mirksėjimų. Siekiant išgauti pakankamą imobilizavimą ir sumažinti streso sukeltą refleksinę ašarų hipersekreciją, kuri galėtų dirbtinai pailginti APPL reikšmes, tyrimas buvo atliktas taikant trumpalaikę disociatyviąją anesteziją ketamino ir medetomidino deriniu. Vertinimui buvo naudojama plyšinė lempa su kobalto mėlynos šviesos filtru. Prieš tyrimą ragenos paviršiui nudažyti buvo naudojamos natrio fluoresceino oftalmologinės juostelės U.S.P., leidžiančios stebint fluoresceinu nudažytą ašarų plėvelę per plyšinę lempą, aiškiai įvertinti ašarų plėvelės vientisumą. Natrio fluoresceino juostelė buvo sudrėkinama minimaliu kiekiu sterilaus 0,9 % NaCl tirpalo ir trumpam (1–2 s) įdedama į apatinį junginės maišelį. Dažo aplikacija buvo atliekama likus 30 sekundžių iki APPL matavimo pradžios, siekiant optimalaus ašarų plėvelėje pasiskirstymo ir fluorescencijos intensyvumo. Prieš matavimą rankiniu būdu buvo švelniai užmerkama ir atmerkama gyvūno akis vieną–du kartus, imituojant natūralų mirksėjimą ir

užtikrinant tolygų fluoresceino pasiskirstymą visame ragenos paviršiuje. Paskutinis šio procedūrinio mirksėjimo momentas žymėjo laiko skaičiavimo pradžią. Iš karto po paskutinio mirksėjimo akies paviršius buvo apšviestas kobalto mėlynos šviesos filtro šviesa per plyšinę lempą, naudojant platų plyšį ( $\geq 3$  mm) ir vidutinį didinimą (10–16 $\times$ ), leidžiantį vienu metu stebėti visą ragenos paviršių. Chronometras buvo sustabdomas momentu, kai pastebėta pirmoji stabili sausa dėmė ar fluorescencijos defektas, nepriklausomai nuo jos lokalizacijos ragenos paviršiuje. Fiksuojama laiko reikšmė sekundėmis paskutinio sumirksėjimo iki plyšimo momento (žr. Pav. 2). Kiekvienai akiai buvo atliekami trys nepriklausomi matavimai su ne mažesniu kaip 3–5 minučių pertrauka tarp jų, leidžiant ašarų plėvelei atsistatyti. Galutinis rezultatas buvo apskaičiuojamas kaip trijų matavimų aritmetinis vidurkis.



**Pav. 2.** Triušio ašarų plėvelės stabilumo vertinimas.

#### 2.2.9. Teleangiektazijų ir Meibomo liaukų angų kiekybinis vertinimas

Klininis akių vokų vertinimas buvo atliktas siekiant nustatyti Meibomo liaukų angų užsikimšimus bei teleangiektazijų išsivystymo laipsnį, kurie yra būdingi Meibomo liaukų disfunkcijai ir sausų akių sindromui. Vertinimas buvo atliekamas naudojant plyšinę lempą (slit lamp), leidžiančią detaliam apžiūrėti akių vokų kraštus, Meibomo liaukų angas ir aplinkinius audinius didinant vaizdą ir apšviečiant fokusuota šviesa. Teleangiektazijos - tai išsiplėtusios smulkios kraujagyslės, matomos aplink Meibomo liaukų angas, o angų užsikimšimas nustatomas pagal matomus meibomo kamščių

požymius. Klinikinis vertinimas buvo atliekamas atskirai teleangiektazijai ir Meibomo liaukų angų užsikimšimui naudojant standartizuotą trijų balų skalę, leidžiančią įvertinti pažeidimų stiprumą:

- **0 balų** – nepastebėta paraudimų arba užsikimšusių angų;
- **1 balas** – lengvas paraudimas arba iki 4 užsikimšusių angų;
- **2 balai** – vidutinio sunkumo teleangiektazija aplink angas, hiperemija arba 4–7 užsikimšusios angos;
- **3 balai** – stipri teleangiektazija aplink angas, ryški hiperemija arba daugiau kaip 7 užsikimšusios angos.

Akių vokų laisvasis kraštas buvo suskirstytas į tris zonas: vidinę, vidurinę ir išorinę. Kiekviena zona buvo vertinama atskirai, o galutinis rezultatas apskaičiuotas susumuojant visų trijų zonų įvertinimus. Maksimalus galimas balas buvo 9, minimalus – 0.

Meibomo liaukų angų užsikimšimai ir teleangiektazijos su hiperemija buvo vertinami atskirai, siekiant išsamiai įvertinti būklės sunkumą.

Be to, vertinimo metu buvo stebimi papildomi požymiai, tokie kaip angų paraudimas, paviršiaus nelygumai, liaukų išsiplėtimas ar deformacija. Šie duomenys padėjo tiksliau įvertinti uždegiminių procesų intensyvumą ir meibomo išsiskyrimo sutrikimus.

#### 2.2.10. Histologinių mėginių kokybinis vertinimas

Akių audiniai, įskaitant akių vokus, rageną ir junginę, buvo paimti po gyvūnų eutanazijos paskutinę tyrimo dieną. Eutanazija buvo atlikta perdozuojant anestetinius preparatus, laikantis etinių reikalavimų ir užtikrinant gyvūno visišką nejautrumą skausmui. Įsitikinus, kad gyvūnas negyvas, buvo pradėtas audinių surinkimas histologiniam vertinimui.

Iš kiekvieno gyvūno buvo paimtas toks audinių kiekis, leidžiantis paruošti ne mažiau kaip tris histologinius mėginius iš visų minėtų organų. Tuo atveju, kai akis buvo paveikta sausų akių sindromo arba Meibomo liaukų disfunkcijos indukcijos metodais, histologiniai pjūviai buvo imami ties patologinių pokyčių vietų. Toks mėginių ėmimo būdas užtikrina galimybę tiksliau identifikuoti ir įvertinti vizualiai nustatytus patologinius pakitimus, atsiradusius dėl eksperimentinių intervencijų. Neindukuotų akių audiniai buvo imami arčiau centrinės audinio dalies. Visi audiniai po atidalinimo fiksuoti 4% paraformaldehido tirpale per naktį. Po fiksavimo audiniai buvo supjaustyti į 8 µm storio pjūvius ir dažyti hematoksilinu-eozinu (HE) bei periodine rūgštimi–Schiff (PAS) metodais. Paruošti histologiniai pjūviai buvo vertinami

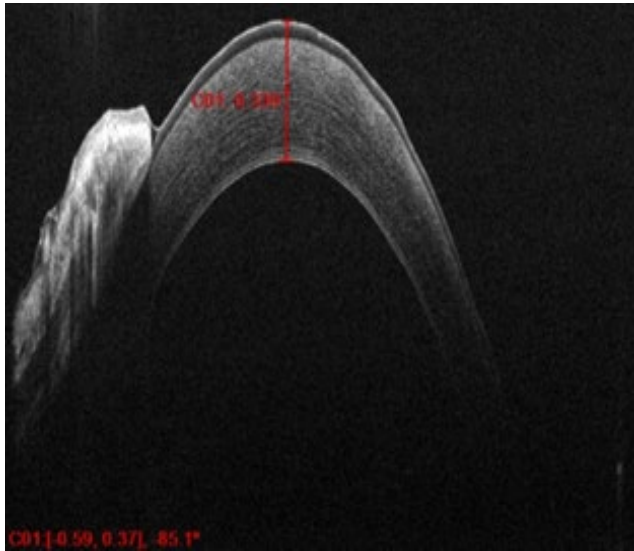
kokybiškai, siekiant nustatyti esamus patologinius pokyčius kiekviename mėginyje atskirai. Vertinimas buvo atliekamas šviesiniu mikroskopu, nustatant, ar audinyje stebimi patologiniai pokyčiai, ar audinio struktūra išlieka normali. Analizės metu kiekvienas audinys buvo vertinamas pagal jam būdingus morfologinius kriterijus:

- Ragenos pjūviuose vertintas priekinio epitelio ląstelių išsidėstymas, sluoksnių skaičius ir vientisumas, nustatant, ar nėra epitelio suplonėjimo, atplyšimo ar struktūrinių pažeidimų.
- Junginės pjūviuose buvo analizuojamas uždegiminių infiltratų buvimas ir intensyvumas, taip pat Gobletto ląstelių tankumas, siekiant įvertinti gleivinės sluoksnio būklę ir sekrecinę funkciją.
- Vokų pjūviuose (su Meibomo liaukomis) įvertintas uždegiminės infiltracijos intensyvumas ir pasiskirstymas, Meibomo liaukų acinusų struktūra ir prisipildymas meibumu, taip pat ištekamųjų latakėlių ir centrinio latako vientisumas bei prisipildymo laipsnis.

Visi stebėti pakitimai buvo kokybiškai palyginti su kontrolinės (sveikos) akies audinių pjūviais, siekiant nustatyti patologinių procesų pobūdį, jų lokalizaciją ir galimą ryšį su eksperimentiniu poveikiu.

#### 2.2.11. Ragenos optinė koherentinė tomografija (OKT)

Ragenos optinė koherentinė tomografija (pav. 3) buvo atliekama 1 dieną prieš eksperimentą (-1 dieną) ir kiekvieną savaitę iki tyrimo pabaigos. Triušiai buvo anestezuoti naudojant ketamino ir medetomidino mišinį, fiksuojant priešais UŠT lęšį, o ragena nuskaitoma optinės koherentinės tomografijos aparatu (Envisu R2210, Bioptigen/Leica, JAV).



**Pav. 3.** Triušio Ragenos OKT. Matavimas atliekamas centrinėje ragenos dalyje.

#### 2.2.12. Statistinė duomenų analizė

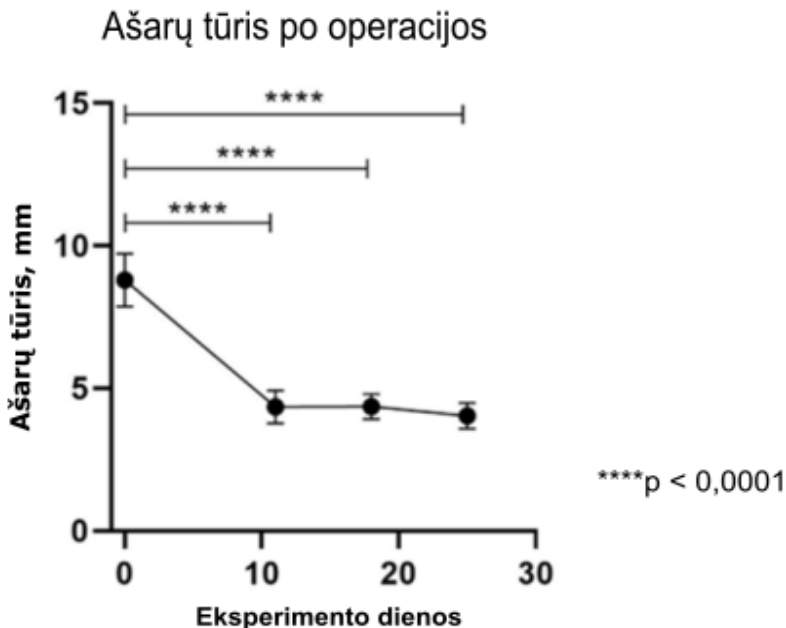
Statistiniai skaičiavimai buvo atlikti naudojant „GraphPad“ programinę įrangą (versija 8.0.1). Kiekybiniai duomenys buvo nubraižyti, analizuoti ir pateikti kaip vidurkis  $\pm$  standartinė vidurkio paklaida (SEM). Parametriniai duomenys buvo analizuojami naudojant dvipusį ANOVA testą. Disertacijoje skirtumai buvo laikomi statistiškai reikšmingais, kai  $p$  -reikšmė buvo mažesnė nei 0,05.

### 3. REZULTATAI

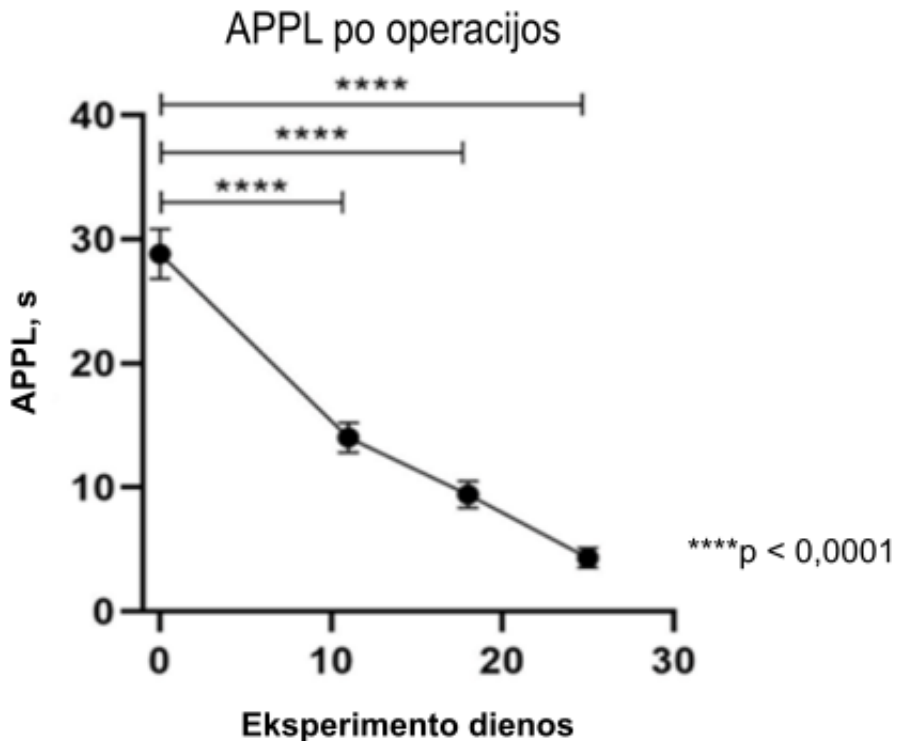
Siekiant išsamiai ištirti Meibomo liaukų disfunkciją, naudojant gyvūnų modelius, triušiams buvo taikyti skirtingi sausų akių sindromo ir Meibomo liaukų disfunkcijos indukcijos metodai. Toks metodologinis požiūris leido ne tik palyginti skirtingų indukcijos metodų poveikį, bet ir identifikuoti klinikinius žymenis, specifinius kiekvienai SAS formai. Tyrimas buvo orientuotas į klinikinių požymių stebėjimą, biožymenų rinkimą, histologinių pokyčių vertinimą bei funkcinius akies paviršiaus rodiklius.

#### 3.1. Ašarų liaukų pašalinimas chirurginiu būdu

Atlikus AL, HL ir TVM chirurginę rezekciją, buvo gauti rezultatai, kurie pateikiami 4 paveiksle. Vidutinė visų tiriamųjų (n=5) ašarų gamyba po operacijos sumažėjo 50 % ir tokia išliko iki eksperimento pabaigos. Taip nutiko todėl, kad ašarų liauka yra pagrindinė ašarų plėvelės gausiausio vandeninio sluoksnio gamintoja. Trečiojo voko membrana triušiams taip pat reikšmingai prisideda prie ašarų plėvelės vandeninio komponento gamybos, ką patvirtina ašarų tūrio palyginimas prieš ir po operacijos.

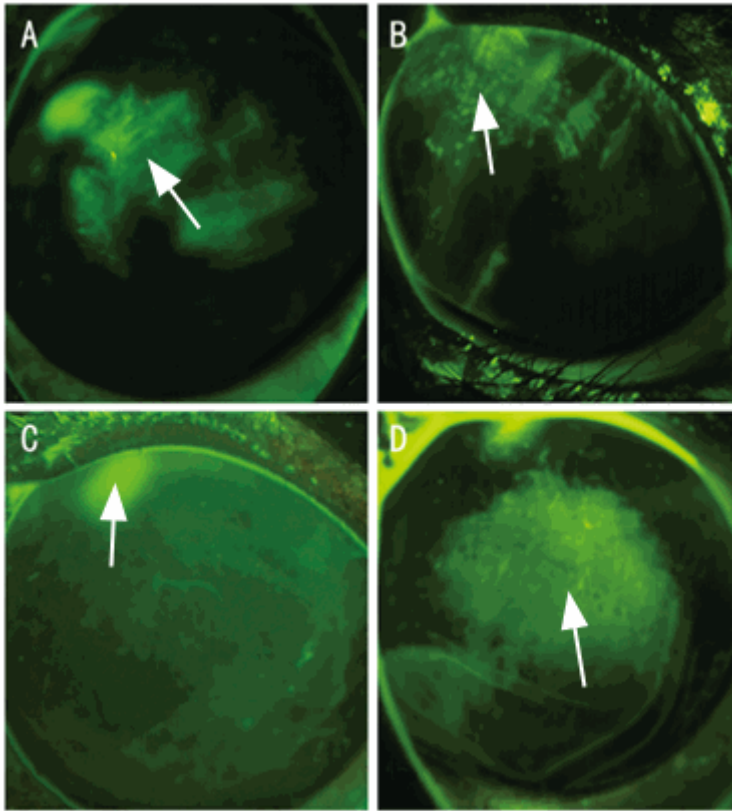


**Pav. 4.** Ašarų tūris po ašarų liaukų, Harderio liaukos ir trečio voko membranos chirurginio pašalinimo.



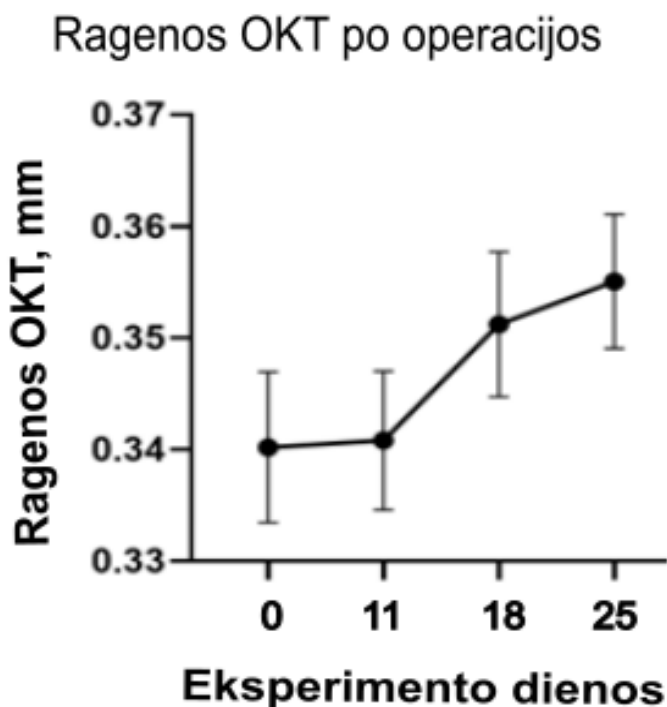
**Pav. 5.** Ašarų plėvelės plyšimo laikas prieš ir po AL, HL ir TVM pašalinimo.

Praėjus 11 dienų po operacijos, buvo nustatytas reikšmingas ašarų plėvelės plyšimo laiko sutrumpėjimas, kuris pavaizduotas 5 paveiksle. Vėlesnėmis matavimų dienomis APPL toliau trumpėjo. Šiuos pokyčius lėmė ne tik sumažėjusi ašarų plėvelės vandeninė dalis. Papildomai poveikį turėjo trečiojo voko pašalinimas, kuri prisideda prie akies obuolio padengimo ir AP atnaujinimo, bei Harderio liaukos chirurginis pašalinimas. Šis sutrumpėjimas rodo padidėjusį ašarų plėvelės nestabilumą ir sumažėjusį gebėjimą apsaugoti akies paviršių nuo išdžiūvimo.



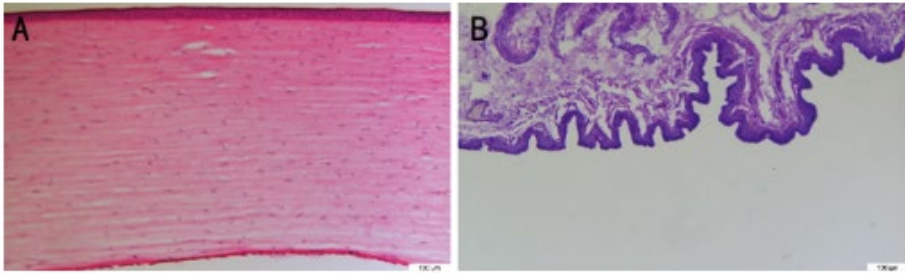
**Pav. 6.** Ragenos dažymo fluoresceinu nuotraukų rinkinys.

Ragenos dažymo fluoresceinu tyrimas buvo atliktas siekiant įvertinti ragenos epitelio vientisumą, erozijų (nuobružų) susidarymą bei nustatyti akių paviršiaus pažeidimo laipsnį, atsirandantį dėl SAS sukeltų pokyčių. 6 paveikslo A dalyje pateikta ragenos fluoresceinu dažymo nuotrauka, atlikta prieš operaciją. Joje matoma nežymiai intensyviau nusidažiusi sritis centrinėje ragenos dalyje (balta rodyklė), rodanti minimalų epitelio pažeidimą. B dalyje pavaizduota ragena praėjus 11 dienų po operacijos. Joje stebimi sausoms akims būdingi išplitę taškiniai nusidažymo židiniai (balta rodyklė), rodantys padidėjusį ašarų plėvelės nestabilumą ir paviršiaus pažeidimą. 5 paveikslo C dalyje matomas ragenos nusidažymas praėjus 18 dienų po operacijos. Ragenos paviršius nusidažęs intensyviau, o viršutinėje dalyje matoma besiformuojanti ragenos opa (balta rodyklė), rodanti progresuojantį epitelio ir paviršiaus pažeidimą. D dalyje pavaizduota ragena praėjus 25 dienoms po operacijos. Lyginant su pradine A nuotraukos dalimi, nustatytas reikšmingai išplitęs nusidažymo plotas, atspindintis pažengusį sausų akių sindromo sukeltą ragenos epitelio pažeidimą ir uždegiminį procesą.



**Pav. 7.** Ragenos optinė koherentinė tomografija

Ragenos storio pokyčiai buvo vertinami naudojant optinės koherentinės tomografijos metodą, siekiant nustatyti struktūrinius ragenos audinių pakitimus po ašarų liaukos, Harderio liaukos ir trečiojo voko membranos chirurginio pašalinimo. OKT buvo pasirinkta kaip neinvazinis ir didelio tikslumo metodas, leidžiantis įvertinti ragenos storį mikronų tikslumu bei stebėti jos struktūrinius pokyčius. Šio tyrimo rezultatai pateikiami 6 paveiksle. Gauti rezultatai parodė, kad ragenos storis, lyginant su pradiniu matavimu (0 dieną), išliko panašus iki 11 eksperimento dienos, tačiau vėliau pradėjo nuosekliai didėti, ypač 18 ir 25 dieną po operacijos. Šis progresuojantis storio padidėjimas gali rodyti subtilius morfologinius pokyčius ragenos audiniuose, tokius kaip epitelio ar stromos patinimas, atsirandantis dėl sutrikusios ašarų plėvelės funkcijos ir uždegiminės reakcijos. Šie pokyčiai gali atspindėti ir lėtinį epitelio pažeidimą, kurį lemia sumažėjusi ašarų gamyba ir padidėjęs ašarų plėvelės išgaravimas. Tokie požymiai būdingi sausų akių sindromui.



**Pav. 8.** Ragenos ir junginės histologiniai pjūviai po chirurginio ašarų liaukų pašalinimo.

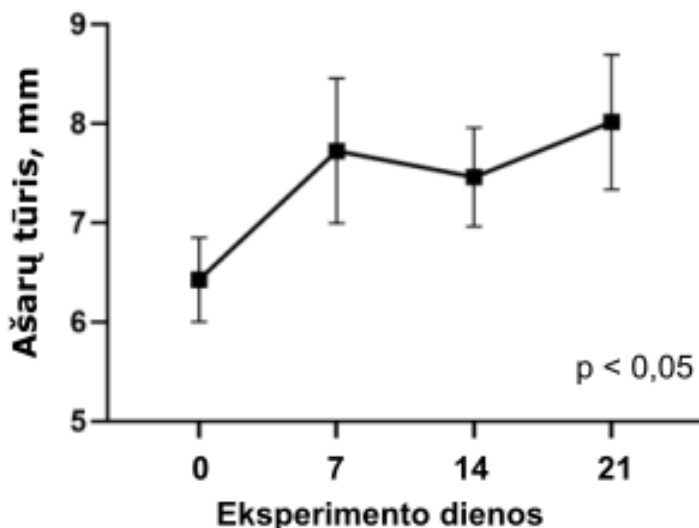
Histologinis ragenos ir junginės audinių vertinimas atskleidė reikšmingus struktūrinius pokyčius, susijusius su sausų akių sindromo indukcija. Ragenos stroma iš esmės išliko nepakitusi, jos kolageninės skaidulos buvo išsidėsčiusios tvarkingai, be edemos požymių ar infiltracijos, kas rodo, jog pagrindinis pažeidimas pasireiškė paviršiniuose priekinio epitelio sluoksniuose. Tačiau daugiasluoksnis, plokščiasis, neragėjantis epitelis vietomis buvo pastebimai suplonėjęs (8 pav. A), o kai kuriose srityse matyti epitelio ląstelių disorganizacija bei branduolių apoptozė, rodanti ląstelių degeneraciją. Šie pokyčiai atspindi sutrikusią epitelio regeneraciją, kuri dažnai pasireiškia esant lėtiniam ašarų trūkumui ir paviršiaus dehidratacijai.

Junginės histologiniai pjūviai (8 pav. B) taip pat parodė būdingus pokyčius. Daugeliu atvejų buvo stebimas gobleto (taurinės) ląstelių kiekio sumažėjimas, o kai kuriose srityse šios ląstelės visai nebuvo matomos. Gobleto ląstelės yra atsakingos už mucino sekreciją, kuri būtina ašarų plėvelės stabilumui ir tolygiam pasiskirstymui ant akies paviršiaus. Jų sumažėjimas rodo gleivinės sluoksnio pažeidimą ir lemia ašarų plėvelės nestabilumą bei padidėjusį akies paviršiaus jautrumą.

### 3.2. Benzalkonio chlorido lašinimo metodas

BAK yra dažnai naudojamas kaip akių lašų konservantas, tačiau nuolatinis jo naudojimas gali sukelti akies išorinės dalies pažeidimus.

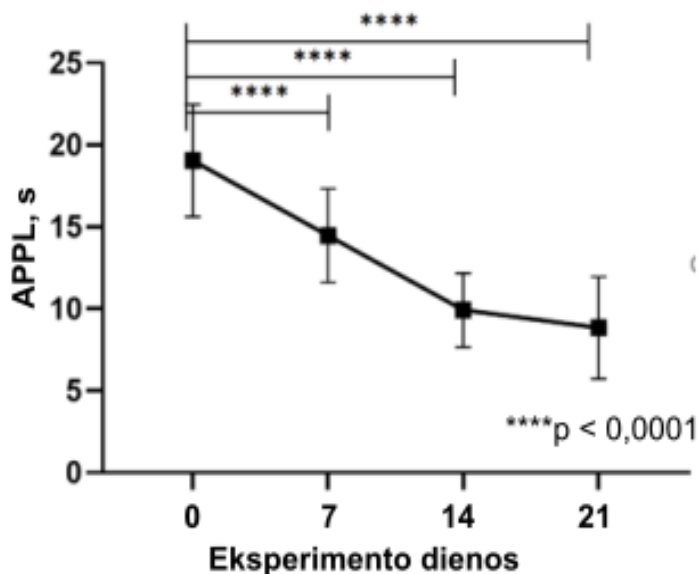
## Ašarų tūris lašinant konservantą (BAK)



**Pav. 9.** Ašarų tūris prieš ir BAK lašinimo metu.

Tyrimo metu jau po 7 eksperimento dienų buvo nustatytas ašarų tūrio padidėjimas, kuris išliko padidėjęs viso tyrimo laikotarpiu, lyginant su pradiniu kiekiu prieš benzalkonio chlorido lašinimą. Šis pokytis pavaizduotas 9 paveiksle, tačiau statistškai reikšmingas jis nebuvo. Nepaisant to, pokytis rodo, kad BAK akies paviršiui sukelia fiziologinį kompensacinį atsaką, pasireiškiantį padidėjusią ašarų gamybą. Tokia reakcija laikoma gynybiniu mechanizmu, kai akies paviršiaus audiniai, reaguodami į cheminį dirgiklį, aktyvina refleksinį ašarojimą. Padidėjęs ašarų kiekis mechaniniu būdu padeda pašalinti dirginančias medžiagas nuo akies paviršiaus, mažina uždegiminių mediatorių koncentraciją ir palaiko drėgmės balansą.

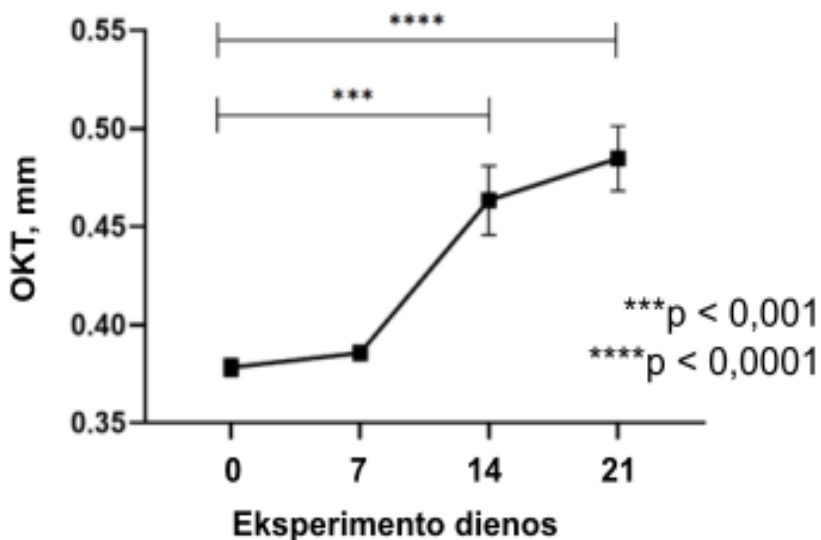
## APPL lašinant konservantą (BAK)



**Pav. 10.** Ašarų plėvelės plyšimo laikas prieš ir BAK lašinimo metu.

Eksperimento metu, pradėjus lašinti 0,1 % benzalkonio chlorido tirpalą, kiekvieną matavimo kartą buvo stebimas nuoseklus ir statistiškai reikšmingas ašarų plėvelės plyšimo laiko trumpėjimas, lyginant su pirminiais rodmenimis (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Ryškus APPL sutrumpėjimas rodo, kad BAK, veikdamas kaip konservantas, pasižymi toksiniu poveikiu akies paviršiaus struktūroms, ypač epitelinėms ir muciną sekretuojančioms ląstelėms. BAK poveikis ląstelių membranoms lemia uždegimines reakcijas ir sukelia junginės taurinių (gobletų) ląstelių skaičiaus sumažėjimą ir tiesiogiai mažina mucinų gamybą – vieną iš pagrindinių ašarų plėvelės komponentų, atsakingų už jos stabilumą. Dėl to sumažėja mucininio sluoksnio vientisumas, o ašarų plėvelė tampa nestabili ir linkusi greičiau plyšti.

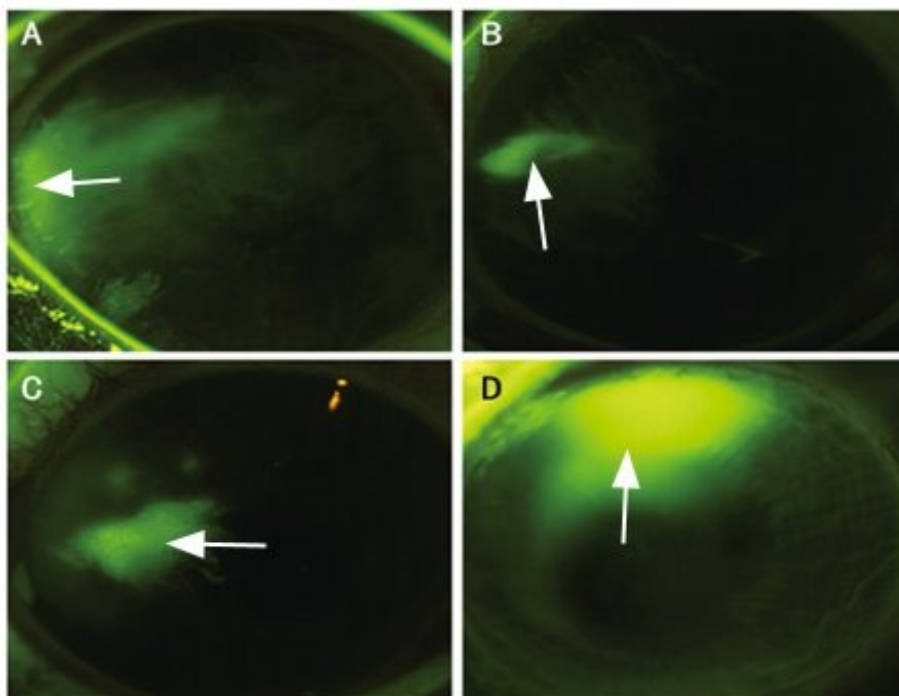
## Ragenos OKT lašinant konservantą (BAK)



**Pav. 11.** Ragenos optinė koherentinė tomografija prieš ir BAK lašinimo metu.

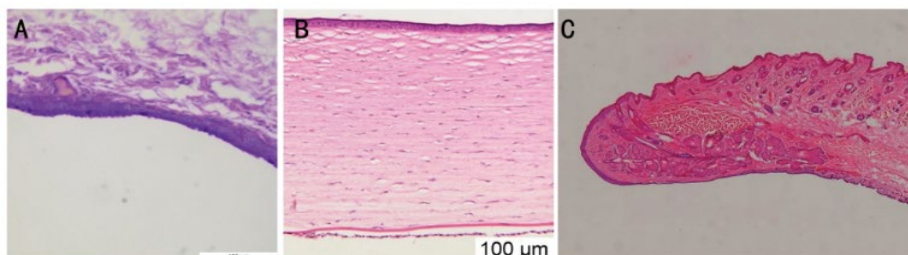
Ekspimento metu ragenos storis buvo vertinamas atliekant ragenos optinę koherentinę tomografiją. Lašinant 0,1 % benzalkonio chlorido tirpalą, ragenos storio padidėjimas tapo statistiškai reikšmingas nuo 7 iki 14 eksperimento dienos (\*\*\*) ir dar labiau išreikštas 21 dieną, palyginus su pradinėmis reikšmėmis (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). Šis ragenos pastorėjimas gali būti siejamas su epitelinių ląstelių edemos vystymusi, ekstraląstelinio skysčio kaupimusi bei uždegiminiais procesais, atsiradusiais dėl BAK toksiško poveikio akies paviršiniams sluoksniams.

Ragenos nudažymas fluoresceinu yra svarbus diagnostinis metodas, leidžiantis vizualiai įvertinti akies paviršiaus pažeidimo mastą, epitelio vientisumo praradimą bei sausų akių sindromo progresavimą BAK modelyje ir pavaizduota 11 paveiksle.



**Pav. 12.** Ragenos nudažymo fluoresceinu nuotraukų rinkinys BAK sukeltame modelyje.

Nuotraukoje (12 pav. A) pateiktas ragenos nudažymas fluoresceinu prieš BAK lašinimo pradžią, kurio metu matomas tik nedidelis, lokaliai intensyviau nusidažęs plotas, rodantis minimalų paviršiaus nelygumą. Nuotraukoje (12 pav. B) praėjus 7 dienoms nuo BAK tirpalo lašinimo pradžios, stebimas labiau koncentruotas ir aiškiau apibrėžtas fluoresceinu nusidažęs plotas, kuris gali rodyti ankstyvus epitelio barjero pažeidimo požymius. Nuotraukoje (12 pav. C), po 14 dienų trukusio BAK poveikio, nusidažęs plotas tampa dar labiau išsiplėtęs ir netolygus, atspindintis progresuojančią epitelinių ląstelių degeneraciją bei paviršiaus išsausėjimą. Nuotraukoje (12 pav. D), praėjus 21 dienai nuo indukcijos pradžios, matomas intensyviai fluoresceinu nusidažęs plotas, užimantis žymiai didesnę ragenos dalį. Jo forma ir intensyvumas būdingi susiformavusiai ar besiformuojančiai ragenos erozijai.

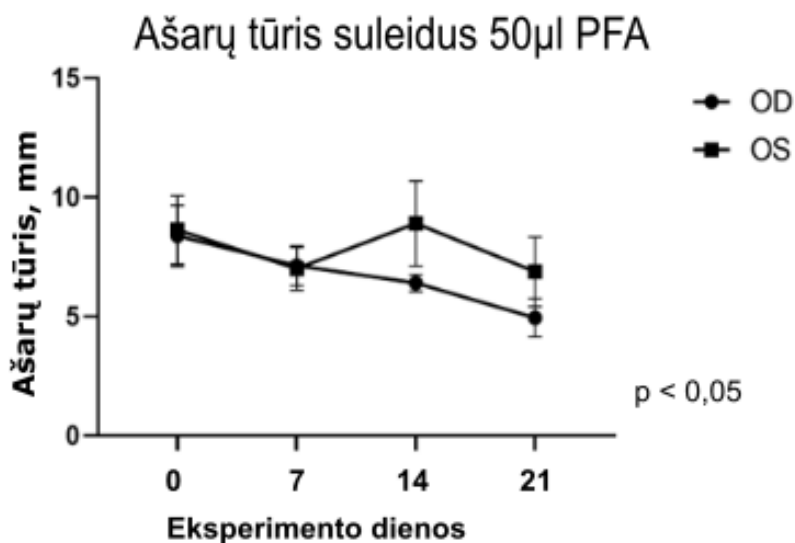


**Pav. 13.** Histologiniai triušio akies audinių mėginiai gauti iš BAK modelio.

13 paveikslo A nuotraukoje pavaizduota junginės histologinė struktūra, nudažyta PAS (Periodic Acid-Schiff) metodu, kuris leidžia aiškiai identifikuoti Gobleto ląsteles, atsakingas už mucino gamybą. Šiame vaizde matomas Gobleto ląstelių kiekio išretėjimas, rodantis sutrikusią mucino sekreciją ir dėl to sumažėjusį ašarų plėvelės stabilumą. 13 paveikslo B nuotraukoje pateikta ragenos histologija, nudažyta hematoksilinu ir eozinu (HE). Aiškiai matomas suplonėjęs priekinis daugiasluoksnis ragenos epitelis, ypač paviršinės ląstelės, kas rodo epitelio ląstelių praradimą ir paviršiaus vientisumo pažeidimą, būdingą BAK sukeltam toksiškumui. 13 paveikslo C nuotraukoje pavaizduotas triušio akies voko skersinis pjūvis, kuriame nepastebima aiškių uždegiminių infiltratų, tačiau fiksuojamas sumažėjęs junginės taurinių ląstelių kiekis. Tai pat aiškiai matomi Meibomo liaukų acinusai ir centrinis kanalas.

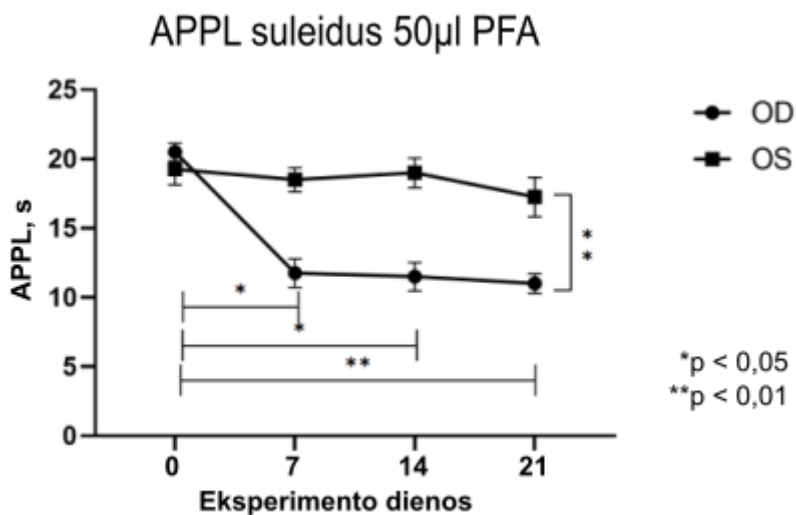
### 3.3. Meibomo liaukų disfunkcija su paruoštu Freundo adjuvantu

Vienas svarbiausių SAS sukėlimo modelių buvo eksperimentinė Meibomo liaukų disfunkcija, kuomet į kiekviena voko krašto dalį buvo suleidžiama po 50μl paruošto Freundo adjuvanto.



**Pav. 14.** Ašarų tūris prieš ir po 50 μL PFA injekcijų.

Vidutinis ašarų tūris, iliustruotas 14 paveikslo grafike, pradėjo mažėti abiejose akyse nuo eksperimento pradžios. PFA injekcijos buvo atliktos į dešinės akies (OD) vokus, o kairės akies (OS) vokuose buvo suleistas 0,9 % natrio chlorido (NaCl) tirpalas, kuris veikė kaip kontrolė. Po 7 dienų nuo eksperimento pradžios abiejose akyse ašarų gamyba išliko vienoda. Praėjus 14 dienų po injekcijos, OD akies ašarų tūris toliau mažėjo, rodydamas progresuojantį liaukų funkcijos slopinimą dėl PFA sukeltos uždegiminės reakcijos. Šis poveikis greičiausiai susijęs su imuninio atsako aktyvacija ir uždegiminių mediatorių išsiskyrimu, paveikiančiu ašarų liaukos sekreciją bei Meibomo liaukų veiklą. Tuo tarpu OS akyje, kur buvo suleistas fiziologinis tirpalas, po 14 dienų užfiksuotas nedidelis ašarų tūrio padidėjimas. 21-ąją eksperimento dieną OD akyje ašarų gamyba išliko ženkliai sumažėjusi, rodydama ilgalaikį ašarų liaukų funkcijos sutrikimą, tuo tarpu OS akies ašarų tūris taip pat šiek tiek sumažėjo, tačiau ne tiek, kad pasiektų OD akies rodmenis. Šie rezultatai rodo, kad PFA injekcijos į akies vokus sukelia vietinį ir ilgalaikį uždegimą, kuris lemia ašarų sekrecijos sumažėjimą, paviršiaus homeostazės sutrikimą bei uždegiminių procesų aktyvaciją. Atlikus dvipusę ANNOVA analizę, tarp gautų duomenų statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta.



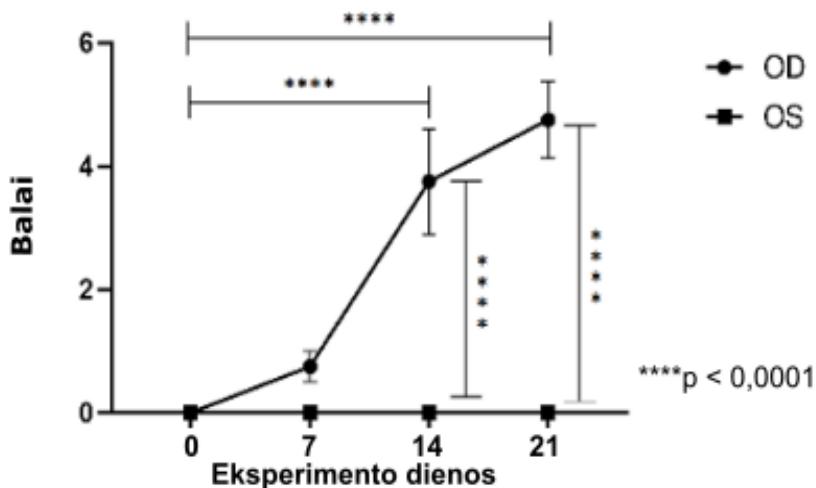
**Pav. 15.** Ašarų plėvelės plyšimo laikas prieš ir po suleistų 50 μL PFA injekcijų.

15 paveikslo grafike pateikti duomenys rodo ašarų plėvelės plyšimo laiko pokyčius per 21 dieną. Pradiniame taške (0 dieną) abiejų akių APPL buvo panašus, apie 20 sekundžių, kas atspindi normalų ašarų plėvelės stabilumą. Po 7 dienų nuo PFA injekcijos OD akyje APPL reikšmingai sumažėjo maždaug 50 % ( $p < 0,05$ ) ir išliko nepakitęs iki eksperimento pabaigos (21 d.). Šie rezultatai rodo, kad PFA sukeltas uždegimas turėjo ilgalaikį poveikį ašarų plėvelės stabilumui ir skatino išgaravimą.

Tuo tarpu OS (kontrolinėje) akyje, kurioje nebuvo sukelta uždegiminė reakcija, APPL reikšmingai nesikeitė per visą eksperimento laikotarpį išlikdamas panašiam lygyje.

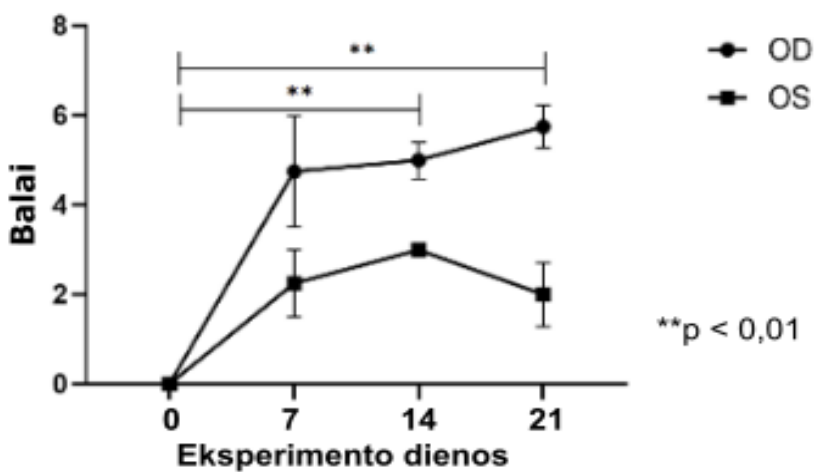
21 dieną OD akies APPL išliko žymiai trumpesnis nei OS akyje ( $p < 0,01$ ), o toks skirtumas rodo, kad PFA 50 μl injekcijos sukėlė ilgalaikį ašarų plėvelės nestabilumą.

### ML angų vertinimas suleidus 50μl PFA



A.

### Teleangiektazija suleidus 50μl PFA

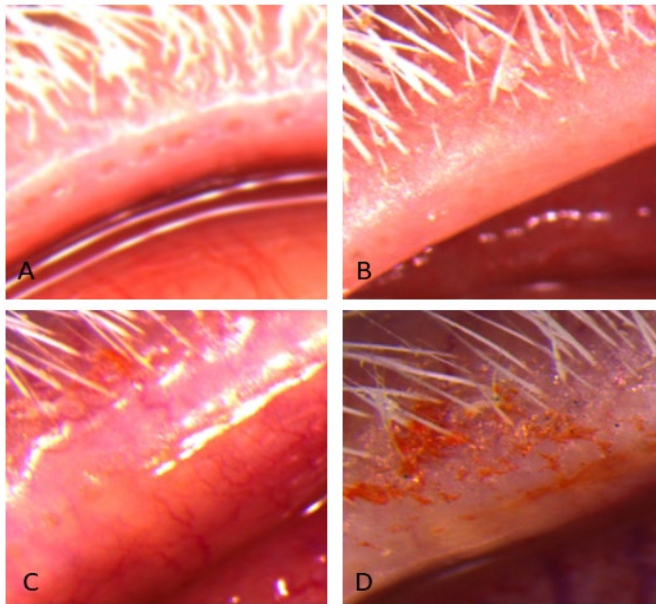


B.

**Pav. 16.** (A) Meibomo liaukų angų užsikimšimo teleangiektazijos (B) vertinimas balais.

Pradiniame eksperimento etape abiejų akių vokų Meibomo liaukų angos buvo neužsikimšusios ir be matomų uždegimo požymių. Po 50 μL PFA injekcijos į dešinės akies (OD) voka, jau po 7 dienų stebėtas aiškus

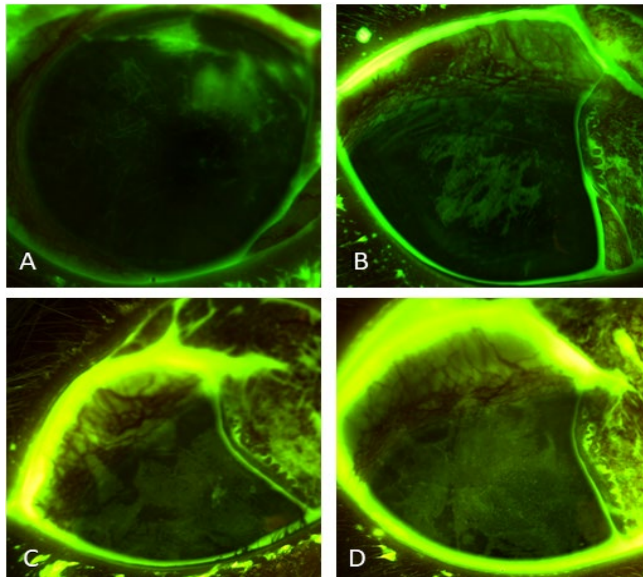
užsiblokavusių liaukų angų skaičiaus didėjimas, kuris toliau progresavo iki 14 dienos ir 21 dieną (Pav. 16 A.) ir pasiekė maksimumą. Šie pokyčiai rodo, kad PFA sukelta uždegiminė reakcija paveikė Meibomo liaukų funkciją, galimai dėl liaukų lataukų edemos ar sekreto tirštėjimo, lemiančio jų obstrukciją. Tuo tarpu kairėje (OS) akyje, kur PFA injekcija nebuvo atlikta, Meibomo liaukų angų pokyčių nenustatyta, kas rodo, kad pažeidimas yra lokalus ir tiesiogiai susijęs su PFA poveikiu. 16 B paveiksle pavaizduotas teleangiektazijos vystymasis parodė, kad abiejose akyse atsirado smulkių kraujagyslių išsiplėtimo požymių, tačiau jie buvo žymiai ryškesni dešinėje (OD) akyje, kurioje atlikta PFA injekcija. Pokyčiai tapo statistiškai reikšmingi jau po 14 dienų ( $p < 0,01$ ) ir išliko reikšmingi iki 21 dienos, kai tuo tarpu OS akyje teleangiektazijos lygis nepasiekė statistiškai reikšmingų pokyčių, lyginant su pradine būkle. Šie rezultatai rodo, kad 50  $\mu$ l PFA sukeltas uždegimas gali skatinti paviršinių kraujagyslių proliferaciją ir išsiplėtimą, būdingą lėtiniam blefaritui, SAS ar Meibomo liaukų disfunkcijai.



**Pav. 17.** Triušio akių vokų kraštų nuotraukų rinkinys.

17 paveikslo A nuotraukoje matomas akies voko kraštas su aiškiais apibrėžtais kontūrais ir gerai matomomis Meibomo liaukų angomis prieš PFA injekciją. 17 paveikslo nuotraukoje B pavaizduotas akies vokas praėjus 7 dienoms po PFA injekcijos, stebimas voko krašto suapvalėjimas bei paraudimas, nors Meibomo liaukų angos vis dar matomos. 17 paveikslo C

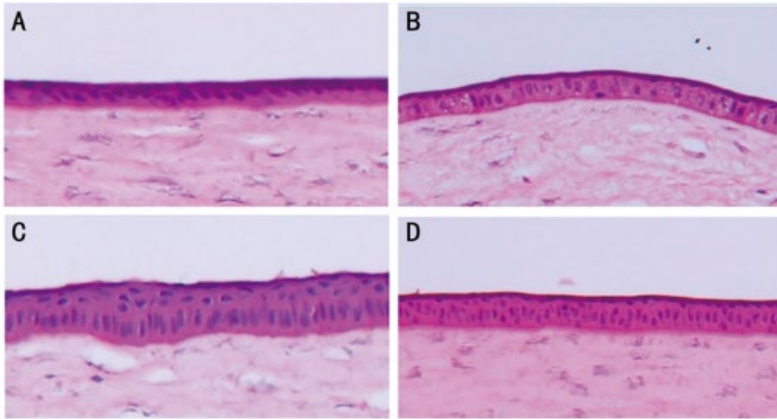
nuotraukoje matomas akies vokas praėjus 14 dienų po PFA injekcijos, voko kraštas patinęs, Meibomo liaukų angos sunkiai išžiūrimos, stebima ryški hiperemija ir išsiplėtusios kapiliarinės kraujagyslės. 17 paveikslo nuotraukoje D akies vokas praėjus 21 dienai po PFA injekcijos. Meibomo liaukų angos beveik nematomos arba visiškai užblokuotos, patinimas ir hiperemija išlieka panašaus intensyvumo kaip ir 17 paveikslo C nuotraukoje.



**Pav. 18.** Triušio ragenos nudažymo fluoresceinu nuotraukų rinkinys prieš ir po PFA suleidimų praėjus 21 dienai.

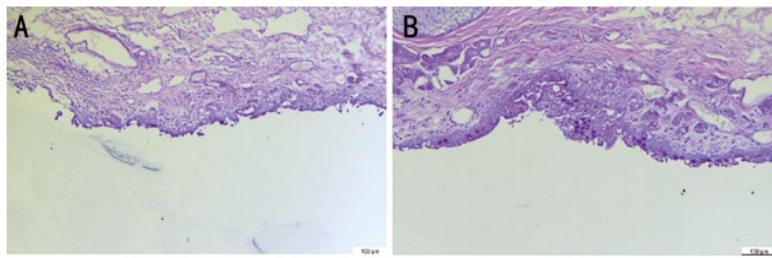
Vertinant šio gyvūnų modelio fluoresceinu nudažytos ragenos nuotraukas (žr. pav. 18), eksperimento metu buvo nustatyti tam tikri ragenos pokyčiai. 18 paveikslo nuotraukoje A dažymas atliktas prieš atliekant PFA injekcijas, kur matosi kelios nusidažiusios sritys ragenos periferinėje dalyje, o centrinė ragenos dalyje nusidažymas beveik nepastebimas. 18 paveikslo nuotraukoje B pateiktas ragenos vaizdas su fluoresceinu praėjus 7 d. po PFA injekcijų, ragenos paviršiuje stebimi ryškesni nusidažymo plotai, apimantys didesnę ragenos dalį. 18 paveikslo nuotraukoje C, ragenos vaizdas praėjus 14 dienų po PFA injekcijos, nusidažymo plotas dar labiau išplitęs, dažymosi intensyvumas padidėjęs, ypač centrinėje ragenos dalyje. Tokie pokyčiai rodo progresuojantį epitelio barjero pažeidimą ir paviršiaus nelygumus, būdingus sausos akies arba uždegiminio tipo pažeidimams. 18 paveikslo nuotraukoje D pateiktas ragenos vaizdas praėjus 21 d. po PFA injekcijų. Ragenos paviršiaus dažymosi sritis dar labiau išsiplėtusi ir apima beveik visą ragenos

plotą, o nusidažymas yra intensyvus. Šis vaizdas rodo reikšmingą epitelio vientisumo praradimą, galimą lėtinį uždegiminį procesą bei pažengusį akių paviršiaus pažeidimą, atsiradusį dėl ilgalaikio PFA poveikio.



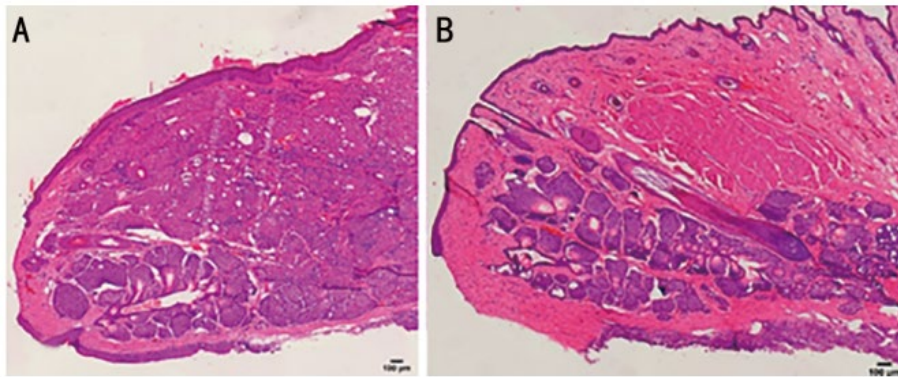
**Pav. 19.** Ragenos priekinio epitelio histologiniai pjūviai, nudažyti hematoksilinu ir eozinu.

19 paveikslo A ir B nuotraukose pavaizduotos akys, kurios buvo indukuotos ir jose aiškiai matomas ragenos epitelio suplonėjimas bei sumažėjęs ląstelių sluoksnių tankis, palyginti su kontrolinėmis akimis 19 paveikslo C ir D nuotraukose, kuriose epitelis išlieka vientisas ir daugiasluoksnis, su aiškiai išreikštais kelių sluoksnių ląstelių dariniais. Šie struktūriniai pokyčiai OD akyse rodo epitelio degeneraciją ir galimą ląstelių praradimą, būdingą sausų akių sindromui arba uždegiminės reakcijos sukeltam pažeidimui bei MLD. Kontrolinių akių C, D nuotraukų histologiniuose pjūviuose matomas išsaugotas epitelio vientisumas ir normali ląstelių struktūra, rodanti, kad po NaCl 0,9% indukcijos ragenos paviršius išlieka stabilus, o epitelio sluoksnis išlaiko fiziologinį storį bei vientisą barjerinę funkciją.



**Pav. 20.** Triušio akies junginės histologiniai pjūviai nudažyti PAS metodu.

20 paveikslo A nuotraukoje pavaizduotas indukuotos akies histologinis pjūvis, kur matomas akivaizdus taurinių (Gobleto) ląstelių kiekio sumažėjimas junginės epitelyje, o likusios ląstelės atrodo išretėjusios, su neaiškiai išreikštais sekretiniais granulių plotais. Tokie histologiniai pokyčiai rodo epitelio pažeidimą ir sekretinės funkcijos sumažėjimą, kurie dažnai pasireiškia esant MLD ar SAS. Šie pažeidimai gali lemti mucinų (ypač MUC5AC) gamybos sumažėjimą, dėl kurio susilpnėja ašarų plėvelės stabilumas ir pablogėja akies paviršiaus drėkinimas. Priešingai, 20 paveikslo B nuotraukoje OS akies junginėje matomas gausus Gobleto ląstelių kiekis, tolygiai išsidėstęs visame epitelio storyje, o PAS teigiamas dažymasis išryškina intensyviai rožines sekretorinių mucinų sankaupas. Tai rodo normalią sekretinę veiklą ir gerai funkcionuojantį ašarų plėvelės mucininį sluoksnį.



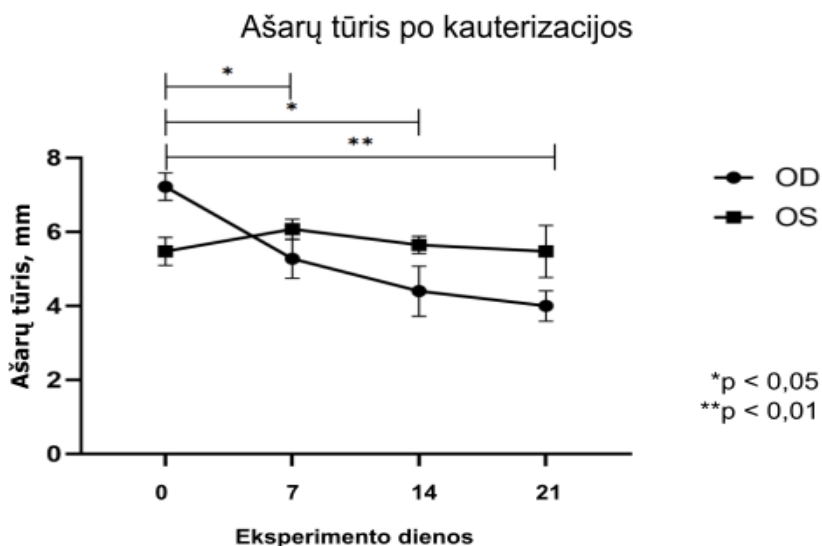
**Pav. 21.** Triušio akies voko skersinio pjūvio histologiniai paveiksliai, nudažyti hematoksilinu ir eozinu.

21 paveikslo A nuotraukoje pavaizduotas dešinės akies vokas praėjus 28 dienoms po PFA injekcijos, o 21 paveikslo B nuotraukoje, kairės akies vokas, į kurį buvo suleistas fiziologinis tirpalas (NaCl 0,9 %). 21 paveikslo A nuotraukoje akies voko audiniuose akivaizdžiai matomas uždegiminis procesas. Meibomo liaukų parenchima ir aplinkiniai jungiamieji audiniai yra infiltruoti uždegiminėmis ląstelėmis, tarp kurių gausu makrofagų, plazmocitų, eozinofilų ir neutrofilų. Šios ląstelės susitelkusios aplink liaukines struktūras bei kraujagysles, o tai rodo aktyvų imunologinį atsaką ir lėtinio uždegimo požymius. Pastebimas liaukinių struktūrų spindžių susiaurėjimas bei epitelio degeneraciniai pokyčiai, galintys lemti meibumo sekretijos sutrikimus ir prisidėti prie MLD vystymosi. Tokie pokyčiai dažnai siejami su ašarų plėvelės lipidinio sluoksnio pažeidimu bei padidėjusiu ašarų išgaravimu. Priešingai, 21 paveikslo B nuotraukoje pavaizduotame OS akies voke, kuris buvo injekuotas

fiziologiniu tirpalu, uždegiminių infiltratų nenustatyta. Meibomo liaukų struktūra išlieka išlaikyta, ląstelės išsidėsčiusios tolygiai, matomas aiškus epitelio, jungiamojo audinio liaukinių struktūrų atskyrimas. Tokia morfologija rodo normalų audinių vientisumą ir fiziologinę sekrecinę funkciją.

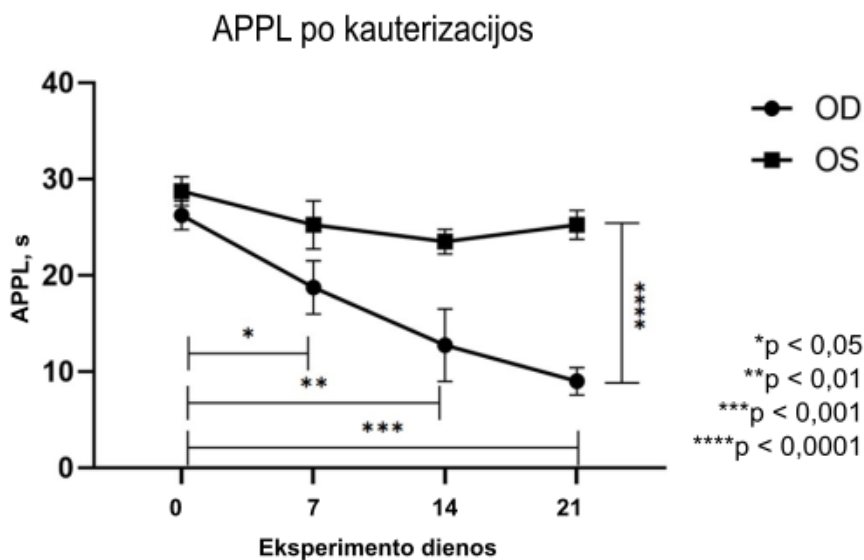
### 3.4. Meibomo liaukų disfunkcija po kauterizacijos

Atliktas Meibomo liaukų kauterizacijos metodas, siekiant pagrįsti šio metodo tinkamumą eksperimentiniam sausų akių sindromo modeliui, orientuotam į Meibomo liaukų disfunkcijos tyrimus. Taip pat siekta palyginti gautus rezultatus su kitais SAS ir MLD triušių modeliais.



**Pav. 22.** Širmerio testu nustatyti pokyčiai prieš ir po Meibomo liaukų disfunkcijos sukėlimo taikant kauterizacijos metodą.

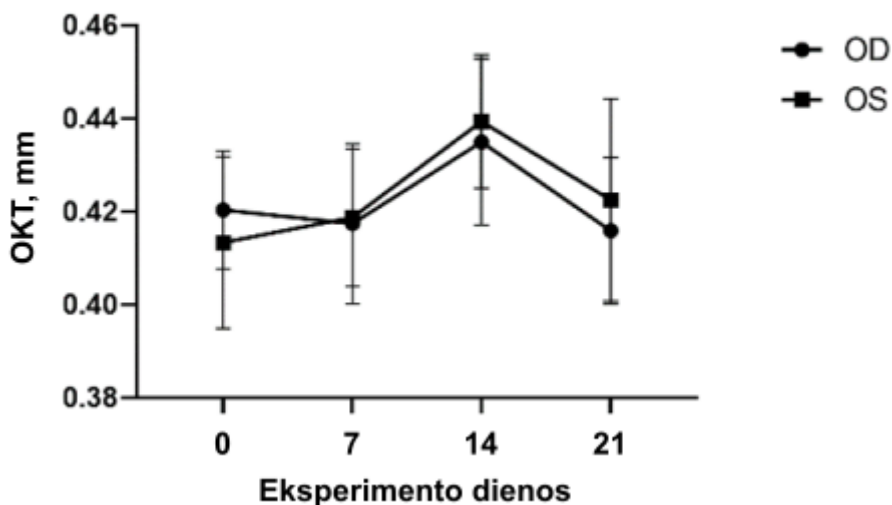
Pradiniame taške (0) abiejų akių ašarų kiekis buvo panašus - vidutiniškai apie 6–7 mm, o tai rodo normalią ašarų gamybą prieš intervenciją. Praėjus 7 dienoms po kauterizacijos, OD akyje stebėtas reikšmingas ašarų tūrio sumažėjimas iki ~5 mm ( $p < 0,05$ ), o OS akis išliko gana stabili. 14 dieną OD ašarų tūris toliau mažėjo iki ~4 mm ( $p < 0,05$ ), o tuo tarpu OS akyje pastebėtas tik nedidelis, statistiškai nereikšmingas sumažėjimas. 21 eksperimento dieną OD akies ašarų kiekis dar labiau sumažėjo - iki maždaug 3 mm ( $p < 0,01$ ), o tai rodo pažengusią sausų akių būklę ir Meibomo liaukų pažeidimą. Tuo tarpu OS akis išliko apie 5 mm riboje, išlaikydama didesnę ašarų gamybą ir stabilumą.



**Pav. 23.** Ašarų plėvelės plyšimo laiko testu nustatyti pokyčiai prieš ir po Meibomo liaukų disfunkcijos sukėlimo taikant kauterizacijos metodą

Diagrama (žr. pav. 23) pateikia ašarų plėvelės plyšimo laiko pokyčius dešinėje ir kairėje akyse eksperimentiniu laikotarpiu po Meibomo liaukų disfunkcijos sukėlimo taikant kauterizacijos metodą. Pradiniame taške (0) APPL abiejose akyse buvo panašus (~30 sekundžių). Po 7 dienų OD APPL reikšmingai sumažėjo iki maždaug 19 sekundžių (\*p < 0,05), o OS akyje išliko santykinai pastovus (apie 25 sekundės). 14 dieną OD akies APPL dar labiau sumažėjo iki 12 sekundžių (\*\*p < 0,01), tuo tarpu OS akyje pastebėtas tik nedidelis sumažėjimas iki maždaug 22 sekundžių. 21 dieną OD akies APPL sumažėjo iki mažiau nei 10 sekundžių (\*\*\*p < 0,001), tuo tarpu OS akyje išliko stabilus (apie 20 sekundžių). Šie rezultatai rodo reikšmingą APPL sumažėjimą OD akyje ir patvirtina, kad MLD sukėlimas kauterizacijos metodų reikšmingai sumažina ašarų plėvelės stabilumą.

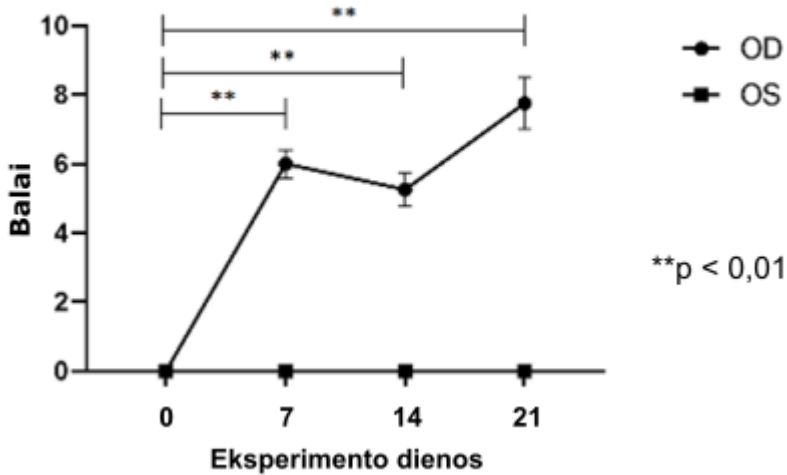
## Ragenos OKT po kauterizacijos



**Pav. 24.** Ragenos optinė koherentinė tomografija prieš ir po kauterizacijos modelio indukcijos.

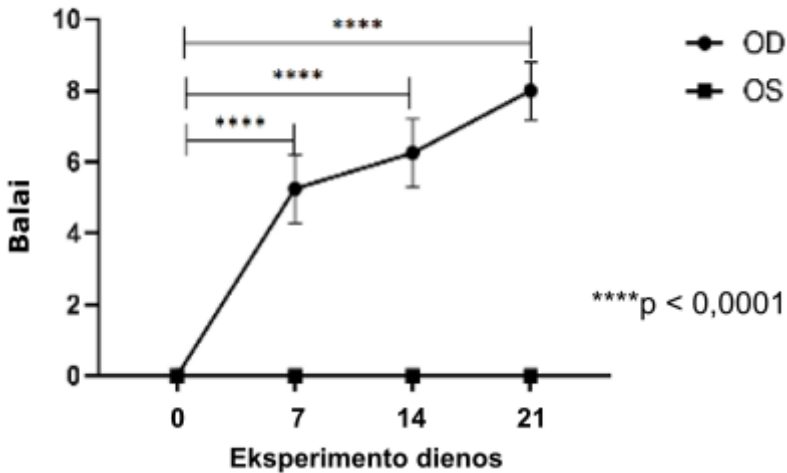
24 paveikslo diagrama rodo ragenos storio pokyčius, matuojant OKT dešinėje (OD) ir kairėje (OS) akyse per eksperimentinį laikotarpį po MLD sukėlimo kauterizacijos būdu. Prieš kauterizaciją 24 paveiksle (eksperimento diena 0) abiejų akių ragenos storis buvo panašus (apie 0,42 mm). Praėjus 7 dienoms, ragenos storis nesikeitė nei OD, nei OS akyse, o reikšmingų skirtumų tarp jų nenustatyta. Didžiausias storio padidėjimas buvo užfiksuotas 14 dieną (apie 0,45 mm), o tai galimai atspindi uždegiminę reakciją arba skysčių kaupimąsi dėl epitelio pažeidimų. Tačiau po 21 dienos ragenos storis sumažėjo ir beveik sugrįžo į pradinį lygį abiejose akyse (apie 0,42 mm). Rezultatai rodo, kad eksperimento laikotarpiu uždegiminis procesas mažėjo arba įvyko prisitaikymas prie pažeidimo, nes ragenos struktūriniai pokyčiai, matuoti OKT, buvo vidutinio sunkumo ir laikini. Šie pokyčiai galimai susiję su sausų akių sindromo išsivystymu ir vėlesne organizmo reakcija į Meibomo liaukų disfunkciją.

### Teleangiektazija po kauterizacijos (V.V.)



A.

### Teleangiektazija po kauterizacijos (A.V.)

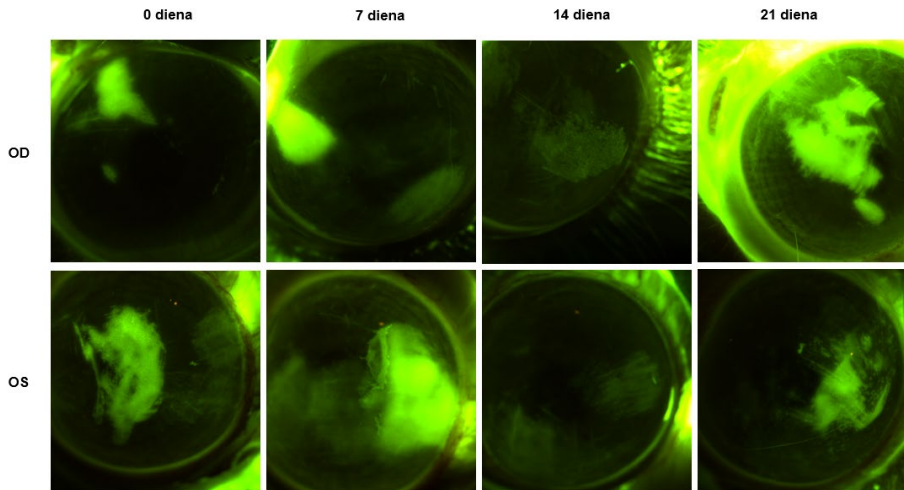


B.

**Pav. 25.** Viršutinio (V.V.) ir apatinio (A.V.) voko teleangiektazijos vertinimas.

25 paveikslo diagrama A iliustruoja teleangiektazijų balo pokyčius, stebėtus eksperimento metu viršutiniame voke dešinėje (OD) ir kairėje (OS) akyse po MLD sukėlimo kauterizacijos būdu. Pradiniame taške prieš vokų kauterizaciją teleangiektazijų balas abiejose akyse buvo 0. Praėjus 7 dienoms,

OD akyse teleangiektazijų balas žymiai padidėjo iki maždaug 6 ( $p < 0,01$ ), o OS akyje išliko 0. 14 dieną OD akyse balas išliko apie 6 ( $p < 0,01$ ), tačiau OS akyse reikšmingų pokyčių nebuvo nustatyta. 21 dieną OD akyse balas dar labiau padidėjo iki 8 ( $p < 0,01$ ), tuo tarpu OS akyse teleangiektazijų balas liko nepakitęs. 25 paveiklso diagramoje B pateikti teleangiektazijų balo pokyčiai apatinėje voko dalyje po MLD sukėlimo kauterizacijos būdu dešinėje (OD) ir kairėje (OS) akyse. Pradiniame taške prieš vokų kauterizaciją teleangiektazijų balas abiejose akyse buvo 0. Po 7 dienų OD akyse teleangiektazijų balas ženkliai padidėjo iki maždaug 6 ( $p < 0,0001$ ), o OS akyse išliko 0. Praėjus 14 dienų, OD teleangiektazijų balas dar labiau padidėjo iki 8 ( $p < 0,0001$ ), ir šis augimas tęsėsi iki 21 dienos, kai balas pasiekė beveik 9 ( $p < 0,0001$ ). Tuo tarpu OS akyse per visą eksperimentą jokie pokyčių nebuvo - balas išliko 0. Šie rezultatai rodo stiprų uždegiminį atsaką OD akyse, kai OS akys išliko nepažeistos viso eksperimento metu.



**Pav. 26.** Triušio ragenos nudažymo fluoresceinu nuotraukų rinkinys prieš ir po kauterizacijos.

26 paveikslo OD dešinė akis, kurios vokams buvo atlikta pilna Meibomo liaukų angų kauterizacija, ir OS kairė akis, kuri palikta sveika kaip kontrolinė akis. 0 dieną abiejose akyse matėsi tam tikri labiau nusidažę ragenos plotai, nes net sveikiems triušiams gali pasireikšti nedideli ragenos pažeidimai dėl aplinkos, laikymo sąlygų ir kitų veiksnių. Praėjus 7 dienoms, abiejose akyse buvo matomi lokalizuotai nudažyti ragenos plotai. 14 dieną nudažyti plotai vis dar buvo stebimi, tačiau ne tokie ryškūs. 21 dieną indukuotoje akyje OD

nudažytas plotas palyginus su 0 diena žymiai išplito, tuo tarpu OS plotas, palyginus su 0 diena, šiek tiek sumažėjo.



A.

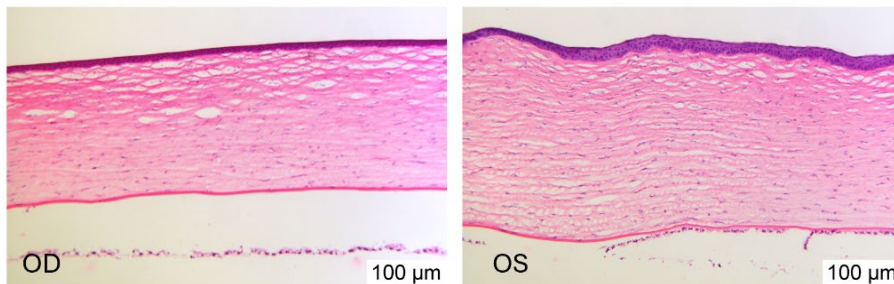


B.

**Pav. 27.** Triušių akių vokų kraštų nuotraukų rinkinys po MLD sukélimo taikant kauterizacijos metodą

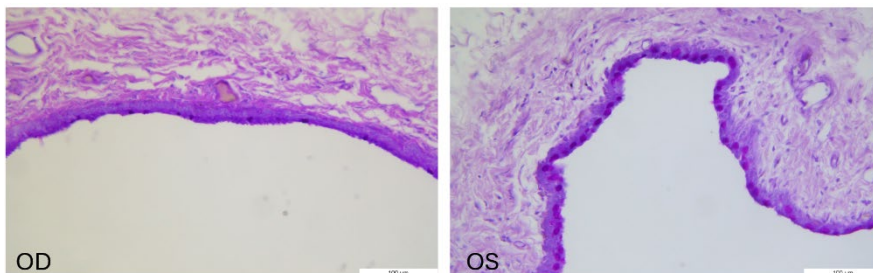
27 paveikslo A nuotraukų rinkinyje matomi OD vokų pokyčiai per tyrimo laikotarpį. 0 dieną iš karto po kauterizacijos matėsi pažeisti vokų kraštai. Po 7 dienų abu voko kraštai tapo uždegiminiais, Meibomo liaukų angos buvo nematomos. 14 dieną OD akių vokų kraštai tapo stipriai paraudę, nelygūs, o Meibomo liaukų angos vis dar neiškios. 21 dieną pastebimi ryškūs patologiniai pokyčiai: viršutinio voko krašte matosi kraujavimas ir voko įtrūkimas, galimai atsiradęs dėl antrinės infekcijos ir uždegimo. Apatinis

vokas taip pat paraudęs, surandėjęs ir nepilnai sugijęs. 27 paveikslo B nuotraukų rinkinyje pavaizduota OS kontrolinė akis, kuri viso tyrimo metu išliko nepažeista. Akies vokai atrodė sveiki, be uždegiminių pokyčių, o Meibomo liaukų angos išliko aiškiai matomos.



**Pav. 28.** Ragenos priekinio epitelio histologinė struktūra nudažyta HE metodu.

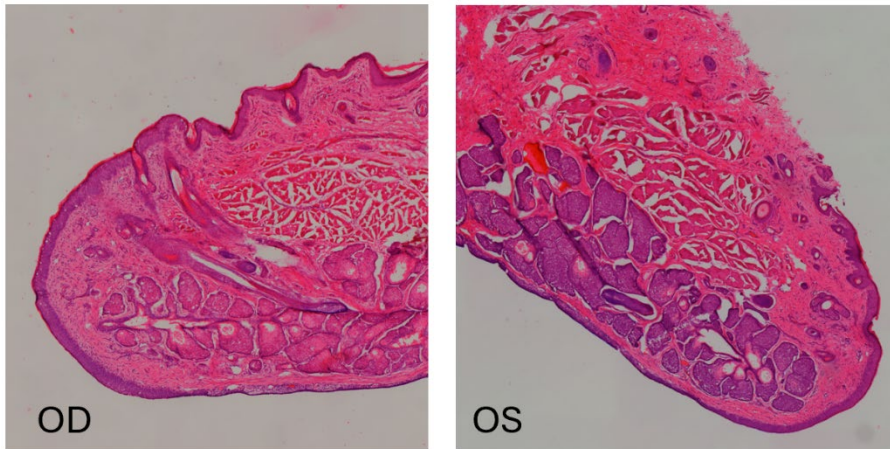
28 paveikslo kauterizuoto dešinio voko OD ragenos epitelio sluoksnis akivaizdžiai plonesnis ir retesnis, palyginus su sveiko kairės akies voko OS epitelio sluoksniu. Epitelio ląstelės atrodo mažiau kompaktiškos, o sluoksnių storis sumažėjo, kas rodo pažeidimą ir galimą regeneracijos sutrikimą. Šis paveikslėlis iliustruoja sausų akių sindromo ir Meibomo liaukų disfunkcijos įtaką ragenos epitelio struktūrai.



**Pav. 29.** Triušio akies junginės histologiniai pjūviai, nudažyti PAS metodu, po vokų kauterizacijos.

29 paveikslo OD (dešinės akies) junginė buvo paimta 21-ąją eksperimento dieną po kauterizacijos. Histologiniame preparate matyti sumažėjęs taurinių ląstelių tankis, palyginti su OS (kairės akies) sveikos junginės pavyzdžiu. Gobleto ląstelių skaičiaus sumažėjimas rodo pažeidimą, tikėtina susijusį su uždegimu ir mechaniniais pokyčiais, atsiradusiais po

kauterizacijos. Šis paveikslas iliustruoja, kaip eksperimentinė intervencija gali paveikti svarbių junginės struktūrinių komponentų funkcionalumą.



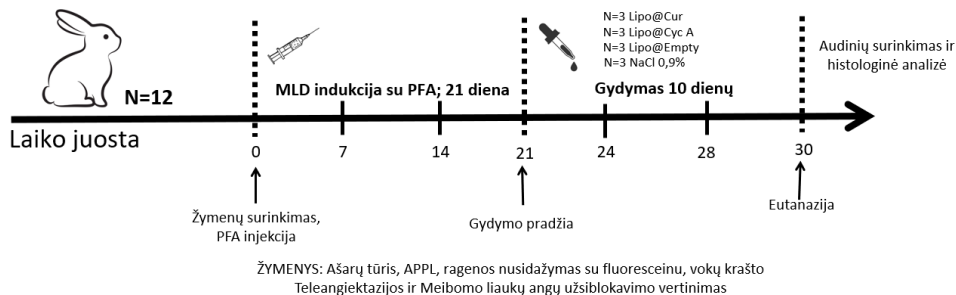
**Pav. 30.** Triušio akies voko skersinio pjūvio histologiniai vaizdai, nudažyti hematoksilinu ir eozinu surinkti, po kauterizacijos.

Kauterizuotos OD (dešinės akies) voko histologinis pjūvis (žr. Pav. 30) atskleidžia akivaizdžius Meibomo liaukų pokyčius. Liaukos labiau prisotintos sekreto, o jų latakuose gausu meibumo. Šie pakitimai gali būti susiję su liaukų disfunkcija ir obstrukcija, atsiradusia po kauterizacijos. Taip pat stebimi uždegiminiai pokyčiai, pasireiškiantys intensyvesniu rausvu eozinofiliniu dažymu, būdingu uždegiminėms ląstelėms ir audiniams. Sveikos kairės akies OS voko histologinio pjūvio pavyzdyje Meibomo liaukos dažėsi ryškiai mėlyna spalva, būdinga riebalinėms liaukoms, pabrėžiant jų normalią struktūrą ir funkciją. Be to, sveikame voke aiškiai išryškėjo aplinkiniai audiniai, įskaitant epidermį, dermą ir raumenis, kurie išliko struktūriškai nepakitę.

### 3.5. Liposominiai preparatai gydant Meibomo liaukų disfunkciją

Remiantis ankstesnių tyrimų rezultatais, CFA modelis buvo optimizuotas sumažinant injekcijos tūrį nuo 50  $\mu$ l iki 30  $\mu$ l. Šis modelis taip pat buvo patvirtintas tiriant liposominių preparatų efektyvumą gydant Meibomo liaukų disfunkciją. Šiame tyrime buvo panaudota 12 triušių (žr. Pav. 31), kuriems buvo sukelta MLD suleidus 30  $\mu$ l PFA pagal ankščiau pateiktą metodologiją. Prieš PFA suleidimą atlikti žymenų surinkimo testai, siekiant turėti pradinius

duomenis. Vėliau žymenys pakartotinai buvo renkami kas 7 dienas iki 21 dienos.



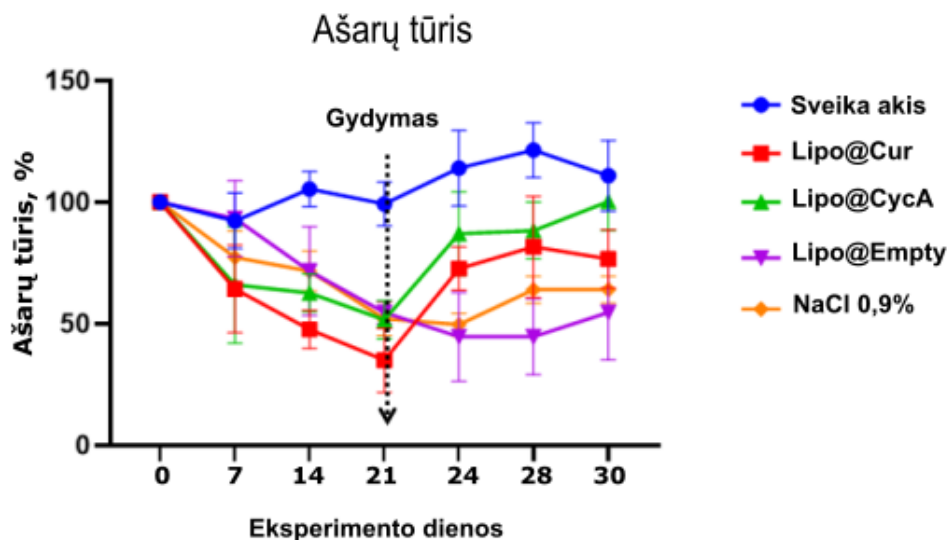
**Pav. 31.** Liposominių akių lašų tyrimo planas.

Praėjus 21 dienai po PFA injekcijos, pradėtas eksperimentinis gydymas naudojant 3 liposominius bandomuosius preparatus:

- Lipo@Cur – liposomų lašiukai, prisotinti kurkumino
- Lipo@CycA – liposomų lašiukai, prisotinti Cyklosporino A
- Lipo@Empty – liposomų lašiukai, be jokio aktyvaus preparato
- NaCl 0,9% - fiziologinis tirpalas.

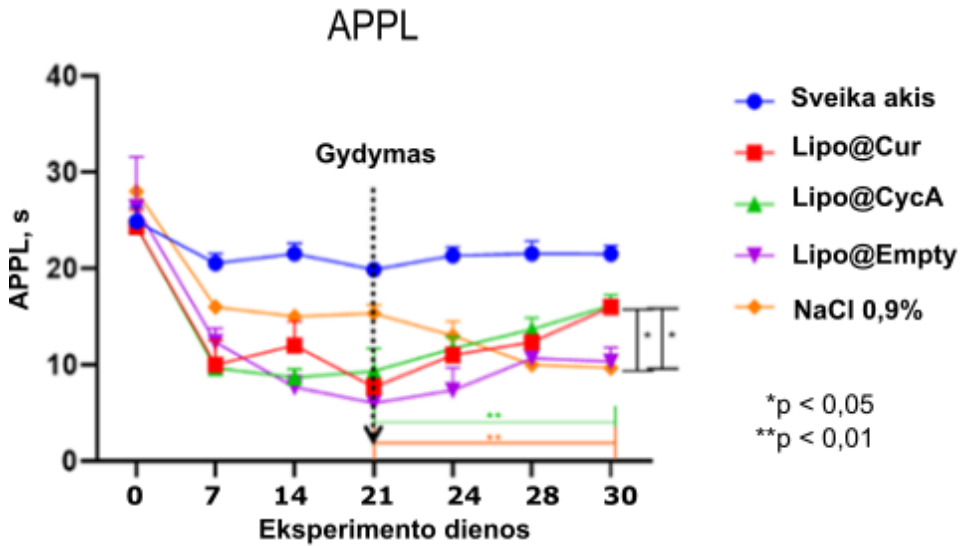
Tiriamieji ir kontroliniai preparatai buvo lašinami po 30  $\mu$ l, 2 kartus per dieną, 12 valandų intervalu. Gydymas truko 10 dienų. Prasidėjus eksperimentiniam gydymui, žymenys buvo renkami 24, 28 ir 30 eksperimento

dieną. Triušiai 30 eksperimento dieną buvo eutanazuoti. Tuo pačiu metu histologiniams tyrimams paimti ragenos, junginės ir vokų audiniai.



**Pav. 32.** Ašarų tūrio pokyčiai eksperimento metu, pateikti procentais.

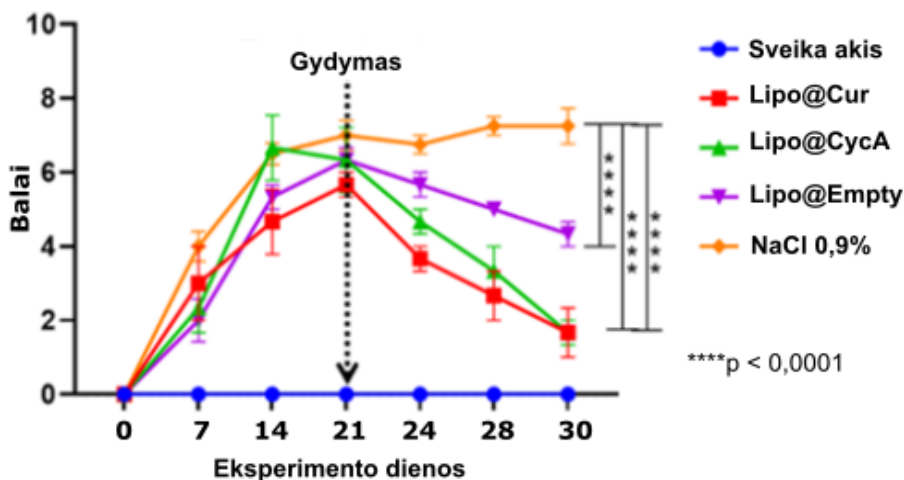
32 paveikslo grafikas iliustruoja ašarų kiekio dinamiką įvairiose eksperimentinėse grupėse per 30 dienų. Sveikos kontrolinės grupės (sveika akis) ašarų kiekis viso eksperimento metu išliko stabilus (~100 % ar daugiau), atspindėdamas sveiką ašarų plėvelę. Po uždegimo indukcijos (PFA injekcija, 0–21 dienos) visose eksperimentinėse grupėse, išskyrus kontrolę, ašarų kiekis sumažėjo (~40–50 %). Nuo 21 dienos pradėjus gydymą, Lipo@CycA grupėje pastebėtas stabilus ir reikšmingas ašarų kiekio gamybos padidėjimas (~85 % iki 30 dienos), o Lipo@Cur grupėje – vidutinis pagerėjimas (~70–80 %). Lipo@Empty grupėje reikšmingo terapinio poveikio neužfiksuota, ašarų kiekis išliko žemas (~50 %), panašiai kaip NaCl 0,9% grupėje, kurioje ašarų kiekis beveik neatsistatė (~40 %).



**Pav. 33.** Ašarų plėvelės plyšimo laikas eksperimento metu.

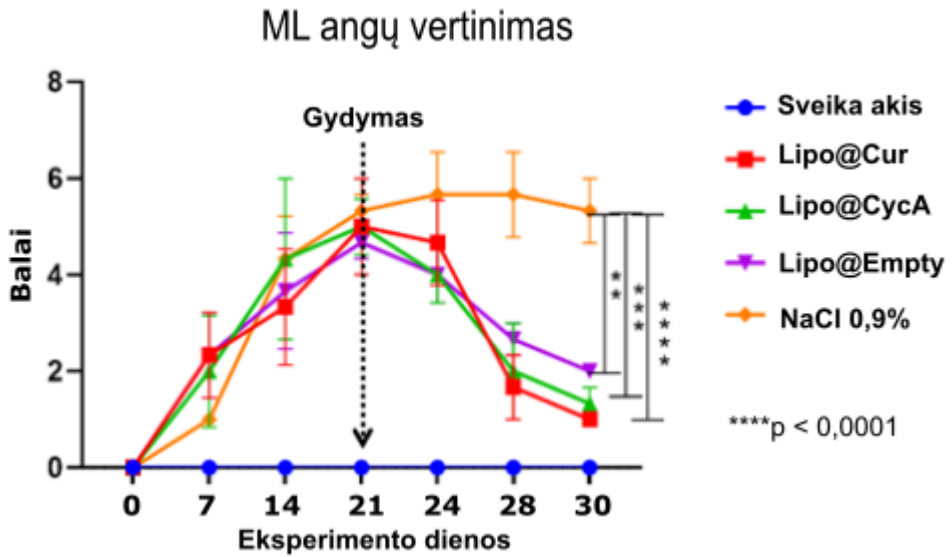
Grafikas, pateiktas 33 paveiksle, iliustruoja ašarų plėvelės stabilumo pokyčius įvairiose eksperimentinėse grupėse per 30 dienų laikotarpį. Sveikos kontrolinės grupės APPL reikšmė išliko pastovi (~25 s), o tai rodo stabilią ir sveiką ašarų plėvelę. Po uždegimo indukcijos (PFA injekcija, 0–21 dienos) visose eksperimentinėse grupėse, išskyrus kontrolinę, APPL reikšmė sumažėjo (~10 s), rodydama ašarų plėvelės destabilizaciją. Pradėjus gydymą (nuo 21 dienos), Lipo@Cur ir Lipo@CycA grupėse buvo pastebėtas statistiškai reikšmingas ( $p < 0,01$ ) APPL padidėjimas (~15–20 s iki 30 dienos), o ryškesnis stabilizuojantis poveikis nustatytas Lipo@Cur grupėje. Tuo tarpu Lipo@Empty grupėje reikšmingo pagerėjimo nenumatyta, APPL reikšmė išliko žema (~10 s), o NaCl 0,9% grupėje ašarų plėvelės stabilumas buvo mažiausias (~8 s). Šie rezultatai rodo, kad Lipo@Cur ir Lipo@CycA preparatai efektyviau gerina ašarų plėvelės stabilumą, palyginti su kitomis grupėmis.

## Teleangiektazija



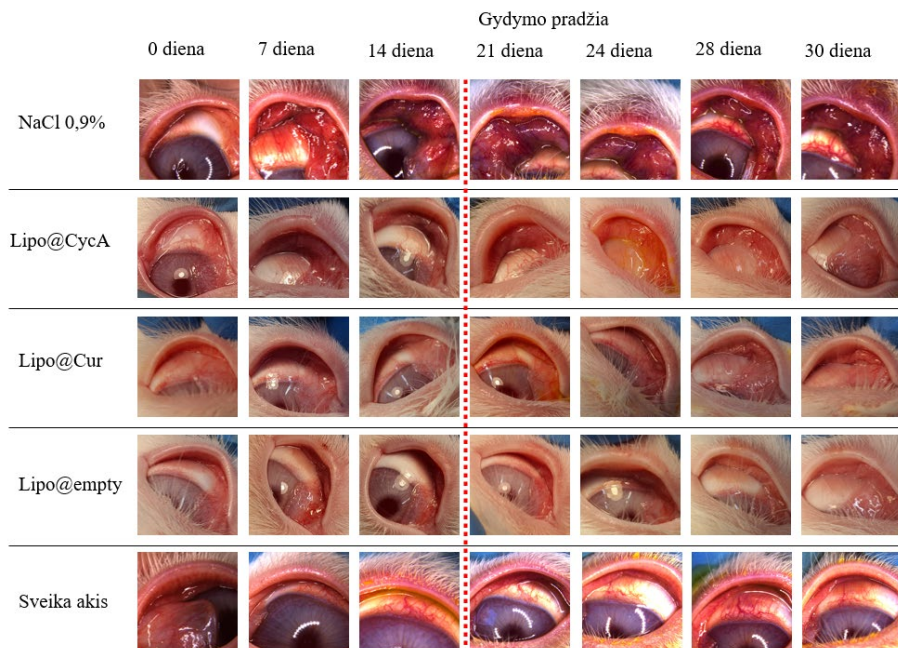
**Pav. 34.** Teleangiaktazijos pokyčių įvertinimas skirtingose eksperimentinėse grupėse.

34 paveiksle pateiktas grafikas parodo teleangiaktazijos progresavimą ir regresiją eksperimentinių grupių vokų junginės kraštuose per 30 dienų laikotarpį. Po PFA injekcijos (iki 21 eksperimento dienos) visose paveiktose grupėse buvo stebimas laipsniškas teleangiaktazijos balų didėjimas, kuris piką pasiekė 21 dieną. Tuo tarpu sveikos akies kontrolinėje grupėje teleangiaktazijos balai viso eksperimento metu išliko 0, rodydami normalią fiziologinę būklę. Nuo 21 dienos pradėjus gydymą, Lipo@Cur ir Lipo@CycA grupėse buvo fiksuojamas ryškus teleangiaktazijos sumažėjimas: iki 30 dienos balai sumažėjo iki ~2–3, kas rodo reikšmingą uždegimo regresiją. Lipo@Empty ir NaCl 0,9% negydytoje grupėje po 21 dienos teleangiaktazijos balai išliko aukšti, ypač NaCl 0,9% grupėje (~6 balai), kas rodo silpną arba visai nepasireiškusį terapinį poveikį. 30 dieną efektyviausias teleangiaktazijos sumažėjimas nustatytas Lipo@Cur ir Lipo@CycA grupėse (\*\*\*\*p < 0,0001), o NaCl 0,9% kontrolinėje grupėje patologijos mažėjimas buvo nereikšmingas arba visai nepastebėtas.



**Pav. 35.** Meibomo liaukų angų užsikimšimo grafikas eksperimento metu.

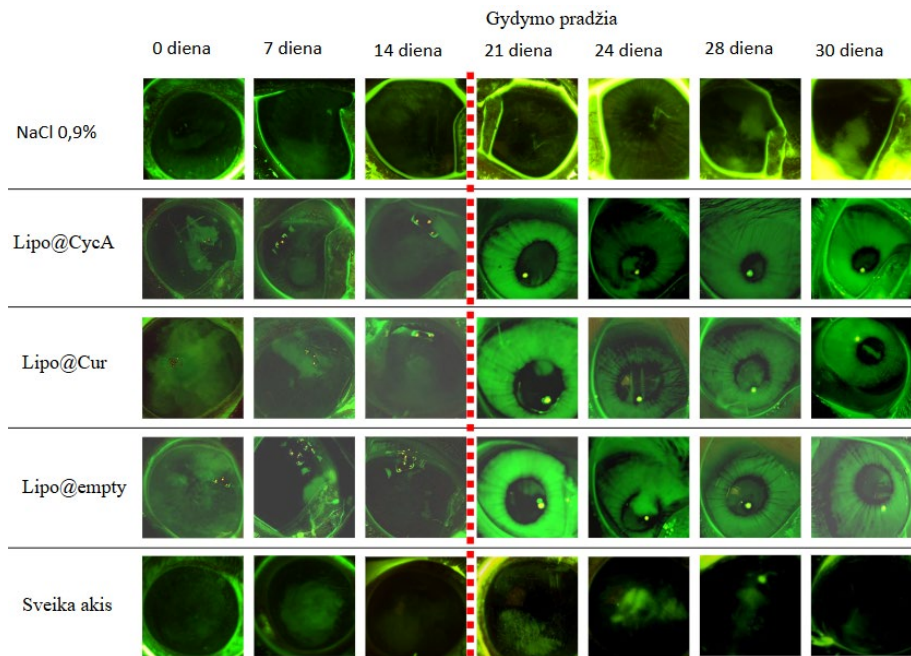
35 paveiksle pateiktas grafikas vaizduoja Meibomo liaukų angų užsikimšimo progresiją ir regresiją per 30 eksperimento dienų. Sveikos akies kontrolinėje grupėje balai išliko 0, rodydami normalią vokų būklę ir neužsikimšusias liaukų angas. PFA injekcija (iki 21 dienos) sukėlė užsikimšusių liaukų angų balų didėjimą visose grupėse, kuriose buvo suleistas PFA ir pasiekė didžiausią reikšmę (~6 balai). Vertinant užsikimšusių Meibomo liaukų angų balus 30 eksperimento dieną, tarp tiriamų grupių išryškėjo aiškūs skirtumai. Lipo@Cur ir Lipo@CycA grupėse balai sumažėjo iki ~1–2, rodydami beveik visišką liaukų angų atsikimšimą ir sekreto tekėjimo atkūrimą. Šių dviejų akių lašų preparatų poveikis buvo panašus, tačiau Lipo@CycA grupėje pastebėtas šiek tiek ryškesnis regresinis efektas, kuris gali būti susijęs su stipresniu ciklosporino A imunomoduliaciniu poveikiu. Tuo tarpu Lipo@Empty ir NaCl 0,9% grupėse balai išliko aukštesni, ypač NaCl 0,9% grupėje (~5 balai), kas rodo silpną arba visai nepasireiškusį terapinį efektą. Šie rezultatai pabrėžia Lipo@Cur ir Lipo@CycA preparatų veiksmingumą mažinant Meibomo liaukų angų užsikimšimą, lyginant su kontrolinėmis grupėmis.



**Pav. 36.** Skirtingų grupių triušių vokų nuotraukų rinkinys eksperimento laikotarpyje.

36 paveiksle pateiktos nuotraukos iliustruoja vokų ir jų krašto būklės pokyčius skirtingose eksperimentinėse grupėse 0, 7, 14, 21, 24, 28 ir 30 eksperimento dienomis. Pirmuoju eksperimentiniu etapu (0–21 d.), po PFA injekcijų, visose paveiktose grupėse buvo stebimas progresuojantis vokų kraštų uždegimas: atsirado teleangiektazijos, paraudimas bei sekrecijos pokyčiai. Tuo tarpu sveikų akių kontrolinėje grupėje akių vokų būklė išliko normali. NaCl 0,9% grupėje 7 ir 14 dienomis akių vokai buvo ryškiai paraudę, patinę ir padengti išskyromis. 21 dieną būklė dar labiau pablogėjo - pastebimas intensyvus audinių paraudimas, eksudato sankaupos ir ryškus uždegimas. Kadangi šioje grupėje vietoj liposominių preparatų buvo naudojamas NaCl 0,9% tirpalas, 21–30 dienomis uždegiminiai pokyčiai išliko nepakitę arba dar labiau progresavo. Lipo@CycA grupėje gydymas pradėtas 21 dieną lėmė reikšmingą pagerėjimą. 24 dieną akių vokų audinių būklė atrodė švelniai paraudusi, sumažėjęs uždegimas ir eksudatai. 30 dieną akys beveik normalizavosi – uždegimas liko minimalus, o akių vokų audiniai atrodė sveikesni. Lipo@Cur grupėje gydymo pradžioje buvo stebimas vidutinis pagerėjimas. 24 ir 28 dienomis uždegimas mažėjo, tačiau eksudatai ir audinių paraudimas vis dar buvo pastebimi. 30 dieną akių būklė buvo geresnė, tačiau dar ne visiškai normalizuota, išliko uždegiminių pokyčių požymių.

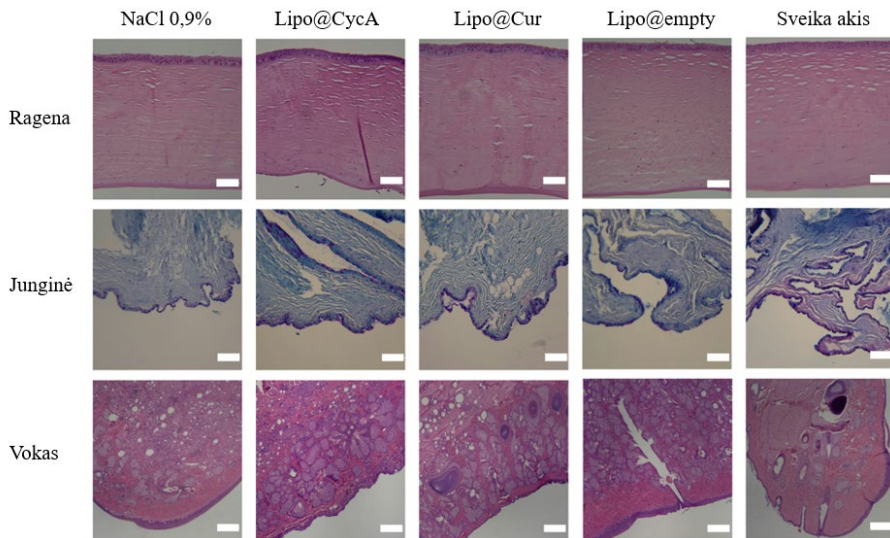
Lipo@Empty grupėje gydymas reikšmingų rezultatų neparodė. 24–30 dienomis akių būklė liko panaši į tą, kuri buvo 21 dieną, uždegiminiai pokyčiai ir eksudatai išliko ryškūs. Pradėjus gydymą 21 dieną (pažymėta vertikalia punktyrine linija), Lipo@Cur ir Lipo@CycA grupėse stebimas palaipsnis klinikinių požymių sumažėjimas: mažėjo paraudimas, kraujagyslių išsiplėtimas bei sekrecijos sankaupos vokų kraštuose. 24–30 dienomis šių grupių vokų būklė žymiai pagerėjo, vizualiai artėdama prie sveikos kontrolinės grupės. Tuo pačiu Lipo@Empty ir NaCl 0,9 % grupėse klinikinių požymių regresija buvo žymiai mažesnė: išliko paraudimas, hiperemija bei teleangiektazijos. Tai patvirtina ribotą arba visai nepasireiškusį šių kontrolinių preparatų terapinį poveikį.



**Pav. 37.** Triušio ragenos nudažymo fluoresceinu rezultatų dinamika eksperimentinėse grupėse per 30 dienų laikotarpį.

37 paveiksle 0 dieną pavaizduotos triušių ragenos prieš suleidžiant PFA. Net ir neindukuotose triušių akyse matomi nusidažantys plotai, atspindintys pradinę ragenos būklę. 7, 14 ir 21 dienomis triušiai buvo stebimi ir vertinami, analizuojant ragenos paviršiaus dažymosi pokyčius bei išryškėjusius plotus, kurie indikavo ragenos pažeidimo laipsnį. Sukėlus MLD, nuo 21 dienos, surinkus pradinis duomenis, triušiai buvo suskirstyti į gydomąsias ir kontrolines grupes, o gydomosioms grupėms pradėti lašinti liposominiai

preparatai. NaCl 0,9% grupėje dažymas fluoresceinu iki 21 dienos rodė laipsnišką ragenos pažeidimų progresavimą, matėsi intensyvios fluoresceino kaupimosi sritys, o dėl netaikyto gydymo (21–30 dienomis) pažeidimai išliko ryškūs. Lipo@CycA grupėje, gydymą pradėjus 21 dieną, buvo stebimas reikšmingas ragenos paviršiaus atsistatymas. 30 dieną pažeidimų beveik nebesimatė, o tai rodo preparato terapinį poveikį ir ragenos regeneracijos skatinimą. Lipo@Cur grupėje taip pat buvo stebimas ragenos paviršiaus atsistatymas po gydymo pradžios, tačiau efektas šiek tiek silpnesnis nei Lipo@CycA grupėje - iki 30 dienos išliko nedideli pažeidimai. Lipo@Empty grupėje gydymas nebuvo toks veiksmingas, nes pažeidimai išliko intensyviūs, panašiai kaip NaCl 0,9% grupėje. 30 eksperimento dieną rezultatai parodė, kad negydytoje grupėje ragenos nusidažymas išliko žymiai intensyvesnis, palyginus su grupėmis, kuriose buvo naudojami liposominiai preparatai, o tai rodo jų teigiamą poveikį mažinant ragenos pažeidimus.



**Pav. 38.** Pateikti histologiniai ragenos, junginės ir voko pjūviai, nudažyti hematoksilino-eozino bei periodinės rūgšties-Schiff (PAS) metodais.

38 paveiksle ragena, nudažyta HE dažais, parodė reikšmingus skirtumus tarp grupių. Negydytoje grupėje pastebėta daugiau mėginių su plonesniu epitelio sluoksniu, kas rodo epitelio degradaciją ir ragenos pažeidimą. Tuo tarpu gydytų grupių (Lipo@CycA ir Lipo@Cur) mėginiuose epitelio storis buvo panašus į sveikos akies ragenos epitelio storį, ypač Lipo@CycA grupėje, kurioje regeneracijos efektyvumas buvo didžiausias. Lipo@Empty grupėje pokyčiai nebuvo reikšmingi, lyginant su negydyta grupe. Junginės PAS

dažymas atskleidė gobletų ląstelių kiekio skirtumus tarp grupių. Sveikos kontrolinės grupės junginėje taurinių ląstelių kiekis buvo normalus, tuo tarpu negydytoje grupėje NaCl 0,9% jų skaičius buvo reikšmingai mažesnis, kas rodo uždegiminį procesą ir sumažėjusią gleivinės funkciją. Gydytų grupių, ypač Lipo@CycA mėginiuose, pastebėtas dalinis gobletų ląstelių kiekio atsigavimas, kas rodo terapinį poveikį. Akies voko histologinė analizė parodė gausias difuzines histiocitines granulomas, kurių sudėtyje buvo nedidelis kiekis eozinofilų ir plazmocitų. Šios granulomos buvo aptiktos tiek negydytų, tiek gydytų grupių mėginiuose. Vis dėlto, Lipo@CycA ir Lipo@Cur grupėse uždegiminis atsakas buvo mažesnis, palyginti su negydyta grupe, o sveikos kontrolinės grupės audiniai išliko be pataloginių pokyčių. Histologinė analizė parodė, kad Lipo@CycA preparatas efektyviausiai atstatė ragenos epitelio storį ir sumažino uždegimo požymius junginėje bei voke, palyginti su kitomis gydymo grupėmis. Lipo@Cur pastebėtas terapinis poveikis, tačiau silpnesnis. Lipo@Empty grupėje poveikis buvo minimalus, o negydytos grupės mėginiai atskleidė ryškius uždegimo ir audinių degeneracijos požymius.

## 4. REZULTATŲ APTARIMAS

### 4.1. Ašarų liaukų pašalinimas chirurginiu būdu

Atlikus triušio AL, HL ir TVM chirurginę rezekciją, gauti rezultatai suteikia svarbių įžvalgų apie sausų akių sindromo patofiziologiją ir jo poveikį išoriniams regos organams. Ašarų tūrio testas, kuriuo matuojama ašarų gamyba, parodė vidutinį 50% sumažėjimą, o tai rodo ryškų ašarų plėvelės vandeninio komponento sumažėjimą. Šis rezultatas atitinka prognozuotą efektą po ašarų liaukų pašalinimo, nes pagrindinis ašarų gamybos šaltinis buvo pažeistas. Šį rezultatą taip pat patvirtina ir JAV mokslininko Roberto Honkaneno duomenys, kurie rodo, kad chirurgiškai pašalinus ašarų liaukas, ašarų gamyba sumažėja maždaug 50 %. (251) Tačiau kai kurie autoriai nurodo, kad po analogiškos operacijos ašarų gamybą nesumažėjo (252,253). Vis dėlto verta pažymėti, kad šiuose tyrimuose ašarų tūrio matavimai buvo pradėti tik praėjus maždaug vienam mėnesiui po operacijos, todėl tikėtina, jog per šį laikotarpį galėjo įvykti kompensaciniai procesai, tokie kaip papildomų liaukinių struktūrų ar junginės ląstelių aktyvacija. Šis metodologinis skirtumas gali paaiškinti literatūroje pateikiamus skirtingus rezultatus. Ašarų plėvelės plyšimo laiko tyrimas atskleidė kritiškai sumažėjusį plėvelės stabilumą: nuo vidutiniškai 30 sekundžių iki vos 5 sekundžių per eksperimento laikotarpį. Toks pokytis pabrėžia, kad pažeistas lipidinis sluoksnis nebeatlieka savo apsauginės funkcijos, todėl ašarų plėvelė tampa itin nestabili, o ašarų išgaravimo greitis padidėja. Dėl to akies paviršius tampa labiau pažeidžiamas aplinkos poveikiui, atsiranda sausumo pojūtis ir uždegiminiai procesai. Panašius rezultatus pateikė ir R. Honkanenas, kuris nurodė, kad po ašarų liaukų chirurginio pašalinimo APPL sumažėjo iki 90 % nuo pradinės reikšmės (251). Šiuos pokyčius papildė nudažymo fluoresceinu rezultatai, kurie parodė žymų ragenos ir junginės epitelio pažeidimą. Dažymo intensyvumo padidėjimas koreliavo su sumažėjusiu ašarų gamybos kiekiu ir APPL, kas liudija, kad ašarų plėvelės apsauginių funkcijų praradimas lemia mechaninius akies paviršiaus pažeidimus mirksėjimo metu. Šie rezultatai patvirtina, kad SAS vystymosi procese trūkstama ašarų plėvelės apsauga turi daugiafaktorinį poveikį akies paviršiaus sveikatai. Ragenos OKT tyrimo rezultatai, rodantys nedidelį padidėjimą eksperimento laikotarpiu, gali atspindėti subtilius struktūrinius pokyčius arba patinimą, reaguojant į lėtinį epitelio pažeidimą ir uždegimą. Triušių ragenos OKT yra retai taikomas tyrimo metodas ir todėl gautų rezultatų palyginimas su kitų autorių duomenimis yra sudėtingas. Tai gali būti siejama su keliais veiksniais: OKT įranga yra brangi, jos taikymui reikia specialių ekspertinių žinių, o triušių modelis matavimo metu reikalauja

specifinių gyvūnų fiksavimo metodų. Vienintelė tiesioginė palyginimo galimybė yra sveikų triušių centrinės ragenos storio vertės. Mūsų prieš operaciją gauti OKT matavimai atitinka literatūros duomenis - mokslininko Kamran Hosseini (Mastrichto universitetas, Nyderlandai) tyrime nurodyta, kad triušių centrinės ragenos storis yra apie 350  $\mu\text{m}$  (254). Surinkti histologiniai mėginiai, parodantys sumažėjusį ragenos priekinio epitelio storį daugumoje pjūvių, suteikia ryškų įrodymą apie degeneracinius pokyčius ląstelių lygiu. Šis epitelio retėjimas rodo sutrikusią ląstelių apykaitą ir regeneraciją, greičiausiai dėl nuolatinio tinkamos ašarų plėvelės apsaugos ir maitinimo trūkumo. Be to, histologiniuose mėginiuose pastebėtas sumažėjęs gobletų ląstelių kiekis junginėje atskleidžia kitą kritinį sausų akių patofiziologijos aspektą. Gobletų ląstelės yra būtinos mucinų gamybai, kurie padeda išlaikyti ašarų plėvelės stabilumą ir tolygų pasiskirstymą akies paviršiuje. Jų sumažėjimas rodo pažeistą gleivinės sluoksnį, didinančią ašarų plėvelės nestabilumą ir dar labiau prisidedantį prie akių paviršiaus pažeidimo bei uždegimo ciklo. Panašius histologinius pakitimus savo tyrime aprašė ir Li N. su bendraautoriais, kurie po AL, HL ir TVM chirurginio pašalinimo triušių modelyje nustatė ragenos priekinio epitelio suplonėjimą ir reikšmingą gobletų ląstelių kiekio sumažėjimą junginėje (255)

Bendrai galima teigti, kad triušio ašarų liaukų pašalinimo modelio rezultatai veiksmingai parodo sumažėjusios ašarų gamybos kaskadinį poveikį išoriniams regos organams. Ryškus ašarų plėvelės stabilumo sumažėjimas, patvirtintas APPL tyrimais ir padidėjusiu nudažymu fluoresceinu, taip pat histologiniai ragenos epitelio ir junginės gobletų ląstelių pokyčiai, pabrėžia kompleksinį sausų akių ligos pobūdį. Šie rezultatai akcentuoja esminį išsamių terapinių metodų poreikį, skirtą ne tik ašarų papildymui, bet ir ašarų plėvelės stabilumo bei akies paviršiaus vientisumo atkūrimui.

#### 4.2. Benzalkonio chlorido indukuotas SAS modelis

Triušio modelio su benzalkonio chloridu rezultatai suteikia naudingų įžvalgų apie BAK poveikį regos organų išorinio paviršiaus būklei per 21 dienų laikotarpį. Ašarų tūris (žr. Pav. 9) viso eksperimento metu nereikšmingai padidėjo. Vis dėlto šis pokytis rodo, kad BAK poveikis regos organų išoriniam paviršiui sukelia fiziologinį kompensacinį atsaką - padidėjusi ašarų gamybą. Tokia reakcija laikoma gynybiniu mechanizmu, kai akies paviršiaus audiniai, reaguodami į cheminį dirgiklį, suaktyvina refleksinį ašarojimą. Padidėjęs ašarų kiekis padeda mechaniškai pašalinti dirginančias medžiagas nuo akies paviršiaus, sumažinti uždegiminių mediatorių koncentraciją ir palaikyti drėgmės balansą. Šie rezultatai leidžia teigti, kad mūsų tyrimo sąlygomis

BAK neturėjo ryškios įtakos ašarų plėvelės vandeniniam komponentui. Vis dėlto literatūroje pateikiama ir prieštaringų duomenų. Pavyzdžiui Thacker M. ir bendraautoriai savo tyrime nustatė reikšmingą ašarų gamybos sumažėjimą triušiams, kuriems 0,1% BAK tirpalas buvo lašinamas tris kartus per dieną keturias savaites. (256) Autoriai pažymėjo, kad matavimai buvo atliekami gyvūnams esant anestezuotiems, todėl tai galėjo turėti įtakos refleksinio ašarojimo slopinimui ir gautiems rezultatams. Tuo tarpu kitame tyrime, kurį su bendraautoriais atliko Carpena-Tores C., nustatyta priešingą tendencija – triušiams lašinant 0,2% BAK tirpalą, ašarų tūris reikšmingai padidėjo, palyginti su kontroline grupe (257). Šie tyrimų rezultatų skirtumai gali būti siejami su skirtinga BAK koncentracija, lašinimo dažniu bei taikyta matavimo metodologija. Tačiau reikšmingas ašarų plėvelės plyšimo laiko sutrumpėjimas (žr. pav. 10) - nuo maždaug 18 iki 8 sekundžių, - rodo ryškų ašarų plėvelės stabilumo sumažėjimą. Šis APPL sutrumpėjimas leidžia manyti, kad BAK pažeidžia ašarų plėvelės lipidų arba mucino sluoksnį, todėl didėja jos garavimas ir sausėja išorinis akies obuolio paviršius. Panašius APPL sumažėjimo rezultatus gavo ir minėtas autorius Carpena-Tores C. su bendraautoriais, o tai rodo neigiamą BAK poveikį ašarų plėvelei skirtinguose triušių akių modeliuose (257).

OKT rezultatai (žr. pav. 11) rodo ragenos pastorėjimą, palygti matavimus prieš indukcijos pradžią ir 14 bei 21 eksperimento dieną. Tai greičiausiai atspindi ragenos stromos edemą arba patinimą kaip atsaką į lėtinį epitelio pažeidimą ir barjero sutrikimą, kurį sukelia BAK. Šis nustatymas atitinka fluoresceinu rezultatus (žr. pav. 12), nes eksperimento pabaigoje kai kuriose ragenose nustatytos opos ir intensyviau nusidažę ragenos plotai. Šios opos ir padidėję dažymo plotai rodo epitelio irimą bei padidėjusį pralaidumą, todėl fluoresceinas gali prasiskverbti į gilesnius ragenos sluoksnius. Ragenos opų buvimas pabrėžia BAK sukeltą epitelio pažeidimo sunkumą.

Histologinė ragenos pjūvių analizė parodė indukuotų akių OD pasikartojančius epitelio sluoksnio suplonėjimus (žr. Pav. 13), palyginus su sveikų akių mėginiais, kas atitinka pastebėtus epitelio pažeidimus intensyviai nusidažiusius fluoresceiną. Priekinio epitelio sluoksnio plonėjimas rodo sutrikusią ląstelių regeneraciją ir padidėjusį jautrumą mechaniniams bei aplinkos veiksnių sukeltiems pažeidimams. Tokie pokyčiai dažnai siejami su ilgalaikiu ašarų plėvelės nestabilumu ir sumažėjusiu jos apsauginiu poveikiu. Sumažėjęs gobletų ląstelių kiekis junginėje dar labiau didina ašarų plėvelės nestabilumą, nes šios ląstelės yra būtinos mucinų, kurie palaiko ašarų plėvelės vientisumą ir pasiskirstymą akies paviršiuje, gamybai. Labai panašius histologinius pokyčius su bendraautoriais aprašė Zhou T., kurio tyrime

nustatyta reikšminga gobleto ląstelių redukcija ir netvarkingas ragenos priekinio epitelio ląstelių išsidėstymas, patvirtinantis BAK sukkelto toksinio poveikio mechanizmą akių paviršiaus audiniuose (258).

Įdomu tai, kad histologiniai akių vokų mėginiai neparodė matomo uždegimo požymių, o tai leidžia manyti, kad pirminis BAK poveikis yra lokalizuotas akies paviršiuje ir nesukelia platesnio uždegiminio atsako akių vokų audiniuose. Voko uždegimo nebuvimas gali rodyti, kad BAK citotoksinis poveikis yra ryškesnis subtilioms ragenos ir junginės epitelio ląstelėms, kurios yra tiesiogiai veikiamos konservanto.

Apibendrinant BAK triušio modelio rezultatus, galima teigti, kad jie patvirtina žalingą BAK poveikį akies paviršiui, ypač pabrėžiant jo poveikį ašarų plėvelės stabilumui, ragenos vientisumui ir junginės gobleto ląstelių tankiui. Nepaisant stabilaus ašarų kiekio, reikšmingas APPL sumažėjimas ir ragenos OKT rodmenų padidėjimas, kartu su ragenos opomis ir retėjančiu epitelium, rodo neigiamas BAK poveikio pasekmes. Dėl šių priežasčių būtina atsargiai naudoti BAK turinčius oftalmologinius tirpalus ir skatinti alternatyvių konservantų ar preparatų be konservantų kūrimą, siekiant sumažinti galimą žalingą poveikį akies paviršiui.

#### 4.3. Meibomo liaukų disfunkcija su PFA

Triušio Meibomo liaukų disfunkcijos modelio, naudojant paruoštą Freund'o adjuvantą injekcijas, rezultatai suteikia įtikinamų įžvalgų apie sukkelto MLD pataloginį poveikį ir atskleidžia reikšmingus skirtumus tarp pažeistų ir kontrolinių akių. 14 paveiksle pateikti ašarų tūrio testo rezultatai rodo, kad ašarų kiekis abiejose akyse pradėjo mažėti 7 dieną po atliktų injekcijų. Dešinėje akyje mažėjimas tęsėsi iki 21 eksperimento dienos, tuo tarpu kairėje akyje, kur buvo padaryta injekcija su NaCl 0,9%, ašarų tūris normalizavosi jau 14 dieną ir tik nežymiai sumažėjo 21 dieną. Šis skirtingas atsakas pabrėžia ilgalaikį PFA poveikį ašarų gamybai ir rodo lėtinį uždegiminį procesą, labiau pažeidžiantį ašarų liaukos funkciją. Reikšmingas ašarų plėvelės stabilumo sumažėjimas buvo apie 50% dešinėje akyje, palyginti su nepakitusiu APPL kairėje akyje, o tai tik dar labiau patvirtina PFA sukkelto uždegimo poveikį ašarų plėvelės stabilumui (žr. Pav. 15). Dešinės akies ašarų plėvelės stabilumo sutrikimas greičiausiai atsiranda dėl sumažėjusios ašarų gamybos ir kokybinių meibumo plokščių, atspindinčių liaukų funkcinių pablogėjimą. Laipsniškas užsikimšusių Meibomo liaukų angų skaičiaus didėjimas dešiniajame voke pavaizduotas 16 A paveiksle, ypač ryškus 14 ir 21 dieną, kontrastuoja su neužsikimšusiomis angomis kairiajame voke. Šis procesas pabrėžia tiesioginį PFA sukkelto uždegimo poveikį Meibomo liaukų

obstrukcijai ir patvirtina šio modelio tinkamumą tiriant liaukų užsikimšimo mechanizmus bei jų vaidmenį MLD patogenezėje. Talengiektazijų atsiradimas abiejose akyse pavaizduotas 16 B paveiksle, su žymiai didesniais pokyčiais dešinėje akyje, rodo, kad nors sisteminiai veiksniai gali sukelti lengvus kraujagyslių pokyčius, tačiau lokalizuotas uždegiminis atsakas dešinėje akyje sustiprina šiuos pokyčius, sukeldamas ryškų kraujagyslių išsiplėtimą ir prisideda prie pastebėtų simptomų. Panašius rezultatus su bendraautoriais publikavo ir Miyake H. (259), kurie savo tyrime aprašė bei vaizdiškai pateikė meibomo struktūros pakitimus, drumstumą ir aiškiai matomas talengiektazijas vokų krašte. Šie autoriai taip pat nurodo, kad tokie pokyčiai glaudžiai susiję su Meibomo liaukų uždegimu ir paviršiniaus kapiliariniais sutrikimais, o tai atitinka mūsų gautus morfoloģinius pakitimus. Ragenos nudažymo fluoresceinu rezultatai atskleidžia progresuojantį ragenos paviršiaus epitelio būklės blogėjimą dešinėje akyje, nes fluoresceinas nusidažė visame ragenos paviršiuje 21 dieną (žr. pav. 18). Plačiai pasklidęs nusidažymas rodo stiprų epitelio pažeidimą ir pabrėžia lėtinį uždegiminį procesą, kurį sukėlė PFA. Histologinių mėginių analizė patvirtina šį pastebėjimą: dešinėje akyje epitelio sluoksnis sumažėja, kas atspindi sutrikusią ląstelių regeneraciją ir padidėjusį jautrumą aplinkos sukeltiems stresiniams dirgikliams (žr. pav. 19). Periodinės rūgšties-Schiff (PAS) dažymas atskleidė sumažėjusį gobletų ląstelių kiekį dešinės akies junginėje (žr. pav. 20), tuo tarpu kairėje akyje taurinių ląstelių kiekis išliko gausus. Šios ląstelės yra būtinos mucinų gamybai, kurie stabilizuoja ašarų plėvelę. Jų sumažėjimas dešinėje akyje rodo sutrikusį gleivinės sluoksnį, prisidedantį prie nustatyto ašarų plėvelės nestabilumo. Uždegiminis procesas dešiniajame voke (žr. pav. 21 A), pasireiškė makrofagų, eozinofilų, plazmocitų ir kitų uždegiminių ląstelių infiltracija, todėl histologiniai pjūviai patvirtina klinikinius ir funkcinis pokyčius. Ši plačiai paplitusi infiltracija rodo stiprų imuninį atsaką, kuris tikriausiai palaiko MLD lėtinį ir sunkų pobūdį. Panašius rezultatus su bendraautoriais publikavo Miyake H., kurie tyrime, atliktame su PFA sukeltu modeliu, aprašė granuliacinio uždegiminio proceso sukeltą meibominių liaukų hipertrofiją ir hiperplaziją, patvirtinančią užsitęsio uždegimo poveikį šių liaukų morfoģijai (259). Priešingai, kairiajame voke, į kurį buvo suleistas NaCl 0,9%, audinių struktūros išliko aiškiai atskirtos, be padidėjusio uždegiminių ląstelių kiekio (žr. pav. 21 B). Šie skirtumai aiškiai patvirtina, kad nustatyti patologiniai pokyčiai dešinėje akyje yra specifiniai PFA sukeltam uždegimui ir nėra susiję su pačiu injekcijos procesu.

Apibendrinant gautus rezultatus, galima teigti, kad PFA sukeltas triušių MLD modelis veiksmingai atkartoja klinikinius, funkcinis ir histologinius

lėtinio MLD požymius, pastebimus ir žmonėms. Ilgalaikis ašarų gamybos sumažėjimas, reikšmingas APPL sutrumpėjimas, padidėjusi liaukų obstrukcija, sunkus ragenos epitelio pažeidimas ir ryški uždegiminė infiltracija pabrėžia daugialypį MLD poveikį akių funkcionavimui. Šie rezultatai patvirtina šio modelio tinkamumą MLD patogenezės tyrimams ir leidžia naudoti išbandant galimas terapines intervencijas, siekiant sušvelninti uždegimą ir atkurti Meibomo liaukų funkciją.

#### 4.4. Meibomo liaukų disfunkcija po kauterizacijos

Triušių modelio, sukkelto Meibomo liaukų kauterizacija, rezultatai pateikia išsamų vaizdą apie šio metodo poveikį ašarų plėvelei, ragenos struktūrai ir regos organų išoriniam paviršiui. Gauti ašarų tūrio rezultatai, pavaizduoti 22 paveiksle rodo, kad po Meibomo liaukų angų kauterizacijos ašarų gamyba sumažėjo indukuotoje akyje, tuo tarpu priešingoje akyje išliko gana stabili. Tačiau kiti autoriai savo publikacijose nurodo nepastebėję reikšmingų ašarų tūrio pokyčių (260). APPL testas, pavaizduotas 23 paveiksle, atliekamas siekiant įvertinti ašarų plėvelės stabilumą. Tyrimo rezultatai parodė, kad praėjus septynioms dienoms po kauterizacijos OD akies APPL sumažėjo apie 30% ir toliau mažėjo viso eksperimento metu, o OS akies APPL per visą eksperimento laikotarpį reikšmingai nekito. Šie rezultatai rodo, kad kauterizacija žymiai padidina ašarų plėvelės išgaravimo greitį ir pablogina stabilumą OD akyje. Panašias išvadas pateikia ir kiti tyrėjai, pavyzdžiui, Prasad D. su bendraautoriais (260) bei Gallois-Bernos A. ir kt. (261). Jie savo tyrimuose, atliktuose po Meibomo liaukų angų kauterizacijos, taip pat nustatė reikšmingą ašarų plyšimo laiko sumažėjimą, rodantį ašarų plėvelės kokybės ir stabilumo blogėjimą. Ragenos OKT tyrimas, kurio rezultatai pavaizduoti 24 paveiksle, parodė, kad kauterizuotos OD akies ragenos storis po 7 dienų reikšmingai nepakito ir buvo panašus į OS sveikos akies ragenos storį. Tačiau vėlesnėmis tyrimo dienomis OD akies ragenos storis išliko didesnis nei OS akies, kas gali rodyti galimą edemą arba uždegiminį atsaką po vokų kraštų kauterizacijos. Teleangiektazijos viršutiniame ir apatiniame vokuose buvo žymiai padidėjusios 7 dieną po kauterizacijos, kaip pavaizduota 25 A ir B paveiksluose. 14 dieną po procedūros viršutiniame voke teleangiektazija šiek tiek sumažėjo, tačiau apatiniame voke vertinimo balais padidėjo. Praėjus 21 dienai po kauterizacijos, hiperemija abiejuose vokuose dar padidėjo, kas rodo nuolatinį uždegiminį procesą. Toks uždegiminis procesas yra labai tikėtinas, nes visiškai sustabdomas meibomo ištekėjimas. Tokia pakitusi ašarų plėvelės sudėtis gali turėti įtakos uždegiminiams procesams. Ragenos fluoresceino dažymo rezultatai, pavaizduoti 26 paveiksle, parodė, kad prieš kauterizaciją

abiejose akyse buvo stebimi tam tikri labiau nusidažę ragenos plotai, kurie laikomi priimtini dėl aplinkos poveikio. Tačiau praėjus 7 dienoms po kauterizacijos OD akies ragenos dažymo plotas išplito, o 21 dieną jis dar labiau išplito, kas rodo ragenos epitelio pažeidimą ir nestabilią ašarų plėvelę. Tuo tarpu OS akies nusidažęs plotas laikui bėgant sumažėjo. Šie pokyčiai patvirtina išgaruojančio SAS požymius, susijusius su MLD. 27 A paveiksle pateiktos nuotraukos aiškiai iliustruoja Meibomo liaukų kauterizacijos poveikį akies vokų struktūrai ir paviršiaus anatomijai viso tyrimo laikotarpiu. Jau pirmąją dieną po procedūros matomi tiesioginiai terminio pažeidimo požymiai, kurie patvirtina, kad kauterizacija efektyviai sukėlė lokalizuotą Meibomo liaukų angų pažeidimą. Septintąją dieną stebimas ryškus uždegiminis atsakas, pasireiškiantis vokų kraštų paraudimu, paburkimu ir visišku Meibomo liaukų angų praradimu. Šie požymiai rodo ūminės uždegiminės fazės pradžią, kai audiniuose aktyvuojasi neutrofilai ir makrofagai, o Meibomo liaukų sekretas dėl latakų obstrukcijos nebegali būti išskiriamas. 14 dieną uždegiminiai procesai išlieka, o vokų kraštai tampa nelygūs, sustorėję ir paraudę, kas atitinka granuliacinio audinio formavimosi fazę. Meibomo liaukų angos vis dar nematomos, o tai leidžia manyti, kad vyksta jų randėjimas ar fibrozė, apsunkinanti normalią liaukų funkciją. Praėjus 21 dienai, fiksuojami sunkūs patologiniai pokyčiai: matomas kraujavimas, voko krašto įtrūkimas ir surandėjimas, galimai susijęs su antrine infekcija ar užsitęsusiu uždegimu. Šis laikotarpis rodo perėjimą iš ūminės į lėtinę uždegiminę fazę, kuriai būdinga audinių fibrozė ir Meibomo liaukų struktūrinė degeneracija. Priešingai, 27 B paveiksle kontrolinėje (OS) akyje viso tyrimo metu išliko normali vokų anatomija aiškiai matomos Meibomo liaukų angos, kas patvirtina, kad OD akyje stebėti pokyčiai yra tiesioginis kauterizacijos poveikis, o ne sisteminis organizmo atsakas. Histologinis tyrimas su HE dažymu parodė, kad kauterizuotos OD akies ragenos epitelis, pavaizduotas 28 paveiksle, yra plonesnis ir retesnis nei OS sveikos akies epitelio sluoksnis. Tai rodo epitelio regeneracijos sutrikimus ir audinių pažeidžiamumą. PAS dažymas atskleidė, kad 29 paveiksle pavaizduotoje OD akies junginėje yra mažesnis gobletų ląstelių tankis, palyginti su OS akimi, kas rodo sumažėjusią mucino gamybą ir ašarų plėvelės nestabilumą. 30 paveiksle pateikta OD akies voko histologija parodė, kad Meibomo liaukos yra labiau pripildytos ir uždegiminės, su daug eozinofilinių ląstelių, kas rodo stiprų uždegiminį atsaką. Tuo tarpu OS akies vokas išliko sveikas, be uždegimo požymių. Panašius MLD sukeltus histologinius požymius nustatė ir Prasad D. su bendraautoriais, kure savo tyrime teigia apie matomus

išsiplėtusius latakus, centrinio latako obstrukciją, sutirštėjusį sekretą ir acinusų atrofiją (260).

Gauti rezultatai rodo, kad ML kauterizacija sukelia reikšmingus pokyčius ašarų plėvelėje, ragenos struktūroje ir regos organų išorėje. Dėl šių pokyčių modelis gali būti naudojamas kaip tinkamas MLD ir sausų akių sindromo tyrimams. Vienas šio modelio trūkumų yra tai, kad išgydyti MLD yra neįmanoma, dėl negrįžtamai sukeltos ML angų obstrukcijos.

#### 4.5. Liposominiai preparatai gydant Meibomo liaukų disfunkciją

Šioje išsamioje MLD ir SAS eksperimentinių modelių analizėje mūsų tyrimas pateikė svarbių duomenų apie biomimetinių liposominių nanodalelių Lipo@Cur ir Lipo@CycA terapinį poveikį mažinant šių būklių pasireiškimus. Tyrimo tikslas buvo įrodyti, kad mūsų pasirinktas SAS ir MLD tyrimų modelis yra tinkamas naujų terapinių medžiagų efektyvumui tirti. Šiam tyrimui buvo pasirinktas MLD modelis, sukeltas PFA injekcijų. Pirmiausia buvo indukuota MLD, o vėliau tirti liposominių preparatų poveikis juos lašinant į triušų akis. Praėjus 21 dienai po PFA injekcijų buvo nustatytas reikšmingas ašarų tūrio (žr. Pav. 32) ir plėvelės plyšimo laiko sumažėjimas (žr. Pav. 33), kas patvirtina PFA tinkamumą imituojant MLD sukeltą ašarų plėvelės nestabilumą ir SAS. Nustatyta, kad 10 dienų lašinant Lipo@Cur ir Lipo@CycA preparatus reikšmingai pagerėjo ašarų tūris ir APPL, o ryškiausias poveikis nustatytas Lipo@Cur grupėje, kas rodo jo didesnę potencialą atkurti ašarų plėvelės stabilumą ir mažinti sausų akių simptomus.

Atlikus papildomus vertinimus, tokius kaip teleangiektazijų (žr. Pav. 34) atsiradimas ir užsikimšusių Meibomo liaukų angų analizė (žr. Pav. 35), buvo dar aiškiau atskleistas ligos progresavimo pobūdis bei taikytų tiriamųjų preparatų veiksmingumas. Negydytoje grupėje šie patologiniai požymiai progresavo, patvirtindami natūralią sausų akių sindromo ir Meibomo liaukų disfunkcijos vystymosi eigą nesant gydymui. Priešingai, visose gydytose grupėse buvo stebimas reikšmingas klinikinių požymių mažėjimas. Ryškiausi teigiami pokyčiai nustatyti Lipo@Cur ir Lipo@CycA grupėse, kuriose šie preparatai ženkliai sumažino uždegiminę reakciją ir normalizavo išorinių regos organų klinikinius požymius, patvirtindami jų terapinį potencialą atkuriant išorinio akių paviršiaus homeostazę. 36 paveiksle pateiktos nuotraukos aiškiai atskleidžia akių vokų audinių pokyčius skirtingose eksperimentinėse grupėse per visą tyrimo laikotarpį, įskaitant uždegimo vystymosi dinamiką ir terapinių intervencijų efektyvumą. Pirmuoju eksperimento etapu (0–21 dienomis) po PFA injekcijų visose eksperimentinėse grupėse, išskyrus sveikų akių kontrolę, buvo stebimi akių

vokų kraštų uždegimai, pasireiškiantys teleangiektazijomis, paraudimu, paburkimu ir sekrecijos sankaupomis. Šie pokyčiai rodo sėkmingai sukeltą Meibomo liaukų disfunkcijos modelį, kuriame pasireiškia būdingi lėtinio uždegimo požymiai, analogiški aprašytiems žmonių MLD klinikiniuose atvejuose (15,24). Kontrolinėje NaCl 0,9 % grupėje stebėti pokyčiai patvirtina, kad fiziologinis tirpalas nesuteikia terapinio poveikio uždegiminiam procesui. 7 ir 14 dienomis buvo fiksuotas ryškus vokų paraudimas, patinimas ir gausios išskyros, o 21 dieną uždegimas dar labiau progresavo. Antrojo tyrimo etapo metu (21–30 dienomis), kai kitose grupėse buvo pradėtas gydymas, NaCl 0,9 % grupėje uždegiminiai požymiai išliko ryškūs arba dar labiau stiprėjo, kas rodo nevaldomą lėtinio uždegimo eigą be veikliosios medžiagos poveikio. Lipo@CycA grupėje, kur gydymas buvo pradėtas 21 dieną, nustatytas ryškiausias klinikinis pagerėjimas. Jau po trijų dienų (24 d.) pastebėtas uždegimo ir eksudacijos sumažėjimas, o 30 tyrimo dieną akių vokų audiniai beveik visiškai normalizavosi – uždegimas tapo minimalus, išnyko eksudatai, o Meibomo liaukų angos tapo aiškiau matomos. Šis rezultatas atitinka ciklosporino A (CycA) žinomą imunomoduliacinį poveikį, mažinant T limfocitų aktyvumą ir uždegiminių citokinų (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) ekspresiją, kaip aprašyta Zhou ir bendraautorijų tyrimuose (258). Lipo@Cur grupė taip pat parodė teigiamą terapinį atsaką, tačiau pagerėjimo dinamika buvo lėtesnė. Uždegimo sumažėjimas buvo pastebimas jau 24 dieną, tačiau iki 30 dienos išliko nedidelis audinių paraudimas ir eksudacijos pėdsakais. Tai gali būti susiję su lėtesniu kurkumino veikimo mechanizmu, kuris, nors ir pasižymi stipriu prieš uždegiminiu poveikiu (262), veikia per antioksidacinio atsako ir NF- $\kappa$ B slopinimo kelius, todėl visiškas terapinis efektas pasiekiamas vėliau nei imunomoduliatorių atveju. Lipo@Empty grupėje, gavusioje liposominį preparatą be veikliosios medžiagos, uždegimo eigą pakito nereikšmingai. 24–30 dienomis klinikiniai požymiai išliko panašūs į stebėtus 21 dieną – paraudimas, eksudatai ir teleangiektazijos išliko ryškūs, o tai rodo, kad vien liposomų buvimas be veikliosios medžiagos neužtikrina pakankamo terapinio efekto. Apibendrinus galima teigti, kad Lipo@CycA ir Lipo@Cur pasižymėjo reikšmingu prieš uždegiminiu poveikiu, pasireiškusiu paraudimo, kraujagyslių išsiplėtimo ir sekrecijos sankaupų mažėjimu, o jų terapinis poveikis buvo ženkliai efektyvesnis nei NaCl 0,9 % ir Lipo@Empty grupėse. Gauti duomenys patvirtina, kad liposominės formulės gali pagerinti veikliųjų medžiagų biologinį prieinamumą ir terapinį aktyvumą, ypač gydant uždegimines akių vokų ir Meibomo liaukų patologijas.

Gauti rezultatai atitinka ankstesnius tyrimus, kuriuose liposomomis inkapsuluotas ciklosporinas ar kurkuminas pasižymėjo didesniu terapiniu

aktyvumu ir geresniu toleravimu nei tradiciniai preparatai (263). 37 paveiksle pateiktas nuotraukų rinkinys iliustruoja ragenos paviršiaus pažeidimų dinamiką po PFA sukeltos Meibomo liaukų disfunkcijos ir skirtingų liposominių preparatų terapinio poveikį. Fluoresceino dažymas, atliktas įvairiais tyrimo etapais, leido aiškiai įvertinti ragenos epitelio vientisumo pokyčius lašinant skirtingus liposominius preparatus. Pradiniai vaizdai (0 dieną) parodė, kad neindukuotose akyse buvo matomi nedideli fluoresceinu nusidažantys plotai, kurie atspindi fiziologinį ragenos paviršiaus mikropažeidimų foną, būdingą laboratoriniams triušiams. Tai atitinka literatūroje aprašytus duomenis, kad ragenos epitelis jautriai reaguoja į aplinkos veiksnius ir eksperimentinį stresą (264). Pirmojo tyrimo etapo metu (7–21 dienomis), po PFA injekcijų, visose paveiktose grupėse buvo stebimas laipsniškas fluoresceino nudažymo intensyvumas, ypač ryškus 21 dieną. Tai rodo ragenos epitelio pažeidimą, paviršiaus nelygumus ir uždegiminių procesų aktyvaciją. Šie pokyčiai koreliuoja su MLD sukeltu ašarų plėvelės nestabilumu, lipidinio sluoksnio deficitu ir didesniu ragenos paviršiaus išsausėjimu, kurie yra būdingi SAS patologijai (265). Negydytoje NaCl 0,9 % grupėje ragenos pažeidimai išliko ryškūs viso tyrimo metu. 21 dieną buvo fiksuoti intensyvūs fluoresceino nusidažymo plotai, kurie iki 30 dienos neatsistatė, o tai patvirtina, kad fiziologinis tirpalas neturi regeneracinio ar priešuždegiminio poveikio. Šis rezultatas taip pat patvirtina PFA sukulto modelio stabilumą ir patikimumą, nes be terapinės intervencijos ragenos pažeidimai išlieka lėtiniai ir progresuojantys. Lipo@CycA grupėje, pradėjus gydymą 21 dieną, buvo užfiksuotas reikšmingas ragenos būklės pagerėjimas. Jau po kelių dienų (24–28 d.) dažymosi intensyvumas žymiai sumažėjo, o 30 dieną ragenos paviršius praktiškai normalizavosi, nebuvo matoma ryškių pažeidimo zonų. Tai rodo, kad liposominė ciklosporino A formulė efektyviai mažina uždegimą ir stimuliuoja epitelio regeneraciją. Ciklosporino A mechanizmas, slopinantis T limfocitų aktyvumą ir uždegiminių citokinų ekspresiją (IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ ), galėjo būti vienas pagrindinių ragenos gijimą skatinančių veiksnių, kaip aprašyta (266,267) tyrimuose. Lipo@Cur grupėje taip pat stebėtas panašus, tačiau šiek tiek lėtesnis regeneracinis atsakas. Po gydymo pradžios fluoresceino dažymosi plotai palaipsniui mažėjo, o 30 dieną išliko tik nedideli paviršiniai pažeidimai. Šie rezultatai patvirtina kurkumino priešuždegimines ir antioksidacines savybes, kurios padeda mažinti oksidacinį stresą ir ląstelių apoptozę ragenos epitelio ląstelėse (268). Nors Lipo@Cur poveikis buvo šiek tiek silpnesnis nei Lipo@CycA, jis vis tiek reikšmingai pagerino ragenos paviršiaus būklę, kas rodo biomimetinių liposomų svarbą veikliųjų medžiagų biologiniam prieinamumui.

Lipo@Empty grupėje terapinis poveikis buvo minimalus – fluoresceino nudažymo plotai išliko intensyvūs iki tyrimo pabaigos. Tai patvirtina, kad liposomų sudėtis be veikliosios medžiagos nėra pakankama epitelio regeneracijai skatinti, nors gali suteikti tam tikrą drėkinamąjį efektą. Apibendrinant gautus duomenis galima teigti, kad liposominiai preparatai, ypač Lipo@CycA ir Lipo@Cur, pasižymėjo reikšmingu terapiniu poveikiu – jie mažino ragenos epitelio pažeidimus, skatino gijimo procesus ir slopino uždegimą. Gauti rezultatai sutampa su ankstesniais tyrimais, rodančiais, jog liposomomis inkapsuliuotos priešuždegiminės medžiagos yra efektyvesnės gydant SAS ir MLD sukeltus ragenos pažeidimus, lyginant su įprastinėmis vaistų formomis (269,270). 38 paveiksle pateikti histologiniai rezultatai atskleidžia reikšmingus struktūrinius skirtumus tarp ragenos, junginės ir akių vokų audinių skirtingose eksperimentinėse grupėse, leidžiančius įvertinti PFA sukeltos MLD ir liposominių preparatų terapinį potencialą. Ragenos histologinė analizė parodė ryškius epitelio struktūros pokyčius negydytoje grupėje - priekinio epitelio sluoksnis buvo suplonėjęs ir fragmentuotas, o kai kuriose vietose pastebėtos ląstelių degeneracijos zonos. Šie pokyčiai rodo ragenos epitelio atrofiją ir barjerinės funkcijos sutrikimą, būdingą lėtinei sausų akių sindromo eigai (271) Toks epitelio suplonėjimas dažnai susijęs su ilgalaikiu ašarų plėvelės nestabilumu ir padidėjusiu oksidaciniu stresu, o tai sukelia epitelio ląstelių apoptozę (272). Priešingai, (Lipo@CycA ir Lipo@Cur) gydytose grupėse ragenos epitelio struktūra buvo artimesnė neindukuotos akies struktūrai. Lipo@CycA grupėje epitelio struktūra beveik atitiko sveikos kontrolės ragenos parametrus, o tai rodo veiksmingą audinių regeneraciją ir uždegimo slopinimą. Šį efektą galima paaiškinti ciklosporino A priešuždegiminiu poveikiu, kuris slopina T-limfocitų proliferaciją, citokinų (IL-2, TNF- $\alpha$ ) gamybą bei MMP-9 aktyvumą, taip mažindamas audinių pažeidimą ir skatindamas gijimą (273). Lipo@Cur grupėje taip pat buvo stebėtas epitelio storio panašumas į neindukuotos akies bei audinio struktūros stabilumas. Kurkumino priešuždegiminės ir antioksidacinės savybės (148) tikėtina prisidėjo prie epitelio atkūrimo. Lipo@Empty grupėje histologiniai pokyčiai iš esmės nesiskyrė nuo negydytos grupės – ragenos epitelis daugelyje vietų išliko suplonėjęs, o tai rodo, kad vien liposominė struktūra be veikliosios medžiagos neturi reikšmingo regeneracinio ar priešuždegiminio poveikio, nors gali suteikti paviršinį drėkinamąjį efektą. Junginės histologinė analizė (PAS dažymas) parodė gobletų ląstelių tankio skirtumus tarp grupių. Sveikos kontrolinės grupės mėginiuose gobletų ląstelių tankis išliko normalus ir atitiko sveiką fiziologinę gleivinės būklę. Tuo tarpu negydytoje grupėje (NaCl 0,9 %) gobletų ląstelių kiekis buvo reikšmingai sumažėjęs, o tai rodo gleivinės

disfunkciją ir sumažintą mucino sekreciją, svarbią ašarų plėvelės stabilumui (274). Gydytose grupėse, ypač Lipo@CycA, buvo pastebėtas dalinis gobleto ląstelių kiekio atsistatymas, rodantis terapinį preparato poveikį junginės regeneracijai ir mucinų sekrecijos normalizacijai. Tai sutampa su literatūriniais duomenimis, kad ciklosporino A terapija gerina gobleto ląstelių funkciją lėtiniuose SAS modeliuose (275). Akių vokų histologinių pjūvių analizė atskleidė difuzines histiocistines granulomas, kuriose buvo nustatytas nedidelis kiekis eozinofilų ir plazmocitų, rodantis granulomatinį uždegiminį atsaką. Tokios reakcijos gali būti susijusios su užsitęsusiu Meibomo liaukų uždegimu ir PFA sukeltu imuninės sistemos aktyvumu. Šios granulomos buvo aptiktos visose MLD indukuotose grupėse, tačiau jų intensyvumas buvo mažesnis gydytose grupėse, ypač Lipo@CycA, palyginti su negydyta grupe. Tai rodo, kad liposominiai preparatai sumažina lėtinį uždegiminį infiltratą ir apriboja audinių destruktiją. Sveikos kontrolinės grupės audiniuose patologinių pokyčių nenustatyta, o tai patvirtina modelio patikimumą. Bendrai vertinant, histologinė analizė patvirtino liposominių preparatų, ypač Lipo@CycA, efektyvumą, mažinant uždegimą ir audinių pažeidimus, taip pat skatinant epitelio regeneraciją ragenoje ir junginėje. Lipo@Cur taip pat demonstravo teigiamą terapinį poveikį, tačiau mažesnio intensyvumo. Šie rezultatai patvirtina, kad biomimetinės liposominės nanodalelės gali būti veiksminga priemonė MLD ir SAS sukeltų akies paviršiaus pažeidimų gydymui, nes jos užtikrina ilgalaikį veikliųjų medžiagų išsiskyrimą ir geresnį biologinį prieinamumą, lyginant su tradicinėmis formulėmis (238). Literatūroje plačiai aprašomas tiek kurkumino, tiek liposominių akių lašų ar kitų profilaktikai bei gydymui skirtų formuluočių poveikis. Daugelis autorių nurodo ryškų kurkumino priešuždegiminį ir antioksidacinį poveikį, taip pat liposomų gebėjimą pagerinti akių paviršiaus drėkinimą ir vaistinės medžiagos biologinį prieinamumą (268,276). Tačiau mūsų tyrime naudota kurkuminiu prisotinta liposominė formulė (Lipo@Cur) yra nauja ir iki šiol literatūroje plačiai neaprašyta. Ši formulė pasižymėjo reikšmingai didesniu terapiniu efektyvumu, palyginti su atskiromis kurkumino ar liposomų formomis, ypač gydant sausų akių sindromą ir Meibomo liaukų disfunkciją. Gautų rezultatų visuma leidžia manyti, kad liposominė kurkumino sistema užtikrina sinerginį poveikį: liposomos pagerina kurkumino skvarbą į audinius, o kurkuminas efektyviai slopina uždegiminius procesus.

Šie rezultatai ne tik patvirtina sukurto modelio tinkamumą, bet ir pabrėžia specifinių gydymo būdų svarbą, sprendžiant pagrindinius uždegiminius SAS ir MLD mechanizmus. Apibendrinant galima teigti, kad mūsų tyrimas patvirtina reikšmingą Lipo@Cur ir Lipo@CycA preparatų terapinį potencialą

kontroliuojant SAS ir MLD. Šios formulės pasižymi gebėjimu pagerinti ašarų plėvelės stabilumą, sumažinti akies paviršiaus uždegimą ir užkirsti kelią struktūriniam akių audinių pokyčiams.

## IŠVADOS

### 1. Meibomo liaukų disfunkcijos modelių sukūrimas.

Tyrimo metu sėkmingai sukurti keturi skirtingi Meibomo liaukų disfunkcijos (MLD) modeliai triušiuose, atspindintys įvairius patologijos mechanizmus:

- chirurginis ašarų liaukų pašalinimas;
- benzalkonio chlorido sukeltas cheminis akies paviršiaus pažeidimas;
- Meibomo liaukų angų kauterizacija;
- leidžiant paruoštą Freund'o adjuvantą.

### 2. MLD poveikio įvertinimas akies struktūroms.

Atlikus tyrimą nustatyta, kad Meibomo liaukų disfunkcija daro kompleksinį poveikį akies paviršiui, pažeisdama rageną, junginę, ašarų liaukas ir vokų struktūras. Pastebėti ragenos epitelio pažeidimai, gobletų ląstelių nykimas, uždegiminių infiltracijų bei ašarų plėvelės stabilumo ir kiekio sumažėjimas, kas rodo kompleksinį ligos poveikį akies paviršiaus būklei.

### 3. Ikiiklinikinio modelio pritaikymas.

Atliktų eksperimentų metu buvo nustatytos tinkamiausios sąlygos ikiiklinikinio triušių modelio pritaikymui naujų sausų akių sindromui skirtų vaistų vertinimui. PFA sukeltas Meibomo liaukų disfunkcijos modelis pasirodė labiausiai tinkamas vertinti naujų terapinių preparatų efektyvumą. Biomimetiniai liposominiai preparatai (Lipo@Cur ir Lipo@CycA) veiksmingai mažina uždegiminius procesus ir gerina ašarų plėvelės stabilumą. Modelis suteikia patikimą ikiiklinikinį pagrindą tolimesniems farmakologiniams tyrimams.

## REKOMENDACIJOS

1. Toliau tirti šio modelio taikymą siekiant suprasti sausų akių sindromo mechanizmus ir išbandyti naujus terapinius preparatus. Rekomenduojama įtraukti skirtingus gydymo būdus, tokius kaip dirbtinės ašaros, priešuždegiminiai vaistai ir regeneraciniai terapijos metodai, siekiant įvertinti jų poveikį ašarų plėvelės stabilumui ir akių paviršiaus būklei.
2. Apsvarstyti alternatyvių konservantų naudojimą akių lašuose, siekiant sumažinti BAK sukeltus neigiamus poveikius. Be to, toliau tirti BAK poveikio mechanizmus ir išbandyti įvairius priešuždegiminius ir regeneracinius terapijos metodus, siekiant sumažinti jo sukeltą žalą regos organų išoriniam paviršiui.
3. Naudoti sukurta PFA modelį ateities tyrimuose, siekiant geriau suprasti MGD patofiziologiją ir įvertinti naujus gydymo būdus. Rekomenduojama tirti priešuždegiminius ir Meibomo liaukų funkciją atkuriančius terapinius preparatus, taip pat išbandyti aplinkos, įpročių pokyčius ir dietos intervencijas, kurios gali turėti teigiamą poveikį MLD kontroliavimui.
4. Plėtoti ir tobulinti PFA modelį, siekiant jį naudoti naujų terapinių medžiagų ir gydymo metodų tyrimuose. Rekomenduojama išbandyti skirtingas gydymo strategijas, tokias kaip vietiniai priešuždegiminiai vaistai, regeneraciniai terapijos metodai ir pažangūs biomedžiagos, siekiant pagerinti ašarų plėvelės stabilumą ir akies paviršiaus būklę.
5. Tęsti biomimetinių liposominių nanodalelių tyrimus, siekiant iširti jų veiksmingumą ir saugumą ilgesnėje perspektyvoje. Rekomenduojama toliau tirti įvairius natūralius aktyvius ingredientus, kurie gali būti įsotinti į liposomų formules, siekiant pagerinti gydymo efektyvumą ir personalizuoti gydymo strategijas. Taip pat rekomenduojama atlikti klinikinius tyrimus, siekiant patvirtinti šių gydymo būdų veiksmingumą ir saugumą žmonėms.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Chhadva P, Goldhardt R, Galor A. Meibomian Gland Disease. *Ophthalmology*. 2017 Nov;124(11):S20–6.
2. Sheppard AL, Wolffsohn JS. Digital eye strain: prevalence, measurement and amelioration. *BMJ Open Ophthalmol* [Internet]. 2018 Apr 16;3(1):e000146. Available from: <https://bmjophth.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmjophth-2018-000146>
3. Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo CK, et al. TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *Ocul Surf* [Internet]. 2017 Jul;15(3):276–83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1542012417301192>
4. Liyue H, Chiang PPC, Sung SC, Tong L. Dry Eye-Related Visual Blurring and Irritative Symptoms and Their Association with Depression and Anxiety in Eye Clinic Patients. *Curr Eye Res*. 2016 May 3;41(5):590–9.
5. Iglesias E, Sajnani R, Levitt RC, Sarantopoulos CD, Galor A. Epidemiology of Persistent Dry Eye-Like Symptoms After Cataract Surgery. *Cornea* [Internet]. 2018 Jul 7;37(7):893–8. Available from: <https://journals.lww.com/00003226-201807000-00016>
6. Barabino S, Labetoulle M, Rolando M, Messmer EM. Understanding Symptoms and Quality of Life in Patients With Dry Eye Syndrome. *Ocul Surf* [Internet]. 2016 Jul;14(3):365–76. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1542012416300398>
7. Rouen PA, White ML. Dry Eye Disease. *Home Healthc Now* [Internet]. 2018 Mar;36(2):74–83. Available from: <https://journals.lww.com/01845097-201803000-00003>
8. Barabino S, Labetoulle M, Rolando M, Messmer EM. Understanding Symptoms and Quality of Life in Patients With Dry Eye Syndrome. *Ocul Surf* [Internet]. 2016 Jul;14(3):365–76. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1542012416300398>
9. Jonas JB, Wei W Bin, Xu L, Rietschel M, Streit F, Wang YX. Self-rated depression and eye diseases: The Beijing Eye Study. Shukla D, editor. *PLoS One* [Internet]. 2018 Aug 10;13(8):e0202132. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0202132>
10. Messmer EM. The Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment of Dry Eye Disease. *Dtsch Arztebl Int*. 2015 Jan 30;
11. Adams WH. A Case Report from the Ancient Past. *American Journal of Case Reports*. 2019 Dec 20;20:1907–14.

12. Hunting P. 'To unlock the secret places of Man's Mind'. Thomas Willis (1621–1675). *J Med Biogr.* 2022 Aug 22;30(3):202–4.
13. Yañez-Soto B, Mannis MJ, Schwab IR, Li JY, Leonard BC, Abbott NL, et al. Interfacial Phenomena and the Ocular Surface. *Ocul Surf.* 2014 Jul;12(3):178–201.
14. Wu Y, Wang C, Wang X, Mou Y, Yuan K, Huang X, et al. Advances in Dry Eye Disease Examination Techniques. *Front Med (Lausanne).* 2022 Jan 25;8.
15. Wolffsohn JS, Arita R, Chalmers R, Djalilian A, Dogru M, Dumbleton K, et al. TFOS DEWS II Diagnostic Methodology report. *Ocul Surf.* 2017 Jul;15(3):539–74.
16. Gupta PK, Vora GK, Matossian C, Kim M, Stinnett S. Outcomes of intense pulsed light therapy for treatment of evaporative dry eye disease. *Canadian Journal of Ophthalmology.* 2016 Aug;51(4):249–53.
17. HERRANZ RMHRMC (ed. ), disorders and therapeutic care. *Ocular surface: anatomy and physiology, disorders and therapeutic care.* CRC Press; 2012.
18. Llorens-Quintana C, Rico-del-Viejo L, Syga P, Madrid-Costa D, Iskander DR. Meibomian Gland Morphology: The Influence of Structural Variations on Gland Function and Ocular Surface Parameters. *Cornea.* 2019 Dec 6;38(12):1506–12.
19. Mizoguchi S, Iwanishi H, Arita R, Shirai K, Sumioka T, Kokado M, et al. Ocular surface inflammation impairs structure and function of meibomian gland. *Exp Eye Res.* 2017 Oct;163:78–84.
20. Prabhasawat P, Chirapapaisan C, Chitkornkijsin C, Pinitpuwadol W, Saiman M, Veeraburinon A. Eyeliner Induces Tear Film Instability and Meibomian Gland Dysfunction. *Cornea.* 2020 Apr 12;39(4):473–8.
21. Tichenor AA, Ziemanski JF, Ngo W, Nichols JJ, Nichols KK. Tear Film and Meibomian Gland Characteristics in Adolescents. *Cornea.* 2019 Dec 17;38(12):1475–82.
22. Dietrich J, Garreis F, Paulsen F. Pathophysiology of Meibomian Glands – An Overview. *Ocul Immunol Inflamm.* 2021 May 19;29(4):803–10.
23. Kim HM, Eom Y, Song JS. The Relationship Between Morphology and Function of the Meibomian Glands. *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice.* 2018 Jan;44(1):1–5.
24. Nichols KK, Foulks GN, Bron AJ, Glasgow BJ, Dogru M, Tsubota K, et al. The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction:

- Executive Summary. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011 Mar 30;52(4):1922.
25. Maskin SL, Alluri S. Expressible Meibomian Glands Have Occult Fixed Obstructions: Findings From Meibomian Gland Probing to Restore Intraductal Integrity. *Cornea*. 2019 Jul;38(7):880–7.
  26. Eom Y, Han JY, Kang B, Hwang HS, Lee HK, Kim HM, et al. Meibomian Glands and Ocular Surface Changes After Closure of Meibomian Gland Orifices in Rabbits. *Cornea*. 2018 Feb 16;37(2):218–26.
  27. Borchman D. Lipid conformational order and the etiology of cataract and dry eye. *J Lipid Res*. 2021;62:100039.
  28. Knop E, Knop N, Millar T, Obata H, Sullivan DA. The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: Report of the Subcommittee on Anatomy, Physiology, and Pathophysiology of the Meibomian Gland. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011 Mar 30;52(4):1938.
  29. Khan S, Fitch S, Knox S, Arora R. Exocrine gland structure-function relationships. *Development*. 2022 Jan 1;149(1).
  30. Nien CJ, Massei S, Lin G, Liu H, Paugh JR, Liu CY, et al. The development of meibomian glands in mice. *Mol Vis*. 2010 Jun 18;16:1132–40.
  31. Rehorek SJ, Holland JR, Johnson JL, Caprez JM, Cray J, Mooney MP, et al. Development of the Lacrimal Apparatus in the Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and Its Potential Role as an Animal Model for Humans. *Anat Res Int*. 2011 Jul 27;2011:1–13.
  32. Butovich IA. Meibomian glands, meibum, and meibogenesis. *Exp Eye Res*. 2017 Oct;163:2–16.
  33. Hwang HS, Parfitt GJ, Brown DJ, Jester J V. Meibocyte differentiation and renewal: Insights into novel mechanisms of meibomian gland dysfunction (MGD). *Exp Eye Res*. 2017 Oct;163:37–45.
  34. Kam WR, Sullivan DA. Neurotransmitter Influence on Human Meibomian Gland Epithelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011 Nov 1;52(12):8543.
  35. Butovich IA. Lipidomics of human Meibomian gland secretions: Chemistry, biophysics, and physiological role of Meibomian lipids. *Prog Lipid Res*. 2011 Jul;50(3):278–301.
  36. Cox SM, Nichols JJ. The Neurobiology of the Meibomian Glands. *Ocul Surf*. 2014 Jul;12(3):167–77.

37. Wang LX. Androgen and meibomian gland dysfunction: from basic molecular biology to clinical applications. *Int J Ophthalmol*. 2021 Jun 18;14(6):915–22.
38. Sahin A, Liu Y, Kam WR, Darabad RR, Sullivan DA. Dihydrotestosterone suppression of proinflammatory gene expression in human meibomian gland epithelial cells. *Ocul Surf*. 2020 Apr;18(2):199–205.
39. Blackie CA, Korb DR. The Diurnal Secretory Characteristics of Individual Meibomian Glands. *Cornea*. 2010 Jan;29(1):34–8.
40. Pucker AD, Nichols JJ. Analysis of Meibum and Tear Lipids. *Ocul Surf*. 2012 Oct;10(4):230–50.
41. Wojtowicz JC, Butovich IA, McCulley JP. Historical Brief on Composition of Human Meibum Lipids. *Ocul Surf*. 2009 Jul;7(3):145–53.
42. Schnetler R, Gillan WDH, Koorsen G. Lipid composition of human meibum. *African Vision and Eye Health*. 2013 Dec 12;72(2).
43. Sledge S. Role of meibum and tear phospholipids in the evaporative water loss associated with dry eye. University of Louisville; 2021.
44. Mudgil P, Borchman D, Gerlach D, Yappert MC. Sebum/Meibum Surface Film Interactions and Phase Transitional Differences. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2016 May 4;57(6):2401.
45. Lam SM, Tong L, Yong SS, Li B, Chaurasia SS, Shui G, et al. Meibum Lipid Composition in Asians with Dry Eye Disease. *PLoS One*. 2011 Oct 17;6(10):e24339.
46. Jun I, Kim S, Kim H, Kim SW, Ji YW, Kim KP, et al. Evaluation of Meibum Lipid Composition According to Tear Interferometric Patterns. *Am J Ophthalmol*. 2022 Aug;240:37–50.
47. Arita R, Mori N, Shirakawa R, Asai K, Imanaka T, Fukano Y, et al. Linoleic acid content of human meibum is associated with telangiectasia and plugging of gland orifices in meibomian gland dysfunction. *Exp Eye Res*. 2016 Apr;145:359–62.
48. Butovich IA, Lu H, McMahon A, Ketelson H, Senchyna M, Meadows D, et al. Biophysical and Morphological Evaluation of Human Normal and Dry Eye Meibum Using Hot Stage Polarized Light Microscopy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2014 Jan 7;55(1):87.
49. Butovich IA. On the Lipid Composition of Human Meibum and Tears: Comparative Analysis of Nonpolar Lipids. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2008 Sep 1;49(9):3779.

50. Pucker AD, Haworth KM. The Presence and Significance of Polar Meibum and Tear Lipids. *Ocul Surf.* 2015 Jan;13(1):26–42.
51. Ngo W, Chen J, Panthi S, Nichols KK, Nichols JJ. Comparison of Collection Methods for the Measure of Human Meibum and Tear Film-Derived Lipids Using Mass Spectrometry. *Curr Eye Res.* 2018 Oct 3;43(10):1244–52.
52. Suzuki T, Fujiwara S, Kinoshita S, Butovich IA. Cyclic Change of Fatty Acid Composition in Meibum During the Menstrual Cycle. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2019 Apr 23;60(5):1724.
53. Downie LE, Bandlitz S, Bergmanson JPG, Craig JP, Dutta D, Maldonado-Codina C, et al. BCLA CLEAR - Anatomy and physiology of the anterior eye. *Contact Lens and Anterior Eye.* 2021 Apr;44(2):132–56.
54. Georgiev GA, Yokoi N, Ivanova S, Krastev R, Lalchev Z. Surface Chemistry Study of the Interactions of Pharmaceutical Ingredients with Human Meibum Films. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2012 Jul 12;53(8):4605.
55. Bron AJ, Tiffany JM, Gouveia SM, Yokoi N, Voon LW. Functional aspects of the tear film lipid layer. *Exp Eye Res.* 2004 Mar;78(3):347–60.
56. Villarreal-Gonzalez AJ, Jocelyn Rivera-Alvarado I, Rodriguez-Gutierrez LA, Rodriguez-Garcia A. Analysis of ocular surface damage and visual impact in patients with primary and secondary Sjögren syndrome. *Rheumatol Int.* 2020 Aug 2;40(8):1249–57.
57. Arita R, Itoh K, Inoue K, Kuchiba A, Yamaguchi T, Amano S. Contact Lens Wear Is Associated with Decrease of Meibomian Glands. *Ophthalmology.* 2009 Mar;116(3):379–84.
58. Suzuki T, Sutani T, Nakai H, Shirahige K, Kinoshita S. The Microbiome of the Meibum and Ocular Surface in Healthy Subjects. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2020 Feb 13;61(2):18.
59. Sweeney DF, Millar TJ, Raju SR. Tear film stability: A review. *Exp Eye Res.* 2013 Dec;117:28–38.
60. Butovich IA. Tear film lipids. *Exp Eye Res.* 2013 Dec;117:4–27.
61. Stahl U, Willcox M, Stapleton F. Osmolality and tear film dynamics. *Clin Exp Optom.* 2012 Jan 1;95(1):3–11.
62. Mann A, Tighe B. Contact lens interactions with the tear film. *Exp Eye Res.* 2013 Dec;117:88–98.

63. Willcox MDP, Argüeso P, Georgiev GA, Holopainen JM, Laurie GW, Millar TJ, et al. TFOS DEWS II Tear Film Report. *Ocul Surf*. 2017 Jul;15(3):366–403.
64. Cox SM, Berntsen DA, Chatterjee N, Hickson-Curran SB, Jones LW, Moezzi AM, et al. Eyelid Margin and Meibomian Gland Characteristics and Symptoms in Lens Wearers. *Optometry and Vision Science*. 2016 Aug;93(8):901–8.
65. Pflugfelder SC, Stern ME. Biological functions of tear film. *Exp Eye Res*. 2020 Aug;197:108115.
66. Messmer EM, Bulgen M, Kampik A. Hyperosmolarity of the Tear Film in Dry Eye Syndrome. In 2010. p. 129–38.
67. Braun RJ. Dynamics of the Tear Film. *Annu Rev Fluid Mech*. 2012 Jan 21;44(1):267–97.
68. Yin Y, Gong L. The quantitative measuring method of meibomian gland vagueness and diagnostic efficacy of meibomian gland index combination. *Acta Ophthalmol*. 2019 May 14;97(3).
69. Dartt DA, Willcox MDP. Complexity of the tear film: Importance in homeostasis and dysfunction during disease. *Exp Eye Res*. 2013 Dec;117:1–3.
70. Din N, Patel N. Blepharitis — a review of diagnosis and management. *International Journal of Ophthalmic Practice*. 2012 Aug;3(4):150–5.
71. Pflugfelder SC, Karpecki PM, Perez VL. Treatment of Blepharitis: Recent Clinical Trials. *Ocul Surf*. 2014 Oct;12(4):273–84.
72. Lindsley K, Matsumura S, Hafez E, Akpek EK. Interventions for chronic blepharitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2012 May 16;
73. Bitton E, Ngo W, Dupont P. Eyelid hygiene products: A scoping review. *Contact Lens and Anterior Eye*. 2019 Dec;42(6):591–7.
74. Lee H, Kim M, Park SY, Kim EK, Seo KY, Kim T. Mechanical meibomian gland squeezing combined with eyelid scrubs and warm compresses for the treatment of meibomian gland dysfunction. *Clin Exp Optom*. 2017 Nov 1;100(6):598–602.
75. Al-Namaeh M. A systematic review of the effect of omega-3 supplements on meibomian gland dysfunction. *Ther Adv Ophthalmol*. 2020 Jan 16;12:251584142095218.
76. Thode AR, Latkany RA. Current and Emerging Therapeutic Strategies for the Treatment of Meibomian Gland Dysfunction (MGD). *Drugs*. 2015 Jul 1;75(11):1177–85.

77. Lam PY, Shih KC, Fong PY, Chan TCY, Ng ALK, Jhanji V, et al. A Review on Evidence-Based Treatments for Meibomian Gland Dysfunction. *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice*. 2020 Jan;46(1):3–16.
78. Rolando M, Merayo-Llodes J. Management Strategies for Evaporative Dry Eye Disease and Future Perspective. *Curr Eye Res*. 2022 Jun 3;47(6):813–23.
79. Verjee MA, Brissette AR, Starr CE. Dry Eye Disease: Early Recognition with Guidance on Management and Treatment for Primary Care Family Physicians. *Ophthalmol Ther*. 2020 Dec 22;9(4):877–88.
80. Gurnani B, Kaur K, Kumar M. Current concepts and future trends in dry eye syndrome – A review of literature. *TNOA Journal of Ophthalmic Science and Research*. 2021;59(1):38.
81. Lee Y, Kim M, Galor A. Beyond dry eye: how co-morbidities influence disease phenotype in dry eye disease. *Clin Exp Optom*. 2022 Feb 17;105(2):177–85.
82. Dana R, Bradley JL, Guerin A, Pivneva I, Stillman IÖ, Evans AM, et al. Estimated Prevalence and Incidence of Dry Eye Disease Based on Coding Analysis of a Large, All-age United States Health Care System. *Am J Ophthalmol*. 2019 Jun;202:47–54.
83. Baudouin C, Aragona P, Van Setten G, Rolando M, Irkeç M, Benítez del Castillo J, et al. Diagnosing the severity of dry eye: a clear and practical algorithm. *British Journal of Ophthalmology*. 2014 Sep;98(9):1168–76.
84. Mandell JT, Idarraga M, Kumar N, Galor A. Impact of Air Pollution and Weather on Dry Eye. *J Clin Med*. 2020 Nov 20;9(11):3740.
85. Alves M, Asbell P, Dogru M, Giannaccare G, Grau A, Gregory D, et al. TFOS Lifestyle Report: Impact of environmental conditions on the ocular surface. *Ocul Surf*. 2023 Jul;29:1–52.
86. Belmonte C. Pain, Dryness, and Itch Sensations in Eye Surface Disorders Are Defined By a Balance Between Inflammation and Sensory Nerve Injury. *Cornea*. 2019 Nov 4;38(1):S11–24.
87. Sekeroglu HT, Sekeroglu MA. Ocular Inflammation and Depression: Ophthalmologists' Perspective. *Curr Top Med Chem*. 2018 Nov 26;18(16):1402–7.
88. Sayegh RR, Yu Y, Farrar JT, Kuklinski EJ, Shtein RM, Asbell PA, et al. Ocular Discomfort and Quality of Life Among Patients in the Dry Eye Assessment and Management Study. *Cornea*. 2021 Jul;40(7):869–76.

89. Tong L, Lim L, Tan D, Heng WJ, Lim J, Chan C, et al. Assessment and Management of Dry Eye Disease and Meibomian Gland Dysfunction: Providing a Singapore Framework. *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*. 2021 Nov;10(6):530–41.
90. Shah S, Jani H. Prevalence and associated factors of dry eye: Our experience in patients above 40 years of age at a Tertiary Care Center. *Oman J Ophthalmol*. 2015;8(3):151.
91. Trief D. Dry Eye Syndrome. In: *The Columbia Guide to Basic Elements of Eye Care*. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 105–15.
92. Gipson IK. Age-Related Changes and Diseases of the Ocular Surface and Cornea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2013 Dec 13;54(14):ORSF48.
93. Peck T, Olsakovsky L, Aggarwal S. Dry Eye Syndrome in Menopause and Perimenopausal Age Group. *J Midlife Health*. 2017;8(2):51–4.
94. Sambursky R, Davitt WF, Latkany R, Tauber S, Starr C, Friedberg M, et al. Sensitivity and Specificity of a Point-of-Care Matrix Metalloproteinase 9 Immunoassay for Diagnosing Inflammation Related to Dry Eye. *JAMA Ophthalmol*. 2013 Jan 1;131(1):24.
95. Seen S, Tong L. Dry eye disease and oxidative stress. *Acta Ophthalmol*. 2018 Jun 21;96(4).
96. Akpek EK, Amescua G, Farid M, Garcia-Ferrer FJ, Lin A, Rhee MK, et al. Dry Eye Syndrome Preferred Practice Pattern®. *Ophthalmology*. 2019 Jan;126(1):P286–334.
97. n–3 Fatty Acid Supplementation for the Treatment of Dry Eye Disease. *New England Journal of Medicine*. 2018 May 3;378(18):1681–90.
98. Kojima T. Contact Lens-Associated Dry Eye Disease: Recent Advances Worldwide and in Japan. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2018 Nov 27;59(14):DES102.
99. Nair S, Kaur M, Sharma N, Titiyal JS. Refractive surgery and dry eye - An update. *Indian J Ophthalmol*. 2023 Apr;71(4):1105–14.
100. Vehof J, Snieder H, Jansonius N, Hammond CJ. Prevalence and risk factors of dry eye in 79,866 participants of the population-based Lifelines cohort study in the Netherlands. *Ocul Surf*. 2021 Jan;19:83–93.
101. Hallak JA, Tibrewal S, Mohindra N, Gao X, Jain S. Single Nucleotide Polymorphisms in the BDNF, VDR, and DNASE 1 Genes in Dry Eye Disease Patients: A Case-Control Study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2015 Sep 22;56(10):5990.

102. Shanti Y, Shehada R, Bakkar MM, Qaddumi J. Prevalence and associated risk factors of dry eye disease in 16 northern West bank towns in Palestine: a cross-sectional study. *BMC Ophthalmol.* 2020 Dec 13;20(1):26.
103. Kaiser T, Janssen B, Schrader S, Geerling G. Depressive symptoms, resilience, and personality traits in dry eye disease. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology.* 2019 Mar 15;257(3):591–9.
104. Leonardi A, Modugno RL, Salami E. Allergy and Dry Eye Disease. *Ocul Immunol Inflamm.* 2021 Aug 18;29(6):1168–76.
105. Galor A, Feuer W, Lee DJ, Florez H, Carter D, Pouyeh B, et al. Prevalence and Risk Factors of Dry Eye Syndrome in a United States Veterans Affairs Population. *Am J Ophthalmol.* 2011 Sep;152(3):377-384.e2.
106. Napoli PE, Nioi M, Fossarello M. The “Quarantine Dry Eye”: The Lockdown for Coronavirus Disease 2019 and Its Implications for Ocular Surface Health. *Risk Manag Healthc Policy.* 2021 Apr;Volume 14:1629–36.
107. Wolkoff P. External eye symptoms in indoor environments. *Indoor Air.* 2017 Mar;27(2):246–60.
108. Alves M, Novaes P, Morraye M de A, Reinach PS, Rocha EM. Is dry eye an environmental disease? *Arq Bras Oftalmol.* 2014;77(3).
109. Jung SJ, Mehta JS, Tong L. Effects of environment pollution on the ocular surface. *Ocul Surf.* 2018 Apr;16(2):198–205.
110. Moore QL, De Paiva CS, Pflugfelder SC. Effects of Dry Eye Therapies on Environmentally Induced Ocular Surface Disease. *Am J Ophthalmol.* 2015 Jul;160(1):135-142.e1.
111. Chlasta-Twardzik E, Górecka-Nitoń A, Nowińska A, Wylęgała E. The Influence of Work Environment Factors on the Ocular Surface in a One-Year Follow-Up Prospective Clinical Study. *Diagnostics.* 2021 Feb 25;11(3):392.
112. Jaki Mekjavic P, Tipton MJ, Mekjavic IB. The eye in extreme environments. *Exp Physiol.* 2021 Jan 29;106(1):52–64.
113. Rauchman SH, Locke B, Albert J, De Leon J, Peltier MR, Reiss AB. Toxic External Exposure Leading to Ocular Surface Injury. *Vision.* 2023 Apr 3;7(2):32.
114. Abusharha AA, Pearce EI, Fagehi R. Effect of Ambient Temperature on the Human Tear Film. *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice.* 2016 Sep;42(5):308–12.

115. McDonald M, Patel DA, Keith MS, Snedecor SJ. Economic and Humanistic Burden of Dry Eye Disease in Europe, North America, and Asia: A Systematic Literature Review. *Ocul Surf.* 2016 Apr;14(2):144–67.
116. Truong S, Cole N, Stapleton F, Golebiowski B. Sex hormones and the dry eye. *Clin Exp Optom.* 2014 Jul 1;97(4):324–36.
117. Nkiru Z N, Stella O, Udeh N, Polycarp U A, Daniel C N, Ifeoma R E. Dry eye disease: A longitudinal study among pregnant women in Enugu, south east, Nigeria. *Ocul Surf.* 2019 Jul;17(3):458–63.
118. Matossian C, McDonald M, Donaldson KE, Nichols KK, MacIver S, Gupta PK. Dry Eye Disease: Consideration for Women’s Health. *J Womens Health.* 2019 Apr;28(4):502–14.
119. Sriprasert I, Warren DW, Mircheff AK, Stanczyk FZ. Dry eye in postmenopausal women. *Menopause.* 2016 Mar;23(3):343–51.
120. Dang A, Nayeni M, Mather R, Malvankar-Mehta MS. Hormone replacement therapy for dry eye disease patients: systematic review and meta-analysis. *Canadian Journal of Ophthalmology.* 2020 Feb;55(1):3–11.
121. Prakash Maurya R, Gupta A, Verma S, P Singh V, Singh A, Singh V, et al. Sex hormones and dry eye disease: Current update. *IP International Journal of Ocular Oncology and Oculoplasty.* 2021 Jul 28;7(2):139–50.
122. Mostafa S, Seamon V, Azzarolo AM. Influence of sex hormones and genetic predisposition in Sjögren’s syndrome: A new clue to the immunopathogenesis of dry eye disease. *Exp Eye Res.* 2012 Mar;96(1):88–97.
123. Abd-Allah NM, Hassan AA, Omar G, Hamdy M, Abdelaziz STA, Abd El Hamid WM, et al. Dry eye in rheumatoid arthritis: relation to disease activity. *Immunol Med.* 2020 Apr 2;43(2):92–7.
124. Wang L, Xie Y, Deng Y. Prevalence of dry eye in patients with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *BMJ Open.* 2021 Sep 29;11(9):e047081.
125. Chin YH, Ng CH, Lee MH, Koh JWH, Kiew J, Yang SP, et al. Prevalence of thyroid eye disease in Graves’ disease: A meta-analysis and systematic review. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2020 Oct 10;93(4):363–74.
126. Yoo TK, Oh E. Diabetes mellitus is associated with dry eye syndrome: a meta-analysis. *Int Ophthalmol.* 2019 Nov 7;39(11):2611–20.
127. McCusker MM, Durrani K, Payette MJ, Suchecki J. An eye on nutrition: The role of vitamins, essential fatty acids, and antioxidants

- in age-related macular degeneration, dry eye syndrome, and cataract. *Clin Dermatol.* 2016 Mar;34(2):276–85.
128. Demirci G, Karaman Erdur S, Ozsutcu M, Eliacik M, Olmuscelik O, Aydin R, et al. Dry Eye Assessment in Patients With Vitamin D Deficiency. *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice.* 2018 Sep;44(1):S62–5.
129. Garcia-Queiruga J, Pena-Verdeal H, Sabucedo-Villamarin B, Giraldez MJ, Garcia-Resua C, Yebra-Pimentel E. A cross-sectional study of non-modifiable and modifiable risk factors of dry eye disease states. *Contact Lens and Anterior Eye.* 2023 Jun;46(3):101800.
130. Ji YW, Mittal SK, Hwang HS, Chang EJ, Lee JH, Seo Y, et al. Lacrimal gland-derived IL-22 regulates IL-17-mediated ocular mucosal inflammation. *Mucosal Immunol.* 2017 Sep;10(5):1202–10.
131. Rhee MK, Mah FS. Inflammation in Dry Eye Disease. *Ophthalmology.* 2017 Nov;124(11):S14–9.
132. Yamaguchi T. Inflammatory Response in Dry Eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2018 Nov 27;59(14):DES192.
133. Mesquida M, Drawnel F, Fauser S. The role of inflammation in diabetic eye disease. *Semin Immunopathol.* 2019 Jul 7;41(4):427–45.
134. Stepp MA, Menko AS. Immune responses to injury and their links to eye disease. *Translational Research.* 2021 Oct;236:52–71.
135. I. Y. Hasan Z. Dry eye syndrome risk factors: A systemic review. *Saudi Journal of Ophthalmology.* 2021;35(2):131.
136. Leonardi A, Van Setten G, Amrane M, Ismail D, Garrigue JS, Figueiredo FC, et al. Efficacy and Safety of 0.1% Cyclosporine a Cationic Emulsion in the Treatment of Severe Dry Eye Disease: A Multicenter Randomized Trial. *Eur J Ophthalmol.* 2016 Jul 4;26(4):287–96.
137. Abidi A, Shukla P, Ahmad A. Lifitegrast: A novel drug for treatment of dry eye disease. *J Pharmacol Pharmacother.* 2016 Dec 11;7(4):194–8.
138. He X, Zhao Z, Wang S, Kang J, Zhang M, Bu J, et al. High-Fat Diet-Induced Functional and Pathologic Changes in Lacrimal Gland. *Am J Pathol.* 2020 Dec;190(12):2387–402.
139. Lestari MLAD, Indrayanto G. Curcumin. In 2014. p. 113–204.
140. Peng Y, Ao M, Dong B, Jiang Y, Yu L, Chen Z, et al. Anti-Inflammatory Effects of Curcumin in the Inflammatory Diseases: Status, Limitations and Countermeasures. *Drug Des Devel Ther.* 2021 Nov;Volume 15:4503–25.

141. Radomska-Leśniewska DM, Osiecka-Iwan A, Hyc A, Gózdź A, Dąbrowska AM, Skopiński P. Therapeutic potential of curcumin in eye diseases. *Central European Journal of Immunology*. 2019;44(2):181–9.
142. Sabet S, Rashidinejad A, Melton LD, McGillivray DJ. Recent advances to improve curcumin oral bioavailability. *Trends Food Sci Technol*. 2021 Apr;110:253–66.
143. Obeid MA, Alsaadi M, Aljabali AA. Recent updates in curcumin delivery. *J Liposome Res*. 2023 Jan 2;33(1):53–64.
144. Ahmed KS, Hussein SA, Ali AH, Korma SA, Lipeng Q, Jinghua C. Liposome: composition, characterisation, preparation, and recent innovation in clinical applications. *J Drug Target*. 2019 Aug 9;27(7):742–61.
145. Mishra H, Chauhan V, Kumar K, Teotia D. A comprehensive review on Liposomes: a novel drug delivery system. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2018 Nov 25;8(6):400–4.
146. López-Cano JJ, González-Cela-Casamayor MA, Andrés-Guerrero V, Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez IT. Liposomes as vehicles for topical ophthalmic drug delivery and ocular surface protection. *Expert Opin Drug Deliv*. 2021 Jul 3;18(7):819–47.
147. Agarwal R, Iezhita I, Agarwal P, Abdul Nasir NA, Razali N, Alyautdin R, et al. Liposomes in topical ophthalmic drug delivery: an update. *Drug Deliv*. 2016 May 3;23(4):1075–91.
148. Aboali FA, Habib DA, Elbedaiwy HM, Farid RM. Curcumin-loaded proniosomal gel as a biofriendly alternative for treatment of ocular inflammation: In-vitro and in-vivo assessment. *Int J Pharm*. 2020 Nov;589:119835.
149. Gupta PK, Periman LM, Lain E, Donnenfeld E, Hovanesian J, Kim T, et al. Meibomian Gland Dysfunction: A Dermatological Perspective on Pathogenesis and Treatment Outlook. *Clinical Ophthalmology*. 2021 Nov;Volume 15:4399–404.
150. Irfan S. Meibomian Gland Dysfunction. *Pakistan Journal of Ophthalmology*. 2019 Apr 1;35(1).
151. Blackie CA, Korb DR, Knop E, Bedi R, Knop N, Holland EJ. Nonobvious Obstructive Meibomian Gland Dysfunction. *Cornea*. 2010 Dec;29(12):1333–45.
152. Villani E, Marelli L, Dellavalle A, Serafino M, Nucci P. Latest evidences on meibomian gland dysfunction diagnosis and management. *Ocul Surf*. 2020 Oct;18(4):871–92.

153. Jester J V., Parfitt GJ, Brown DJ. Meibomian gland dysfunction: hyperkeratinization or atrophy? *BMC Ophthalmol.* 2015 Nov 17;15(S1):156.
154. Moreno I, Verma S, Gesteira TF, Coulson- Thomas VJ. Recent advances in age-related meibomian gland dysfunction (ARMGD). *Ocul Surf.* 2023 Oct;30:298–306.
155. Talens-Estarellles C, García-Marqués JV, Cervino A, García-Lázaro S. Use of digital displays and ocular surface alterations: A review. *Ocul Surf.* 2021 Jan;19:252–65.
156. Kocamiş Ö, Temel E, Aşikgarip N, Örnek K. Electronic Device Screen Time and Meibomian Gland Morphology in Children. *J Ophthalmic Vis Res.* 2021 Oct 25;
157. Li Y, Li S, Zhou J, Liu C, Xu M. Relationship between lipid layer thickness, incomplete blinking rate and tear film instability in patients with different myopia degrees after small-incision lenticule extraction. *PLoS One.* 2020 Mar 12;15(3):e0230119.
158. Daniel E, Maguire MG, Pistilli M, Bunya VY, Massaro-Giordano GM, Smith E, et al. Grading and baseline characteristics of meibomian glands in meibography images and their clinical associations in the Dry Eye Assessment and Management (DREAM) study. *Ocul Surf.* 2019 Jul;17(3):491–501.
159. Mathebula SD. Latest developments on meibomian gland dysfunction: Diagnosis, treatment and management. *African Vision and Eye Health.* 2022 May 30;81(1).
160. Gao H, Chen H, Xie HT, Xu KK, Shi BJ, Huang YK. Changes in Meibum Lipid Composition With Ocular *Demodex* Infestation. *Transl Vis Sci Technol.* 2021 Dec 7;10(14):6.
161. Borchman D, Foulks GN, Yappert MC, Bell J, Wells E, Neravetla S, et al. Human Meibum Lipid Conformation and Thermodynamic Changes with Meibomian-Gland Dysfunction. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2011 May 31;52(6):3805.
162. Zhang SD, He JN, Niu TT, Chan CY, Ren CY, Liu SS, et al. Bacteriological profile of ocular surface flora in meibomian gland dysfunction. *Ocul Surf.* 2017 Apr;15(2):242–7.
163. Rao SK, Gokhale N, Matalia H, Mehta P. Inflammation and dry eye disease—where are we? *Int J Ophthalmol.* 2022 May 18;15(5):820–7.
164. Yoo YS, Na KS, Byun YS, Shin JG, Lee BH, Yoon G, et al. Examination of Gland Dropout Detected on Infrared Meibography by

- Using Optical Coherence Tomography Meibography. *Ocul Surf.* 2017 Jan;15(1):130-138.e1.
165. Arita R, Mizoguchi T, Kawashima M, Fukuoka S, Koh S, Shirakawa R, et al. Meibomian Gland Dysfunction and Dry Eye Are Similar but Different Based on a Population-Based Study: The Hirado-Takushima Study in Japan. *Am J Ophthalmol.* 2019 Nov;207:410–8.
  166. Baudouin C, Messmer EM, Aragona P, Geerling G, Akova YA, Benítez-Del-Castillo J, et al. Revisiting the vicious circle of dry eye disease: A focus on the pathophysiology of meibomian gland dysfunction. Vol. 100, *British Journal of Ophthalmology.* BMJ Publishing Group; 2016. p. 300–6.
  167. Chan TC, Chow SS, Wan KH, Yuen HK. Update on the association between dry eye disease and meibomian gland dysfunction. *Hong Kong Medical Journal.* 2019 Jan 31;
  168. Bikbov MM, Gilmanshin TR, Zainullin RM, Kazakbaeva GM, Iakupova EM, Fakhretdinova AA, et al. Prevalence and associations of dry eye disease and meibomian gland dysfunction in the ural eye and medical study. *Sci Rep.* 2022 Nov 7;12(1):18849.
  169. Cho BJ, Jee DH, Kim WJ, Shin MC, Kim EC, Kim MS, et al. Direct Visualization of Continuous Meibum Secretion From the Orifices of Meibomian Glands to the Tear Film. *Cornea.* 2019 Oct 16;38(10):1245–52.
  170. Sheppard J, Shen Lee B, Periman LM. Dry eye disease: identification and therapeutic strategies for primary care clinicians and clinical specialists. *Ann Med.* 2023 Dec 12;55(1):241–52.
  171. Shen Lee B, Kabat AG, Bacharach J, Karpecki P, Luchs J. <p>Managing Dry Eye Disease and Facilitating Realistic Patient Expectations: A Review and Appraisal of Current Therapies</p>. *Clinical Ophthalmology.* 2020 Jan;Volume 14:119–26.
  172. Zhu J, Inomata T, Shih KC, Okumura Y, Fujio K, Huang T, et al. Application of Animal Models in Interpreting Dry Eye Disease. *Front Med (Lausanne).* 2022 Feb 1;9.
  173. Xu X, Wilkerson A, Li G, Butovich IA, Zuo YY. Comparative Biophysical Study of Meibomian Lipids of Wild Type and *Soat1* -Null Mice: Implications to Meibomian Gland Dysfunction and Dry Eye Disease. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2023 Aug 16;64(11):20.

174. Widjaja-Adhi MAK, Chao K, Golczak M. Mouse models in studies on the etiology of evaporative dry eye disease. *Exp Eye Res.* 2022 Jun;219:109072.
175. Singh S, Sharma S, Basu S. Rabbit models of dry eye disease: Current understanding and unmet needs for translational research. *Exp Eye Res.* 2021 May;206:108538.
176. Prasad D, Salman M, Reddy AA, Jaffet J, Sahoo A, Jakati S, et al. A review of rabbit models of meibomian gland dysfunction and scope for translational research. *Indian J Ophthalmol.* 2023 Apr;71(4):1227–36.
177. Marques C, Meireles M, Norberto S, Leite J, Freitas J, Pestana D, et al. High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte.* 2016 Feb 3;5(1):11–21.
178. Bu J, Zhang M, Wu Y, Jiang N, Guo Y, He X, et al. High-Fat Diet Induces Inflammation of Meibomian Gland. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2021 Aug 16;62(10):13.
179. Sebbag L, Pe'er O. Role of Inflammation in Canine Primary Glaucoma. *Animals.* 2023 Dec 28;14(1):110.
180. Sun M, Moreno IY, Dang M, Coulson-Thomas VJ. Meibomian Gland Dysfunction: What Have Animal Models Taught Us? *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 21;21(22):8822.
181. Gong L, Guan Y, Cho W, Li B, Pan L, Yang Z, et al. A new non-human primate model of desiccating stress-induced dry eye disease. *Sci Rep.* 2022 May 13;12(1):7957.
182. Butovich IA, Lu H, McMahon A, Eule JC. Toward an Animal Model of the Human Tear Film: Biochemical Comparison of the Mouse, Canine, Rabbit, and Human Meibomian Lipidomes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2012 Oct 5;53(11):6881.
183. Thomas B, Bhat K, Mapara M. Rabbit as an animal model for experimental research. *Dent Res J (Isfahan).* 2012;9(1):111.
184. Quinn RH. Rabbit Colony Management and Related Health Concerns. In: *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents.* Elsevier; 2012. p. 217–41.
185. Murphy D, Ricci A, Auce Z, Beechinor JG, Bergendahl H, Breathnach R, et al. EMA and EFSA Joint Scientific Opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety (RONAFA). *EFSA Journal.* 2017 Jan;15(1).
186. Hubrecht, Carter. The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. *Animals.* 2019 Sep 30;9(10):754.

187. Everitt JI, Berridge BR. The Role of the IACUC in the Design and Conduct of Animal Experiments that Contribute to Translational Success. *ILAR J.* 2017;58(1):129–34.
188. No Title. Available from: <https://vmvt.lrv.lt/lt/veiklos-sritys/gyvunu-sveikata-ir-gerove/gyvunu-gerove/bandomieji-gyvunai/>
189. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/LT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063>.
190. <https://e-seimas.lrs.lt/portal/legalAct/lt/TAD/TAIS.437081>.
191. MacArthur Clark J, Clifford P, Jarrett W, Pekow C. Communicating About Animal Research with the Public. *ILAR J.* 2019 Dec 31;60(1):34–42.
192. Sabeti S, Kheirhah A, Yin J, Dana R. Management of meibomian gland dysfunction: a review. *Surv Ophthalmol.* 2020 Mar;65(2):205–17.
193. Geerling G, Tauber J, Baudouin C, Goto E, Matsumoto Y, O'Brien T, et al. The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: Report of the Subcommittee on Management and Treatment of Meibomian Gland Dysfunction. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2011 Mar 30;52(4):2050.
194. López-Miguel A, Tesón M, Martín-Montañez V, Enríquez-de-Salamanca A, Stern ME, Calonge M, et al. Dry Eye Exacerbation in Patients Exposed to Desiccating Stress under Controlled Environmental Conditions. *Am J Ophthalmol.* 2014 Apr;157(4):788–798.e2.
195. Tesón M, González-García MJ, López-Miguel A, Enríquez-de-Salamanca A, Martín-Montañez V, Benito MJ, et al. Influence of a Controlled Environment Simulating an In-Flight Airplane Cabin on Dry Eye Disease. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2013 Mar 27;54(3):2093.
196. Chaudhari P, Satarker S, Thomas R, Theruveethi N, Ghate V, Nampoothiri M, et al. Rodent models for dry eye syndrome: Standardization using benzalkonium chloride and scopolamine hydrobromide. *Life Sci.* 2023 Mar;317:121463.
197. Lin Z, Liu X, Zhou T, Wang Y, Bai L, He H, et al. A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride. *Mol Vis.* 2011 Jan 25;17:257–64.
198. Shinomiya K, Ueta M, Kinoshita S. A new dry eye mouse model produced by exorbital and intraorbital lacrimal gland excision. *Sci Rep.* 2018 Jan 24;8(1):1483.

199. Bereiter DA, Rahman M, Ahmed F, Thompson R, Luong N, Olson JK. Title: P2x7 Receptor Activation and Estrogen Status Drive Neuroinflammatory Mechanisms in a Rat Model for Dry Eye. *Front Pharmacol.* 2022 Apr 5;13.
200. Qin DY, Deng YP. Transgenic dry eye mouse models: powerful tools to study dry eye disease. *Int J Ophthalmol.* 2022 Apr 18;15(4):635–45.
201. Wu Y, Wu J, Bu J, Tang L, Yang Y, Ouyang W, et al. High-fat diet induces dry eye-like ocular surface damages in murine. *Ocul Surf.* 2020 Apr;18(2):267–76.
202. Robin M, Liang H, Baudouin C, Labbé A. In vivo Meibomian gland imaging techniques: A review of the literature. *J Fr Ophtalmol.* 2020 Apr;43(4):e123–31.
203. Deng Y, Wang Q, Luo Z, Li S, Wang B, Zhong J, et al. Quantitative analysis of morphological and functional features in Meibography for Meibomian Gland Dysfunction: Diagnosis and Grading. *EClinicalMedicine.* 2021 Oct;40:101132.
204. Hwang HS, Mikula E, Xie Y, Brown DJ, Jester J V. A novel transillumination meibography device for in vivo imaging of mouse meibomian glands. *Ocul Surf.* 2021 Jan;19:201–9.
205. Ban Y, Shimazaki-Den S, Tsubota K, Shimazaki J. Morphological Evaluation of Meibomian Glands Using Noncontact Infrared Meibography. *Ocul Surf.* 2013 Jan;11(1):47–53.
206. Finis D, Ackermann P, Pischel N, König C, Hayajneh J, Borrelli M, et al. Evaluation of Meibomian Gland Dysfunction and Local Distribution of Meibomian Gland Atrophy by Non-contact Infrared Meibography. *Curr Eye Res.* 2015 Oct 3;40(10):982–9.
207. Liang Q, Pan Z, Zhou M, Zhang Y, Wang N, Li B, et al. Evaluation of Optical Coherence Tomography Meibography in Patients With Obstructive Meibomian Gland Dysfunction. *Cornea.* 2015 Oct;34(10):1193–9.
208. Cui X, Wu Q, Zhai Z, Yang Y, Wei A, Xu J, et al. Comparison of the Meibomian Gland Openings by Optical Coherence Tomography in Obstructive Meibomian Gland Dysfunction and Normal Patients. *J Clin Med.* 2020 Sep 30;9(10):3181.
209. Srinivasan S, Menzies K, Sorbara L, Jones L. Infrared Imaging of Meibomian Gland Structure Using a Novel Keratograph. *Optometry and Vision Science.* 2012 May;89(5):788–94.

210. Wong S, Srinivasan S, Murphy PJ, Jones L. Comparison of meibomian gland dropout using two infrared imaging devices. *Contact Lens and Anterior Eye*. 2019 Jun;42(3):311–7.
211. Zheng Q, Xue Y, Zhong X, Li G, Shi W, Wang T. Correlation Study Between Abnormal Morphology of Meibomian Glands and Meibum in Patients With Dry Eye Disease Under in vivo Confocal Microscopy. *Front Med (Lausanne)*. 2022 Jan 12;8.
212. Fasanello V, Agnifili L, Mastropasqua R, Brescia L, Di Staso F, Ciancaglini M, et al. *In Vivo* Laser Scanning Confocal Microscopy of Human Meibomian Glands in Aging and Ocular Surface Diseases. *Biomed Res Int*. 2016;2016:1–8.
213. Maruoka S, Tabuchi H, Nagasato D, Masumoto H, Chikama T, Kawai A, et al. Deep Neural Network-Based Method for Detecting Obstructive Meibomian Gland Dysfunction With in Vivo Laser Confocal Microscopy. *Cornea*. 2020 Jun;39(6):720–5.
214. Vasanthapuram VH, Saha P, Mohamed A, Naik MN. Ultrasound biomicroscopic features of the normal lower eyelid. *Orbit*. 2021 Sep 3;40(5):375–80.
215. Rousou C, Schuurmans CCL, Urtti A, Mastrobattista E, Storm G, Moonen C, et al. Ultrasound and Microbubbles for the Treatment of Ocular Diseases: From Preclinical Research towards Clinical Application. *Pharmaceutics*. 2021 Oct 25;13(11):1782.
216. Deschamps N, Baudouin C. Dry Eye and Biomarkers: Present and Future. *Curr Ophthalmol Rep*. 2013 Jun 15;1(2):65–74.
217. Baenninger PB, Voegeli S, Bachmann LM, Faes L, Iselin K, Kaufmann C, et al. Variability of Tear Osmolarity Measurements With a Point-of-Care System in Healthy Subjects—Systematic Review. *Cornea*. 2018 Jul 4;37(7):938–45.
218. Li N, Deng XG, He MF. Comparison of the Schirmer I test with and without topical anesthesia for diagnosing dry eye. *Int J Ophthalmol*. 2012;5(4):478–81.
219. Tsubota K. Short Tear Film Breakup Time—Type Dry Eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2018 Nov 27;59(14):DES64.
220. Yang S, Lee HJ, Kim DY, Shin S, Barabino S, Chung SH. The Use of Conjunctival Staining to Measure Ocular Surface Inflammation in Patients With Dry Eye. *Cornea*. 2019 Jun 14;38(6):698–705.
221. de la Fuente M, Rodríguez-Agirretxe I, Vecino E, Astigarraga E, Acera A, Barreda-Gómez G. Elevation of Tear MMP-9 Concentration as a

- Biomarker of Inflammation in Ocular Pathology by Antibody Microarray Immunodetection Assays. *Int J Mol Sci.* 2022 May 18;23(10):5639.
222. Hu B, Qiu Y, Hong J. Tear cytokine levels in the diagnosis and severity assessment of ocular chronic graft-versus-host disease(GVHD). *Ocul Surf.* 2020 Apr;18(2):298–304.
  223. Corrales RM, Narayanan S, Fernández I, Mayo A, Galarreta DJ, Fuentes-Páez G, et al. Ocular Mucin Gene Expression Levels as Biomarkers for the Diagnosis of Dry Eye Syndrome. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2011 Oct 27;52(11):8363.
  224. Jung JH, Ji YW, Hwang HS, Oh JW, Kim HC, Lee HK, et al. Proteomic analysis of human lacrimal and tear fluid in dry eye disease. *Sci Rep.* 2017 Oct 17;7(1):13363.
  225. Gaudenzi D, Mori T, Crugliano S, Grasso A, Frontini C, Carducci A, et al. AS-OCT and Ocular Hygrometer as Innovative Tools in Dry Eye Disease Diagnosis. *Applied Sciences.* 2022 Feb 4;12(3):1647.
  226. Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine.* 2015 Feb;975.
  227. Xu X, Khan MA, Burgess DJ. Predicting hydrophilic drug encapsulation inside unilamellar liposomes. *Int J Pharm.* 2012 Feb;423(2):410–8.
  228. Okamoto Y, Taguchi K, Yamasaki K, Sakuragi M, Kuroda S, Otagiri M. Albumin-Encapsulated Liposomes: A Novel Drug Delivery Carrier With Hydrophobic Drugs Encapsulated in the Inner Aqueous Core. *J Pharm Sci.* 2018 Jan;107(1):436–45.
  229. Belfiore L, Saunders DN, Ranson M, Thurecht KJ, Storm G, Vine KL. Towards clinical translation of ligand-functionalized liposomes in targeted cancer therapy: Challenges and opportunities. *Journal of Controlled Release.* 2018 May;277:1–13.
  230. Lee Y, Thompson DH. Stimuli-responsive liposomes for drug delivery. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology.* 2017 Sep 15;9(5).
  231. Guimarães D, Cavaco-Paulo A, Nogueira E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. *Int J Pharm.* 2021 May;601:120571.
  232. Saraf S, Jain A, Tiwari A, Verma A, Panda PK, Jain SK. Advances in liposomal drug delivery to cancer: An overview. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2020 Apr;56:101549.

233. Barenholz Y (Chezy). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release*. 2012 Jun;160(2):117–34.
234. Alavi M, Hamidi M. Passive and active targeting in cancer therapy by liposomes and lipid nanoparticles. *Drug Metab Pers Ther*. 2019 Mar 26;34(1).
235. Nisini R, Poerio N, Mariotti S, De Santis F, Fraziano M. The Multirole of Liposomes in Therapy and Prevention of Infectious Diseases. *Front Immunol*. 2018 Feb 5;9.
236. Veloso DFMC, Benedetti NIGM, Ávila RI, Bastos TSA, Silva TC, Silva MRR, et al. Intravenous delivery of a liposomal formulation of voriconazole improves drug pharmacokinetics, tissue distribution, and enhances antifungal activity. *Drug Deliv*. 2018 Jan 1;25(1):1585–94.
237. Tretiakova DS, Vodovozova EL. Liposomes as Adjuvants and Vaccine Delivery Systems. *Biochem (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol*. 2022 Mar 14;16(1):1–20.
238. Bhattacharjee A, Das PJ, Adhikari P, Marbaniang D, Pal P, Ray S, et al. Novel drug delivery systems for ocular therapy: With special reference to liposomal ocular delivery. *Eur J Ophthalmol*. 2019 Jan 14;29(1):113–26.
239. Lai S, Wei Y, Wu Q, Zhou K, Liu T, Zhang Y, et al. Liposomes for effective drug delivery to the ocular posterior chamber. *J Nanobiotechnology*. 2019 Dec 13;17(1):64.
240. Mahmoodi Chalbatani G, Dana H, Gharagouzloo E, Grijalvo S, Eritja R, Logsdon CD, et al. <p>Small interfering RNAs (siRNAs) in cancer therapy: a nano-based approach</p>. *Int J Nanomedicine*. 2019 May;Volume 14:3111–28.
241. Zhen S, Li X. Liposomal delivery of CRISPR/Cas9. *Cancer Gene Ther*. 2020 Aug 2;27(7–8):515–27.
242. Ma Z, Wang N, He H, Tang X. Pharmaceutical strategies of improving oral systemic bioavailability of curcumin for clinical application. *Journal of Controlled Release*. 2019 Dec;316:359–80.
243. Baranauskas V, Jaruseviciene R, Grigalavicius M, Galgauskas S, Karabanovas V, Steponkiene S. Biomimetic Curcumin-Loaded Liposomes for the Treatment of Dry Eyes and Meibomian Gland Dysfunction: An In Vivo Study. *J Clin Med [Internet]*. 2024 Oct 27 [cited 2024 Oct 29];13(21):6436. Available from: <https://www.mdpi.com/2077-0383/13/21/6436>

244. Sohn SI, Priya A, Balasubramaniam B, Muthuramalingam P, Sivasankar C, Selvaraj A, et al. Biomedical Applications and Bioavailability of Curcumin—An Updated Overview. *Pharmaceutics*. 2021 Dec 7;13(12):2102.
245. Boroumand N, Samarghandian S, Hashemy SI. Immunomodulatory, anti-inflammatory, and antioxidant effects of curcumin. *Journal of Herbmед Pharmacology*. 2018 Oct 6;7(4):211–9.
246. Rodella U, Honisch C, Gatto C, Ruzza P, D’Amato Tóthová J. Antioxidant Nutraceutical Strategies in the Prevention of Oxidative Stress Related Eye Diseases. *Nutrients*. 2023 May 12;15(10):2283.
247. Hussain Y, Alam W, Ullah H, Dacrema M, Daglia M, Khan H, et al. Antimicrobial Potential of Curcumin: Therapeutic Potential and Challenges to Clinical Applications. *Antibiotics*. 2022 Feb 28;11(3):322.
248. Liu Z, Smart JD, Pannala AS. Recent developments in formulation design for improving oral bioavailability of curcumin: A review. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2020 Dec;60:102082.
249. Zhang P, Zhang L, Qin Z, Hua S, Guo Z, Chu C, et al. Genetically Engineered Liposome-like Nanovesicles as Active Targeted Transport Platform. *Advanced Materials*. 2018 Feb 27;30(7).
250. Abri Aghdam M, Bagheri R, Mosafer J, Baradaran B, Hashemzaei M, Baghbanzadeh A, et al. Recent advances on thermosensitive and pH-sensitive liposomes employed in controlled release. *Journal of Controlled Release*. 2019 Dec;315:1–22.
251. Honkanen R, Huang W, Huang L, Kaplowitz K, Weissbart S, Rigas B. A New Rabbit Model of Chronic Dry Eye Disease Induced by Complete Surgical Dacryoadenectomy. *Curr Eye Res*. 2019 Aug 3;44(8):863–72.
252. Bhattacharya D, Ning Y, Zhao F, Stevenson W, Chen R, Zhang J, et al. Tear Production After Bilateral Main Lacrimal Gland Resection in Rabbits. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2015 Dec 7;56(13):7774.
253. Ning Y, Bhattacharya D, Jones RE, Zhao F, Chen R, Zhang J, et al. Evaluating the Functionality of Conjunctiva Using a Rabbit Dry Eye Model. *J Ophthalmol*. 2016;2016:1–9.
254. Hosseini K, Kholodnykh AI, Petrova IY, Esenaliev RO, Hendrikse F, Motamedi M. Monitoring of Rabbit Cornea Response to Dehydration Stress by Optical Coherence Tomography. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2004 Aug 1;45(8):2555.

255. Li N, Deng X, Gao Y, Zhang S, He M, Zhao D. Establishment of the mild, moderate and severe dry eye models using three methods in rabbits. *BMC Ophthalmol.* 2013 Dec 5;13(1):50.
256. Thacker M, Tseng CL, Chang CY, Jakfar S, Chen HY, Lin FH. Mucoadhesive Bletilla striata Polysaccharide-Based Artificial Tears to Relieve Symptoms and Inflammation in Rabbit with Dry Eyes Syndrome. *Polymers (Basel).* 2020 Jun 30;12(7):1465.
257. Carpena-Torres C, Pintor J, Pérez de Lara MJ, Huete-Toral F, Croke A, Pastrana C, et al. Optimization of a Rabbit Dry Eye Model Induced by Topical Instillation of Benzalkonium Chloride. *J Ophthalmol.* 2020 May 30;2020:1–10.
258. Zhou T, Li S, Zhu J, Zeng G, Lv Z, Zhang M, et al. Rosmarinic acid-grafted gelatin nanogels for efficient diquafosol delivery in dry eye disease therapy. *Journal of Controlled Release.* 2024 Sep;373:306–18.
259. Miyake H, Oda T, Katsuta O, Seno M, Nakamura M. A Novel Model of Meibomian Gland Dysfunction Induced with Complete Freund's Adjuvant in Rabbits. *Vision.* 2017 Feb 9;1(1):10.
260. Prasad D, Jakati S, Bokara KK, Basu S, Singh V, Donthineni PR. Comparative assessment of structural and tear film alterations in rabbit meibomian gland dysfunction models using chemical and electrocauterization techniques. *Sci Rep.* 2025 Jul 2;15(1):23494.
261. Gallois-Bernos A, Zhong L, Bai M, Blackie CA. A Novel Rabbit Model of Meibomian Gland Dysfunction–Induced Dry Eye. *Transl Vis Sci Technol.* 2025 Jan 29;14(1):28.
262. Chen M, Hu DN, Pan Z, Lu CW, Xue CY, Aass I. Curcumin protects against hyperosmoticity-induced IL-1 $\beta$  elevation in human corneal epithelial cell via MAPK pathways. *Exp Eye Res.* 2010 Mar;90(3):437–43.
263. Wang Y, Hu Y, An J, Zhang H, Liu X, Li X, et al. Liposome-Based Permeable Eyedrops for Effective Posterior Segment Drug Delivery. *Adv Funct Mater.* 2024 Sep 12;34(39).
264. Masterton S, Ahearne M. Mechanobiology of the corneal epithelium. *Exp Eye Res.* 2018 Dec;177:122–9.
265. Bron AJ, Willshire C. Tear Osmolarity in the Diagnosis of Systemic Dehydration and Dry Eye Disease. *Diagnostics.* 2021 Feb 25;11(3):387.
266. Herbaut A, Liang H, Denoyer A, Baudouin C, Labbé A. Tear film analysis and evaluation of optical quality: A review of the literature. *J Fr Ophthalmol.* 2019 Feb;42(2):e21–35.

267. Periman LM, Mah FS, Karpecki PM. <p>A Review of the Mechanism of Action of Cyclosporine A: The Role of Cyclosporine A in Dry Eye Disease and Recent Formulation Developments</p>. *Clinical Ophthalmology*. 2020 Dec;Volume 14:4187–200.
268. Barbalho GN, Brugger S, Raab C, Lechner JS, Gratieri T, Keck CM, et al. Development of transferosomes for topical ocular drug delivery of curcumin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2024 Dec;205:114535.
269. Basnet P, Hussain H, Tho I, Skalko-Basnet N. Liposomal Delivery System Enhances Anti-Inflammatory Properties of Curcumin. *J Pharm Sci*. 2012 Feb;101(2):598–609.
270. Borselli M, Ferrari FF, Bianchi P, Rossi C, Scalzo GC, Mangialavori D, et al. Outcomes of the addition of oral administration of curcumin-phospholipid to hyaluronic acid-based tear substitute for the treatment of dry eye disease. *Frontiers in Ophthalmology*. 2023 Oct 5;3.
271. Lee OL, Tepelus TC, Huang J, Irvine AG, Irvine C, Chiu GB, et al. Evaluation of the corneal epithelium in non-Sjögren’s and Sjögren’s dry eyes: an in vivo confocal microscopy study using HRT III RCM. *BMC Ophthalmol*. 2018 Dec 4;18(1):309.
272. Park JH, Moon SH, Kang DH, Um HJ, Kang SS, Kim JY, et al. Diquafosol Sodium Inhibits Apoptosis and Inflammation of Corneal Epithelial Cells Via Activation of Erk1/2 and RSK: In Vitro and In Vivo Dry Eye Model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2018 Oct 24;59(12):5108.
273. Agarwal P, Rupenthal ID. Modern approaches to the ocular delivery of cyclosporine A. *Drug Discov Today*. 2016 Jun 1;21(6):977–88.
274. Baudouin C, Rolando M, Benitez Del Castillo JM, Messmer EM, Figueiredo FC, Irkec M, et al. Reconsidering the central role of mucins in dry eye and ocular surface diseases. *Prog Retin Eye Res*. 2019 Jul;71:68–87.
275. Wirta DL, Torkildsen GL, Moreira HR, Lonsdale JD, Ciolino JB, Jentsch G, et al. A Clinical Phase II Study to Assess Efficacy, Safety, and Tolerability of Waterfree Cyclosporine Formulation for Treatment of Dry Eye Disease. *Ophthalmology*. 2019 Jun;126(6):792–800.
276. Hueck A, Wehrmann R. Comparison of the Clinical Efficacy of Four Different Liposomal Sprays for the Treatment of Dry Eye. *Open J Ophthalmol*. 2017;07(02):103–16.

## SUMMARY

### Research Problem

The dissertation addresses the growing prevalence and insufficient treatment efficacy of Meibomian gland dysfunction (MGD) and dry eye syndrome (DES), two interrelated ocular surface diseases significantly affecting quality of life. MGD is identified as the leading cause of DES, with a complex pathophysiology involving inflammation, microbial alterations, corneal damage, and tear film instability. These processes create a "vicious cycle" that perpetuates disease progression. The rapid advancement of digital technology, prolonged screen exposure, reduced blink rates, and environmental pollution have contributed to an increase in the incidence of these conditions, particularly in aging populations. Despite existing treatments, many patients do not achieve sufficient relief, necessitating innovative therapeutic approaches to address the underlying mechanisms of these diseases.

### Research Aim and Objectives

The aim of this dissertation is to investigate the pathophysiology of MGD and DES and evaluate the therapeutic potential of biomimetic liposomal nanocarriers in alleviating these conditions. The specific objectives are:

1. To induce meibomian gland dysfunction in a rabbit model using different methods.
2. To determine the effect of MGD on the retina and accessory eye organs: conjunctiva, lacrimal glands and eyelids.
3. To determine the conditions for the application of the preclinical model in the study of newly developed medicinal products for the treatment of SAS.

### Scientific Novelty

This dissertation introduces a novel approach to treating MGD and DES by utilizing biomimetic liposomal nanocarriers loaded with natural active compounds, such as curcumin and cyclosporine A. These formulations are designed to mimic natural tear film properties, delivering targeted anti-inflammatory and tear-stabilizing effects. The research presents groundbreaking findings on the ability of liposomal nanocarriers to break the

"vicious cycle" of MGD and DES by restoring Meibomian gland function, reducing ocular surface inflammation, and stabilizing the tear film.

## Methodology

The study employs a combination of in vivo preclinical models, advanced biochemical assays, and imaging techniques to evaluate the efficacy of liposomal formulations. The rabbit model of MGD and DES was induced using paraffin oil injections to replicate clinical features of these conditions. The therapeutic efficacy of liposomal formulations was assessed by measuring tear breakup time (TBUT), inflammatory biomarkers, Meibomian gland structure, and ocular surface integrity. Statistical analyses, including two-way ANOVA and Dunnett's multiple comparisons test, were performed to validate the results.

## Key Results

1. **Preclinical Model Validation:** The PFA model successfully replicated the pathological features of MGD and DES, including tear film instability, Meibomian gland obstruction, and ocular surface inflammation.
2. **Therapeutic Efficacy of Liposomes:** Biomimetic liposomal formulations (Lipo@Cur and Lipo@CycA) significantly improved TBUT, reduced inflammatory biomarkers, and restored Meibomian gland function. Lipo@Cur demonstrated equal efficacy compared to Lipo@CycA.
3. **Anti-Inflammatory Effects:** Both formulations effectively mitigated conjunctival hyperemia, plugged Meibomian orifices, and corneal epithelial damage, highlighting their potential to address the underlying inflammatory mechanisms of MGD and DES.

## Conclusions

The dissertation substantiates the significant therapeutic potential of biomimetic liposomal nanocarriers in managing MGD and DES. These formulations not only alleviate clinical symptoms but also target the underlying mechanisms of disease progression, offering a promising avenue for personalized and effective ophthalmic treatments. The findings contribute to the advancement of ocular surface disease management and underscore the importance of innovative approaches in modern medicine.

## Doctoral Candidate

The author of this dissertation, Vytautas Baranauskas, holds a strong academic background in biomedical sciences and has a dedicated interest in ocular surface diseases and nanotechnology-based therapeutics. The candidate's research has been presented at international conferences and published in peer-reviewed journals, demonstrating their contribution to advancing the field of ophthalmology and biomedical innovation.

### Research process Research models:

- ❖ Meibomian gland dysfunction with prepared Freund's adjuvant.
- ❖ Dry eye syndrome using a surgical method to remove lacrimal glands.
- ❖ Dry eye syndrome induced by instilling benzalkonium chloride (BAK).
- ❖ Liposomal curcumin effects on induced Meibomian gland dysfunction with prepared Freund's adjuvant.

### Research subjects:

- ❖ New Zealand White rabbits, 12 weeks old, males.
- ❖ Dutch dwarf rabbits, 12 weeks old, males.

### Research location:

- ❖ Vilnius University, Life Sciences Center, vivarium.

Permissions for animal testing projects G2-95 (2018-12-12) and G2-213 (2022-06-10) were obtained from the State Food and Veterinary Service.

## Methodology

Investigation of Meibomian gland dysfunction with prepared Freund's adjuvant. Meibomian gland dysfunction is a condition resulting from impaired gland function, often linked to chronic inflammation that alters the composition of lipids produced by the glands. These altered lipids may become thicker and harder, leading to blocked gland openings and formation of cysts in the ducts. For the experimental MGD model, prepared Freund's adjuvant (PFA) containing lysed lyophilized Mycobacterium cells (Sigma Aldrich, USA) was used. PFA was injected into rabbits under general anesthesia, induced by intramuscular injection of ketamine (25 mg/kg; Ketamidol 10%, 10 ml, Richter Pharma, AT) and medetomidine (0.375

mg/kg; Sedator, 1 mg/ml, 10 ml, Eurovet Animal Health B.V., NL). For pain relief, opioid eye drops (Oftan Obucain, 4 mg/ml, Santen, Tampere, Finland) were used. PFA (30–50  $\mu$ l) was injected into the nasal, central, and temporal areas of the upper eyelid margin of the right eye (OD). Similarly, physiological saline was injected into the same areas of the left eye (OS). The right eye was used as the induced group, and the left eye as the control group.

Investigation of dry eye syndrome induced by surgical removal of specific lacrimal glands Lacrimal gland resection (LGR) was performed to induce a more severe form of dry eye syndrome. This procedure significantly reduces tear production in rabbits, with the extent of reduction dependent on the removal level and individual physiology. During this method, the third eyelid membrane (TEM), Harder's gland (HG), and main lacrimal gland (MLG) were removed in both eyes. Surgery was performed under general anesthesia, induced with intramuscular ketamine (25 mg/kg; Ketamidol 10%, 10 ml, Richter Pharma, AT) and medetomidine (0.375 mg/kg; Sedator 1 mg/ml, 10 ml, Eurovet Animal Health B.V., NL). Anesthesia was maintained using a combination of ketamine and medetomidine. For pain management, buprenorphine (0.03 mg/kg; Sol. Bupaq, multi-dose 0.3 mg/ml, 10 ml, Richter Pharma, UK) was used. Before surgery, the fur around the periocular area was shaved. Heart and respiratory functions were monitored every 15 minutes using a pulse oximeter (PM60A, China), alongside reflex checks. The surgical site was disinfected with 5% betadine solution (Sol. Betadine 1 ml/10 mg, Egis, HU). TEM was removed by incising it at the base. HG was excised through a gap between the medial rectus muscle and anterior orbital wall via a surgical wound post-TEM removal. The gland was fully removed, and hemostasis was achieved by gentle tamponade. A linear incision along the inferior and lateral orbital rim allowed removal of the primary infraorbital, temporal, and intraorbital lobes of the MLG. The orbital septum and skin wound were closed separately using 4-0 polyglactin sutures. Postoperatively, surgical wounds were treated with Maxitrol (5 ml, Alcon, Puurs, Belgium) eye drops three times daily for 7 days. For prophylaxis, enrofloxacin (15 mg/kg; Enroxil 50 mg/ml, KRKA, SL) was subcutaneously administered once daily for 3 days. The study was conducted in the operating room of the vivarium at Vilnius University Life Sciences Center.

Investigation of dry eye syndrome induced by benzalkonium chloride (BAK). Benzalkonium chloride is used to induce corneal epithelial damage and reduce goblet cell count in the conjunctiva. Similar damage is observed in humans with dry eye syndrome (DES). BAK, a commonly used preservative in eye drops, has been shown to exert toxic effects on the ocular surface, reducing tear film stability and increasing the risk of corneal damage.

In the experiment, BAK (Sigma Aldrich, USA) was obtained as a 10% solution and diluted with physiological saline to a 0.1% concentration. The prepared 0.1% BAK solution was instilled into both eyes, 60  $\mu$ l twice daily.

Treatment with liposomal preparations after inducing Meibomian gland dysfunction with CFA. MGD was induced using the CFA method described earlier. Three weeks post-CFA injection, induced eyes were treated with three liposomal formulations specially developed by the National Cancer Institute specialists. Liposomal preparations with curcumin, cyclosporine A, and without active substances were used. Preparations were instilled into the induced right eye (RE) 25  $\mu$ l twice daily, while physiological saline (25  $\mu$ l) was instilled into the left eye (LE) as a control.

Corneal fluorescein staining test. Corneal fluorescein staining assesses epithelial viability and reveals damaged areas on the ocular surface. Sodium fluorescein ophthalmic strips U.S.P. were used. A strip tip was briefly placed in the conjunctival sac, and the eye was blinked several times to distribute the dye. The ocular surface was examined using a stereomicroscope (Leica M165 FC, Germany) and documented with a digital camera (Leica DMC6200, Germany).

Tear secretion test. Tear production was evaluated using Schirmer tear test strips (Optitech Eyecare, India). Rabbits were gently restrained in a cloth wrap. The strip was placed in the middle of the lower eyelid near the conjunctival sac. After 1 minute, the wet strip length was measured in millimeters. Each measurement was performed three times, and the average value was recorded. Strips with no wetting were considered unreadable.

Tear break up time (TBUT). TBUT was used to evaluate tear evaporation caused by dry eye syndrome (DES). The test was conducted on days 0, 7, 14, 21, 24, 28, and 30. TFBUT was measured in seconds from the last blink until the first dry spot appeared in the tear film. The tear film surface is observed until the first breakup sign appears.

Clinical eyelid assessment. Telangiectasia refers to the dilation of small superficial blood vessels in the skin or mucosa around the Meibomian gland openings. Gland blockage occurs due to altered gland structure. Clinical evaluation was performed using a three-point scale: 0 points – no redness or blocked openings observed. 1 point – mild redness and up to 4 blocked openings. 2 points – moderate telangiectasia, hyperemia, and 4–7 blocked openings. 3 points – severe telangiectasia, marked hyperemia, and more than 7 blocked openings. The eyelid margin was divided into three zones: temporal, central, and nasal. Each zone was assessed individually, and the final score was calculated by summing all three zones. The maximum score was 9, and the minimum was 0. Blocked Meibomian gland openings and telangiectasia with hyperemia were assessed separately for a detailed evaluation of condition severity.

Histopathological sample collection. Ocular tissues, including eyelids, cornea, and conjunctiva, were collected post-euthanasia on day 30 post-CFA injection. All tissues were fixed overnight in 4% paraformaldehyde solution in physiological saline. After fixation, tissues were sectioned into 8  $\mu\text{m}$  slices and stained using hematoxylin-eosin (HE) and periodic acid-Schiff (PAS) methods.

Corneal optical coherence tomography (OCT). OCT is a non-invasive laser-based method for examining internal eye structures and measuring corneal layers. Corneal OCT was performed 1 day before the study (-1 day) and weekly from day 11 to the study's end. Anesthetized rabbits were positioned before the OCT lens, and the cornea was scanned with an optical coherence tomography device (Envisu R2210, Bioptigen/Leica, USA). Measurement is conducted in the central cornea.

Statistical data analysis. Statistical calculations were performed using the "GraphPad" software package (version 8.0.1). Quantitative data were plotted, analyzed, and presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Parametric data were evaluated using a two-way ANOVA test. Differences in the dissertation were considered statistically significant when the p-value was less than 0.05.

Weight measurement. Rabbit weight was monitored throughout the study to observe health status and promptly address any deviations from normal weight, indicating potential health issues. Measurements were conducted using animal scales designed for accurate and safe weighing. Rabbits were gently restrained to minimize stress and placed on a sufficiently wide scale platform for stability. Weight was measured at the same time each day under controlled conditions to avoid fluctuations caused by factors such as food or water intake.

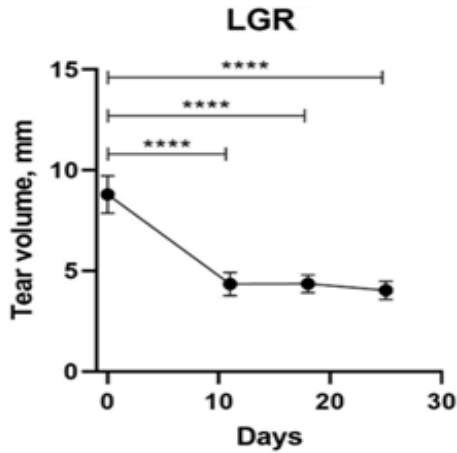
## Results

To comprehensively study the rabbit model of meibomian gland dysfunction, various methods of dry eye syndrome induction were employed. This methodological approach enabled the comparison of the effects of different induction methods and identification of clinical markers specific to each form of DES. The study focused on monitoring clinical signs, histological changes, and functional ocular surface indicators.

Below are the results of the studies using various MGD and DES induction models.

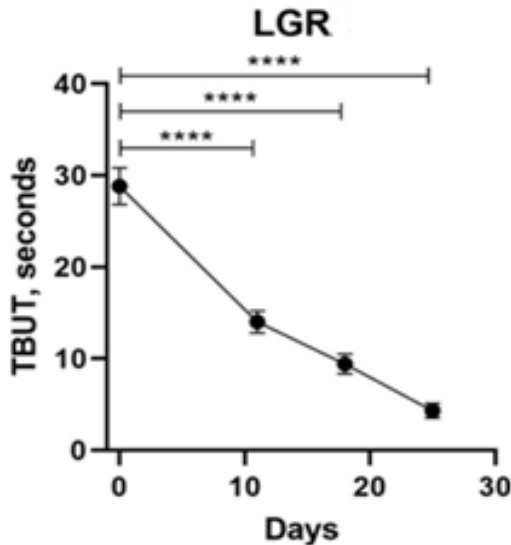
### Surgical Removal of Lacrimal Glands

Following the surgical resection of the main tear glands, Harderian glands, and nictitating membrane, the following results were obtained:



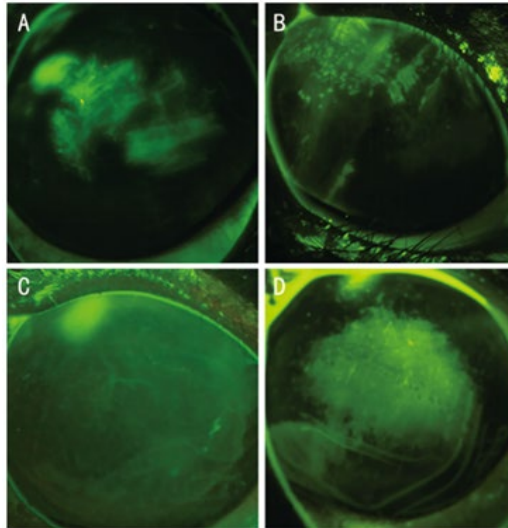
**Figure 1.** Tear Volume After Removal of AL, HL, and TGM.

The average tear production in all animals (n=5) decreased by 50% post-surgery and remained stable until the end of the experiment. This result indicates that the AL contributes significantly to the aqueous component of the tear film. Quantitative data were plotted, analyzed, and presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Parametric data were analyzed using one-way ANOVA, with statistically significant differences considered at  $P < 0.05$ , \*\*\*\*- $P < 0.0001$ .



**Figure 2.** Tear Break-Up Time (TBUT) Before and After Removal of AL, HL, and TGM.

TBUT significantly decreased 11 days post-surgery due to a reduced aqueous tear component. TBUT continued to decline on subsequent measurement days until the experiment concluded. Quantitative data were plotted, analyzed, and presented as mean  $\pm$  SEM. Parametric data were analyzed using one-way ANOVA, with statistically significant differences considered at  $P < 0.05$ , \*\*\*\*- $P < 0.0001$ .

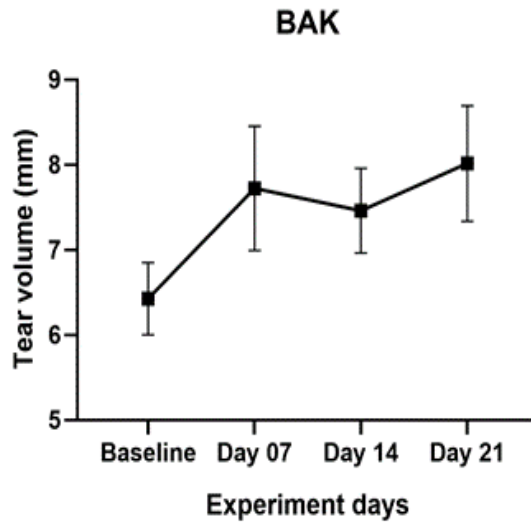


**Figure 3.** Corneal Fluorescein Staining.

A. Fluorescein staining of the cornea before surgery showed slight staining in the central corneal region. B. Fluorescein staining 11 days post-surgery revealed characteristic punctate staining indicative of DES. C. At 18 days post-surgery, staining became more pronounced, with visible corneal ulcer formation at the upper region. D. At 25 days post-surgery, the staining area increased significantly compared to the baseline image (A), reflecting induced DES.

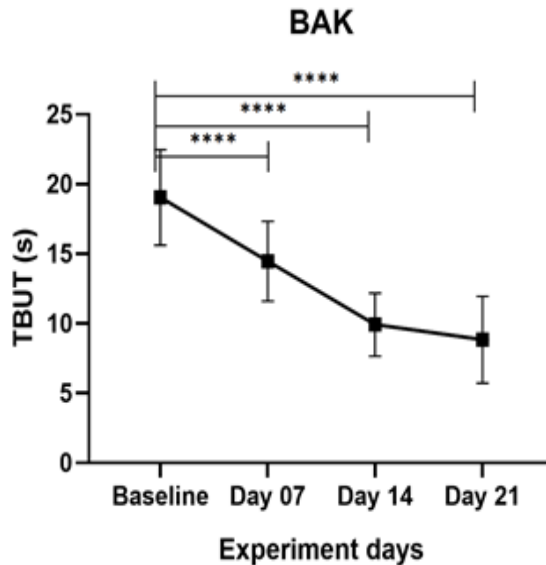
#### BAK Model

The results of the rabbit model induced with benzalkonium chloride are as follows:



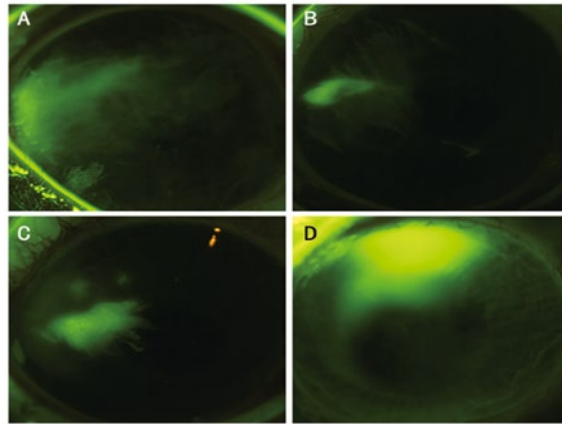
**Figure 4.** Tear Volume Before and During BAK Application.

Tear volume increased significantly after 7 days of BAK exposure and remained elevated throughout the experiment. This compensatory response may reflect an attempt to lubricate and protect the ocular surface in reaction to irritation. Quantitative data were plotted, analyzed, and presented as mean  $\pm$  SEM. Parametric data were analyzed using one-way ANOVA and Dunnett's multiple comparisons test. No significant differences were found at  $P < 0.05$ .



**Figure 5.** TBUT Before and During BAK Application.

TBUT decreased progressively throughout the experiment following exposure to 0.1% BAK solution. The toxic effects of BAK likely reduced goblet cell numbers in the conjunctiva, altering tear film composition and reducing TBUT.

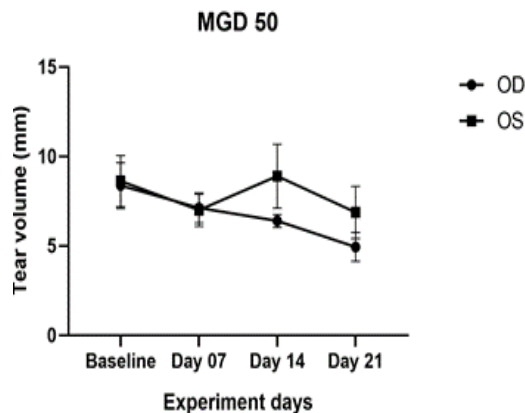


**Figure 6.** Corneal Fluorescein Staining in the BAK Model.

A. Baseline staining before induction showed slight staining in localized areas. B. After 7 days of BAK exposure, staining intensified and localized. C. By day 14, the stained area expanded further. D. At 21 days, the staining pattern resembled a corneal ulcer, indicative of severe DES.

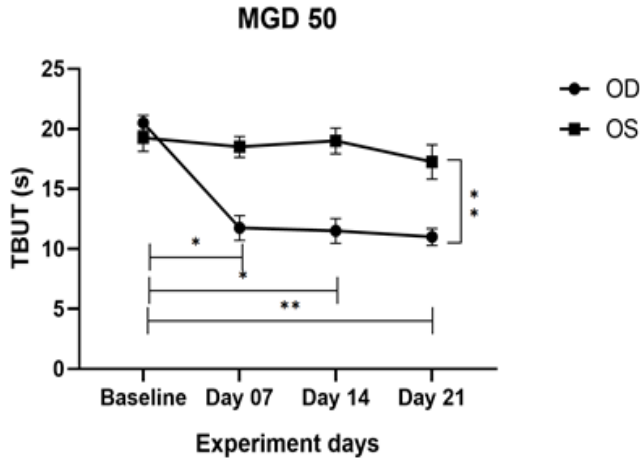
#### CFA-Induced MGD

The results of the CFA injection model (50  $\mu$ L) are summarized below:



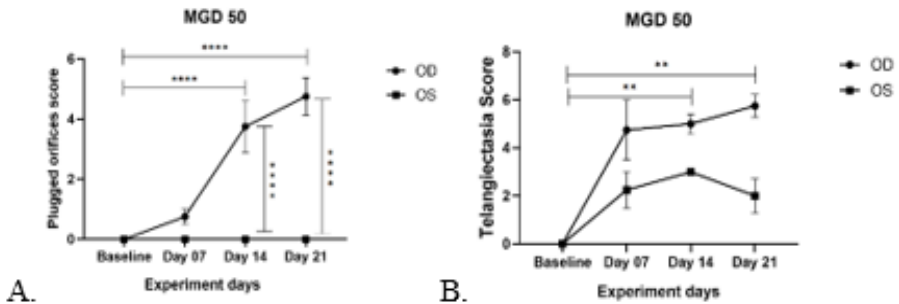
**Figure 7.** Tear Volume Before and After CFA Injection.

Tear volume decreased significantly in the OD eye (CFA-injected) by day 7, while tear production in the OS eye (NaCl-injected) slightly increased by day 14 but dropped again by day 21. No statistical significance was found using two-way ANOVA.



**Figure 8.** TBUT Post-CFA Injection.

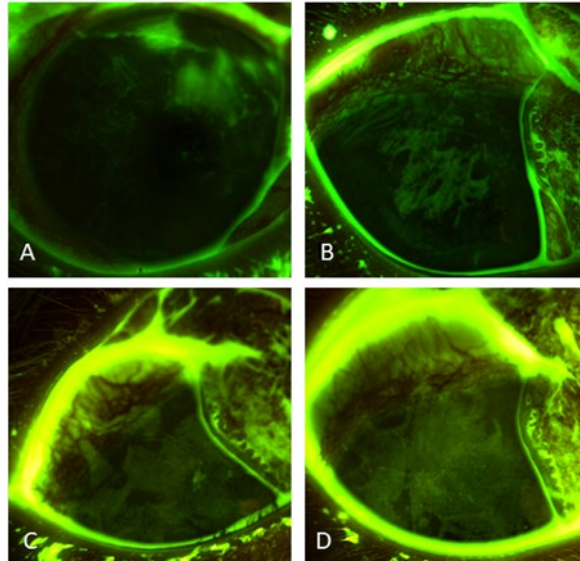
TBUT in the OD eye dropped by approximately 50% within 7 days and remained reduced throughout the experiment, while TBUT in the OS eye remained stable. Significant differences were noted at \*-P<0.05 and \*\*-P<0.001.



**Figure 9.** Evaluation of Meibomian gland orifice obstruction (A) and telangiectasia (B) scoring.

Both eyelids showed no blocked orifices prior to injection. In panel (A), after CFA injection, the number of blocked orifices in the right eyelid significantly increased, particularly on day 14, and further rose by day 21. No blocked orifices were observed in the left eyelid. In panel (B), telangiectasia

was observed in both eyes; however, the change was significantly greater in the right (OD) eye on days 14 and 21, while the change in the left (OS) eye was not statistically significant compared to baseline before induction.

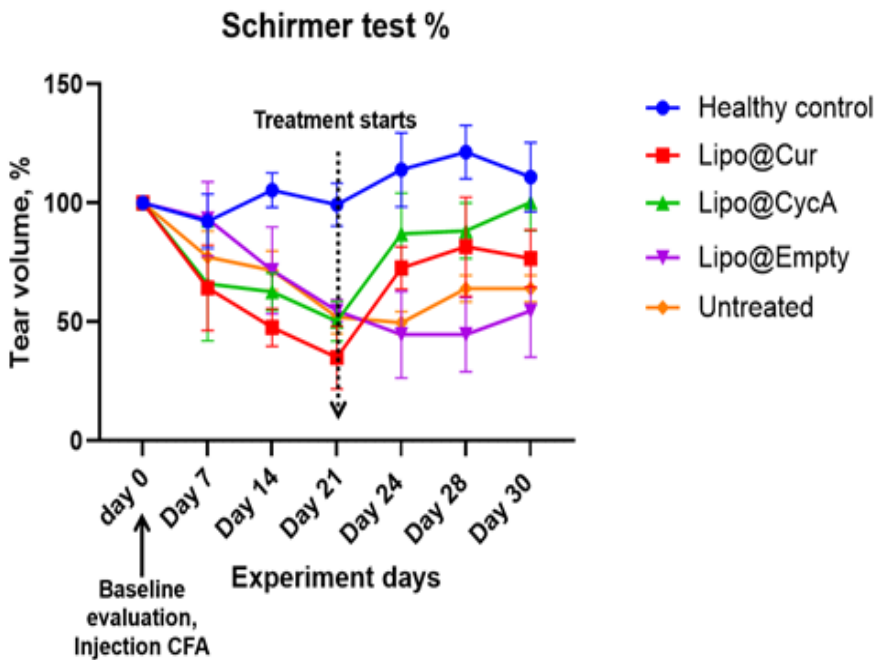


**Figure 10.** Corneal Fluorescein Staining Post-CFA Injection.

A. Pre-induction staining showed minor areas of staining at the corneal margin. B. Day 7 post-CFA injection showed staining over a broader corneal area. C. Day 14 post-CFA injection showed staining covering most of the corneal surface. D. Day 21 post-CFA injection showed diffuse staining indicative of significant corneal damage.

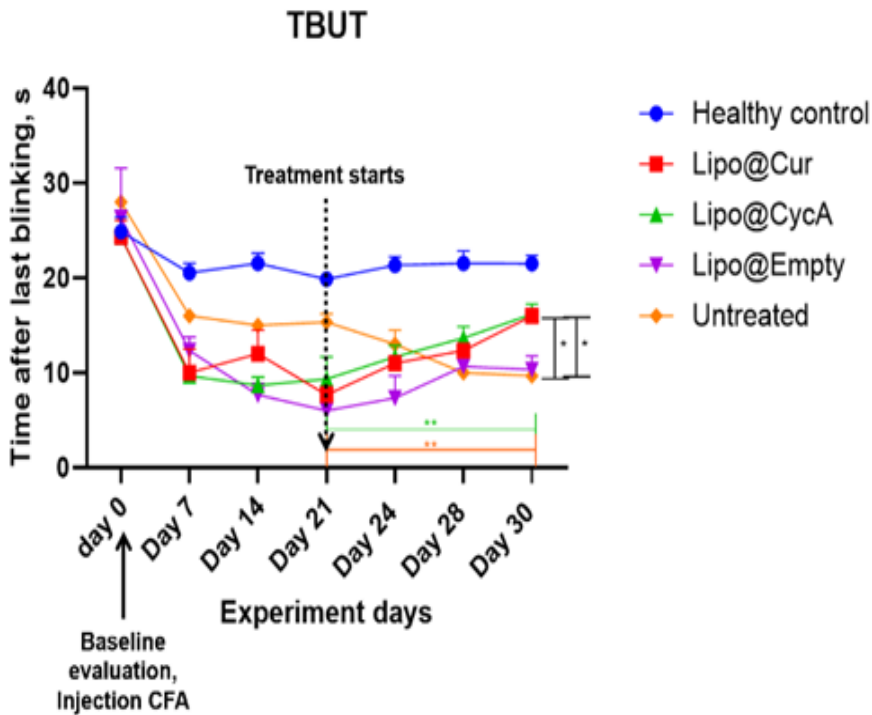
#### Liposomal formulations for MGD treatment

Based on previous studies, the CFA model was optimized by reducing the injection volume from 50  $\mu\text{L}$  to 30  $\mu\text{L}$ . This model was also validated by examining the effectiveness of liposomal formulations in treating Meibomian gland dysfunction. The results of this study are presented below.



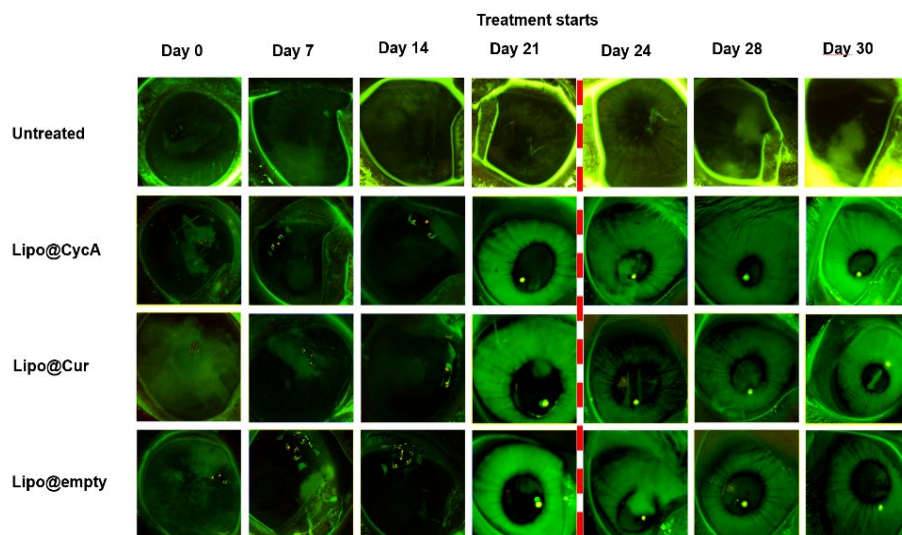
**Figure. 11.** Schirmer test results indicating changes in tear production during the experiment as percentages.

The figure illustrates the dynamics of tear production across various experimental groups over a 30-day period. The tear volume in the Healthy Control group remained stable (~100% or higher) throughout the experiment, reflecting a healthy tear film. Following inflammation induction (CFA injection, days 0–21), tear production decreased (~40–50%) in all experimental groups except the control. From day 21, treatment initiation led to a steady and significant recovery in the Lipo@CycA group (~85% by day 30), while the Lipo@Cur group showed moderate improvement (~70–80%). The Lipo@Empty group showed no significant therapeutic effect, with tear volume remaining low (~50%), similar to the Untreated group (~40%). These results indicate that Lipo@CycA is the most effective treatment in restoring tear film function, whereas untreated inflammation leads to significant tear film damage. A two-way repeated-measures ANOVA test showed no significant differences in tear production among treatment groups compared to the untreated control.



**Figure. 12.** Tear break-up time (TBUT) during the experiment.

The 12 figure illustrates changes in tear film stability in different experimental groups over a 30-day period. The TBUT value of the Healthy control group remains stable (~30 s), indicating a stable and healthy tear film. After inflammation induction (PFA injection, days 0–21), TBUT values decrease (~10 s) in all experimental groups except the control, reflecting tear film destabilization. Upon treatment initiation (from day 21), significant improvement in TBUT (~15–20 s by day 30) is observed in the Lipo@Cur and Lipo@CycA groups, highlighting a stronger stabilizing effect of Lipo@Cur. In the Lipo@Empty group, no significant improvement is noted, with TBUT remaining low (~10 s), while the Untreated group shows the least stable tear film (~8 s). These results emphasize the effectiveness of Lipo@Cur and Lipo@CycA in improving tear film stability compared to other groups. A standard two-way ANOVA test showed significant effects of treatment, time point, and their interaction. Subsequent analysis using Dunnett's multiple comparisons test demonstrated a significant TBUT difference in treatment groups on the final day of treatment compared to the healthy control group. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ .



**Figure.** 13. Dynamics of fluorescein staining results of rabbit corneas over 30 days across experimental groups.

Day 0 shows rabbit corneas before PFA injection. Even in non-induced rabbit eyes, staining areas reflect the initial corneal condition. On days 7, 14, and 21, corneal surface staining and highlighted areas were analyzed, indicating the extent of corneal damage. After collecting data on day 21, rabbits were divided into treatment and control groups, and liposomal preparations were applied to the treatment groups. In the Untreated group, fluorescein staining revealed progressive corneal damage up to day 21, with intense staining areas. Without treatment (days 21–30), the damage remained pronounced. In the Lipo@CycA group, treatment initiated on day 21 resulted in significant restoration of the corneal surface, with almost no damage visible by day 30, indicating therapeutic effects and promotion of corneal regeneration. In the Lipo@Cur group, corneal surface restoration was also observed after treatment initiation, but the effect was slightly less pronounced than in the Lipo@CycA group, with minor damage remaining by day 30. In the Lipo@Empty group, treatment was ineffective, with damage remaining intense, similar to the Untreated group. Results on day 30 showed significantly more intense staining in the untreated group compared to groups treated with liposomal preparations, highlighting their effect in reducing corneal damage. Abbreviations: Untreated: untreated group. Lipo@CycA: group treated with a liposomal preparation containing Cyclosporin A. Lipo@Cur: group treated with a liposomal preparation containing curcumin. Lipo@Empty: group treated with a liposomal preparation without an active substance.

## DISCUSSION OF RESULTS

The aim of this study was to develop a rabbit experimental model of Meibomian gland dysfunction mimicking dry eye syndrome.

### Surgical Removal of Lacrimal Glands

The results of the rabbit lacrimal gland removal model provide significant insights into the pathophysiology of dry eye syndrome and its impact on ocular surface health. The Schirmer test, which measures tear production, showed an average 50% reduction, indicating a substantial decrease in the aqueous component of the tear film. This reduction corresponds to the expected outcome following lacrimal gland removal, as it disrupts the primary source of tear production. The film breakup time test revealed critically reduced film stability: from an average of 30 seconds to just 5 seconds within 25 days post-surgery. This change highlights the compromised protective function of the lipid layer, making the tear film highly unstable and increasing tear evaporation rates. This leaves the ocular surface extremely vulnerable to environmental factors, promotes a sensation of dryness, and triggers inflammatory processes. These changes were further confirmed by fluorescein staining results, which demonstrated significant damage to the corneal and conjunctival epithelium. The increase in staining intensity correlated with reduced tear production and TBUT, indicating that the loss of the tear film's protective function leads to mechanical damage to the ocular surface during blinking.

The histological samples revealed a reduced number of goblet cells in the conjunctiva, highlighting another critical aspect of dry eye pathophysiology. Goblet cells are essential for producing mucins that maintain tear film stability and distribution across the ocular surface. Their reduction indicates a compromised mucin layer, further increasing tear film instability and exacerbating the cycle of ocular surface damage and inflammation.

In summary, the results of the rabbit lacrimal gland removal model effectively demonstrate the cascading effects of reduced tear production on ocular surface health. The significant decrease in tear film stability, confirmed by TBUT and increased fluorescein staining, as well as the histological changes in the corneal epithelium and conjunctival goblet cells, underscore the multifactorial nature of dry eye disease. These findings emphasize the critical need for comprehensive therapeutic approaches targeting not only tear supplementation but also restoring tear film stability and ocular surface integrity.

## BAK Model

The results of the rabbit benzalkonium chloride (BAK) model provide detailed insights into the impact of BAK on ocular surface health over a 21-day period. Tear volume, which showed no significant changes throughout the experiment, indicates that BAK does not markedly affect the aqueous component of the tear film in this model. However, the significant reduction in tear film breakup time (from approximately 18 seconds to 8 seconds) demonstrates a pronounced destabilization of the tear film. This decrease in TBUT suggests that BAK disrupts either the lipid or mucin layer of the tear film, leading to increased evaporation and exposure of the ocular surface.

This finding aligns with the fluorescein staining results, where corneal ulcers and more intense staining were observed toward the end of the experiment. These ulcers and increased staining areas indicate epithelial breakdown and increased permeability, allowing the dye to penetrate deeper layers of the cornea. The presence of corneal ulcers underscores the severity of BAK-induced epithelial damage.

In summary, the results of the BAK rabbit model clearly demonstrate the harmful effects of BAK on the ocular surface, particularly its impact on tear film stability, corneal integrity, and conjunctival goblet cell density. Despite stable tear volume, the significant reduction in TFBUT and increased OCT measurements, along with corneal ulcers and thinning epithelium, emphasize the adverse consequences of BAK exposure. These findings highlight the need for caution when using BAK-containing ophthalmic solutions and underscore the importance of developing alternative preservatives or preservative-free formulations to minimize these harmful effects on ocular surface health.

## Meibomian Gland Dysfunction with CFA

Results from the rabbit model of Meibomian gland dysfunction induced by prepared Freund's adjuvant injections provide compelling insights into the pathophysiological effects of induced MGD and demonstrate significant differences between affected and control eyes. Schirmer's test indicates that tear volume began to decrease in both eyes on day 7 after injection. In the right eye, the reduction continued until day 21, whereas in the left eye, which received saline, tear volume normalized by day 14 and only slightly decreased by day 21. This differential response highlights the prolonged effect of CFA on tear production, suggesting a chronic inflammatory process in the right eye that more severely impairs lacrimal gland function.

A significant decrease in tear film stability—approximately 50% in the right eye compared to the unchanged TBUT in the left eye—further illustrates the inflammation-induced impact of CFA on tear film stability. The instability in the right eye is likely due to reduced tear production and qualitative changes in the meibum, reflecting glandular dysfunction. A gradual increase in the number of obstructed Meibomian gland orifices in the right eyelid, particularly noticeable on days 14 and 21, contrasts with unobstructed orifices in the left eyelid. This process underscores the direct inflammatory impact of CFA on glandular obstruction and supports this model's use in investigating glandular blockage mechanisms and their role in MGD pathogenesis.

In conclusion, the CFA-induced rabbit MGD model effectively replicates the clinical, functional, and histological features of chronic MGD observed in humans. Persistent tear production reduction, significant TBUT decrease, increased gland obstruction, severe corneal epithelial damage, and marked inflammatory infiltration underscore the multifaceted impact of MGD on ocular health. These results validate this model's use in studying MGD pathogenesis and testing potential therapeutic interventions aimed at mitigating inflammation and restoring gland function.

### Liposomal Preparations for MGD

In this comprehensive analysis of Meibomian gland dysfunction and dry eye syndrome models, our study revealed important insights into the therapeutic potential of biomimetic liposomal nanoparticles Lipo@Cur and Lipo@CycA in mitigating these conditions. Following CFA injections, a significant reduction in TBUT was observed, confirming the suitability of CFA for modeling MGD-induced tear film instability and DES. Treatment with Lipo@Cur and Lipo@CycA significantly improved TBUT, with Lipo@Cur showing the most pronounced effect, highlighting its superior potential to restore tear film stability and alleviate dry eye symptoms.

These findings were further supported by statistical analyses, including ordinary two-way ANOVA and Dunnett's multiple comparison tests, which demonstrated the significant impact of these treatments during the observation period. Clinical observations such as telangiectasia, conjunctival hyperemia, and obstructed Meibomian gland orifices further illustrated disease progression and the effectiveness of therapeutic interventions. In the untreated group, these symptoms worsened, emphasizing the natural progression of DES and MGD without treatment. In contrast, all treated groups showed significant improvements, with Lipo@Cur and Lipo@CycA notably reducing inflammation and ocular surface changes.

These results not only validate the models' value but also highlight the importance of specific treatments in addressing the underlying inflammatory mechanisms of DES and MGD. In summary, our study confirms the significant therapeutic potential of Lipo@Cur and Lipo@CycA in managing DES and MGD. These formulations demonstrate the ability to improve tear film stability, reduce ocular surface inflammation, and prevent structural changes in ocular tissues.

These findings contribute to the growing body of literature on DES and MGD management and highlight the importance of timely and targeted interventions to slow disease progression and protect ocular health. The efficacy of biomimetic liposomal nanoparticles in addressing the complex manifestations of DES and MGD represents a promising area of research and therapeutic development. By leveraging natural active ingredients, these formulations enable more effective and personalized treatment strategies in ophthalmology, marking a significant step toward personalized ocular disease therapy.

#### Curriculum Vitae

I hold a degree in Veterinary Medicine from the Lithuanian Veterinary Academy (2006) and a Certified Veterinary Surgeon qualification from the Lithuanian University of Health Sciences (2013). Since 2019, I have been pursuing a PhD at Vilnius University Life Sciences Center, researching rabbit Meibomian gland dysfunction in the context of dry eye syndrome. My professional experience includes roles as Vivarium Coordinator and veterinarian at Vilnius University Faculty of Medicine Institute of Translational Health Research (2024–present), Director of Laboratory Animal Research at UAB “Cureline Baltics” (2021–2024) and UAB “Experimentica” (2018–2021), Veterinary Surgeon at the Lithuanian University of Health Sciences (2015–2018), and Lecturer in exotic and wild animal medicine (2011–2015). I have also contributed to projects in nanotechnology, cell therapy, and preclinical research, co-authored scientific publications, and since 2003, I have been an experienced breeder Shiba Inu dogs and Fédération Cynologique Internationale (FCI) judge, representing Lithuania at international dog shows.

## PADĖKA

LMT už suteikta galimybę studijuoti doktorantūroje. Taip pat esu dėkingas Dr. Virginijai Bukelskienei už suteiktas sąlygas atlikti eksperimentinius tyrimus ir konsultacijas.

Esu dėkingas NVI biomedicininės fizikos laboratorijos moksliniam bendradarbiams sukuriant liposminius preparatus.

Dėkoju savo vadovui Dr. Sauliui Galgauskui už atliktą darbą ir paramą studijų metu.

## PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. Baranauskas V, Daukantaitė J, Galgauskas S, “Rabbit models of dry eye disease: comparative analysis” *International Journal of Ophthalmology*, (2023), 1177-1185, 16(8) <https://doi.org/10.18240/ijo.2023.08.01>
2. Baranauskas Vytautas, Ruta Jaruseviciene, Mantas Grigalavicius, Saulius Galgauskas, Vitalijus Karabanovas, and Simona Steponkiene. 2024. „Biomimetic Curcumin-Loaded Liposomes for the Treatment of Dry Eyes and Meibomian Gland Dysfunction: An In Vivo Study“ *Journal of Clinical Medicine* 13, no. 21: 6436. <https://doi.org/10.3390/jcm13216436>

### Kitos publikacijos:

1. Alizadeh M, Habach F, Maciulis M, Kontenis L, Bagdonas S, Krouglov S, Baranauskas V, Bulotiene D, Karabanovas V, Rotomskis R, Akens M. K, Barzda V “Polarimetric second harmonic generation microscopy of partially oriented fibers II: Imaging study” *Biophysical Journal*, (2023) <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2023.08.015>
2. Tumas Š, Mingaila J, Baranauskas V, Baltrukonytė E, Orla L, Krasko JA, Pocevičiūtė R, Berlina D, Belenky A, Vilenchik M, Vaitkevičienė A, Potapova O and Burokas A (2025) A novel dual DYRK1A/B inhibitor for the treatment of type 1 diabetes. *Front. Pharmacol.* 16:1657042. doi: 10.3389/fphar.2025.1657042
3. Aiste Pupiute, Darius Ciuzas, Odeta Baniukaitiene, Dainius Martuzevicius, Edvardas Bagdonas, Eiva Bernotiene, Tomas Ragauskas, Vytautas Baranauskas, Edvinas Krugly, Layered gradient-pore plasma functionalized poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds promote uniform chondrocyte distribution and proliferation in 3D in vitro chondral models, *Reactive and Functional Polymers*, Volume 224, 2026, 106735, ISSN 1381-5148, <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2026.106735>.

## KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS

1. Dalyvavau Lietuvos optometrinių metų konferencijoje, kuri vyko 2022 04 03 Kaune. Pranešimo pavadinimas “Indukuota triušių Meibomijaus liaukų disfunkcija, imituojanti sausų akių sindromą bandomųjų gyvūnų modelyje”
2. Dalyvavau 3-ojoje Baltijos Biofizikų konferencijoje, kuri vyko 2022 m. spalio 6-7 dienomis Fizinių ir technologijos mokslų centre (Saulėtekio al. 3) Vilniuje. Joje pristačiau stendinių pranešimą, koks yra liposominių preparatų poveikis akims esant meibomijaus liaukų disfunkcijai.
3. Taip pat dalyvavau 2022 spalio 20 d. Kaune Lietuvos akių gydytojų draugijos metinėje konferencijoje, kur skaičiau pranešimą: “Liposomų taikymas sausų akių sindromo gydyme“

## GYVENIMO APRAŠYMAS

### Išsilavinimas:

- 2006 m. Lietuvos veterinarijos akademija, veterinarijos gydytojo kvalifikaciją.
- 2013 m. LSMU, veterinarijos chirurgo kvalifikacija.
- 2019 m. VU GMC, doktorantūros studijos.

### Darbo patirtis:

- 2024 m. lapkričio mėn. – iki dabar, Vivariumo koordinatorius, Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Transliacinių sveikatos tyrimų institutas. Atsakingas už vivariumo veiklos koordinavimą, gyvūnų gerovės užtikrinimą ir tyrimų organizavimą.
- 2021 m. spalio 1 d. – 2024 m. gegužės mėn., Laboratorinių gyvūnų tyrimų direktorius, UAB „Cureline Baltics“. Atsakingas už laboratorinių gyvūnų ir vaistų įsigijimą, apskaitą, gyvūnų gerovės priežiūrą, in vivo tyrimų ir ikiklinikinių projektų organizavimą.
- 2018 m. spalio 1 d. – 2021 m. sausio 5 d., Laboratorinių gyvūnų tyrimų direktorius, UAB „Experimentica“. Vedė laboratorinių gyvūnų skyrių, vykdė R&D projektus bei koordinavo ikiklinikinius vaistų tyrimus.
- 2015 m. lapkričio 2 d. – 2018 m. rugpjūčio 31 d., Veterinarijos gydytojas, Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Gyvūnų tyrimų centras. Laboratorinių gyvūnų priežiūra, sveikatos monitoringas ir chirurginių procedūrų vykdymas.
- 2011 m. rugsėjo 1 d. – 2015 m. liepos 1 d., Asistentas ir dėstytojas, Lietuvos sveikatos mokslų universitetas. Dėstė egzotinių ir laukinių gyvūnų mediciną, organizavo studentų praktiką.

### Savanorystė:

- 2004 m. birželio – 2004 m. rugpjūčio mėn. savanoriauau organizacijoje International Community for the Relief of Starvation and Suffering (ICROSS). Dirbau tarptautinėje komandoje Rytų Afrikoje, kur tobulinau įgūdžius bendruomenės programavimo, stebėsenos, problemų identifikavimo, ligų modelių analizės,

monitoringo ir vertinimo srityse. Veikla buvo vykdoma Ngong Hills regione, Kenijoje.

Dalyvavimas projektuose:

- Aktyviai dalyvavau įvairiuose projektuose, skirtuose nanotechnologijų, ląstelių terapijos ir gyvūnų modelių tyrimams. Turėjau galimybę dalyvauti diabeto tyrimų projektuose, taip pat vėžio tyrimų srityje, kur taikėme PDX (paciento išvestinius ksenograftus) pelių modelius. Teko dalyvauti ir naujų farmakologinių medžiagų kūrimo procese, nuo koncepcijos sukūrimo iki *in vitro* ir *in vivo* tyrimų.

Publikacijos ne disertacijos tema

- Banevičius E., Einorytė J., Falkauskas R., Baranauskas V. „Choline Chloride Possible Effect on the Blood Serum of Cows“, 2016.
- Balčiūnaitė G., Baniulis D., Ragazinskienė O., Baranauskas V. ir kt. „Hemagglutinin Fraction from Echinacea Purpurea L. Impact on Mice Kidney Morphology“, 2018.

Papildoma informacija:

- Nuo 2003 m. esu patyręs šiba šunų veislės veisėjas ir teisėjas, atstovauju Lietuvą tarptautinėse šunų parodose. 2013 m. tapau Tarptautinės kinologų federacijos (FCI) 5 grupės teisėju. Šiuo metu galiu teisėjauti dar keturias FCI grupes.

Vilniaus universiteto leidykla  
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius  
El. p. [info@leidykla.vu.lt](mailto:info@leidykla.vu.lt), [www.leidykla.vu.lt](http://www.leidykla.vu.lt)  
[bookshop.vu.lt](http://bookshop.vu.lt), [journals.vu.lt](http://journals.vu.lt)

Tiražas 15 egz.