

**Бейшенова Гульмира Алимовна**

**Исследование эффективности антиоксидантной терапии при увеите  
(экспериментальное исследование).**

**14.01.07 – Глазные болезни**

**03.01.04 – Биохимия**

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

Работа выполнена в ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней имени Гельмгольца» Минздрава России (директор – Заслуженный деятель науки РФ, д.м.н., профессор **Нероев В.В.**).

**Научные руководители:**

Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор **Нероев Владимир Владимирович**,  
доктор биологических наук, профессор **Чеснокова Наталья Борисовна**.

**Официальные оппоненты:**

**Рябцева Алла Алексеевна** – доктор медицинских наук, профессор, руководитель офтальмологического отделения ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М. Ф. Владимирского».

**Шестопалов Александр Вячеславович** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии лечебного факультета ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Минздрава России.

**Ведущая организация:**

ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России.

Защита диссертации состоится «10» ноября 2015г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д.208.042.01 при ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России (105062, г.Москва, ул. Садовая-Черногрозская, д.14/19)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России (105062, г.Москва, ул. Садовая-Черногрозская, д.14/19)

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2015года.

**Ученый секретарь диссертационного совета**

Доктор медицинских наук

**Филатова И. А.**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Проблема лечения увеитов является одной из важнейших в офтальмологии во всем мире. Пациенты с увеитами и их осложнениями составляют от 5 до 18 % больных глазных стационаров. При тяжелых формах заболевания слепота на оба глаза развивается в 10-15 %, а инвалидность по зрению составляет около 30 % [Зайцева Н.С. 1995; Катаргина Л.А., Хватова А.В., 2000]. Значимость проблемы определяется не столько распространенностью заболевания, сколько тяжестью и рецидивирующим характером течения, его высоким инвалидизирующим эффектом, а также преимущественным поражением лиц молодого и трудоспособного возраста. Полиэтиологичность увеитов и сложность их патогенеза существенно затрудняют выбор препаратов для лечения.

В настоящее время глюкокортикостероидные (ГКС) препараты, занимают ведущее место в лечении эндогенных увеитов у взрослых и детей. К сожалению, ГКС и другие лекарственные вещества, используемые для подавления активности иммунной системы с целью контроля воспалительного процесса могут привести к тяжёлым осложнениям, снижая качество жизни пациентов. Поэтому поиск новых неспецифических противовоспалительных средств для лечения увеитов относится к числу актуальных проблем офтальмологии во всем мире.

При увеите в тканях глаза увеличивается образование свободных радикалов (СР), повышается интенсивность окислительных реакций, усиливающих изменения в иммунной системе, которые в свою очередь способствуют развитию окислительного стресса, то есть образуется так называемый порочный круг [Srivastava S.K., Ramana K.V. 2009; Guha M., Mackman N. 2001; Yadav U.C. et al., 2011] Происходит истощение эндогенного антиоксидантного потенциала [Бабенкова И.В., Комаров О.С, 2005]. Выявлена корреляция между стадией течения увеита и состоянием локальных и системных антиоксидантных резервов [Катаргина Л. А. и соавт, 2003]. Экспериментально доказано, что основная роль в развитии осложнений увеита (катаракта, глаукома, дегенерация сетчатки) принадлежит активации реакций СРО и накоплению СР [Югай М.Т. 1996, Кравчук Е. А. 2004]. Вышесказанное указывает на целесообразность применения антиоксидантов (АО) в

комплексной терапии увеитов. Однако, препараты антиоксидантного действия пока еще не нашли широкого применения в комплексном лечении этого заболевания глаз. В работе исследовали антиоксидантный фермент супероксиддисмутазу (СОД), осуществляющий дисмутацию супероксиданион-радикалов с образованием перекиси водорода и кислорода. Также исследовали действие СОД в составе кальций фосфатных (CaPh) - наночастиц. Мексидол (производное 3-оксипиридина) и гормон мелатонин - вещества с обширным спектром биологического действия, в том числе обладающие антиоксидантными свойствами и способностью повышать активность антиоксидантных ферментов. Важно, что данные вещества, при длительном применении даже в больших количествах не становятся акцепторами неспаренных электронов, то есть не становятся прооксидантами.

Таким образом, исследование влияния антиоксидантных препаратов в зависимости от механизма их действия на клинические проявления и локальные метаболические процессы при экспериментальном увеите может способствовать разработке научно обоснованных методов включения новых антиоксидантных препаратов в комплексную терапию увеитов.

### **ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Оценить действие препаратов, обладающих различным механизмом антиоксидантного действия, на клинические проявления и локальные метаболические процессы при экспериментальном увеите у кроликов.

### **ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:**

1. Изучить изменения биохимических параметров в слезной жидкости и во влаге передней камеры при экспериментальном увеите у кроликов.

2. Изучить влияние местного применения Супероксиддисмутазы и Дексаметазона, а также их сочетания на характер клинического течения и на локальные метаболические процессы во влаге передней камеры при экспериментальном увеите у кроликов.

3. Выявить различия во влиянии местного применения Супероксиддисмутазы в виде водного раствора и Супероксиддисмутазы в составе кальций фосфатных наночастиц на характер клинического течения и на локальные метаболические процессы во влаге передней камеры при экспериментальном увеите у кроликов.

4. Изучить влияние местного применения Мексидола на характер клинического течения и на локальные метаболические процессы во влаге передней камеры при экспериментальном увеите у кроликов.

5. Изучить влияние местного применения Мелатонина и Дексаметазона, а также их сочетания на характер клинического течения и на локальные метаболические процессы во влаге передней камеры при экспериментальном увеите у кроликов.

### **НАУЧНАЯ НОВИЗНА:**

1. Впервые изучено влияние инстилляций Супероксиддисмутазы на локальные метаболические процессы во влаге передней камеры при экспериментальном увеите у кроликов.

2. Впервые показано преимущество инстилляций Супероксиддисмутазы в составе кальций фосфатных наночастиц по сравнению с применением Супероксиддисмутазы в виде водного раствора при экспериментальном увеите у кроликов.

3. Впервые изучено действие инстилляций Мексидола на характер клинического течения и на локальные метаболические процессы во влаге передней камеры при экспериментальном увеите у кроликов.

4. Впервые изучено действие инстилляций Мелатонина на характер клинического течения и на локальные метаболические процессы во влаге передней камеры при экспериментальном увеите у кроликов.

### **ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ:**

1. Представлены объективные данные, свидетельствующие о целесообразности применения супероксиддисмутазы в виде глазных капель в комплексной терапии увеитов.

2. Представлены объективные данные, свидетельствующие о перспективности применения Супероксиддисмутазы в составе кальций фосфатных наночастиц в виде глазных капель для лечения глазных болезней, сопровождающихся окислительным стрессом.

3. Результаты исследования влияния инстилляций Мексидола на характер клинического течения и на локальные метаболические процессы во влаге передней камеры при экспериментальном увеите у кроликов

свидетельствуют о нецелесообразности применения Мексидола в виде глазных капель в комплексной терапии острых увеитов.

4. Представлены объективные данные, свидетельствующие о перспективности применения Мелатонина в виде глазных капель в комплексной терапии увеитов.

**Методология и методы исследования.** Методологической основой диссертационной работы явилось последовательное применение методов научного познания. Работа выполнена в дизайне экспериментального исследования с использованием клинических, инструментальных, морфологических и статистических методов.

### **ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:**

1. При остром увеите в слезной жидкости и во влаге передней камеры изменения биохимических показателей отражают развитие воспаления, сопровождающееся выраженным окислительным стрессом, который служит причиной повреждения тканей глаза и развития осложнений при увеите.

2. Включение инстилляций антиоксидантного фермента Супероксиддисмутазы в комплексную терапию увеитов снижает интенсивность воспаления и повышает антиокислительный потенциал в тканях глаза, способствуя снижению уровня окислительного стресса.

3. Инстилляции Супероксиддисмутазы в составе кальций фосфатных наночастиц более эффективны в лечении экспериментального острого увеита по сравнению с водным раствором фермента.

4. Инстилляции глазных капель Мексидола способствуют снижению воспалительной реакции во влаге передней камеры, однако ухудшают течение увеита за счет увеличения проницаемости кровеносных сосудов радужки и цилиарного тела.

5. Включение местного применения Мелатонина в виде глазных капель в комплексную терапию увеитов снижает интенсивность воспаления и уровень окислительного стресса.

**Степень достоверности** определяется репрезентативным объёмом выборки исследований, выполненных с использованием современных методов обследования, а также большим объёмом проанализированных данных с применением корректных методов статистической обработки.

**Апробация работы.** Работа прошла апробацию на межотделенческой конференции ФГБУ МНИИ ГБ им. Гельмгольца Минздрава России (10.06.2015г.). Основные материалы диссертационной работы доложены на научно-практических конференциях: VI, VII Российский общенациональный офтальмологический форум «РООФ-2013, 2014» (Москва, 2013-14гг); IX Всероссийская научная конференция молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы офтальмологии» (Москва, 2014);

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 3 – в журналах, рецензируемых ВАК РФ. Подана 1 заявка на патент РФ на изобретения.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 161 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, главы собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, содержащего 201 источник (80 отечественных и 121 зарубежных). Работа иллюстрирована 52 таблицами, 26 диаграммами, 48 рисунками.

Работа выполнена в отделе патофизиологии и биохимии (руководитель д.б.н., проф. Чеснокова Н. Б.) и на базе научного экспериментального центра (заведующая к.б.н. Щипанова А.И.) ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России.

## **СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ**

**Материал и методы исследования.** Работа выполнена на 89 кроликах (178 глаз) самцах, породы шиншилла, массой 2-2,5 кг. В работе использована адаптированная и усовершенствованная модель иммуногенного увеита [Нероев В.В., 2006; Baldwin H.A., 1970]. Вначале проводили первичную сенсibilизацию организма путем подкожного введения 5 мл нормальной лошадиной сыворотки («Биомед» Россия) с последующим через 10 дней интравитриальным введением 0,070 мл разрешающей дозы антигена. В качестве местной анестезии использовали 0.5% раствора алкаина.

Использовали препараты: 1. 0.1% р-р супероксиддисмутаза (СОД) (препарат Рексод; ООО "НПП Ферментные технологии", Россия), ЛРС – 007164/09 от 10.09.2009; 2. СОД в кальций фосфатных (CaPh) наночастицах (частицы разработаны и изготовлены на Химическом факультете МГУ им.

Ломоносова); 3. Дексаметазон (р-р для инъекций 4мг/мл; CPSCOUYI Pharmaceutical, КНР), ЛСР-006923/10 от 21.07.10; 4. Мексидол 2% (препарат Мексидол глазные капли; ООО «НПК «Фармасофт», Россия), РН – 002161/01 от 14.03.2008; 5. 0,1% р-р Мелатонина (Sigma-Aldrich), ЕС № 200-797-7; 6. 10 мМ Нерес буфер (рН7,4), ЕС № 230-907-9.

Проведено 5 серий экспериментов: I серия эксперимента, посвящена изучению клинической картины увеита и изменений биохимических параметров в слезной жидкости и во влаге передней камеры (ВПК) при экспериментальном увеите у кроликов. Исследовано: 19 кроликов (38 глаз) с иммуногенным увеитом.

В последующих сериях: изучали влияние местного применения АО с различным механизмом действия на характер клинического течения и на локальные метаболические процессы в ВПК при экспериментальном увеите у кроликов. Кроликам ежедневно в течение 7 дней, начиная со дня введения разрешающей дозы, 3 раза в день в оба глаза проводили инстилляцию по 30 мкл: во II серии эксперимента: 1 группе: р-ра СОД; 2 группе: Дексаметазона; 3 группе: СОД и Дексаметазона с интервалом не менее 60 минут; 4 группе: 10 мМ Нерес буфера; 5 группа: интактные животные. Исследовано: 20 кроликов (по 4 кролика - 8 глаз в группе).

в III серии эксперимента: 1 группе: СОД в виде водного р-ра; 2 группе: СОД в составе СаPh-наночастиц; 3 группе: 10 мМ Нерес буфера; 4 группа: интактные животные. Исследовано: 12 кроликов (по 3 кролика-6 глаз в группе)

в IV серии: 1 группе: р-ра Мексидола; 2 группе: 10 мМ Нерес буфера; 3 группа: интактные животные. Исследовано: 15 кроликов (по 5 кроликов - 10 глаз в группе).

в V серии: 1 группе: р-ра Мелатонина; 2 группе: Дексаметазона; 3 группе: Мелатонина и Дексаметазона с интервалом не менее 60 минут; 4 группе: 10 мМ Нерес буфера; 5 группа: интактные животные. Исследовано: 20 кроликов (по 4 кролика - 8 глаз в группе).

#### Клинические методы исследования:

Данный раздел работы выполнен автором совместно с зав. кабинетом клинической фармакологией ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России, к.м.н. Давыдовой Н. Г. Клиническую оценку течения воспалительного



процесса в глазах проводили ежедневно на 1, 2, 3, 4 и 7-9 сутки увеита (после введения разрешающей дозы) путем биомикроскопии с помощью щелевой лампы. Выраженность клинических признаков увеита оценивали по принятой в лаборатории шкале в условных баллах по 6 критериям (Табл. 1). Одновременно в те же дни проводили фоторегистрацию переднего отрезка глаза.

**Таблица 1.**

**Система оценки выраженности клинических симптомов при экспериментальном увеите у кроликов**

<b>Признак</b>	<b>Степень выраженности</b>	<b>Баллы</b>
<b>Отек век</b>	<b>Слабо выраженный</b>	<b>1</b>
	<b>Умеренный</b>	<b>2</b>
	<b>Выраженный</b>	<b>3</b>
<b>Гиперемия конъюнктивы</b>	<b>Легкая инъекция</b>	<b>1</b>
	<b>Умеренная инъекция</b>	<b>2</b>
	<b>Выраженная инъекция</b>	<b>3</b>
<b>Отек роговицы</b>	<b>Слабовыраженный</b>	<b>1</b>
	<b>Умеренный</b>	<b>2</b>
	<b>Выраженный («матовое стекло»)</b>	<b>3</b>
	<b>Резко выраженный («фарфоровое стекло»)</b>	<b>4</b>
<b>Отек радужки</b>	<b>Слабовыраженный (сглаженный рельеф, незначительное расширение сосудов)</b>	<b>1</b>
	<b>Умеренный (сильно сглаженный рельеф, расширение сосудов)</b>	<b>2</b>
	<b>Выраженный (рельеф практически отсутствует, выраженное расширение сосудов)</b>	<b>3</b>
	<b>Резко выраженный (рельеф отсутствует, резко выраженное расширение сосудов радужки)</b>	<b>4</b>
<b>Фибрин в передней камере (ПК)</b>	<b>Хлопья, сгустки фибрина &lt;1/3 объема ПК</b>	<b>1</b>
	<b>1/3 объема ПК</b>	<b>2</b>
	<b>2/3 объема ПК</b>	<b>3</b>
	<b>Весь объем ПК</b>	<b>4</b>
<b>Неоваскуляризация роговицы</b>	<b>Длина сосудов 0.5мм</b>	<b>0.5</b>
	<b>Длина сосудов 1.0мм</b>	<b>1</b>
	<b>Длина сосудов 1.5мм</b>	<b>1.5</b>
	<b>Длина сосудов 2.0мм</b>	<b>2</b>

Биохимические методы исследования: Данный раздел работы выполнен под руководством зав. отдела патофизиологии и биохимии ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России, д.м.н., проф. Чесноковой Н. Б., совместно с науч. сотрудниками Безнос О. В. и Серебряковой О. Е. Проводили биохимические исследования слезной жидкости и влаги передней камеры глаза. Слезную жидкость отбирали с помощью фильтровальной бумаги, в элюате проводили измерения биохимических показателей. ВПК забирали путем парацентеза передней камеры инсулиновым шприцем под местной анестезией 0.5% раствора алкаина. В ВПК определяли содержание лейкоцитов, затем ее центрифугировали и супернатант использовали для биохимических исследований:

1. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [Lowry O., 1951]; 2. Антиокислительную активность (АОА) определяли по параметрам кинетики хемилюминесценции в модельной системе гемоглобин- $H_2O_2$ -люминол [Гулидова О.В, 1999.]; 3. Активность супероксиддисмутазы определяли по автоокислению кверцетина [Костюк В.А., 1990]; 4. Активность  $\alpha_2$ -макроглобулина ( $\alpha_2$ -МГ) определяли спектрофотометрически со специфическим субстратом п-бензоил-DL-аргинин-р-нитроанилид (БАПНА) по методу К.Н. Веремеенко и Л.И. Волохонской в модификации Т.А. Кримштейн и В.Б. Хватова, адаптированному для микроанализа [Чеснокова Н.Б., 1995.]; 5. Суммарное содержание продуктов обмена монооксида азота (NO) – нитратов и нитритов, определяли фотометрически по методике Green L.C. [Green L.C., 1982]; 6. Лейкоциты определяли микроскопически среднее количество в 5 полях зрения в неокрашенном мазке. Для контроля действия внешних факторов на биохимические показатели в каждом эксперименте исследовали ВПК у здоровых животных. Повторный забор водянистой влаги у одного и того же животного не проводили.

Гистологическое исследование:

Выполнено в лаборатории экспериментальной патоморфологии, зав. лаб., проф. Шехтер А.Б., Первый МГМУ им. И.М. Сеченова). Для более подробного изучения влияния СОД в составе CaPh-наночастиц на 7 сутки проведено гистологическое исследование глазных яблок.

**Методика статистического анализа полученных результатов.** Данный раздел работы выполнен автором совместно с науч. сотрудником отдела патофизиологии и биохимии ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России Безнос О. В. Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистических пакетов программ "Excel" и Statistica 6.0. Исследуемые выборки были подвергнуты тесту на нормальность распределения. Показатели с нормальным распределением представлены как среднее значение (М) и стандартная ошибка среднего арифметического (m). Достоверность различий между группами, с уровнем значимости не менее 95% оценена с помощью параметрического t–критерия Стьюдента. Поскольку показатели выраженности клинических признаков увеита являются дискретными, для оценки различий между группами по этим показателям был применен непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **I серия экспериментального исследования**

#### **Оценка клинической картины увеита у кроликов**

Данный раздел работы выполнен автором совместно с зав. кабинетом клинической фармакологии ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России, к.м.н. Давыдовой Н. Г.

Внешние признаки воспаления (отек век, гиперемия конъюнктивы) и отек роговицы были наиболее выраженными на первые сутки эксперимента, со стиханием воспаления к 7 суткам. В единичных случаях отмечались преципитаты на эндотелии роговицы. Отек стромы радужки, извитость и полнокровность кровеносных сосудов нарастали на протяжении всего периода наблюдения. Формировались задние круговые синехии, зрачок не реагировал на свет, часто имел неправильную форму. Наибольшее количество сгустков фибрина отмечалось на 2 сутки, к 7 суткам происходила их частичная резорбция. Начиная с 3 суток в роговице был отмечен рост новообразованных сосудов со стороны лимба, длина которых к 7 суткам в среднем достигала 3мм (Рис. 1).

#### **Анализ биохимических параметров в слезной жидкости**

Данный раздел работы выполнен под руководством зав. отдела патофизиологии и биохимии ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава

России, д.м.н., проф. Чесноковой Н. Б., совместно с науч. сотрудниками Безнос О. В. и Серебряковой О. Е. В слезной жидкости на 3 сутки воспалительного процесса повышается концентрация белка, уровень  $\alpha_2$ -МГ, активность СОД. К 7 суткам происходит снижение данных показателей. Нами выявлено выраженное снижение уровня АОА в слезной жидкости на 3 сутки эксперимента с незначительным повышением уровня АОА к 7 суткам (Рис. 2).

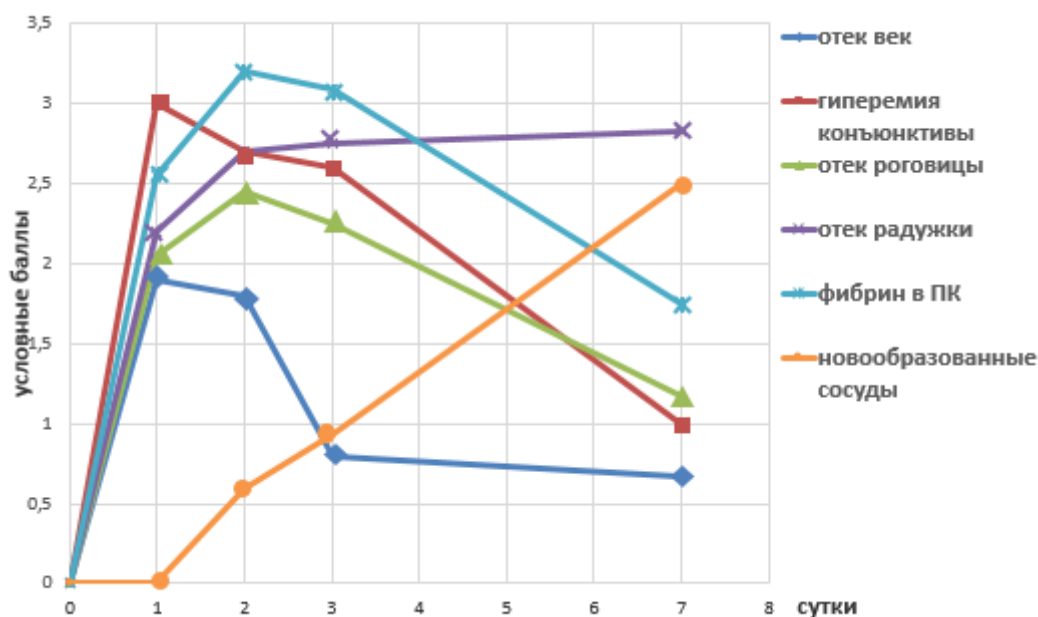


Рис. 1. Клиническая картина экспериментального увеита у кроликов.

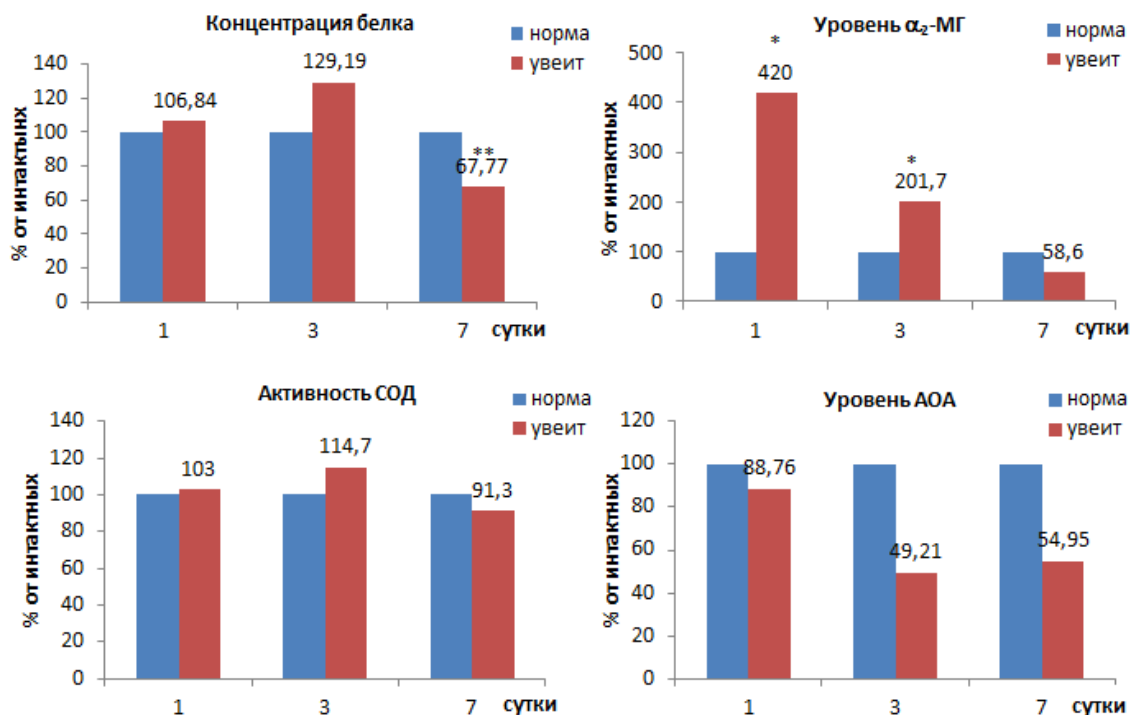


Рис. 2. Биохимические параметры в слезной жидкости на 1, 3 и 7 сутки экспериментального увеита у кроликов. \* -  $p \leq 0,01$  по сравнению с интактными животными; \*\* -  $p \leq 0,05$  по сравнению с группой, получавшей плацебо.

### Анализ биохимических параметров во влаге передней камеры

Данный раздел работы выполнен под руководством зав. отдела патофизиологии и биохимии ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России, д.м.н., проф. Чесноковой Н. Б., совместно с науч. сотрудниками Безнос О. В. и Серебряковой О. Е.

В ВПК на 3 сутки воспалительного процесса значительно повышается концентрация общего белка, уровень  $\alpha_2$ -МГ, концентрация нитратов и нитритов, количество лейкоцитов. На 7 сутки эксперимента происходит снижение данных показателей, однако они остаются на достаточно высоком уровне. Концентрация нитратов и нитритов к 7 суткам достигает уровня нормы. На 3 сутки отмечено значительное снижение уровня АОА, на 7 сутки уровень АОА продолжал снижаться (Рис. 3).

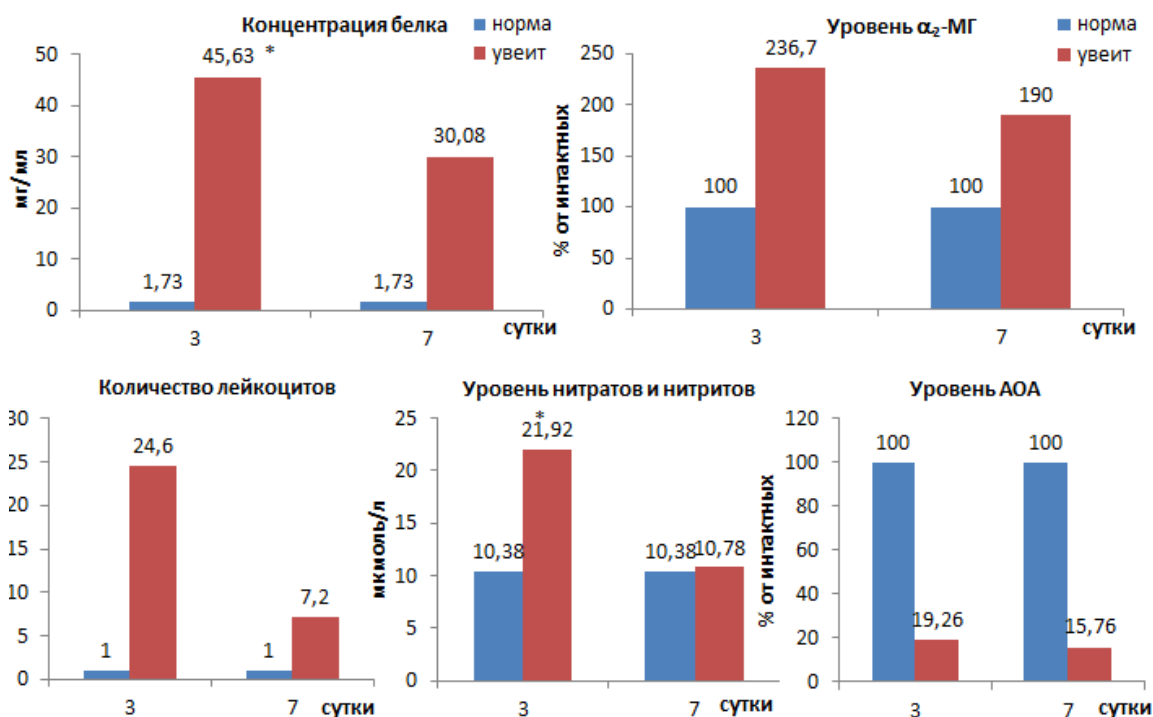


Рис. 3. Биохимические параметры во влаге передней камеры на 3 и 7 сутки экспериментального увеита у кроликов. \* -  $p \leq 0,01$  по сравнению с интактными животными; \*\* -  $p \leq 0,05$  по сравнению с группой, получавшей плацебо.

Таким образом, в воспроизведенной модели экспериментального увеита наблюдались выраженные изменения биохимических показателей слезной жидкости и ВПК. Следует отметить, что изменения биохимических показателей ВПК сохранялись дольше, чем слезной жидкости. Резкое возрастание концентрации белка и увеличение числа лейкоцитов свидетельствует о нарушении гематоофтальмического барьера и повышенной проницаемости

сосудов. Снижение АОА и активности СОД говорит о развитии выраженного окислительного стресса и об истощении эндогенного пула АО. Повышение уровня  $\alpha_2$ -МГ и концентрации нитратов и нитритов также отражает степень остроты воспалительного процесса.

## **II серия экспериментального исследования**

### **Влияние инстилляций супероксиддисмутазы, дексаметазона, а также их сочетания на течение увеита у кроликов**

#### **Оценка клинической картины**

Данный раздел работы выполнен автором самостоятельно.

При применении инстилляций СОД, инстилляций дексаметазона, так же, как и сочетания препаратов при экспериментальном увеите наблюдалось снижение остроты воспалительного процесса (Рис. 4). Инстилляции дексаметазона лучше повлияли на отек век, на гиперемию конъюнктивы и отек радужки, чем инстилляции СОД. Инстилляции СОД лучше снижали отек роговицы, количество фибрина в ВПК, рост новообразованных сосудов роговицы, чем инстилляции дексаметазона. Наблюдалось выраженное синергическое действие СОД и дексаметазона при совместном применении в отношении отека радужки, неоваскуляризации роговицы.

#### **Анализ биохимических параметров во влаге передней камеры**

Выполнен под руководством зав. отдела патофизиологии и биохимии ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца», д.м.н., проф. Чесноковой Н. Б., совместно с науч. сотрудниками Безнос О. В. и Серебряковой О. Е. Выявлено, что на содержание белка в ВПК СОД и дексаметазон повлияли одинаково, а сочетание их не усиливало эффекта. Применение СОД вызывало повышение уровня АОА в ВПК почти в 3 раза, тогда как Дексаметазон в 2 раза снизил имеющийся антиоксидантный потенциал и препятствовал проявлению антиокислительного эффекта СОД. Дексаметазон лучше снизил уровень  $\alpha_2$ -МГ в ВПК, чем СОД. Однако в группе, получавшей СОД, число лейкоцитов оказалось существенно ниже, чем у получавших дексаметазон. Отмечено синергическое действие СОД и дексаметазона при совместном применении двух препаратов в отношении количества лейкоцитов и уровня  $\alpha_2$ -МГ (Рис.5).

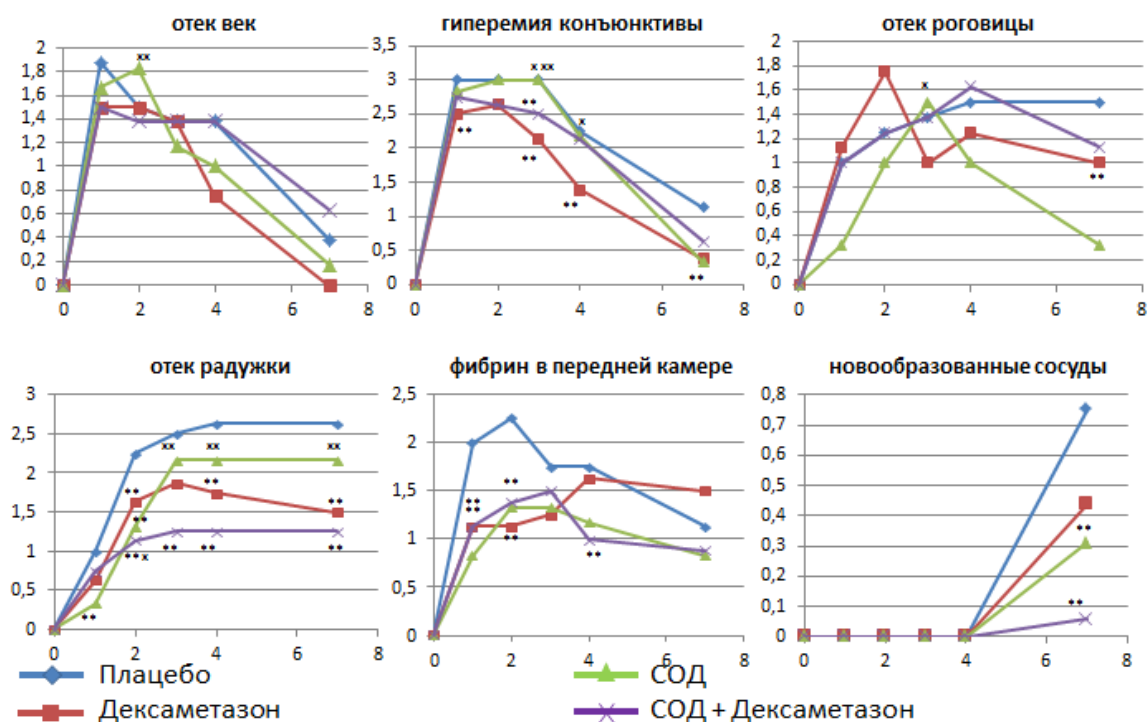


Рис. 4. Влияние инстилляций СОД, Дексаметазона, а также их сочетания на клиническую картину экспериментального увеита у кроликов. По оси Х – сутки экспериментального увеита; по оси Y – условные баллы; \* -  $p \leq 0,01$  по сравнению с интактными животными; \*\* -  $p \leq 0,05$  по сравнению с группой, получавшей плацебо; × -  $p \leq 0,05$  по сравнению с группой, получавшей дексаметазон; ×× -  $p \leq 0,05$  по сравнению с группой, получавшей СОД и дексаметазон.

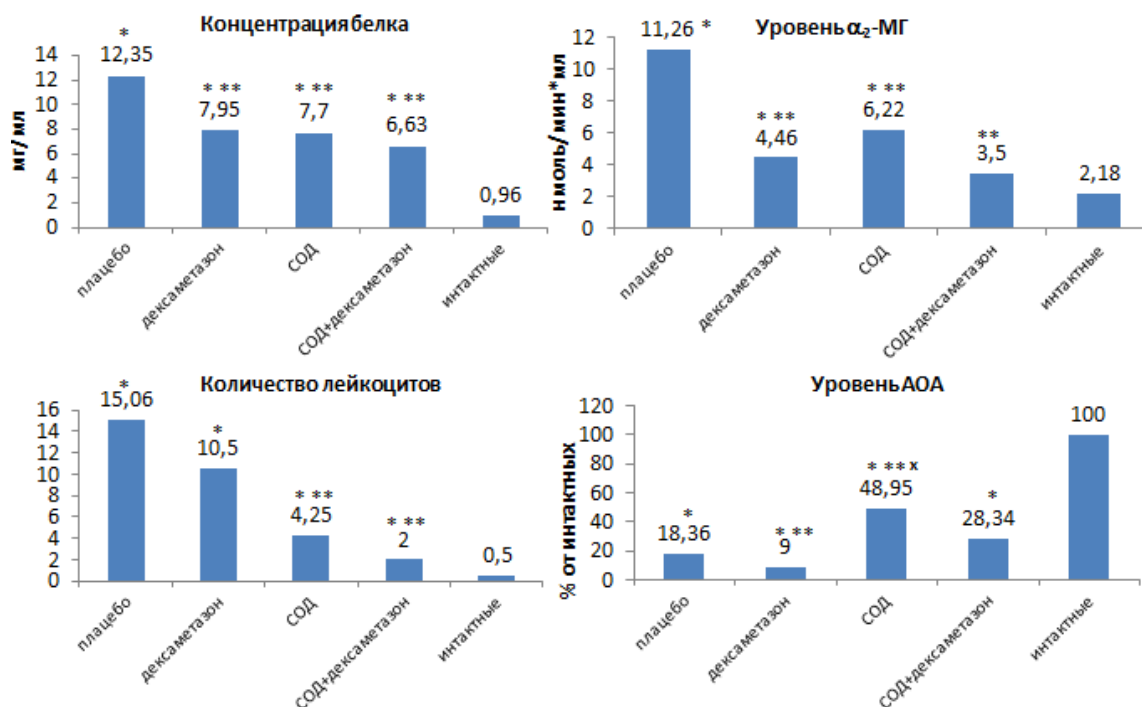


Рис.5. Влияние инстилляций СОД, Дексаметазона, а также их сочетания на биохимические параметры во влаге передней камеры на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов. \* -  $p \leq 0,01$  по сравнению с интактными животными; \*\* -  $p \leq 0,05$  по сравнению с группой, получавшей плацебо; × -  $p \leq 0,05$  по сравнению с группой, получавшей дексаметазон; ×× -  $p \leq 0,05$  по сравнению с группой, получавшей СОД и дексаметазон.

### **III серия экспериментального исследования**

#### **Влияние инстилляций супероксиддисмутазы в виде водного раствора и супероксиддисмутазы в составе кальций-фосфатных наночастиц на течение увеита у кроликов**

CaPh-частицы, содержащие СОД, были получены на базе химического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова. Получение CaPh-частиц проводили по методике, предложенной в работе Шимановской Е.В. и соавт, 2012г. [Шимановская Е.В., 2012]. Включение СОД (препарат "Рексод" производства ООО НПП "Ферментные технологии", Россия) в частицы проводили на стадии их получения. По данным просвечивающей электронной микроскопии полученные СОД-содержащие CaPh-частицы характеризовались округлой формой и размерами не более 0,45мкм. Процент внедрения СОД в частицы оказался высоким и составил  $50\pm 5\%$ . Частицы в лиофильно высушенном состоянии могут храниться без потери своих свойств по крайней мере в течение 6 месяцев, а в растворе при 4°C не менее 3-х месяцев. Ранее было показано, что инстилляции суспензии пустых CaPh-частиц не вызывают раздражения или воспаления в глазу при их закапывании 3 раза в день в течение недели.

#### **Оценка клинической картины**

Данный раздел работы выполнен автором самостоятельно.

При применении СОД в составе CaPh-наночастиц, так же, как и при применении водного раствора СОД, при экспериментальном увеите отмечалось снижение остроты воспаления (Рис. 6). Выявлено, что СОД в составе кальций-фосфатных наночастиц по сравнению с СОД в водном растворе сильнее снижает отек век, гиперемию конъюнктивы, отек роговицы и радужки. На протяжении всего периода наблюдения отмечалось меньшее (в 1,4 раза) количество фибрина в ВПК при лечении СОД в составе CaPh-частиц.

#### **Анализ биохимических параметров во влаге передней камеры**

Данный раздел работы выполнен под руководством зав. отдела патофизиологии и биохимии ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России, д.м.н., проф. Чесноковой Н. Б., совместно с науч. сотрудниками Безнос О. В. и Серебряковой О. Е.

При применении СОД в составе CaPh-наночастиц, так же, как и при применении водного раствора СОД отмечалось снижение уровня



биохимических маркеров воспаления, повышение антиокислительного потенциала в ВПК (Рис. 7). Инстилляций СОД в составе CaPh-частиц сильнее снизили содержание белка в ВПК, чем инстилляций водного раствора СОД. Не было получено достоверных различий в действии двух форм СОД в отношении уровня АОА, уровня  $\alpha_2$ -МГ, количества лейкоцитов.

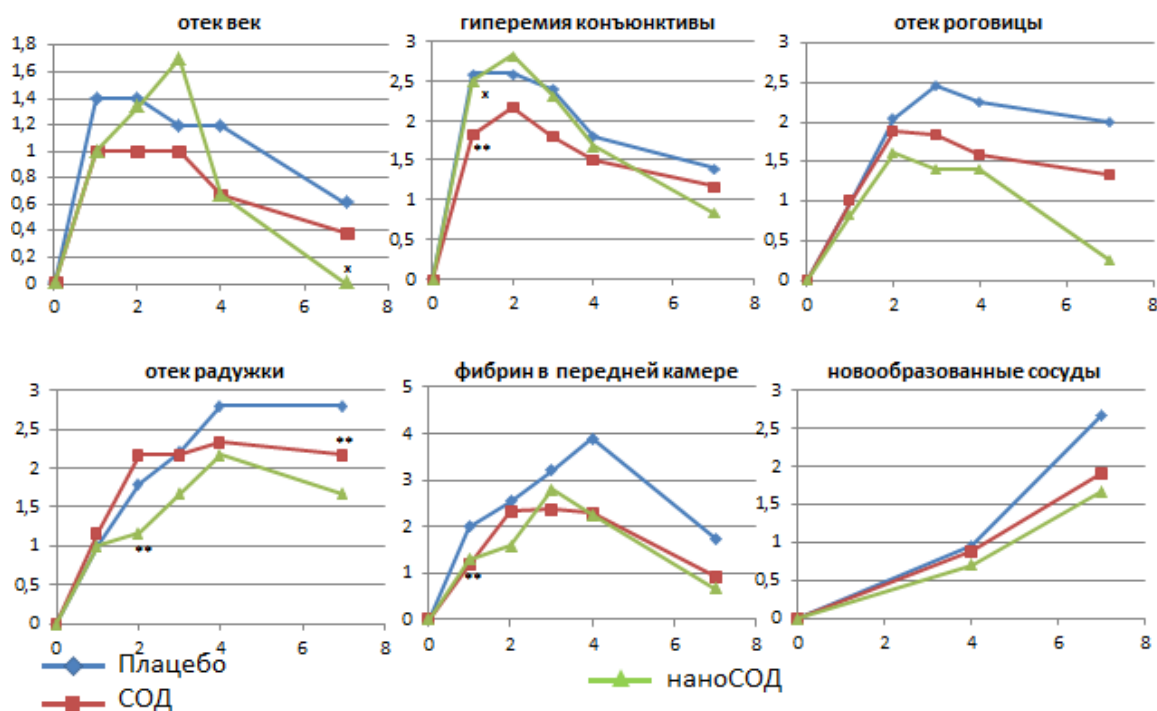


Рис. 6. Влияние инстилляций СОД в виде водного раствора и СОД в составе CaPh-наночастиц на клиническую картину экспериментального увеита у кроликов. По оси X – сутки экспериментального увеита; по оси Y – условные баллы. \* -  $p \leq 0,01$  по сравнению с интактными животными; \*\* -  $p \leq 0,05$  по сравнению с группой, получавшей плацебо; x -  $p \leq 0,05$  по сравнению с группой, получавшей СОД.

Гистологическое исследование выполнено в лаборатории экспериментальной патоморфологии (зав. лаб., проф. Шехтер А.Б., Первый МГМУ им. И.М. Сеченова). Выявлено, что у нелеченных животных, на 8 сутки увеита роговица имеет признаки отека и разрыхления коллагеновых волокон, частичной десквамации эндотелия и очаговой деструкции десцеметовой мембраны. У животных, леченных СОД в виде водного раствора, роговица выстлана неизмененным эпителием, десцеметова мембрана целая, эндотелий местами десквамирован, у большинства животных только в отдельных участках роговицы отмечается разрыхление коллагеновых волокон. Ранее было показано, что при применении производных СОД существенно уменьшалось количество погибших клеток при эндотоксин-индуцированном увеите у мышей [Ando E. 1990]. У животных, получавших СОД в составе CaPh-наночастиц,

роговица имеет плотный характер, выстлана эпителием и эндотелием практически без десквамации, коллагеновые волокна не изменены.

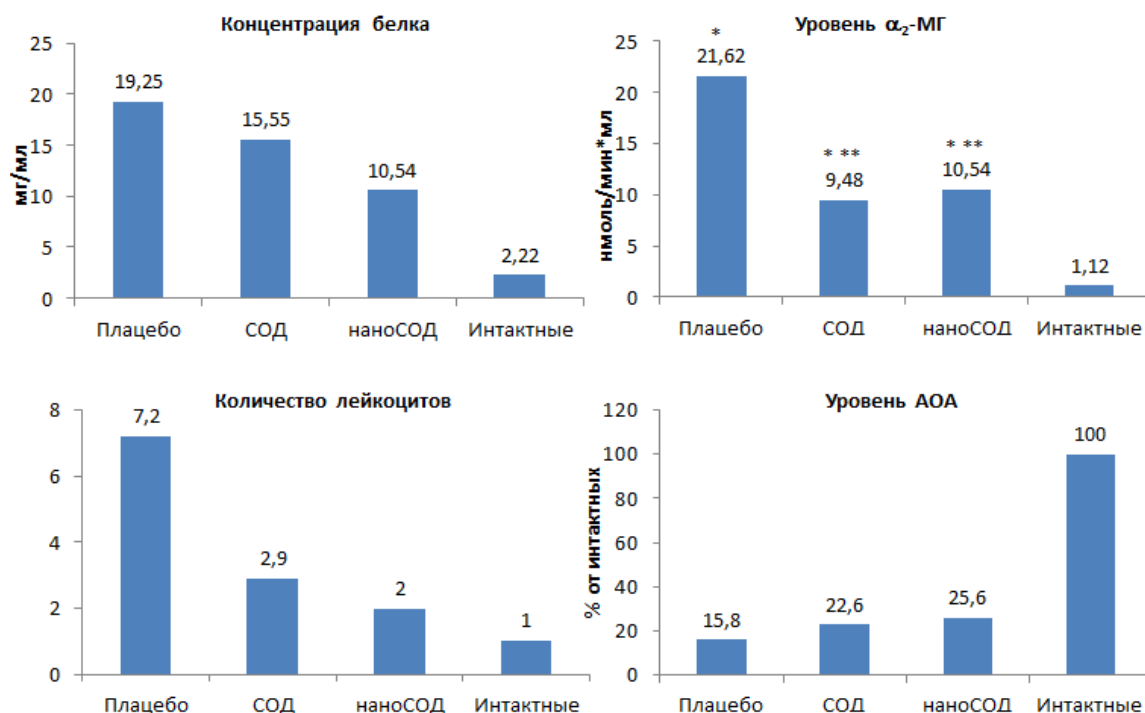


Рис. 7. Влияние инстилляций СОД в виде водного раствора и СОД в составе CaPh-наночастиц на биохимические параметры во влаге передней камеры на 8 сутки экспериментального увеита. \* -  $p \leq 0,01$  по сравнению с интактными животными; \*\* -  $p \leq 0,05$  по сравнению с группой, получавшей плацебо; × -  $p \leq 0,05$  по сравнению с группой, получавшей СОД.

#### **IV серия экспериментального исследования**

##### **Влияние инстилляций Мексидола на течение увеита у кроликов**

###### **Оценка клинической картины**

Данный раздел работы выполнен автором самостоятельно.

В группе животных, получавших мексидол, отек век и отек роговицы были более выраженными. Интенсивность гиперемии конъюнктивы и отека радужки в обеих группах на протяжении всего эксперимента почти не отличалась. В группе, получавшей мексидол, количество фибрина в передней камере было больше в среднем на 80%, что вызвано способностью мексидола повышать проницаемость кровеносных сосудов [Иванов Ю.В., 2000]. Неоваскуляризация роговицы на 40-60% была менее выражена в опытной группе, что объясняется антигипоксическим действием мексидола (Рис. 8).

###### **Анализ биохимических параметров во влаге передней камеры**

Данный раздел работы выполнен под руководством зав. отдела патофизиологии и биохимии ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава

России, д.м.н., проф. Чесноковой Н. Б., совместно с науч. сотрудниками Безнос О. В. и Серебряковой О. Е.

На 9 сутки эксперимента концентрация белка, нитратов и нитритов, уровень  $\alpha_2$ -МГ в ВПК оказались выше на фоне лечения мексидолом, что объясняется его способностью усиливать регионарный кровоток и оказывать сосудорасширяющее действие [Гнездилова А.В., 2010]. Нами не было обнаружено увеличения уровня АОА в ВПК на фоне лечения мексидолом, хотя известно, что его применение вызывает значительное повышение общей АОА в крови [Абраменко Ю.В. 2011] и в слезе [Чеснокова Н.Б. Сообщение 1: 2012] Возможно, избыток NO сыграл негативную роль, так как образующийся из него пероксинитрит усиливает окислительный стресс. Мексидол тем не менее проявляет противовоспалительную активность, что выражается в снижении количества лейкоцитов во влаге передней камеры (Рис. 9).

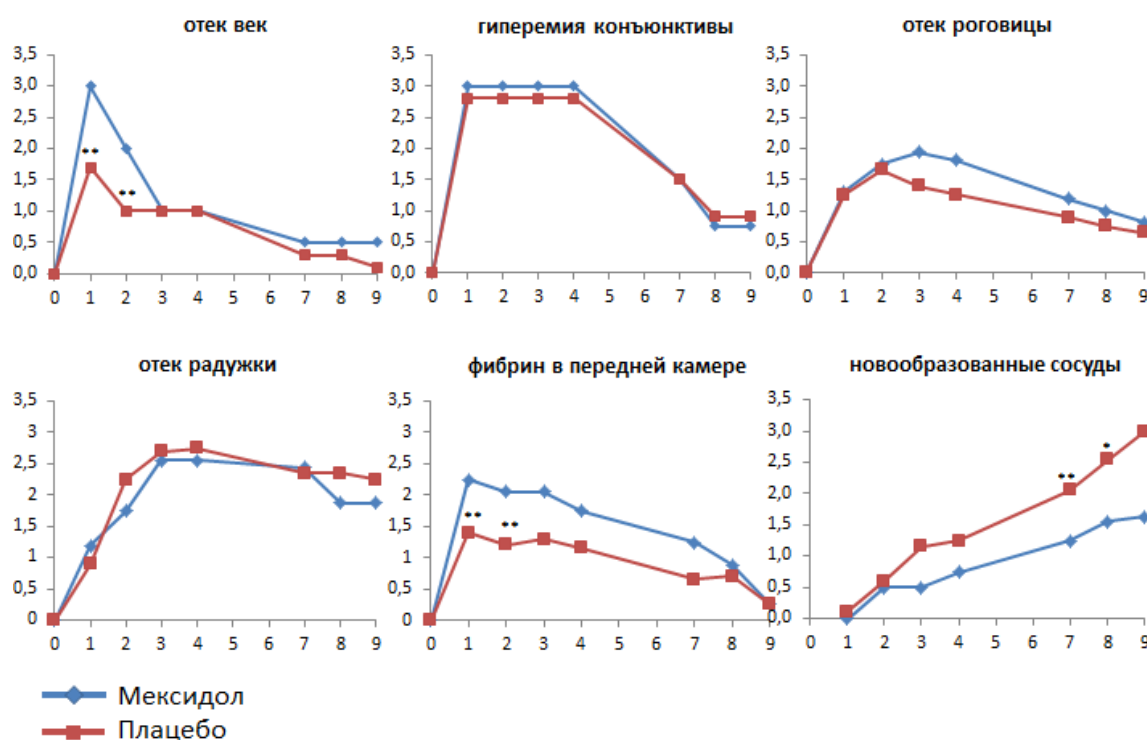


Рис. 8. Влияние инстилляций Мексидола на клиническую картину экспериментального увеита у кроликов. По оси X – сутки экспериментального увеита; по оси Y – условные баллы; \* -  $p \leq 0,01$  по сравнению с интактными животными; \*\* -  $p \leq 0,05$  по сравнению с группой, получавшей плацебо.

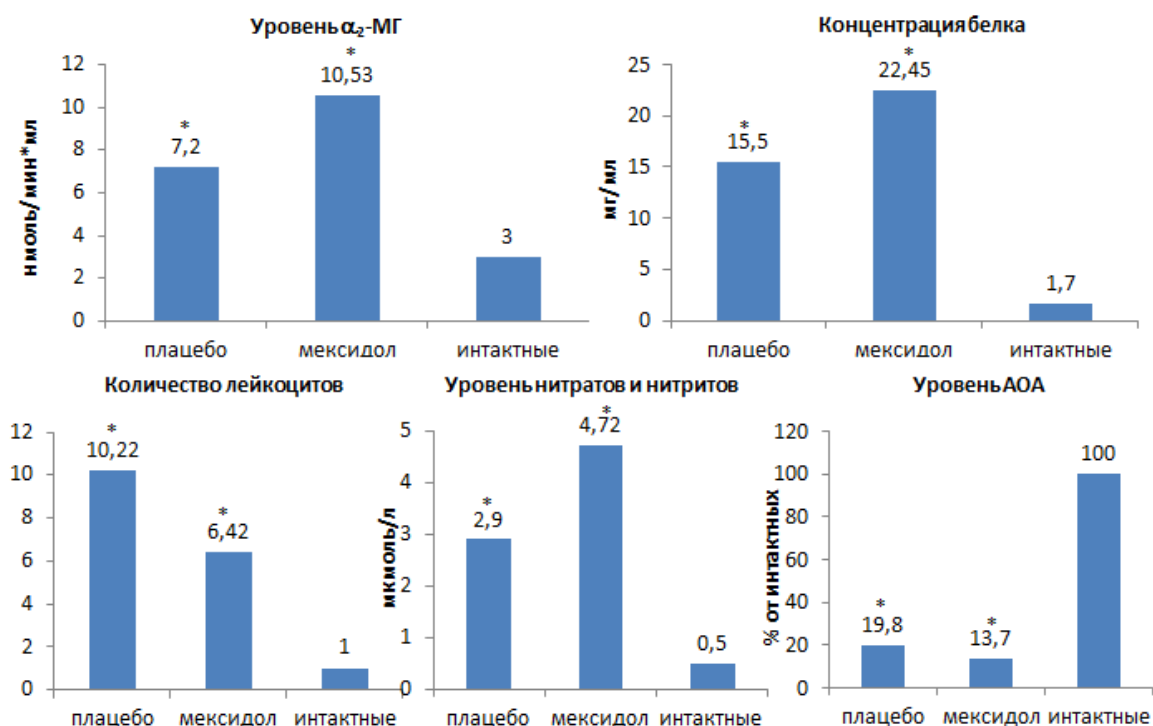


Рис. 9. Влияние инстилляций Мексидола на биохимические параметры влаги передней камеры на 9 сутки экспериментального увеита у кроликов. \* -  $p \leq 0,01$  по сравнению с интактными животными; \*\* -  $p \leq 0,05$  по сравнению с группой, получавшей плацебо.

## **V серия экспериментального исследования**

### **Влияние инстилляций мелатонина, дексаметазона, а также их сочетания на течение увеита у кроликов**

#### **Оценка клинической картины**

Данный раздел работы выполнен автором самостоятельно.

При применении инстилляций Мелатонина, инстилляций дексаметазона, как и при применении сочетания препаратов при экспериментальном увеите у кроликов наблюдалось снижение остроты воспалительного процесса (Рис. 10). Инстилляций дексаметазона несколько лучше влияют на гиперемию конъюнктивы, отек роговицы и радужки, на количество фибрина во влаге передней камеры и рост новообразованных сосудов роговицы. По действию на отек век лечение дексаметазоном сопоставимо с лечением мелатонином. Отмечается синергический эффект дексаметазона и мелатонина при совместном применении в остром периоде воспаления в отношении отека век, гиперемии конъюнктивы и отека роговицы.

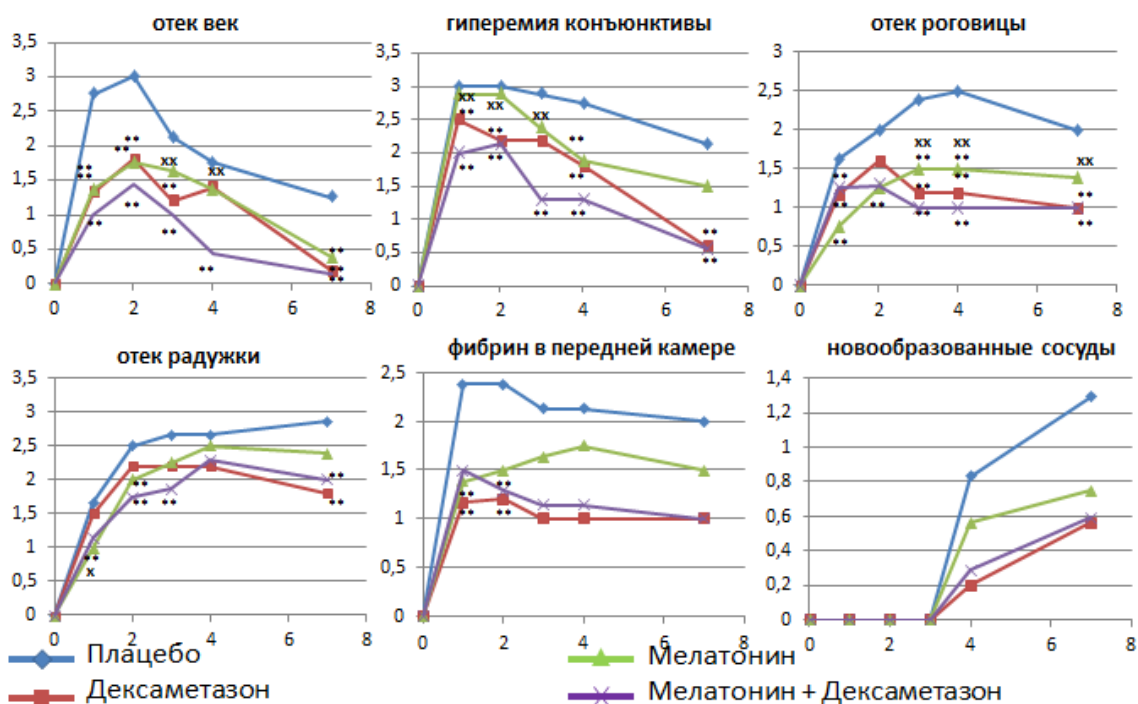


Рис. 10. Влияние инстилляций Мелатонина, Дексаметазона, а также их сочетания на клиническую картину экспериментального увеита у кроликов. По оси X – сутки экспериментального увеита; по оси Y – условные баллы; \* -  $p \leq 0,01$  по сравнению с интактными животными; \*\* -  $p \leq 0,05$  по сравнению с группой, получавшей плацебо; x -  $p \leq 0,05$  по сравнению с группой, получавшей дексаметазон; xx -  $p \leq 0,05$  по сравнению с группой, получавшей Мелатонин и дексаметазон.

#### Анализ биохимических параметров во влаге передней камеры

Данный раздел работы выполнен под руководством зав. отдела патофизиологии и биохимии ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России, д.м.н., проф. Чесноковой Н. Б., совместно с науч. сотрудниками Безнос О. В. и Серебряковой О. Е. Инстилляций мелатонина вызвали большее повышение уровня АОА в ВПК, чем инстилляций дексаметазона, а сочетание препаратов дало промежуточное повышение АОА. Таким образом, применение инстилляций мелатонина позволяет повысить антиокислительный потенциал (Рис. 11). Инстилляций дексаметазона больше снизили содержание белка, уровень  $\alpha_2$ -МГ в ВПК, по сравнению с инстилляциями мелатонина, а сочетание их не усилило эффекта. Инстилляций мелатонина несколько сильнее снизили количество лейкоцитов в ВПК, чем инстилляций дексаметазона. По этому показателю синергическое действие мелатонина и дексаметазона при совместном применении двух препаратов отмечено не было.

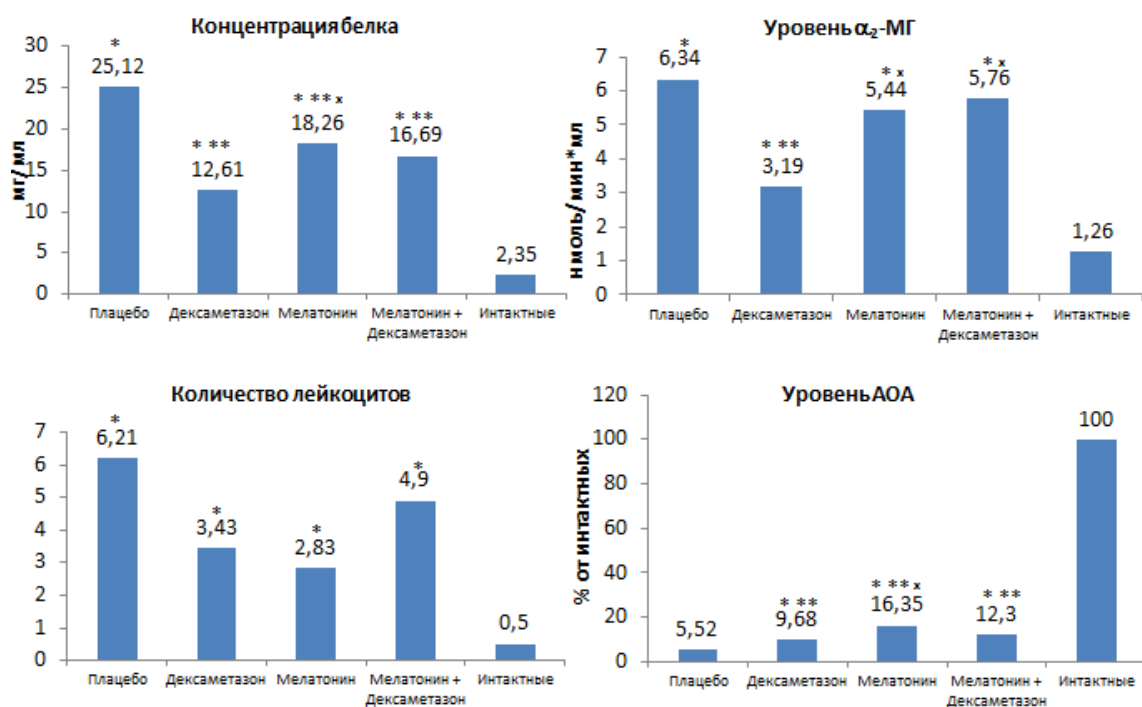


Рис. 11. Влияние инстилляций Мелатонина, Дексаметазона, а также их сочетания на биохимические параметры во влаге передней камеры на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов. \* -  $p \leq 0,01$  по сравнению с интактными животными; \*\* -  $p \leq 0,05$  по сравнению с группой, получавшей плацебо; x -  $p \leq 0,05$  по сравнению с группой, получавшей дексаметазон; xx -  $p \leq 0,05$  по сравнению с группой, получавшей Мелатонин и дексаметазон.

## ВЫВОДЫ:

1. В воспроизведенной модели острого увеита у кроликов, в слезной жидкости и во влаге передней камеры происходит возрастание концентрации общего белка, увеличение числа лейкоцитов, уровня  $\alpha_2$ -макроглобулина, концентрации нитратов и нитритов, значительное снижение антиокислительной активности и активности Супероксиддисмутазы, свидетельствующее о развитии воспаления, сопровождающегося окислительным стрессом. Во влаге эти изменения более выражены.

2. Инстилляции Супероксиддисмутазы и Дексаметазона значительно снижают выраженность клинических проявлений увеита. Во влаге передней камеры Дексаметазон в большей степени снижает уровень  $\alpha_2$ -макроглобулина, тогда как под влиянием Супероксиддисмутазы сильнее уменьшается количество лейкоцитов и в отличие от Дексаметазона происходит восстановление антиокислительной активности. Выявлено синергическое действие Дексаметазона и Супероксиддисмутазы на отек радужки, количество лейкоцитов и уровень  $\alpha_2$ -макроглобулина в водянистой влаге. Включение

инстилляций Супероксиддисмутазы в комплексную терапию увеитов позволяет снизить окислительный стресс и тем самым повысить эффективность лечения.

3. Инстилляции Супероксиддисмутазы в составе CaPh-наночастиц, по сравнению с Супероксиддисмутазой в водном растворе, сильнее снижают отек век и гиперемию конъюнктивы, уменьшают количество фибриновых сгустков в передней камере глаза, снижают содержание белка в водянистой влаге, а также улучшают состояние эндотелия роговицы. Внедрение Супероксиддисмутазы в CaPh-наночастицы способствует стабилизации активности фермента и увеличению сроков хранения препарата.

4. Местное введение Мексидола при остром увеите у кроликов в виде глазных капель приводит к снижению интенсивности неоваскуляризации роговицы, уменьшению количества лейкоцитов во влаге передней камеры, однако значительно увеличивает в ней содержание метаболитов оксида азота и белка за счет повышения проницаемости сосудов радужки и цилиарного тела, при этом значительно возрастает содержание фибриновых сгустков в камерах глаза. Острый увеит является противопоказанием к применению Мексидола.

5. Инстилляции Мелатонина при остром увеите у кроликов, в такой же степени как и инстилляции Дексаметазона, уменьшают отек век и радужки. Наблюдается синергический эффект при совместном применении этих препаратов в отношении отека век, гиперемии конъюнктивы, отека роговицы и радужки. Во влаге передней камеры Дексаметазон сильнее снижает концентрацию белка, уровень  $\alpha 2$ -макроглобулина. Однако Мелатонин значительно уменьшает количество лейкоцитов во влаге передней камеры, повышает антиокислительную активность, означающее снижение окислительного стресса. Полученные данные свидетельствуют о перспективности местного применения Мелатонина при лечении увеита.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ:**

1. При лечении острого увеита не рекомендуется применять препараты, обладающие способностью усиливать регионарный кровоток и оказывать сосудорасширяющее действие.

2. При увеите рекомендуется местно применять препараты, обладающие супероксиддисмутазной активностью, либо стимулирующие эндогенную выработку этого фермента.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Роль изменений биохимических показателей во влаге передней камеры глаза в патогенезе увеита у кроликов (экспериментальное исследование) / Чеснокова Н.Б., Нероев В.В., Безнос О.В., **Бейшенова Г.А.**, Давыдова Н.Г. // VI Российский общенациональный офтальмологический форум: сб. трудов. – Москва, 2013. – Т. 2. – С. 575-580.

2. Использование супероксиддисмутазы в наночастицах в лечении экспериментального увеита / Чеснокова Н.Б., Кост О.А., Галицкий В.А., Безнос О.В., **Бейшенова Г.А.**, Никольская И.И. // VII Российский общенациональный офтальмологический форум: сб. трудов. – Москва, 2014. – Т. 2. – С. 464-465.

3. Влияние местного применения дексаметазона и супероксиддисмутазы на характер клинического течения и биохимические параметры водянистой влаги при увеите (экспериментальное исследование) / **Бейшенова Г.А.**, Чеснокова Н.Б., Нероев В.В., Безнос О.В., Давыдова Н.Г. // IX Всероссийская научная конференция молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы офтальмологии»: сб. трудов. – Москва, 2014. – С. 81-83.

4. Preparation and investigation of calcium-phosphate particles containing superoxide dismutase for ophthalmology applications / Galitskiy V., Kost O., Chesnokova N., Nikolskaya I., Beznos O., Kabanov A., Klyachko N., **Beishenova G.** // “Science of the future conference”: сб. трудов. – Санкт-Петербург, 2014. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.p220conf.ru/abstracts/download/8-chem/365-n-klyachko> (дата обращения 28.12.2014).

5. Окислительный стресс при увеите и его коррекция антиоксидантным ферментом супероксиддисмутазой (экспериментальное исследование) / Чеснокова Н.Б., Нероев В.В., Безнос О.В., **Бейшенова Г.А.**, Никольская И.И., Кост О.А., Биневский П.В., Шехтер А.Б. // **Вестник офтальмологии.** – 2014. – Т. 130, № 5. – С. 30-36.

6. Роль изменений биохимических показателей в слезе и во влаге



передней камеры в патогенезе увеита у кроликов (экспериментальное исследование) / **Бейшенова Г.А.**, Чеснокова Н.Б., Нероев В.В., Безнос О.В. // Актуальные вопросы современной медицины: сб. трудов: Екатеринбург, 2015. – Т. 2. – С. 17-20.

7. Влияние инстилляций дексаметазона и супероксиддисмутаза на течение увеита и локальные биохимические процессы (экспериментальное исследование) / Чеснокова Н.Б., Нероев В.В., Безнос О.В., **Бейшенова Г.А.**, Панова И.Г., Татикилов А.С. // **Вестник офтальмологии.** – 2015. – Т. 131. - №. 3. – С. 71-75.

8. Роль свободнорадикального окисления в патогенезе увеитов (обзор литературы) / **Бейшенова Г.А.**, Чеснокова Н.Б. // **Российский офтальмологический журнал.** – 2015. – Т. 9, № 2. – С. 99-105.

### **ИЗОБРЕТЕНИЯ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:**

1. Способ лечения заболеваний глаз, сопровождающихся окислительным стрессом / Чеснокова Н.Б., Кост О.А., Никольская И.И., Безнос О.В., Галицкий В.А., **Бейшенова Г.А.**, Клячко Н.А., Кабанов А.В. Заявка № 2014150495/14(080981) от 15.12.2014г. Имеется уведомление о положительном результате формальной экспертизы.

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

**АО** - антиоксидант

**АОА** – антиокислительная активность

**ВПК** – влага передней камеры

**ГКС** - глюкокортикостероиды

**СОД** - супероксиддисмутаза

**СР** – свободные радикалы

**СРО** – свободнорадикальное окисление

**СаPh-частицы** – кальций фосфатные частицы

**$\alpha_2$ -МГ** -  $\alpha_2$ -Макроглобулин