

ФГБУ «МОСКОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ГЛАЗНЫХ БОЛЕЗНЕЙ им. ГЕЛЬМГОЛЬЦА» МИНЗДРАВА РОССИИ

На правах рукописи

Бейшенова Гульмира Алимовна

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

14.01.07 - Глазные болезни

03.01.04 – Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

д.м.н., профессор

Нероев Владимир Владимирович,

д.б.н., профессор

Чеснокова Наталья Борисовна.

Москва – 2015

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. Обзор литературы	12
1.1 . Свободно-радикальная патология. История вопроса.....	12
1.2 . Роль окислительного стресса в патогенезе увеита.....	17
1.3 . Общие принципы медикаментозного лечения увеитов.....	24
1.4 . Характеристики, используемых в работе антиоксидантных препаратов.....	30
1.4.1. Супероксиддисмутаза.....	30
1.4.2. Супероксиддисмутаза в кальций-фосфатных наночастицах.....	36
1.4.3. Мексидол.....	40
1.4.4. Мелатонин.....	42
ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования	49
2.1. Характеристика материала исследования.....	49
2.2. Методы исследования.....	54
2.2.1. Клинические методы исследования.....	54
2.2.2. Биохимические методы исследования.....	56
2.2.3. Гистологические методы исследования.....	67
ГЛАВА 3. Результаты собственных исследований	69
3.1. Экспериментальный увеит у кроликов.....	69
3.1.1. Оценка клинической картины.....	69
3.1.2. Анализ биохимических параметров в слезной жидкости и во влаге передней камеры.....	72
3.2. Применение супероксиддисмутазы, дексаметазона, а также их сочетания в виде глазных капель при экспериментальном увеите у кроликов.....	81
3.2.1. Оценка клинической картины.....	81
3.2.2. Анализ биохимических параметров во влаге передней камеры.....	89

3.3. Применение водного раствора супероксиддисмутазы и супероксиддисмутазы в составе кальций-фосфатных наночастиц в виде глазных капель при экспериментальном увеите у кроликов.....	94
3.3.1. Оценка клинической картины.....	94
3.3.2. Анализ биохимических параметров во влаге передней камеры.....	100
3.3.3. Результаты гистологического исследования.....	104
3.4. Применения мексидола в виде глазных капель при экспериментальном увеите у кроликов.....	106
3.4.1. Оценка клинической картины.....	106
3.4.2. Анализ биохимических параметров во влаге передней камеры.....	113
3.5. Применение мелатонина, дексаметазона, а также их сочетание в виде глазных капель при экспериментальном увеите у кроликов.....	118
3.5.1. Оценка клинической картины.....	118
3.5.2. Анализ биохимических параметров во влаге передней камеры.....	125
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	131
ВЫВОДЫ.....	138
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	140
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	141

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АО – антиоксидант

АОА – антиокислительная активность

АФК – активные формы кислорода

ВГД – внутриглазное давление

ВПК – влага передней камеры

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГКС – глюкокортикостероиды

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИЛ - интерлейкин

НПВС – нестероидные противовоспалительные препараты

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПЯЛ – полиморфоядерные лейкоциты

СОД – супероксиддисмутаза

СР – свободные радикалы

СРО – свободнорадикальное окисление

ФНО – фактор некроза опухоли

ХЛ – хемилюминесценция

CaPh-частицы – кальций фосфатные частицы

ЕС-СОД – экстрацеллюлярная супероксиддисмутаза

LPS – липополисахарид

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

В настоящее время 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]. Однако, значимость проблемы увеитов 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 сформировалось несколько подходов к лечению увеитов: консервативная терапия с использованием этиотропных препаратов, глюкокортикостероидов (ГКС), нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВС), иммунодепрессантов и иммуномодуляторов, хирургическая коррекция осложнений и экстракорпоральная терапия (гемосорбция, плазмаферез, квантовая аутогемотерапия), относящаяся к дополнительным методам лечения.

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.

В этом плане большой интерес представляет изучение веществ, влияющих на процессы свободнорадикального окисления (СРО). В работе исследовали антиоксидантный фермент супероксиддисмутазу (СОД), осуществляющий дисмутацию супероксиданион-радикалов с образованием перекиси водорода и

кислорода, принимающий важное участие в регуляции свободно-радикальных процессов в организме. Также исследовали действие СОД в составе кальций фосфатных (CaPh) - наночастиц. CaPh-наночастицы обладают высокой биосовместимостью и биodeградируемостью, нетоксичны и хорошо проходят через тканевые барьеры. 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.

В настоящее время роль СРО доказана в патогенезе очень многих заболеваний и патологических состояний. Практически нет такой офтальмологической патологии, при которой не было бы установлено усиления свободнорадикальных процессов.

Известно, что при увеите в тканях глаза увеличивается образование свободных радикалов (СР), повышается интенсивность окислительных реакций. Свободно-радикальные реакции при увеите тесно связаны с нарушениями, возникающими в иммунной системе. В многочисленных работах показано, что при развитии воспалительного процесса, независимо от этиологии и формы заболевания, происходит нарушение иммунологических процессов, опосредованных цитокинами и хемокинами. Изменения в иммунной системе, в свою очередь способствуют развитию окислительного стресса [Srivastava S.K., Ramana K.V., 2009; Guha M., Mackman N., 2001; Yadav U.C. et al., 2011], то есть образуется так называемый порочный круг

В патогенезе эндогенных увеитов доказана важная роль антиоксидантной системы. При увеите возникают значительные сдвиги показателей антиоксидантной системы, происходит истощение эндогенных запасов АО [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]. Показано, что содержание продуктов ПОЛ в тканях и жидких средах глаза увеличивается, а дефицит интраокулярных компонентов антиоксидантной защиты становится более выраженным по мере прогрессирования патологического процесса и зависит от его тяжести.

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. 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 работы

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, что связано с лучшим проникновением фермента во внутренние структуры глаза (увеличение биодоступности).

4. Инстилляции глазных капель Мексидола способствуют снижению воспалительной реакции во влаге передней камеры, однако ухудшают течение увеита за счет значительного 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 повышает антиокислительный потенциал в тканях глаза, способствуя снижению уровня окислительного стресса.

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

Апробация работы

Работа прошла апробацию на межотделенческой конференции ФГБУ МНИИ ГБ им. Гельмгольца Минздрава России (10.06.2015г.). Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на научно-практических конференциях: VI, VII Российский общенациональный офтальмологический форум «РООФ-2013, 2014» (Москва, 2013-14гг); на IX Всероссийской научной конференция молодых ученых с участием иностранных специалистов «Актуальные вопросы офтальмологии» (Москва, 2014);

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 3 в журналах, рецензируемых ВАК РФ. Подана заявка на патент РФ: «Способ

лечения заболеваний глаз, сопровождающихся окислительным стрессом», авторы: 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).

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 источника (80 отечественных и 121 зарубежных). Работа иллюстрирована 52 таблицами, 26 диаграммами, 48 рисунками.

Работа выполнена на базе отдела 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Свободнорадикальная патология. История вопроса

История открытия СР и изучения их роли в биологических системах берет начало с 30-х годов прошлого века. СР называют вещества, у которых на внешней электронной оболочке атома или молекулы имеется неспаренный электрон, который обуславливает выраженную тенденцию вступать в химическую реакцию с целью достижения стабильности. Проведенные в 50-60-е годы исследования влияния радиации на живые организмы показали, что действие ионизирующих излучений реализуется через образование свободных радикалов, возникающих при расщеплении молекул воды. Был сделан вывод, что главным патогенетическим фактором лучевой болезни являются СР.

Б. Н. Тарусов выдвинул концепцию о свободнорадикальной патологии, которая вызывается усилением процессов СРО, к которой в частности, относится лучевая болезнь [72]. Создатель Института биохимической физики РАН академик Н. М. Эмануэль впервые высказал предположение, что вызванные СР повреждения могут играть важную роль в возникновении и развитии злокачественных новообразований [79]. Если патогенетическая роль СР в живых организмах была выявлена и экспериментально доказана, то их положительные свойства открылись только в 1972-1973 годах [89], было установлено, что кислородные радикалы широко вовлечены в процессы неспецифической резистентности организма и иммунорегуляции.

Согласно Ю. А. Владимирову все радикалы, образующиеся в нашем организме можно разделить на 3 категории [10]. Первичные радикалы образуются из молекул за счет реакций одноэлектронного окисления с участием металлов переменной валентности. К первичным радикалам относят компоненты дыхательной цепи - радикалы убихинона (коэнзима Q), супероксид и окись азота

(NO). Вторичные радикалы образуются из радикалпродуцирующих молекул (перекись водорода, липоперекиси, гипохлорит) в присутствии ионов двухвалентного железа. К вторичным радикалам относятся гидроксильный радикал и липидные радикалы, участвующие в реакциях цепного окисления ненасыщенных жирнокислотных цепей липидов биологических мембран и липопротеинов плазмы крови. Третичные радикалы образуются при действии вторичных радикалов на молекулы антиоксидантов и других легко окисляющихся соединений.

Существует принципиальная разница в биологическом действии первичных и вторичных радикалов [10]. Первичные радикалы специально вырабатываются организмом человека и выполняют жизненно важные функции, вторичные же радикалы, оказывают цитотоксическое действие и, как правило, наносят организму большой вред. Роль третичных радикалов может быть разной.

Активные формы кислорода (АФК) вырабатываются во многих ферментативных и неферментативных реакциях [46]. Кислородные радикалы могут генерироваться при одноэлектронном восстановлении ферментами в процессе транспорта электронов по дыхательной цепи митохондрий и редокс-системе эндоплазматического ретикулума, при аутоокислении оксигемоглобина, НАДФН, глутатиона, флавинов, цитохрома С, аскорбиновой кислоты, адреналина, катехоламинов, в ходе окислительных реакций с участием цитохромов В5 и Р-450, при биосинтезе простагландинов и лейкотриенов из арахидоновой кислоты, при аутооксидации полиненасыщенных жирных кислот, катализе реакций с ферментами (НАДФН-цитохром Р-450-редуктазой, ксантиноксидазой, миелопероксидазой и др.). В дыхательной цепи генерация супероксидного радикала идет на участке сукцинатдегидрогеназа – цитохром В. Прямое образование перекиси водорода происходит в процессе окислительного дезаминирования моноаминов [108]. В сущности, АФК являются неотъемлемыми и жизненно необходимыми звеньями свободнорадикального окисления в организме человека и животных.

В настоящее время известно более 8500 СР, которые образуются в организме в результате естественного метаболизма кислорода или как промежуточные продукты различных окислительно-восстановительных реакций. СР регулируют ключевые моменты трансдукции и важнейшие внутриклеточные процессы, включая фосфорилирование белков, передачу генетической информации, активацию факторов транскрипции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и клеточной пролиферации. Установлена роль СР в регуляции тонуса сосудов, микробицидном действии фагоцитов [52]. Процессы образования различных факторов роста, синтез металлопротеинов и простагландинов также стимулируются повышенной продукцией СР [91, 99].

В условиях воспаления в больших, в норме, количествах образуется супероксид-анион. Супероксид (O_2^-) - это молекулярный кислород с неспаренным электроном на внешнем уровне. Супероксид может реагировать с молекулами воды с образованием более высоко активных веществ, таких как H_2O_2 и гидроксильный радикал. Перекись водорода образуется из супероксида в ходе реакции дисмутации с помощью супероксиддисмутазы. Затем она утилизируется в ходе других ферментативных реакций, катализируемых каталазой и глутатион-пероксидазой. В присутствии супероксидного радикала NO превращается в пероксинитрит ($ONOO^-$), обладающий довольно значительной окислительной способностью. Гипохлорит образуется в основном с помощью миелопероксидазы, которая катализирует окисление хлоридов в присутствии перекиси водорода. Главные источники гипохлорита – фагоцитирующие клетки. Гипохлорит может быстро реагировать с аминами, аминокислотами, сульфгидрильными группами, тиоловыми эфирами, ароматическими соединениями и другими молекулами, имеющими ненасыщенные связи. Гипохлорит может реагировать с другими метаболитами кислорода, образующимися под действием перекиси водорода, с образованием гидроксильного радикала. Гидроксильный радикал (OH^\cdot) является очень сильным окислителем. Первоначально он образуется в результате взаимодействия супероксида и H_2O_2 в присутствии ионов железа в качестве

катализатора. Гидроксильные радикалы могут легко реагировать с органическими и неорганическими молекулами и поэтому чрезвычайно опасны для тканей глаза. Гидроксильный радикал может взаимодействовать с липидами мембран и образовывать потенциально опасные органические свободные радикалы, такие как липидный альдегид. На Рис. 1 показана схема функционирования основных активных форм кислорода в условиях окислительного стресса.

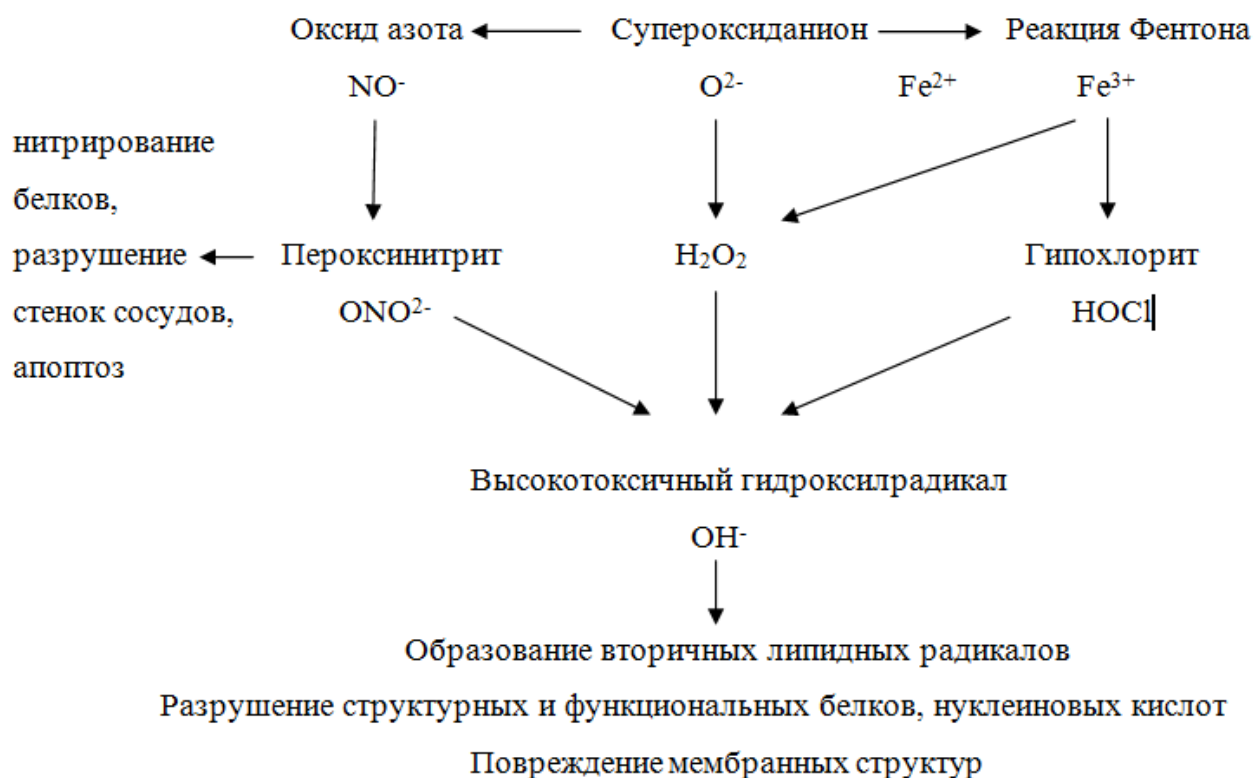


Рисунок 1. Функционирование основных активных форм кислорода в условиях окислительного стресса

В норме процессы образования СР и СРО строго регулируются системой антиоксидантной защиты. Антиоксиданты — это полифункциональные соединения, которые в зависимости от механизма действия подразделяются на антирадикальные ингибиторы, взаимодействующие с органическими радикалами; антиокислители, разрушающие перекиси; хелаторы, связывающие катализаторы окисления (ионы металлов); тушители, инактивирующие возбужденное состояние

молекул [22].

Система антиоксидантной защиты организма включает ферментные и неферментные АО. К числу ферментных АО относятся СОД, каталаза, глутатионзависимые пероксидазы и трансферазы. Большое значение СОД, каталаза и глутатион-пероксидаза играют в защите мембран от свободнорадикального окисления [44, 143]. К числу неферментных антиокислительных систем организма относятся витамины (Е, С, А, К, РР, В6), флавоноиды, каротиноиды, убихинон, SH-содержащие соединения, хелаторы ионов переменной валентности [195].

В зависимости от источника образования и путей поступления в организм АО подразделяются на экзогенные (поступающие с пищей) и эндогенные (синтезирующиеся в организме). АО делятся на жирорастворимые (α -токоферол, витамины А и К, стерины, убихинон) и на водорастворимые (витамины С, В6, РР, серотонин, SH-содержащие соединения). Жирорастворимые АО располагаются в основном субстрате воздействия СР – биологических мембранах и липопротеинах крови, где их главной мишенью являются полиненасыщенные жирные кислоты. В последние годы установлено, что большое значение имеет не только содержание АО в организме, но и соотношение водорастворимых и жирорастворимых АО [100]. Ряд авторов полагают, что некоторые продукты естественного метаболизма, в частности оксид азота, обладают свойствами как про-, так и антиоксидантов [120].

К хелаторам ионов металлов, препятствующим развитию СРО относятся ферритин, трансферрин, гемосидерин, которые связывают ионы железа, а также церулоплазмин и металлотионеины, соединяющиеся с ионами тяжелых металлов.

Антиоксидантное действие этих соединений различно. Например, ферменты необходимы для реакций инактивации свободных радикалов, антиоксиданты неферментного действия могут служить «ловушкой» свободных радикалов и участвовать в создании условий для предотвращения свободнорадикальных реакций, а антиоксиданты-синергисты способствуют

потенцированию действий других антиоксидантов.

1.2. Роль окислительного стресса в патогенезе увеита

В настоящее время роль СРО доказана в патогенезе очень многих заболеваний и патологических состояний. Для этих заболеваний характерно нарушение баланса наработки кислородных радикалов и их ингибирования антиоксидантами, несмотря на то, что причины для этого могут быть разными. Для описания дисбаланса в системе СР и антиоксидантной защиты в последние годы стали применять термин «окислительный стресс», отражающий преобладание процессов СРО в организме [25].

Высокая вероятность свободнорадикального повреждения тканей глаза обуславливается несколькими причинами. Во-первых, ткани глаза постоянно подвергаются действию света, что приводит к фотоинициированию перекисного окисления липидов (ПОЛ). Во-вторых, липиды, входящие в состав внутриглазных тканей, по своему составу являются чрезвычайно легко окисляемым субстратом ПОЛ. Так, в мембранных структурах сетчатки более половины фосфолипидов содержат полиеновые остатки жирных кислот, восприимчивые к атаке очень активными кислородными метаболитами. Более того, в фоторецепторах содержится много митохондрий, в которых проходит постоянное потребление кислорода, сопровождающееся образованием АФК, что делает их еще более уязвимыми в отношении окислительного стресса.

Практически нет такой офтальмологической патологии, при которой не было бы установлено усиления свободнорадикальных процессов. Известно, что развитие многих глазных заболеваний – возрастной макулярной дегенерации [159], глаукомы [26], катаракты [121], псевдоэксфолиативного синдрома [81], внутриглазных кровоизлияний [66] связано с процессами СРО. Интенсификация ПОЛ считается важным фактором повреждения тканевых структур глаза и нарушения их функций при окклюзии центральной вены сетчатки [50], ожоговой

болезни [28] и диабетической ретинопатии [14], [58]. По мнению ряда авторов, для многих глазных болезней характерна активация ПОЛ на уровне всего организма [5].

Термином увеит объединены полиэтиологические воспалительные заболевания сосудистого тракта глаза с различной локализацией процесса и характером течения. 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 % [33].

Основываясь на множестве факторов, вызывающих увеиты, и обобщая многолетний опыт работы коллектива исследователей МНИИ ГБ им. Гельмгольца, Н. С. Зайцева в 1995 году предложила следующую клинко-патогенетическую классификацию увеитов [23]:

1. инфекционные и инфекционно-аутоиммунные;
2. аллергические при неинфекционной аллергии – атопии;
3. увеиты при системных и синдромных заболеваниях – «болезни иммунных комплексов»;
4. увеиты при других патологических состояниях организма (диабет, нефропатии и др.)

Кроме того, в клинике описано много случаев, когда не было установлено причин воспаления (идиопатические увеиты).

Увеальный тракт снабжает кровью практически все внутриглазные структуры, и выступает как проводник воспалительных клеток (гранулоцитов, макрофагов, лимфоцитов) внутрь глаза. Поэтому увеальный тракт вовлекается во многие внутриглазные воспалительные процессы, независимо от того какие ткани и клетки являются истинной мишенью патологического процесса. Клинически выраженной воспалительной реакции предшествует инфильтрация воспалительными клетками радужки, цилиарного тела или хориоидеи [112]. Среди инфильтрирующих клеток, одними из первых в ткани глаза проникают

полиморфоядерные лейкоциты (ПЯЛ). Эти клетки, предназначенные для уничтожения микроорганизмов, вырабатывают АФК за счет деятельности НАДФН-оксидазы, использующей НАДФН в качестве донора электрона. Повышенное содержание АФК запускает экспрессию адгезивных молекул, которые способствуют адгезии и инфильтрации тканей лейкоцитами. Выявлено, что уровень функциональной активности ПЯЛ у больных увеитом достоверно отражает остроту воспаления в тканях глаза. Вместе с исчезновением или уменьшением клиничко-офтальмологических показателей воспаления нормализуется функциональная активность ПЯЛ. Повышенный уровень функциональной активности ПЯЛ указывает на неполное излечение, что подтверждается последующим рецидивом увеита [17]. Базофилы и тучные клетки также продуцируют вазоактивные и хемотаксические медиаторы и играют важную роль в развитии увеитов [116]. В условиях воспаления, независимо от этиологии заболевания основными источниками окислителей, помимо ПЯЛ, являются и макрофаги, проникающие в глаз в следствии нарушения целостности гематоофтальмического барьера [174]. Они способны секретировать множество цитокинов и медиаторов воспаления, таких как интерлейкины (ИЛ) 1, ИЛ 6, фактор некроза опухоли-альфа (ФНО- α) и др.

Изучение аутоиммунного увеита на экспериментальных моделях показало наличие гидроперекисей жирных кислот, которые образуются главным образом в результате ПОЛ мембран, в сетчатке и хориоиде. Образовавшиеся гидроперекиси лавинообразно усиливают процесс ПОЛ, продукты которого, особенно низкомолекулярные альдегиды, такие как 4-Hydroxynonenal, являются токсичными. Кроме того, известно, что гидроперекиси жирных кислот являются хемоаттрактантами для ПЯЛ [162].

Свободно-радикальные реакции при увеите тесно связаны с нарушениями, возникающими в иммунной системе при этой патологии. В многочисленных работах показано, что при развитии воспалительного процесса, независимо от этиологии и формы заболевания, происходит нарушение иммунологических

процессов, опосредованных цитокинами и хемокинами. Так, в водянистой влаге и увеальном тракте при увеите происходит нарушение баланса активности цитокинов, таких как ФНО- α и ИЛ-6, и хемокинов, таких как MCP-1 и MIP-1 [112]. Цитокины и хемокины стимулируют внутриклеточную продукцию АФК в реакциях дыхательной цепи митохондрий, реакциях превращения арахидоновой кислоты с участием циклооксигеназы-2, а также работы мембраносвязанной НАДФ-оксидазы. Повышенная продукция АФК в клетках вызывает окислительно-восстановительный дисбаланс, что изменяет активность редокс-чувствительных транскрипционных факторов, таких как NF- κ B и AP-1 [183]. Их активация играет ключевую роль в воспалении, так как активируется транскрипция генов, кодирующих маркеры воспаления [123]. Это приводит к повышению экспрессии провоспалительных цитокинов и ферментов, таких как индуцибельная NO синтаза и циклооксигеназа-2, и, следовательно, к увеличению продукции оксида азота и простагландина E_2 . Эти локальные молекулы-посредники в свою очередь вызывают увеличение продукции АФК [200]. Повышенная продукция АФК еще больше усиливает иммунологические нарушения. Таким образом, запускается порочный круг, приводящий к неконтролируемому усилению воспалительного процесса [8] (Рис. 2).

Группой исследователей МНИИ ГБ им. Гельмгольца при исследовании цитокинового профиля слезной жидкости при разных формах офтальмопатологии выявлено, что наиболее выраженные сдвиги цитокинового профиля наблюдались при воспалительной патологии роговицы (центральные язвы) и увеальной оболочки (передние увеиты и панувеиты). При этом характер сдвигов имеет свои особенности: отмечается явное преобладание провоспалительных интерлейкинов или интерферонов - в зависимости от активности воспалительного процесса [75].

Группой авторов из Уфимского НИИ глазных болезней показано, что в зависимости от этиологии увеитов наблюдаются различия в спектре и динамике изменений уровня цитокинов, участвующих в инициации и развитии воспалительного процесса [69]. Важной особенностью глаза является наличие в

нем большого числа увеитогенных антигенов, способных в определенных условиях индуцировать иммунный ответ и вызывать воспаление сосудистой оболочки глаза. К их числу относят преимущественно антигены фоторецепторного слоя сетчатки – ретинальный S-антиген, интерфоторецепторный белок сетчатки, ретиноидсвязывающий белок и др., а также аутоантигены других структур глаза – хрусталика, хориоидеи (меланин-ассоциированный белок). Наиболее активным и изученным из них является S-антиген (48 кДа), который способен вызывать различные клинические формы увеитов в эксперименте [128]. Доказана его роль в развитии увеитов в клинике [67, 135].



Рисунок 2. Участие свободных радикалов в патогенезе увеита

Необходимо учитывать, что более важным механизмом тканевого повреждения при увеитах представляется не гуморально опосредованный путь

воздействия, а Т-клеточный механизм. Установлена важная роль угнетения как специфического, так и неспецифического клеточного иммунитета в развитии тяжелых и рецидивирующих увеитов. Тяжелые исходы увеита отмечены при диссоциации показателей Т- и В-клеточного иммунитета. Выявлены различия в клеточном составе влаги передней камеры и стекловидного тела у больных острым и хроническими увеитами: преобладание Т-клеточного, преимущественно Т-хелперов, при острых увеитах и В-лимфоцитов в сочетании с Т-супрессорами – при хронических формах, что по мнению авторов, может объяснить ряд аспектов течения и хронизации увеитов [29, 39].

При увеите имеется высокая степень корреляции между выраженностью воспаления и окислительным стрессом. За счет активной генерации АФК и сильной активации ПОЛ происходит повреждение разнообразных молекул-мишеней, в том числе, липидов мембран, нарушается нормальный тканевой гомеостаз [156]. В слезной жидкости более значительное повышение концентрации продуктов ПОЛ наблюдается в остром периоде воспаления, хотя и при вялотекущем увеите, а особенно при его обострении, отмечается активация ПОЛ [32]. Во многих исследованиях при экспериментальном увеите подтверждалось наличие продуктов ПОЛ в тканях глаза, в том числе сетчатке, и водянистой влаге [136, 7]. В условиях нарастающего окислительного стресса также активируется множество протеолитических ферментов, в том числе металлопротеаз, которые вызывают изменения структуры внутриклеточных и внеклеточных белков, как структурных, так и функциональных (ферментов, гормонов и др.), структуры ДНК [173]. Окислительный стресс является важнейшим фактором, запускающим повреждение сетчатки и развитие воспаления при экспериментальном аутоиммунном увеите, в результате таких процессов, как повреждение митохондриальной ДНК, усиление экспрессии индуцибельной NO-синтазы в митохондриях фоторецепторов, нитрование пероксинитритом митохондриальных белков фоторецепторов на ранних стадиях заболевания [180]. При развитии увеита усиление СРО происходит не только во

влаге передней камеры и тканях глаза, но и в слезной жидкости, и в сыворотке крови [43].

Экспериментально доказано, что основная роль в развитии осложнений увеита (катаракта, глаукома, дегенерация сетчатки) принадлежит активации СРО и накоплению СР [80]. В эксперименте также установлено, что применение веществ, связывающих ионы металлов, значительно уменьшает тяжесть воспалительного процесса [105].

В патогенезе эндогенных увеитов доказана важная роль антиоксидантной системы. При увеите возникают значительные сдвиги показателей антиоксидантной системы, происходит истощение эндогенных запасов АО. Выявлена корреляция между стадией течения увеита и состоянием локальных и системных антиоксидантных резервов [63, 37]. Показано, что содержание продуктов ПОЛ в тканях и жидких средах глаза увеличивается, а дефицит интраокулярных компонентов антиоксидантной защиты становится более выраженным по мере прогрессирования патологического процесса и зависит от его тяжести. Выявлено, что для прогноза течения увеита имеет значение соотношение антиокислительной активности (АОА) слезной жидкости и сыворотки крови. Низкое значение этого соотношения в фазе начальной ремиссии указывает на истощение локальной антиокислительной системы, что повышает риск обострения увеита. Изменения АОА в слезной жидкости отражают функционирование локальной антиокислительной системы, в то время как изменения АОА сыворотки крови указывают на системные нарушения и требуют системной антиоксидантной терапии [36].

Таким образом, окислительный стресс является важнейшим фактором, запускающим повреждение тканей глаза и развитие воспаления при увеите. Имеется высокая степень корреляции между окислительным стрессом и выраженностью клинико-офтальмологических показателей воспаления внутриглазных структур. При увеите происходит истощение эндогенных запасов антиоксидантов.

1.3. Общие принципы медикаментозного лечения увеитов

В настоящее время сформировалось несколько подходов к лечению увеитов.

Медикаментозные средства, используемые для лечения увеитов, условно могут быть разделены на несколько групп:

1. Этиотропная терапия;
2. Неспецифическая противовоспалительная терапия;
3. Иммунокорректирующая терапия;
4. Симптоматическая терапия;
5. Терапия, направленная на биохимические звенья патогенеза (антиоксиданты, ингибиторы протеаз и др.)

Лечебные мероприятия при эндогенных увеитах весьма различны и всегда носят комплексный характер. Они зависят от множества факторов: этиологии и локализации увеита, индивидуальных клинических особенностей течения заболевания, общего состояния здоровья пациента и индивидуальной иммунореактивности и т.д. При остром увеите в активной фазе воспаления лечение в первую очередь направлено на возможный этиологический агент и ликвидацию воспалительных реакций, вызывающих повреждение тканей глаза.

При затяжном хроническом увеите или рецидивирующем воспалительном процессе помимо указанного выше в комплекс лечения включают иммуотропные и патогенетически ориентированные препараты, которым и отводится ведущая роль.

Лечение каждого больного должно быть индивидуальным с выделением доминирующих, наиболее важных причин и механизмов внутриглазного воспаления.

Вопрос о целесообразности назначения при увеитах противовирусных, антибактериальных и противопаразитарных препаратов, а также об интенсивности их применения является достаточно дискуссионным в связи с

меняющимися представлениями о патогенезе эндогенных увеитов, в том числе индуцированных инфекционными факторами.

На современном этапе антибиотики широкого спектра действия редко используются в комплексном лечении эндогенных увеитов. Это связано с тем, что число эндогенных увеитов, вызванных инфекционными агентами, чувствительными к действию антибиотиков, весьма ограничено.

В активной фазе увеита бактериальной этиологии, доказанной или подозреваемой, а также при тяжелых панувеитах неясной этиологии на первом этапе лечения целесообразно применение антибиотиков широкого спектра действия (в виде инстилляций, парабульбарных и внутримышечных или внутривенных инъекций, а также перорально). Наиболее широкое применение в офтальмологии при лечении бактериальных воспалительных процессов нашли антибиотики из группы аминогликозидов (гентамицин, тобрамицин, нетромицин и др.), цефалоспорины различных поколений.

Для лечения вирусных увеитов могут использоваться многие противовирусные препараты, индукторы интерферона и препараты интерферона, а также герпетическая вакцинация и специфическая десенсибилизация.

На сегодняшний день глюкокортикостероидные препараты, несмотря на ряд побочных эффектов, занимают ведущее место в лечении эндогенных увеитов у детей и взрослых. Глюкокортикостероиды (ГКС) – относятся к наиболее сильным противовоспалительным препаратам с выраженным иммунодепрессивным действием. Противовоспалительный эффект достигается за счет уменьшения сосудистой проницаемости, уменьшения тканевого и клеточного отека, торможения миграции нейтрофилов в зону воспаления, агрегации моноцитов в этой зоне, ингибирования активности медиаторов воспаления (простагландины, интерлейкины и др.) ряда ферментов (коллагеназа, активатор плазминогена и др.). Влияние на иммунную систему обусловлено преимущественным действием на нейтрофилы и моноциты. Стероидная терапия увеличивает продукцию нейтрофилов и продолжительность их жизни и

уменьшает число циркулирующих моноцитов, эозинофилов и базофилов. Происходит угнетение киллерной функции моноцитов и антителозависимой цитотоксичности этих клеток, экспрессии на них Fc-рецепторов. Особенно выражено влияние ГКС на число циркулирующих лимфоцитов, преимущественно Тх, что ведет к уменьшению бактерицидной активности, уменьшению продукции лимфокинов, снижению гиперчувствительности замедленного типа. Использование ГКС в терапевтических дозах не влияет на продукцию антител, однако высокие дозы ГКС могут угнетать функции антителообразующих клеток [55].

Форма и методика применения ГКС при увеитах широко варьирует. На сегодняшний день применяют ГКС в инстилляциях, субконъюнктивальных, парабульбарных и интравитреальных инъекциях. При тяжелых двусторонних неинфекционных увеитах с выраженным нарушением зрения, а также при системных заболеваниях с поражением глаз используют системное введение препаратов. Важно учитывать побочные эффекты ГКС в зависимости от способа их введения. Одним из побочных эффектов инстилляций является возможный подъем внутриглазного давления (ВГД), что встречается у 32-42% взрослых пациентов [172]. Спорным остается вопрос о частоте развития стероидной катаракты при использовании ГКС.

Реактивация инфекции, а также присоединение вторичной инфекции при длительной стероидной терапии возможны при всех формах введения кортикостероидов. Побочными эффектами местного применения ГКС могут быть подавление локальных иммунных реакций, играющих важную роль в течении внутриглазного воспалительного процесса, и развитие вторичных инфекций. Наличие исходно сниженных местных иммунологических реакций, по мнению ряда исследователей, является противопоказанием к локальному применению кортикостероидных препаратов [54, 35].

При периокулярных инъекциях к числу нежелательных побочных эффектов, помимо указанных выше, относят риск повреждения глазного яблока,

развитие проптоза и периокулярного фиброза, фиброза экстраокулярных мышц. Кроме того, после парабульбарных инъекций пролонгированных форм ГКС может развиваться крайне тяжелая рефрактерная глаукома, что в ряде случаев вызывает необходимость хирургического иссечения депо препарата для ликвидации осложнений [196, 158].

Проводя лечение ГКС длительно, следует помнить о нежелательных побочных эффектах, таких как нарушение электролитного баланса с потерей калия, задержка жидкости в организме, возможность развития гипокалиемического алкалоза, в тяжелых случаях с комой. Со стороны мышц и скелета побочный эффект может проявляться развитием остеопороза, мышечной слабостью, реже стероидной миопатией и асептическим некрозом. Характерны нарушение слизистой оболочки желудка, тошнота, в тяжелых случаях развитие язв и перфораций. В детском возрасте могут быть выражены эндокринологические нарушения. Частота побочных реакций при длительном назначении (12 месяцев и более) больших доз кортикостероидов (более 1 мг/кг в сутки) достигает 50% [51, 119].

Важным направлением в терапии эндогенных увеитов является применение нестероидных противовоспалительных средств (НПВС). Большинство авторов придерживается мнения о необходимости комбинации НПВС с глюкокортикостероидами для достижения большего терапевтического эффекта.

В последние годы для лечения неинфекционных увеитов все шире стали применять циклоспорин А, относящийся к разряду иммунокорректоров нового поколения с избирательным действием на Т-систему иммунитета. Препарат действует на уровне клеточных субпопуляций, влияя на баланс Т-хелперов и Т-супрессоров, ингибируя синтез интерлейкина-2 и в меньшей степени интерлейкина-1.

Показанием к назначению циклоспорина является наличие активного двустороннего тяжелого неинфекционного увеита при отсутствии эффекта от лечения ГКС в умеренных дозах. Первичный курс лечения составляет не менее 3

месяцев. Препарат довольно токсичный при использовании в больших дозах. Нефротоксический эффект циклоспорина может усиливаться при употреблении неспецифических противовоспалительных средств, что необходимо учитывать в клинической практике. Напротив, комбинация низких доз циклоспорина со стероидами в низкой дозе потенцирует их эффект и уменьшает риск побочных осложнений.

Важным и интересным направлением иммуносупрессивной терапии является использование антилимфоцитарных сывороток, моноклональных антител против Т-клеток, а также против рецепторов к лимфокинам на Т-клетках, молекулам адгезии и др. [59].

В лечении глазных воспалительных заболеваний в настоящее время используются и цитотоксические иммуносупрессивные средства. Из антиметаболитов наиболее часто назначают метотрексат – производный препарат фолиевой кислоты, который оказывает выраженное действие на клеточный метаболизм путем ингибирования активности дегидрофолиата редуктазы. Получены данные об антипролиферативном влиянии метотрексата на эндотелиальные клетки, уменьшении синтеза лейкотриена в нейтрофилах, уменьшении концентрации интерлейкина 1-бета в синовиальной жидкости, выраженном подавлении клеточно-опосредованного иммунитета, ингибировании высвобождения гистамина [102]. Метотрексат имеет множество побочных эффектов, которые включают лейкопению и тромбоцитопению, наиболее опасен возможный гепатотоксический эффект, повышение сывороточной аминотрансферазы, меняются и другие функции печени. Возможно побочное действие препарата и на почки [88]. Метотрексат может также вызывать вторичные пневмонии в результате активирования пневмоцистной инфекции.

В отечественной клинической медицинской практике широкое применение нашли препараты вилочковой железы. Спектр выпускаемых препаратов очень широк и включает как препараты пептидной природы, выделенные из вилочковой железы крупного рогатого скота, так и синтетические производные. Препараты

обладают иммунокорригирующим действием широкого плана, нормализуя различные звенья иммунитета, повышая сниженные и снижая гиперергические реакции, улучшая результаты лечения увеитов [73].

Одним из важных направлений терапии при эндогенных увеитах являются экстракорпоральные методы лечения – обменный плазмаферез, лимфоферез и гемосорбция, ультрафиолетовое и лазерное облучение аутокрови и др. Данные процедуры чаще используют при затяжных двусторонних увеитах у пациентов, длительно получающих массивную медикаментозную терапию, а не как самостоятельный метод лечения. Ряд авторов сообщают об успешном применении различных экстракорпоральных методик лечения с тяжелыми эндогенными увеитами [15, 76, 20].

Одним из направлений медикаментозной терапии эндогенных увеитов, которое относится к разряду патогенетически ориентированных, является использование ингибиторов протеолитических ферментов (гордокс, контрикал). Их лечебное действие связано с торможением протеолиза и снижением образования медиаторов воспаления, устранением ферментативной токсемии, гипосенсибилизацией, активацией фагоцитоза, нормализацией процессов окисления, торможения аутоиммунных процессов в ране, стабилизацией клеточных мембран и др. [42].

Спектр медикаментозных препаратов, применяемых в комплексном лечении эндогенных увеитов весьма широк. Однако ряд препаратов, активно используемых в практике, имеет много противопоказаний и может привести к тяжёлым осложнениям. Поэтому поиск новых неспецифических противовоспалительных средств для лечения увеитов относится к числу актуальных проблем офтальмологии во всем мире. Несмотря на патогенетическую роль окислительного стресса при эндогенных увеитах в клинической практике антиоксидантные препараты пока еще не нашли широкого применения в комплексном лечении данного заболевания.

В литературе имеются сведения о применении антиоксидантов в терапии

эндогенных увеитов. Гусева М.Р. в 1996г. изучала активацию процессов ПОЛ при эндогенных увеитах у детей и впервые исследовала антиоксидантную активность 52 фармацевтических препаратов, применяемых для лечения заболеваний глаз. Выявлена высокая антиокислительная активность 18 из них (дицинон, пипольфен и др.) [17].

Yamada M., et al в 1986г. изучили возможность применения СОД при S-антиген ассоциированном аутоиммунном хориоретините у морских свинок. Если в начале заболевания животные получали лечение СОД, количество воспалительных клеток во влаге передней камеры было достоверно ниже, чем у нелеченных животных. Подобный протективный эффект СОД также наблюдали при увеите, индуцированном бычим сывороточным альбумином у кроликов [189].

Kozak Y., et al. в 1989г. также наблюдали противовоспалительный эффект антиоксидантных ферментов СОД и глутатион-пероксидазы при тяжелом аллергическом экспериментальном увеите, вызванном S-антигеном, у крыс [104].

Hu S., et al в 1993 г. изучали эффект применения СОД при экспериментальном аллергическом увеите, вызванном инъекцией бычьего сывороточного альбумина в стекловидное тело морских свинок. По данным патогистологического исследования, у животных, леченных СОД, инфильтрация воспалительными клетками и экссудация в переднюю камеру глаза была значительно снижена, по сравнению с нелечеными животными. Это позволяет предположить, что СОД, которая способна нейтрализовывать супероксид-анион-радикал, может ослаблять клеточную реакцию при увеите [107].

1.4. Характеристики, используемых в работе антиоксидантных препаратов

1.4.1. Супероксиддисмутаза

СОД (Рис.3) представляет собой группу металлопротеинов, осуществляющих дисмутацию супероксид-анион-радикалов (O_2^-) с образованием перекиси водорода и кислорода.

Супероксиддисмутаза

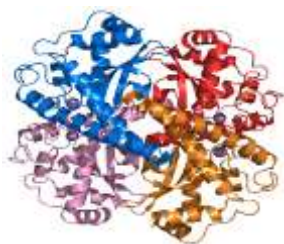
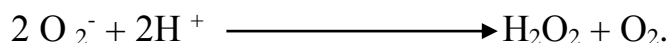


Рисунок 3. 3D структура СОД человека (32,5 кДа).

В отсутствии СОД дисмутация супероксидных радикалов приводит к образованию перекиси и наиболее агрессивной формы кислородных радикалов - синглетного кислорода (O_{2x}) [78].

СОД имеет несколько изоферментных форм, отличающихся строением активного центра. Структура и свойства разных изоформ СОД в настоящее время хорошо изучены [60]. Наиболее древним в эволюционном плане является железосодержащий изофермент. Fe-СОД имеет широкое филогенетическое распространение – от бактерий и простейших до растений-эукариот [185]. У эукариот, в том числе у человека и млекопитающих, СОД встречается в виде следующих изоформ: медь-цинксодержащая СОД (Cu,Zn-СОД) и марганец содержащая СОД (Mn-СОД). Различия между изоформами СОД подтверждены и электрофоретическими методами, и с помощью хроматографии. Каждая из изоформ имеет свою локализацию в клетке и свои функциональные задачи.

Молекула Cu,Zn-СОД, молекулярной массой 31кДа, состоит из двух идентичных субъединиц, связанных дисульфидным мостиком. Каждая субъединица содержит один атом Cu^{2+} и один атом Zn^{2+} , предполагается что атом цинка необходим для стабилизации молекулы, в то время как медь принимает непосредственное участие в дисмутации. Уровень Cu,Zn-СОД у человека намного ниже, чем у других млекопитающих, однако Cu,Zn-СОД у человека обладает наиболее высокой активностью. Cu,Zn-СОД содержится в ядрах,

цитоплазматическом матриксе, пероксисомах и межмембранном пространстве митохондрий только клеток эукариот [103]. Наибольшая активность Cu,Zn-СОД выявлена в печени, почках, сердце, селезенке, щитовидной железе, а наименьшая в лимфатических узлах и легких.

Mn-СОД имеет молекулярную массу около 40 кДа и состоит из 4 или 2 (у бактерий) субъединиц, содержащих $\frac{1}{2}$ или 1 ион марганца в активном центре. Содержание Mn-СОД у человека и других млекопитающих примерно одинаковое. Mn-СОД локализована в митохондриях и матриксе хлоропластов эукариот, а также обнаруживается у бактерий [199]. Самая высокая активность Mn-СОД у человека встречается в печени, почках, сердце, а самая низкая - в щитовидной железе и легких.

В организме человека и животных Cu,Zn-СОД и Mn-СОД являются преимущественно внутриклеточными ферментами, и в межклеточных жидкостях быстро, в течение 5-10 минут, разрушаются [201]. В 1982 году S.L. Marklund впервые была обнаружена и выделена экстрацеллюлярная высокомолекулярная форма СОД (ЕС-СОД) – Cu,Zn-содержащий гликопротеин, состоящий из четырех субъединиц [138].

Молекулярная масса ЕС-СОД составляет 135 кДа, активный центр фермента содержит 4 атома Cu и возможно столько же атомов Zn [132]. В отличие от других изоформ СОД, ЕС-СОД гликозилирована, хотя значение этого факта неясно, так как дегликозилирование не сопровождается заметным изменением свойств и функций фермента [82]. Вместе с тем гликозилирование придает ферменту устойчивость в различных органических растворителях. С помощью гель-хроматографии на гепарин-сефарозе ЕС-СОД была разделена на 3 фракции: А - не обладающая сродством к гепарину, В - обладающая слабым сродством к гепарину и С - с относительно высоким сродством к гепарину [171]. Предполагается, что фермент синтезируется в виде фракции С [138], а типы А и В являются результатом, постсекреторной модификации в сыворотке, например, в результате протеолиза [171] либо неферментативного гликозилирования [157]. У

человека в наибольшей степени представлена фракция С, которая хорошо связывается с гепаринсульфатом гликокаликса эндотелиоцитов и интерстициального соединительнотканного матрикса, но не с лейкоцитами и эритроцитами [139].

У человека уровень ЕС-СОД в тканях и органах намного ниже, чем других изоформ, кроме того ЕС-СОД обладает наиболее низкой активностью. ЕС-СОД является главным изоэнзимом межклеточных жидкостей (плазмы, лимфы, синовиальной жидкости), и в небольших количествах обнаруживается практически во всех тканях [138]. Максимальная концентрация обнаружена в легких, поджелудочной и щитовидной железах, лимфатических узлах, а также в ткани матки. Активность ЕС-СОД максимальна в щитовидной и поджелудочной железе, легких, а в печени и селезенке она минимальна.

Иммуногистохимический анализ содержания ЕС-СОД в стенках артериальных и венозных сосудов показал, что больше всего фермента содержится в артериальной интиме, где в качестве его источника, по-видимому выступают гладкомышечные клетки [192]. С помощью иммунофлюоресцентного анализа выявлена тесная взаимосвязь содержания ЕС-СОД и эндотелиальной NO-синтазы в разных участках и тканях сердца, что указывает на участие ЕС-СОД в регуляции тонуса сосудов сердца [95]. Предполагается, что ЕС-СОД локально защищает эндотелиоциты, не вмешиваясь в процесс генерации АФК гранулоцитами для уничтожения микроорганизмов [118].

Экспрессия ЕС-СОД происходит преимущественно в фибробластах и клетках глии [137]. На экспрессию ЕС-СОД влияют различные факторы иммунной системы: стимулируется экспрессия интерфероном- γ , стимулируется или подавляется интерлейкином-1 α , подавляется ФНО- α и рост-трансформирующим фактором β [140]. Дефицит цинка в пище вызывает резкое снижение активности ЕС-СОД, но мало влияет на активность CuZn-СОД [115].

Существование разных молекулярных форм СОД в различных тканях и биологических жидкостях, несомненно, связано с более тонкой регуляцией

равновесия супероксидных радикалов, но многие вопросы регуляции соотношения изоферментов СОД в зависимости от меняющихся условий внутренней среды организма еще не выявлены.

Супероксиддисмутаза наиболее подробно изучена среди внутриглазных антиоксидантов. Так, в работах Behndig A. и соавт, показано, что низкая активность СОД отмечается в слезе, водянистой влаге и стекловидном теле. Сетчатка с ее активным окислительным метаболизмом, характеризуется наивысшей активностью CuZn-СОД, в то же время, активность Mn-СОД и внеклеточной СОД имеют низкий уровень. Роговица, склера и хрусталик характеризуются более низкой активностью цитоплазматических СОД, тогда как внеклеточная – высоким уровнем [188]. При более подробном изучении роговицы было показано, что общее и особенно внеклеточное содержание СОД в центральной зоне роговицы здоровых лиц ниже, чем на периферии. CuZn-СОД обнаружена в клетках, тогда как внеклеточная СОД – на поверхности клеток, в базальной мембране и строме [187]. G. E. Marshall установлено присутствие CuZn-СОД в клетках радужки [141].

Биосинтез СОД находится под жестким контролем. Существуют данные, подтверждающие обратно пропорциональную зависимость синтеза Mn-СОД и CuZn-СОД. Методом синтеза СОД являются рибосомы клетки, которые используют информацию, поставляемую ядерной ДНК. Регуляция активности СОД осуществляется редокс-системой клетки. НАДФН-зависимые цепи митохондрий эндоплазматического ретикулума, являясь генераторами супероксидного радикала, могут выполнять триггерную роль: индуцировать синтез фермента при концепции радикалов и, наоборот, подавлять его активность при смещении донорно-акцепторного равновесия. Активность СОД находится также под контролем нейрогуморальных механизмов. Высвобождение нейромедиаторов и выброс гормонов, в частности эстрогенов, инсулина и глюкагона, активно воздействуют на биосинтез и распад фермента [38].

СОД принадлежит важная физиологическая роль в регуляции свободно-

радикальных процессов клеточного метаболизма [61]. Об этом свидетельствуют данные о торможении СОД перекисного окисления липидов в нативных мембранах митохондрий, микросомах и лизосомах, а также реконструированной микросомальной системе. По-видимому, СОД (вместе с другими компонентами антиоксидантной системы и регуляторами клеточного метаболизма) и ПОЛ обеспечивают взаимодополняющую регуляцию свободнорадикального окисления, направленную на стабилизацию мембранных структур клетки. Кроме того, СОД не только выступает как мощный ингибитор окислительных процессов, но и предотвращает лизис эритроцитов, участвуя в поддержании стабильности мембраны и формы эритроцита, а также участвует в реализации функции тромбоцитов при свертывании крови. Антиоксидантная функция СОД в биологических жидкостях важна при состояниях, связанных с интенсивной генерацией АФК.

Роль АФК в возникновении патологических состояний свидетельствует о важности исследования антиоксидантных ферментов как показателей неспецифической резистентности организма к повреждающим агентам. Кроме того, уровень ферментов может отражать "биохимическую предпатологию" [24].

В последние годы широко исследуются возможности клинического применения CuZn-СОД, обладающей выраженным защитным эффектом при воспалительных, ишемических и стрессовых поражениях. Нестабильность фермента, попадающего во внеклеточные жидкости, создает определенные препятствия к его практическому использованию; в этой связи получены препараты СОД, ковалентно связанной с иммуноглобулинами, моно- и полисахаридами, сывороточным альбумином и другими макромолекулами, или встроенной в липосомы. В таких препаратах удастся сохранить активность фермента и увеличить время его циркуляции в крови до 30 часов и более.

В настоящее время получены и активно изучаются рекомбинантные препараты ЕС-СОД, которая эффективно защищает эндотелий сосудов и имеет время полувыведения около 20 часов [25].

Существует отечественный препарат «Рексод», основным действующим веществом которого является рекомбинантная СОД человека, получаемая из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, штамм Y2134. Имеется опыт применения препарата «Рексод» в качестве нейропротекции при экспериментальной глаукоме. Выявлено, что данный антиоксидант нормализует гидродинамические и метаболические процессы, предотвращает патоморфологические изменения зрительного нерва [2].

1.4.2. Супероксиддисмутаза в кальций-фосфатных наночастицах

Методика получения кальций-фосфатных частиц была впервые упомянута и запатентована в 2002 году [92]. В литературе подчёркивается то, что кальциево-фосфатные частицы могут использоваться в медицине и в частности в офтальмологии для доставки лекарственных препаратов. Кальций-фосфатные (CaPh) нано- и микрочастицы привлекли к себе особенный интерес, так как они обладают высокой биосовместимостью и хорошей биodeградируемостью, поскольку фосфат кальция является структурным материалом костей и зубов человеческого организма. Кроме того, неоспоримым преимуществом этих частиц для применения в медицине является то, что получают их из водных растворов. Размеры CaPh-частиц достаточно легко стабилизировать при помощи полимеров или нуклеиновых кислот. Кроме того, их можно визуализировать путём внедрения ионов лантанидов в структуру CaPh-частиц, инкапсулированием красителей в частицы, а также модификацией их поверхности различными метками. Получают CaPh-частицы по очень простой методике, которая не требует использования органических растворителей: водные растворы CaCl_2 (иногда $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) и K_2HPO_4 ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) смешивают в одинаковых концентрациях в присутствии цитрата натрия, как стабилизирующего агента. Далее оставляют частицы на 2 дня при постоянном медленном перемешивании в течение 48 ч, затем их подвергают ультразвуковому воздействию. Как было

определено методом динамического светорассеяния, при этом образуются частицы с размерами от 10 до 1500 нм [179, 124]. Можно использовать разнообразные методики внедрения препаратов в CaPh-частицы:

1. образование частиц в среде с препаратом, который может быть растворён в одном или нескольких растворах необходимых для формирования частиц;
2. пустые CaPh-частицы можно «пропитывать» как самим препаратом, так препаратом в растворе покрывающего вещества (например, ПЭГ, целлобиоза), кроме того, можно послойно адсорбировать препарат на частицы [179].

На сегодняшний день кальций-фосфатные частицы очень широко используются в биомедицине для осуществления процесса трансфекции (процесс проникновения ДНК через плазматическую мембрану внутрь клетки). Из-за того, что молекула ДНК заряжена отрицательно, процесс её проникновения внутрь клетки крайне затруднен, так как мембрана клеток представляет собой липидный бислой с обращёнными наружу отрицательно заряженными фосфатными группами. Считается, что ионы Ca^{2+} способствуют и ускоряют процесс переноса ДНК в клеточное ядро, поэтому CaPhosph являются прекрасными носителями в этом случае благодаря своему составу. Был разработан ряд систем с CaPhosph для доставки нуклеиновых кислот [122, 125, 109].

Кроме того, стоит отметить, что CaPh-наночастицы могут быть эффективно использованы при фототерапии [160] - бурно развивающийся метод лечения рака. В этом методе светочувствительные частички, в качестве которых могут выступать модифицированные красителями CaPh-частицы, захватываются злокачественными тканями и облучаются лазером. Облучение приводит к возбуждению электронов красителя, сопровождающегося переносом энергии к растворённому триплетному кислороду, который затем переходит в синглетный кислород, а он, в свою очередь, способен уничтожать злокачественные клетки и бактерии. Так как большинство красителей по своей природе гидрофобны, это вызывает трудности при их применении и вызывает болевые ощущения у пациентов при введении их в растворе спирта. Поэтому важно найти

водорастворимую систему для доставки подобных веществ. Коллоид CaPh-частиц может применяться для этих целей, так как частицы могут быть стабилизированы различными полимерами и полиэлектролитами, которые способны захватывать красители [96].

Кроме того, есть данные о том, что CaPh-частицы выступает хорошим потенциальным вспомогательным средством для создания эффективных вакцин, так как их введение не вызывает побочных эффектов и дополнительной выработки IgE [97]. Авторы получали CaPh-частицы с внедрённым в них вирусом герпеса типа 2 (HSV-2) и проводили *in vivo* тесты полученных частиц на мышах. Был получен коллоидный раствор, содержащий CaPh-частицы 10 мг /мл и HSV-2 2 мг /мл. В ходе *in vivo* экспериментов мышам проводились назальные закапывания и внутривагинальные инъекции контрольных растворов PBS, HSV-2, CaPh и CaPh-частиц, содержащие HSV-2. Полученные исследователями результаты свидетельствовали о том, что мыши, которым вводили CaPh-частицы, содержащие HSV-2, имеют высокие уровни концентрации антител и эффективные титры нейтрализационных антител, таким образом, они были более защищены от инфекции при последующих инфицированиях. Благодаря своим малым размерам CaPh-частицы стимулируют клеточный ответ и выработку Т-киллеров [186].

Имеются сведения о внедрении инсулина в CaPh-частицы. Были проведены эксперименты по исследованию доставки рекомбинантного инсулина человека через ткани лёгких с помощью инкапсулирования белка в CaPh-частицы. Было показано, что при использовании такой системы процент абсорбированного инсулина выше и действие его длится дольше. Тесты на животных также показали, что использование CaPh-ПЭГ частиц позволяет снижать концентрации лекарственного вещества без снижения его эффективности. Стоит отметить также, что CaPh-ПЭГ частицы при этом не имеют побочных эффектов. Было установлено, что инсулин в таких частицах циркулирует в организме гораздо дольше, нежели инсулин, применяемый в водном растворе. Такие результаты

свидетельствуют о том, что применение инсулин-CaPh-ПЭГ частиц с размерами от 2 до 4 мкм повышает эффективность доставки лекарственного препарата через лёгкие [113].

Одной из важных задач в медицине является визуализация внутриклеточных структур и создание специальных меток, для диагностики и визуализации злокачественных образований в живом организме. Было показано, что внедрение флуоресцентных меток в CaPh-частицы приводит к улучшению не только физико-химических свойств красителей, но и к увеличению их биодоступности и биосовместимости [161]. В этой связи использование CaPh-частиц, меченных лантанидами [186] или покрытых функциональными веществами связанными или связывающими органические красители [111] может являться отличным решением современных медицинских проблем.

Последнее время в литературе появились сведения о применении CaPhosph в офтальмологии. Были проведены эксперименты по внедрению в CaPhosph ингибитора карбоангидразы, который эффективно снижает внутриглазное давление (ВГД), и показано, что такой препарат снижает ВГД намного эффективнее не только водного раствора этого вещества, но и коммерческого препарата бринзоламида. Кроме того, в ходе экспериментов *in vivo* никаких побочных эффектов при использовании частиц выявлено не было. Таким образом, предполагается, что такая форма офтальмологических препаратов может стать заменой их водным растворам [134].

Также было продемонстрировано усиление эффективности и длительности действия антиглаукомного препарата тимолола при его инкапсулировании в кальций-фосфатные частицы в экспериментах *in vivo* [62].

Были проведены эксперименты по сравнению активности водного раствора фермента и растворов CaPh-частиц с инкапсулированным СОД. Из литературы известно, что водный раствор СОД заметно теряет свою активность в течение 3-4 дней хранения при температуре +4°C [177]. Исследование влияния инкапсулирования СОД в CaPh-частицы на стабильность фермента проводилось

при +4°C в течение 4-х дней. Было показано, что внедрение фермента в CaPh-частицы способствует его стабилизации при хранении (+4°C). Обнаруженный эффект стабилизации СОД за счёт внедрения в кальций-фосфатные частицы авторы объясняют ограничением конформационной свободы структуры фермента, что, как известно, приводит к повышению стабильности многих ферментов. Данный эффект дает преимущество применения этого препарата в частицах по сравнению с водным раствором.

Как видно из литературного обзора, при использования нано- и микроносителей для доставки лекарственных препаратов важны такие их свойства, как высокая биосовместимость и биodeградируемость. Крайне важными параметрами являются размеры частиц, заряд их поверхности, меняя которые можно варьировать проникающую способность носителей и их адгезивные свойства по отношению к различными тканям и клеткам организма. В настоящее время в офтальмологии существует ряд проблем, связанных с эффективностью доставки лекарственных препаратов к внутриглазным тканям. Эти проблемы могут быть решены при использовании нано- и микроносителей для доставки лекарственных препаратов.

1.4.3. Мексидол

Мексидол, является производным 3-оксипиридина (азотсодержащего гетероциклического фенола). Это вещество обладает антиоксидантной активностью, которая обусловлена его способностью окислять и/или хелатировать ионы двухвалентного железа и взаимодействовать с водорастворимыми радикалами, супероксиданион радикалом [6]. Кроме того, он структурно близок к соединениям группы витамина В6, которые являются необходимыми компонентами ключевых ферментативных процессов обмена аминокислот и биогенных аминов.

Мексидол отличается от эмоксипина наличием в его структурной формуле радикала сукцината. Исследования показали, что антиокислительная активность мексидола выше, чем эмоксипина [6]. Выявлено также, что применение мексидола приводит к повышению активности ферментов антиоксидантной защиты: СОД и каталазы [68], что дополнительно усиливает его антиоксидантное действие.

Установлено также, что мексидол влияет на свойства клеточных и внутриклеточных мембран, воздействуя, таким образом, на состояние ионных каналов, рецепторных комплексов, мембраносвязанных ферментов и ферментов, находящихся внутри мембранных образований клеток [197]. Мембранопротекторный эффект Мексидола обусловлен не только ингибированием ПОЛ, но и непосредственным модифицирующим действием на физико-химические характеристики липидного компонента мембран [3]. Сукцинат – входит в число субстратов цикла Кребса, который обеспечивает основные энергетические потребности организма, что усиливает антигипоксантные свойства Мексидола. Сукцинат самостоятельно плохо проходит через тканевые барьеры, но будучи присоединенным к оксипиридину, лучше проникает через клеточные мембраны [45]. Кроме того, сукцинат обладает способностью обеспечивать ресинтез фосфолипидов [40].

В основном мексидол применяется перорально и в виде инъекций. Мексидол хорошо зарекомендовал себя при системном применении в качестве ноотропного, нейропротекторного средства, антигипоксанта и антиоксиданта, оказывающего энерготропное воздействие при ишемических состояниях и метаболических нарушениях [3, 13]. Выраженное терапевтическое действие мексидола при сердечно-сосудистой, неврологической патологии, согласно исследованиям, определяется тем, что препарат является веществом «коктейльного типа», сочетающее разные эффекты [13]. При местном применении для лечения ран, а также в стоматологии показано, что мексидол оказывает антинекротическое и ранозаживляющее действие. В хирургии

используются перевязочные материалы с иммобилизованным мексидолом [21]. В качестве противовоспалительного и ускоряющего заживление средства мексидол успешно используется в гинекологии и гастроэнтерологии. Имеются данные об эффективности мексидола при системном применении в офтальмологии, например, в комплексном лечении глаукомы [18, 53], острого посттравматического увеита [49], заболеваний глаз дегенеративно-дистрофического происхождения [19, 48].

Изучено влияние мексидола на течение раневого процесса в глазу и локальные метаболические процессы в слезной жидкости при ожоге центральной области роговицы, а также при моделировании послеожоговой ишемии конъюнктивы у кроликов. Выявлено, что инстилляции мексидола улучшают заживление ожоговой раны глаза у кроликов, способствуют более быстрому восстановлению микроциркуляции в конъюнктиве после ее ожога. Данные эффекты обусловлены способностью мексидола повышать локальный антиоксидантный потенциал и усиливать протеолиз в ранние сроки после травмы, способствуя своевременному очищению раны [70]. Мексидол на ранних этапах способствует очищению от некротизированных тканей, что связано с усилением под его влиянием кровоснабжения в конъюнктиве и повышением содержания плазминогена [71].

ООО «НПК «Фармасофт» была разработана лекарственная форма Мексидол глазные капли, которая находится на стадии доклинических исследований.

Вышеуказанные свойства мексидола обосновывают его целесообразное применение при экспериментальном увеите у кроликов.

1.4.4. Мелатонин

Гормон мелатонин (5-метокси-N-ацетилтриптамин) был открыт в 1958 году профессором Aaron B. Lerner. В организме человека мелатонин синтезируется из

аминокислоты триптофана, которая участвует в синтезе нейромедиатора серотонина. Мелатонин является индольным производным серотонина и синтезируется с участием различных ферментов (Рис. 4).



Рисунок 4. Схема синтеза мелатонина

В основном мелатонин вырабатывается секреторными клетками эпифиза — пинеалоцитами. Экстрапинеальными источниками синтеза мелатонина являются энтерохромаффинные клетки желудочно-кишечного тракта (ЕС-клетки). Выявлен синтез этого гормона в большом количестве в нейроэндокринных клетках воздухоносных путей, лёгких, в корковом слое почек и вдоль границы между корковым и мозговым слоем надпочечников, под печеночной капсулой, в параганглиях, яичниках, эндометрии, предстательной железе, плаценте, желчном пузыре и внутреннем ухе. За последние годы изучения обнаружен синтез мелатонина и в неэндокринных клетках: в клетках крови — тучных клетках, лимфоцитах, тромбоцитах, эозинофильных лейкоцитах, а также в тимусе, поджелудочной железе, мозжечке, сетчатке глаза и в некоторых эндотелиальных клетках. Функционально многие клетки, продуцирующие мелатонин, относятся к так называемой диффузной нейроэндокринной системе — универсальной системе адаптации и поддержания гомеостаза организма.

У взрослого человека за сутки синтезируется около 30 мкг мелатонина, его концентрация в сыворотке крови ночью в 30 раз больше, чем днем, причём пик

активности в среднем приходится приблизительно на 2 часа ночи [4, 182] по местному солнечному времени. Мелатонин транспортируется сывороточным альбумином, после освобождения от альбумина связывается со специфическими рецепторами на мембране клеток-мишеней, проникает в ядро и там осуществляет своё действие. Мелатонин быстро гидролизуется в печени и экскретируется с мочой, основным метаболитом является 6-гидроксимелатонин-сульфат, содержание которого в моче позволяет косвенно судить о продукции мелатонина эпифизом. Мелатонин является преимущественно жирорастворимым веществом [101], однако, доказано, что он также хорошо растворяется и в водной среде [181].

Мелатонин легко проникает через все физиологические барьеры, например, плаценту и гематоэнцефалический барьер, и проникает во все структуры клетки, где обеспечивает защиту от свободных радикалов [83].

С возрастом наблюдается значительное снижение эндогенной продукции мелатонина [164, 145]. Доказано, что снижение эндогенного мелатонина является одним из факторов, участвующих в патогенезе возрастных кардиоваскулярных [133] и нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и возрастная деменция [176, 175, 167].

Мелатонин — гормон, к которому имеются рецепторы как на клеточной, так и на ядерной мембране. У млекопитающих имеется два мембранных рецептора мелатонина — MTNR1A (MT1), экспрессирующийся в основном на клетках передней доли гипофиза и супрахиазмальных ядер гипоталамуса, но также присутствующий во многих периферических органах, и MTNR1B (MT2), экспрессирующийся в некоторых других участках мозга, в сетчатке и в лёгких. Многие эффекты мелатонина обусловлены взаимодействием с этими рецепторами [155]. У птиц, амфибий и рыб имеется третий рецептор — MTNR1C (MT3), который отсутствует у млекопитающих. Рецепторы мелатонина относятся к семейству рецепторов, связанных с G-белками, и действуют через Gαi-белок, снижая уровень цАМФ. Недавно открытые ядерные рецепторы мелатонина относятся к подсемейству RZR/ROR ретиноидных рецепторов. Видимо, через них

опосредуются многие иммуностимулирующие и противоопухолевые эффекты мелатонина.

К основным функциям мелатонина относится: регуляция сезонной ритмики у многих животных. Так как продукция мелатонина зависит от длины светового дня, многие животные используют её как «сезонные часы». Продукция мелатонина летом меньше, чем зимой, таким образом, мелатонин может регулировать функции, зависящие от фотопериода — размножение, миграционное поведение, сезонную линьку. Одним из основных действий мелатонина является регуляция сна. Он принимает участие в создании циркадного (циркадианного) ритма, непосредственно воздействуя на клетки и изменяя уровень секреции других гормонов и биологически активных веществ, концентрация которых зависит от времени суток. Сдвиг ритма секреции мелатонина происходит и при перелёте через часовые пояса. Прием мелатонина восстанавливает ритм сна, облегчает засыпание, восстанавливает естественный циркадный цикл, устраняет дневную сонливость.

Мелатонин улучшает настроение и психическое состояние [93]. Под влиянием мелатонина повышается содержание гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) в центральной нервной системе (ЦНС) и серотонина в среднем мозге и гипоталамусе. Известно, что ГАМК является тормозным медиатором ЦНС, а снижение активности серотонинэргических механизмов может иметь значение в патогенезе депрессивных состояний.

Мелатонин нормализует артериальное давление, в связи с регулирующим влиянием на эндокринную систему. Основное влияние мелатонина на эндокринную систему у многих видов заключается в торможении секреции гонадотропинов. Кроме того, снижается, но в меньшей степени, секреция других тропных гормонов передней доли гипофиза — кортикотропина, тиротропина, соматотропина. Мелатонин снижает чувствительность клеток передней доли гипофиза к гонадотропин-рилизинг фактору и может подавлять его секрецию.

Мелатонин усиливает эффективность работы иммунной системы [84]. Мелатонин является иммуностимулятором, так как участвует в регуляции функции тимуса и щитовидной железы, повышая активность Т-клеток и фагоцитов.

Мелатонин обладает противоопухолевым эффектом. На ранних стадиях эмбрионального развития биогенные амины, в том числе мелатонин, играют роль специализированных клеточных сигнальных молекул, которые регулируют процессы клеточного обновления. В ряде исследований на лабораторных животных и в системах культур опухолевых тканей было обнаружено, что мелатонин обладает антиопухолевым, онкостатическим действием. Механизмы воздействия мелатонина на опухолевый рост многообразны: он может влиять на синтез и секрецию гипофизарных и половых гормонов, способен модулировать иммунный ответ при наличии опухолевых клеток и взаимодействовать с RZR/ROR рецепторами [148]. Предполагается, что мелатонин может усиливать экспрессию молекул адгезии и этим препятствовать росту опухоли, так как известно, что в большинстве злокачественных опухолей имеются нарушения в адгезии клеток и дефекты функциональных межклеточных связей.

Мелатонин обладает антиоксидантными свойствами, замедляет процессы старения и увеличивает продолжительность жизни [117]. Механизм антиоксидантного действия проявляется в том, что мелатонин обладает выраженной способностью связывать свободные радикалы [193].

Доказано, что мелатонин обладает способностью обезвреживать наиболее токсичный гидроксильный радикал, как *in vitro* [142, 165, 184], так и *in vivo* [147].

Мелатонин также обезвреживает пероксинитрит анион [150], тем самым нивелируя его токсические эффекты *in vivo* [168].

Было показано, что мелатонин может напрямую связывать оксид азота [144]. Данная способность мелатонина может объяснить его защитное действие на ткани при ишемически-реперфузионных повреждениях [152]. Мелатонин активирует некоторые антиоксидантные ферменты, такие как

супероксиддисмутазу [149], глутатион пероксидазу и глутатионредуктазу [178]. Мелатонин ингибирует провоспалительные ферменты, такие как NO-синтазу, предотвращая тем самым окислительное воздействие на ткани оксида азота, а также пероксинитрита [129]. Кроме того, мелатонин снижает активность 5-липоксигеназы [98]. Мелатонин хелатирует ионы металлов переменной валентности и тем самым защищает клеточные мембраны от повреждения [193].

Мелатонин эффективно предотвращает повреждение нуклеарной ДНК и разрушение мембран, в результате перекисного окисления липидов [146]. Многочисленные исследования *in vivo* и *in vitro* доказывают способность мелатонина предотвращать повреждения хромосом в результате пагубного воздействия на клетки ионизирующей радиации [198, 153].

Помимо антиоксидантного эффекта, существуют и другие механизмы нейротропного действия мелатонина. Данные механизмы, опосредованы, взаимодействием мелатонина с белком кальмодулином [126]; блокированием роста уровня внутриклеточного Ca^{2+} [151]; ингибированием нитридэргического пути [163, 131]; уменьшением уровня эндотелиального фактора роста сосудов [94, 87]; снижением концентрации глутамата в синапсах сетчатки [104].

Мелатонин – является эндогенным нейромодулятором в сетчатой оболочке глаза. В противовес мелатонину, эпифизарного происхождения, который воздействуют на все ткани организма, ретинальный мелатонин вероятно действует в пределах глаза [127]. Доказано, что при удалении шишковидной железы средний уровень мелатонина в сетчатке глаза хомяков значительно повышается, что говорит о том, что мелатонин в сетчатке продуцируется самой тканью [114].

В экспериментах показано, что мелатонин играет защитную роль при таких заболеваниях глаз как кератиты, катаракта, глаукома, ретинопатия недоношенных, ишемически-реперфузионных повреждениях [169].

Kukner A. и др. в 2006 г. показали, что инъекция мелатонина внутрибрюшно (10мг/кг) значительно уменьшает отек сетчатки при экспериментальном увеите у морских свинок [110].

Sande P. H. и др. в 2008 г. исследовали терапевтический эффект мелатонина при увеите у хомяков. Увеит был вызван однократной интравитреальной инъекцией бактериального липополисахарида (LPS). Микросфера с мелатонином была введена подкожно за два часа до интравитреальной инъекции LPS. Спустя 24 часа и 8 суток после интравитреальной инъекции проводили оценку воспалительного ответа, оценивали клинические признаки воспаления, целостность гематофтальмического барьера, функциональную активность сетчатки, проводили патогистологическое исследование. Было выявлено, что мелатонин снижает ликидж белков и клеток в передний отрезок глаза, уменьшает клинические признаки воспаления, такие как расширение сосудов конъюнктивы структуры гематофтальмического барьера. По данным патогистологического исследования в группе нелеченных животных наблюдалась значительная дезорганизация мембранных дисков наружных сегментов палочек, тогда как в группе животных, леченных мелатонином, не наблюдалось морфологических изменений в наружных сегментах фоторецепторов. Мелатонин предотвращал снижение электрического потенциала сетчатки на электроретинограмме, вызванной введением LPS. Мелатонин значительно снижал повышенный при увеите уровень активности NO-синтазы, ФНО α , нуклеарного фактора κ B. Данные результаты позволяют сделать вывод, что мелатонин при экспериментальном увеите уменьшает клинические, биохимические, функциональные и патогистологические проявления увеита [194].

Вышеперечисленные свойства мелатонина обосновывают его целесообразное применение при экспериментальном увеите у кроликов.

ГЛАВА 2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика материала исследования

Экспериментальная работа выполнена на 89 кроликах (178 глаз) самцах, породы шиншилла, массой 2-2,5 кг. Разделение животных на экспериментальные группы проводилось случайным образом.

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

Данное исследование выполнено в соответствии с:

- Правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н);
- Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (Москва 2010);
- Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, Москва, ОАО «Издательство «Медицина», 2005;
- Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy press. – Washington, D.C. 1996.

Основные правила содержания и ухода соответствуют «Санитарным правилам по содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденным МЗ СССР 06.07.73 г. и приказа МЗ СССР № 755 от 12.08.77 и положениям Хельсинской декларации.

Работа одобрена локальным этическим комитетом ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России от 03.12.2013г, протокол № 22/2.

Изучали влияние местного применения антиоксидантов с различным механизмом действия на характер клинического течения и на локальные метаболические процессы во влаге передней камеры при экспериментальном увеите у кроликов.

Использовали препараты:

- 0.1% р-р супероксиддисмутазы (препарат Рексод; ООО "НПП Ферментные технологии", Россия). Препарат разводили 10 мМ Нерес буфером, рН 7,4, разделяли на суточные дозы и хранили при -20°C.; ЛРС – 007164/09 от 10.09.2009.
- СОД в кальций фосфатных (CaPh) наночастицах (частицы разработаны и изготовлены на Химическом факультете МГУ им. Ломоносова),
- Дексаметазон (р-р для инъекций 4мг/мл; CPSCOUYI Pharmaceutical, КНР), ЛСР-006923/10 от 21.07.10;
- Мексидол 2% (препарат Мексидол глазные капли; ООО «НПК «Фармасофт», Россия). РН – 002161/01 от 14.03.2008;
- 0,1% р-р Мелатонина (Sigma-Aldrich). Порошок разводили в фосфатном буфере рН 7,4 (2/3) с ДМСО (1/3), разделяли на суточные дозы и хранили при -5°C.; ЕС № 200-797-7;
- 10 мМ Нерес буфер (рН7,4). ЕС № 230-907-9.

Проведено 5 серий экспериментов:

I серия эксперимента, посвящена изучению клинической картины и изменений биохимических параметров во влаге передней камеры при экспериментальном увеите у кроликов.

Характеристика группы	Проводимое лечение
Группа кроликов с иммуногенным увеитом, 19 кроликов (38 глаз)	лечение не проводилось
Интактные кролики, 3 кролика (6 глаз)	лечение не проводилось

II серия эксперимента, посвящена изучению влияния местного применения Супероксиддисмутазы, Дексаметазона, а также их сочетания на характер клинического течения и на локальные метаболические процессы во влаге передней камеры при экспериментальном увеите у кроликов.

Характеристика группы	Проводимое лечение
Группа кроликов с иммуногенным увеитом, получавшая СОД, 4 кролика (8 глаз)	ежедневно в течение 7 дней, начиная со дня введения разрешающей дозы, проводили инстилляцией 0.1% раствора СОД 3 раза в день по 0,03 мл в оба глаза.
Группа кроликов с иммуногенным увеитом, получавшая Дексаметазон, 4 кролика (8 глаз)	ежедневно в течение 7 дней, начиная со дня введения разрешающей дозы, проводили инстилляцией 0.4% Дексаметазона 3 раза в день по 0,03 мл в оба глаза.
Группа кроликов с иммуногенным увеитом, получавшая СОД и Дексаметазон, 4 кролика (8 глаз)	ежедневно в течение 7 дней, начиная со дня введения разрешающей дозы, проводили инстилляцией 0.4% раствора Дексаметазона и 0.1% раствора СОД с интервалом не менее 60 минут 3 раза в день по 0,03 мл в оба глаза.
Группа кроликов с иммуногенным увеитом, 4 кролика (8 глаз)	инстилляцией плацебо (10 мМ Нерес буфер, рН7,4).
Интактные кролики, 4 кролика (8 глаз)	лечение не проводилось

III серия эксперимента, посвящена изучению влияния местного применения СОД в виде водного раствора и СОД в составе CaPh-наночастиц на характер клинического течения и на локальные метаболические

процессы во влаге передней камеры при экспериментальном увеите у кроликов.

Характеристика группы	Проводимое лечение
Группа кроликов с иммуногенным увеитом, получавшая СОД, 3 кролика 6 глаз)	ежедневно в течение 7 дней, начиная со дня введения разрешающей дозы, проводили инстилляцией 0.1% раствора СОД 3 раза в день по 0,03 мл в оба глаза.
Группа кроликов с иммуногенным увеитом, получавшая СОД в составе СаPh-наночастиц 3 кролика (6 глаз)	ежедневно в течение 7 дней, начиная со дня введения разрешающей дозы, проводили инстилляцией СОД в составе СаPh-наночастиц 3 раза в день по 0,03 мл в оба глаза.
Группа кроликов с иммуногенным увеитом, 3 кролика (6 глаз)	инстилляцией плацебо (10 мМ Нерес буфер, рН7,4).
Интактные кролики, 3 кролика (6 глаз)	Лечение не проводилось

СаPh-частицы, содержащие СОД были получены на базе химического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова. Получение СаPh-частиц проводили по методике, предложенной в работе Шимановской Е.В. и соавт. 2012г. [62]. Включение СОД в частицы проводили на стадии их получения. По данным просвечивающей электронной микроскопии полученные СОД-содержащие СаPh-частицы характеризовались округлой формой и размерами не более 0,45мкм (Рис. 5). Процент внедрения СОД в частицы оказался высоким и составил $50 \pm 5\%$.

Были изучены свойства СОД-содержащих СаPh-частиц в зависимости от условий хранения. Выяснилось, что 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. В предварительных экспериментах было

показано, что инстилляцией суспензии пустых CaPh-частиц не вызывают раздражения или воспаления в глазу при их закапывании 3 раза в день в течение недели.

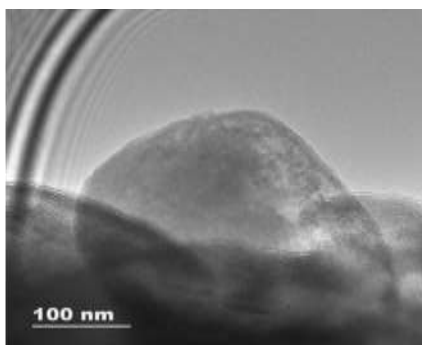


Рисунок 5. Микрофотография CaPh-частицы, содержащей СОД, полученная методом просвечивающей электронной микроскопии.

IV серия эксперимента, посвящена изучению влияния местного применения Мексидола на характер клинического течения и на локальные метаболические процессы во влаге передней камеры при экспериментальном увеите у кроликов.

Характеристика группы	Проводимое лечение
Группа кроликов с иммуногенным увеитом, получавшая Мексидол, 5 кроликов (10 глаз)	ежедневно в течение 9 дней, начиная со дня введения разрешающей дозы, проводили инстилляцией Мексидола 2%, 3 раза в день по 0,03 мл в оба глаза.
Группа кроликов с иммуногенным увеитом 5 кроликов (10 глаз)	инстилляцией плацебо (10 mM Нерес буфер, pH7,4).
Интактные кролики, 5 кролика (10 глаз)	лечение не проводилось

V серия эксперимента, посвящена изучению влияния местного применения Дексаметазона, Мелатонина, а также их сочетания на характер клинического течения и на локальные метаболические процессы во влаге передней камеры при экспериментальном увеите у кроликов.

Характеристика группы	Проводимое лечение
Группа кроликов с иммуногенным увеитом, получавшая Мелатонин, 4 кролика (8 глаз)	ежедневно в течение 7 дней, начиная со дня введения разрешающей дозы, проводили инстилляцией 0,1% р-ра Мелатонина, 3 раза в день по 0,03 мл в оба глаза.
Группа кроликов с иммуногенным увеитом, получавшая Дексаметазон, 4 кролика (8 глаз)	ежедневно в течение 7 дней, начиная со дня введения разрешающей дозы, проводили инстилляцией 0.4% Дексаметазона 3 раза в день по 0,03 мл в оба глаза.
Группа кроликов с иммуногенным увеитом, получавшая Мелатонин и Дексаметазон, 4 кролика (8 глаз)	ежедневно в течение 7 дней, начиная со дня введения разрешающей дозы, проводили инстилляцией 0.4% раствора Дексаметазона и 0,1% раствор Мелатонина с интервалом не менее 60 минут 3 раза в день по 0,03 мл в оба глаза.
Группа кроликов с иммуногенным увеитом 4 кролика (8 глаз)	инстилляцией плацебо (фосфатный буфер рН7,4, содержащий ДМСО в том же соотношении, что использовалось при разведении мелатонина).
Интактные кролики, 4 кролика (8 глаз)	лечение не проводилось

2.2. Методы исследования

2.2.1. 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. Адаптированная и усовершенствованная модель иммуногенного увеита, используемая в настоящем исследовании, отличается простотой выполнения, практически 100% воспроизводимостью и однотипной клинической картины, активным и длительным течением воспалительного процесса [56, 90]. Вначале проводили первичную сенсибилизацию организма путем подкожного введения 5 мл нормальной лошадиной сыворотки («Биомед» Россия). Увеит развивался в ответ на интравитриальное введение на 10 сутки разрешающей дозы антигена (0,070 мл). В качестве местной анестезии использовали 0.5% раствора алкаина.

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**

Признак	Степень выраженности	Баллы
Отек век	Отсутствует	0
	Слабо выраженный	1
	Умеренный	2
	Выраженный	3
Гиперемия конъюнктивы	Отсутствует	0
	Легкая инъекция	1
	Умеренная инъекция	2
	Выраженная инъекция	3
Отек роговицы	Отсутствует	0
	Слабовыраженный	1
	Умеренный	2

	Выраженный («матовое стекло»)	3
	Резко выраженный («фарфоровое стекло»)	4
Отек радужки	Отсутствует	0
	Слабовыраженный (сглаженный рельеф, незначительное расширение сосудов)	1
	Умеренный (сильно сглаженный рельеф, расширение сосудов)	2
	Выраженный (рельеф практически отсутствует, фалды и выраженное расширение сосудов)	3
	Резко выраженный (рельеф отсутствует, выраженные фалды и резко выраженное расширение сосудов радужки)	4
Фибрин в передней камере	Отсутствует	0
	Хлоп. сгустки фибрина <1/3 объема ПК	1
	1/3 объема ПК	2
	2/3 объема ПК	3
	Весь объем ПК	4
Неоваскуляризация роговицы	Длина сосудов 0.5мм	0.5
	Длина сосудов 1.0мм	1
	Длина сосудов 1.5мм	1.5
	Длина сосудов 2.0мм	2

2.2.2. 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.

Основной объект исследования в настоящей работе – влага передней камеры (ВПК). При ограниченном количестве ВПК было необходимо таким образом подобрать набор биохимических тестов, чтобы они наиболее объективно отражали метаболические изменения во ВПК, характерные для исследуемого патологического процесса. При постановке экспериментов измерение биохимических параметров во ВПК до воспроизведения патологического процесса и до начала лечения не представлялось возможным. При постановке

эксперимента всегда формировали группу интактных животных, у которых ВПК собиралась в те же сроки, что и у опытных для исключения влияния режима кормления, содержания животных на исследуемые биохимические параметры. Очень важно наряду с усредненными показателями оценивать индивидуальную динамику. Это обеспечивает возможность оценки степени тяжести патологического процесса, динамического наблюдения за течением патологического процесса и проводимым лечением.

Так как в своих исследованиях мы были ограничены количеством ВПК, то оценить все параметры в рамках одной диссертационной работы не представлялось возможным. Поэтому для данной экспериментальной модели мы выбрали то необходимое количество параметров, которое наиболее адекватно соответствовало поставленным задачам.

На 7-9 сутки эксперимента из каждого глаза у всех кроликов путем парацентеза передней камеры инсулиновым шприцем под местной анестезией 0.5% раствора алкаина производили забор около 0,15 мл влаги передней камеры. В водянистой влаге определяли содержание лейкоцитов, затем ее центрифугировали и супернатант использовали для биохимических исследований. Для контроля действия внешних факторов на биохимические показатели была взята влага передней камеры у здоровых животных.

Во время первой серии экспериментального исследования, для более детального изучения картины заболевания исследована влага передней камеры на 4 сутки после введения разрешающей дозы, для чего половину кроликов из каждой группы данной серии выводили из эксперимента. На 1, 3 и 7 сутки также было исследовано 0,25мл слезной жидкости, забор которой проводили с помощью фильтровальной бумаги.

1. Концентрацию белка во влаге передней камеры определяли по методу Лоури [170]:

Принцип метода: В щелочной среде ионы Cu^{+2} образуют комплекс с пептидными связями, переходя в Cu^{+} . Одновалентные ионы меди реагируют с

реактивом Фолина (фосфомолибденовая кислота с фенолом), образуя нестабильный продукт, переходящий в молибденовую синь, с максимумом адсорбции при 750 нм. Увеличение адсорбции при 750 нм пропорционально концентрации белка. Метод очень чувствителен к наличию в растворе посторонних восстановителей (что затрудняет его использование при определении белка в неочищенных препаратах), чувствительность к белку — 10 — 100 мкг/мл.

Ход определения: Влагу разводили от 50 до 200 раз. К 0,5 мл образца добавляли 2 мл приготовленного реактива (50 мл 2% Na_2CO_3 в 0,1Н NaOH + 1 мл 0,5% CuSO_4 в 1% Na-K виннокислом), тщательно перемешать. В контрольную пробирку добавляли 0,5 мл воды и 2 мл данного реактива. Инкубировали 10 минут при комнатной температуре. Добавляли 200 мкл реактива Фолина, разбавленного водой в 2 раза, тщательно перемешивали. Затем инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Сразу измеряли экстинкцию при 750 нм против контроля. Вносили образец в двух разведениях и потом брали среднее значение концентрации белка.

Реактивы:

1. 10г 2% Na_2CO_3 в 2г 0,1Н NaOH
2. 0,125г 0,5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 0,25г 1% Na-K виннокислого
3. Реактив Фолина («ICN», США).

Прибор: Многофункциональный микропланшетный фотометр Synergy MX (Bio-Tek, США).

2. Антиокислительную активность определяли по параметрам кинетики хемилюминесценции в модельной системе гемоглобин- H_2O_2 -люминол [28]:

Принцип метода: Известны различные модельные системы для определения АОА веществ и биологического материала. В целом, все они состоят, по крайней мере, из двух компонентов: инициатора окисления и субстрата окисления. Торможение антиоксидантами свободнорадикального окисления в модельных

системах оценивается путем определения промежуточных или конечных продуктов окисления с помощью хроматографических, спектрофотометрических, хемилюминесцентных и других методов. Среди этих методов наибольшей информативностью обладают хемилюминесцентные методы, в которых проводится измерение хемилюминесценции (ХЛ), сопровождающей окисление определенных субстратов, для непосредственного слежения за кинетикой окисления [10].

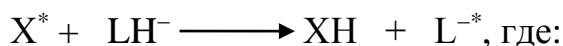
В настоящей работе для изучения антиокислительных свойств влаги передней камеры использована система гемоглобин - перекись водорода - люминол (Hb- H_2O_2 -Лм), в которой в качестве субстрата окисления выступает люминол. Метод разработан на кафедре биофизики РГМУ (зав. кафедрой проф. Владимиров Ю. А.) [47] и был адаптирован в нашей лаборатории применительно к исследованию слезной жидкости [28]. Хемилюминесценция в системе Hb- H_2O_2 -Лм отличается высокой интенсивностью, поэтому для измерения не требуется высокочувствительных хемилюминометров. Радикалы-инициаторы, образующиеся в данной модельной системе, в качестве которых рассматривают феррил-радикалы гемоглобина и гидроксильные радикалы, составляют один из путей иницирования свободнорадикального окисления *in vivo*. Метод отличается простотой и высокой воспроизводимостью, для анализа необходимо небольшое количество биологической жидкости (10мкл).

Метод позволяет количественно оценивать АОА веществ (фармакологических препаратов) и биологического материала (жидких сред и гомогенатов тканей), изучать вклад исследуемых веществ в АОА биоматериала в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, предлагаемый способ определения АОА может быть использован для динамического наблюдения за состоянием антиокислительного потенциала биологических жидкостей при различных патологических процессах и оценки адекватности проводимой терапии.

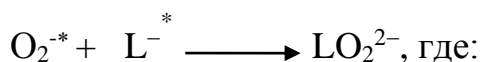
При взаимодействии гемоглобина с H_2O_2 образуются феррил-радикалы гемоглобина и гидроксильные радикалы, которые выступают в качестве

инициаторов окисления люминола в системе Нб-Н₂О₂-Лм. Под действием вышеуказанных радикалов в системе Нб-Н₂О₂-Лм происходит окисление Лм с образованием 3-аминофталат дианиона в возбужденном состоянии, который переходит в основное состояние с испусканием кванта света ХЛ с длиной волны 425 нм. Таким образом, количество выделившихся квантов света ХЛ в системе Нб-Н₂О₂-Лм пропорционально количеству образовавшегося конечного продукта окисления 3-аминофталат дианиона и, следовательно, является мерой степени окисленности Лм [47].

Последовательность реакций выглядит следующим образом:

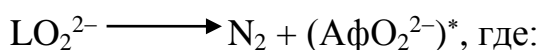


(X[•] - феррил радикал гемоглобина или ОН[•], L[•] - семихинон радикал люминола)

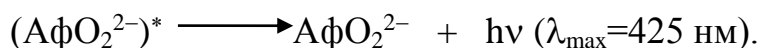


(LO₂²⁻ - эндопероксид люминола)

Эндопероксид люминола является нестабильным соединением и легко разрушается:



(AφO₂²⁻ - 3-аминофталат дианион)



Зависимость интенсивности хемилюминесценции (ХЛ) от времени называют кинетикой ХЛ. Основными параметрами кинетики ХЛ являются: величина латентного периода, светосумма, максимальная интенсивность ХЛ.

В настоящей работе в качестве параметра, характеризующего АОА биологического материала, был выбран период полной защиты Лм от окисления, который отражает латентный период ХЛ. Таким образом, латентный период - это время от момента индукции свободнорадикального окисления Лм до начала развития свечения. Введение в модельную систему антиоксидантов приводит к торможению свободнорадикального окисления люминола. Это проявляется в

увеличении латентного периода ХЛ. Прямо пропорциональная зависимость изменения латентного периода ХЛ (t/t_0) от концентрации вещества, добавленного в модельную систему Нб-Н₂О₂-Лм, позволяет легко выразить АОА одного антиоксиданта через молярную концентрацию другого (стандартного) антиоксиданта. В качестве стандартного антиоксиданта в настоящей работе был использован водорастворимый аналог витамина Е - тролокс. Способ определения АОА основывается на определении латентного периода ХЛ модельной системы без и в присутствии исследуемой биологической жидкости. Полученные значения АОА выражаются через эквивалентную молярную концентрацию тролокса, то есть такую концентрацию тролокса, добавление которой в модельную систему приводит к такому же изменению латентного периода ХЛ, как при добавлении в модельную систему биологической жидкости того же объема.

Ход определения. Для определения латентного периода в модельной системы (t_0) ставили контрольную пробу. В пробирку “эппендорф” вносили 370 мкл фосфатного буфера и добавляли 50 мкл люминола и 50 мкл гемоглобина. Тщательно перемешивали. Для инициирования реакции свободнорадикального окисления люминола добавляли, точно фиксируя время внесения, 30 мкл рабочего раствора Н₂О₂, перемешивали. Пробирку помещали в хемилуцинометр “Биотокс-7”, который регистрировал кинетику свободнорадикальной реакции в модельной системе Нб-Н₂О₂-Лм. “Биотокс- 7” подключали к компьютеру, где на специальной программе, которая позволяет с высокой точностью определять начало реакции (внесение Н₂О₂), развитие свечения и выход на плато, следили за кинетикой реакции. На мониторе кинетическая кривая представляла собой график зависимости изменения интенсивности свечения ХЛ от времени.

Для определения латентного периода модельной системы в присутствии антиоксидантов и/или биологических жидкостей (t) ставили опытную пробу. В пробирку "эппендорф" вносили 340 мкл фосфатного буфера и добавляли последовательно 50 мкл люминола, 50 мкл гемоглобина и 30 мкл биологического материала или раствор тролокса. Тщательно перемешивали. Фиксируя время,

вносили 30 мкл рабочего раствора H_2O_2 , перемешивали и регистрировали кинетику ХЛ на хемиллюминометре (Рис. 6).

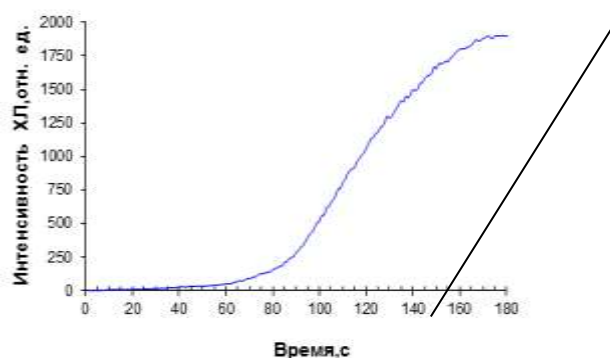


Рисунок 6. Кинетика ХЛ влаги передней камеры кролика в модельной системе $\text{Hb-H}_2\text{O}_2\text{-Lm}$

Для определения АОА исследуемого вещества или биологической жидкости строили калибровочную кривую. Для этого по оси абсцисс откладывали концентрацию тролокса, а по оси ординат величину $(t-t_0)/t_0$. Латентный период определяли путем аппроксимирования прямолинейного участка кривой ХЛ и ее экстраполяцией на ось абсцисс. Для каждого эксперимента строили свою калибровочную кривую, при этом проводили не менее двух серий параллельных измерений. Затем рассчитывали величину $(t-t_0)/t_0$ для исследуемой биологической жидкости и по калибровочной кривой находили соответствующую концентрацию тролокса. Окончательно антиокислительную активность биологической пробы вычисляли с учетом предварительного разведения.

Реактивы:

1. 0.05 М фосфатный буфер, $\text{pH}=7,4$, содержащий ЭДТА- Na («ICN Biomedicals Inc», США);
2. 5,0 мМ раствор гемоглобина («ICN Biomedicals Inc», США) в 0,05 М фосфатном буфере $\text{pH}=7,4$ (готовили *ex tempore*);
3. 1 мМ раствор люминола («ICN Biomedicals Inc», США) в фосфатном

буфере (основной раствор), хранится в пробирках «эппендорф» по 0,5-0,8 мл при -20°C, рабочий раствор готовили в день проведения исследования разведением основного раствора в 10 раз 0,5 М фосфатным буфером. ЕС № 208-309-4;

4. 33% пергидроль - основной раствор, рабочий реактив (0,98 mM H_2O_2) готовили в день проведения исследования разведением основного раствора в 10000 раз бидистиллированной водой;

5. 0,256 mM раствор тролокса («Sigma-Aldrich», Германия) - основной раствор на фосфатном буфере, для построения калибровочной кривой использовали тролокс в концентрациях 4, 8 и 16 мкМ. ЕС № 258-422-8;

Прибор: Хемилюминометр «Энергия», "Биотокс-7".

3. Активность супероксиддисмутазы определяли по автоокислению кверцетина [41]:

Принцип метода: основан на спонтанном окислении кверцетина. СОД тормозит автоокисление кверцетина, поэтому через 20 мин абсорбция в опытных образцах снижается меньше, чем в контроле.

Ход определения: Для определения активности СОД в микрокювету вносили: 900 мкл буфера, 30 мкл влаги и 30 мкл кверцетина и немедленно измеряли абсорбцию при 406нм против воды. Для измерения контроля в микрокювету вносили: 930 мкл буфера и 30 мкл кверцетина. Затем микрокюветы инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. По истечении 20 мин абсорбцию измеряли еще раз. Вычислив разность между абсорбцией при первом и втором измерениях, мы сравнивали ее с таковой в контроле и рассчитывали % ингибирования по сравнению с контролем. Затем по калибровочной кривой определяли активность СОД. Калибровочную кривую – зависимость % ингибирования от концентрации СОД - строили по чистой СОД ("Рексод").

Реактивы: 1. 0,02 М фосфатный буфер с ЭДТА, pH 10,2; («Fluka», США). ЕС № 6384-92.6;

2. тетраметилэтилендиамин (ТМЭДА) («Helicon», Россия). ЕС № 110-18-9;
3. кверцетин 0,015% р-р в ДМСО («ДИАЭМ», Россия). ЕС № 208-322-5.

Прибор: Многофункциональный микропланшетный фотометр Synergy MX (Bio-Tek, США).

4. Активность α_2 -макроглобулина (α_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 [31]:

Принцип метода: основан на том, что комплекс α_2 -МГ–трипсин сохраняет протеолитическую активность по отношению к низкомолекулярным субстратам, и на эту активность не влияет ингибитор трипсина из бобов сои. Для определения α_2 -МГ в слезной жидкости использовали метод К.Н. Веремеенко и Л.И. Волохонской в модификации Т.А. Кримштейн и В.Б. Хватова, модифицированный для микроанализа [77].

Для определения уровня α_2 -МГ к исследуемым образцам добавляется в избыточном количестве трипсин, что обеспечивает полное насыщение α_2 -МГ ферментом, избыток свободного трипсина инактивировали ингибитором трипсина из бобов сои, который полностью нейтрализует свободный трипсин, но не действует на трипсин, находящийся в комплексе с α_2 -МГ. После этого измеряют активность связанного с α_2 -МГ трипсина по отношению к низкомолекулярному субстрату БАПНА.

Ход определения: активности α_2 -МГ во влаге передней камеры при использовании микрометода был следующим. К 40 мкл исследуемого образца добавляли 50 мкл Трис-HCl буфера, 50 мкл 4 мг % раствора трипсина в 0,001 н HCl, 10 мкл $2,3 \times 10^{-6}$ М раствора соевого ингибитора в Трис-HCl буфере. В контрольную пробу вместо образца добавляли соответствующее количество физиологического раствора и не вносили трипсин. После 15-минутной инкубации

при комнатной температуре добавляли 100 мкл 0,92 мМ раствора БАПНА и инкубировали при 37°C. Реакцию останавливали 25 мкл 0,5 Н НСl, и затем в контрольную пробу вносили 50 мкл раствора трипсина.

Расчет активности α_2 -МГ проводили, определяя активность трипсина по отношению к БАПНА с помощью калибровочной кривой, построенной по стандартному раствору п-нитроанилина.

Расчет активности α_2 -МГ во влаге передней камеры:

$$(D - D_k) * 0,108 = A \text{ (нмоль/мин*мл)}$$

$$A / (\text{мг белка} * 0,04\text{мл}) = A \text{ (нмоль/мин*мг)}, \text{ где}$$

A - активность фермента

D - оптическая плотность образцов влаги, измеренная при 410 нм.

D_k - оптическая плотность контрольных образцов

0,108- коэффициент, рассчитанный с помощью калибровочной кривой, построенной по р-нитроанилину.

Реактивы:

1. 50 мкл Трис-НСl буфера, («Sigma-Aldrich», Германия). ЕС № 201-064-4;
2. 4 мг % р-р Трипсина («ICN Biomedicals Inc», США). ЕС № 232-650-8;
3. 0,92 мМ раствор БАПНА («Sigma-Aldrich», Германия). ЕС № 213-011-2;
4. Диметилформамид («Лаверна», Россия) для растворения БАПНА;
5. Ингибитор трипсина из бобов сои («Sigma-Aldrich», Германия). ЕС № 232-906-9.

Прибор: Многофункциональный микропланшетный фотометр Synergy MX (Bio-Tek, США).

5. Суммарное содержание продуктов обмена монооксида азота (NO) – нитратов и нитритов, определяли фотометрически по методике Green L. C. [86]:

Принцип метода: Содержание продуктов обмена оксида азота - нитратов и нитритов определяли фотометрически по методике, разработанной Green L. C. и соавт, и адаптированной нами для исследования влаги передней камеры. Принцип

метода заключается в определении интенсивности окраски проб в реакции диазотирования нитритом сульфаниламида, входящего в состав реактива Грисса при длине волны 540 нм.

Ход определения: Готовили стандартные растворы NaNO_2 (0-25 мкМ). Для определения концентрации нитритов в лунки планшета разливали по 50 мкл стандарта и образца (2 или 3 параллели). Для определения общей концентрации [нитриты + нитраты] добавляли в каждую лунку 5мкл раствора нитратредуктазы и 10мкл 2мМ NADPH, инкубировали с перемешиванием при комнатной температуре 20 мин. Затем добавляли 100 мкл реагента Грисса в каждую лунку и инкубировали с перемешиванием при комнатной температуре 10-15 минут в отсутствии света. Измеряли абсорбцию при 540 нм. Окраска должна быть стабильна в течение 30 минут. Строили калибровочную кривую по NaNO_2 и по графику определяли неизвестную концентрацию; [нитрат] = [нитрат + нитрит] – [нитрит].

Реактивы:

1. Стандартный раствор нитрита натрия, 100 мМ (6,9 мг/л воды), (Sigma-Aldrich, Германия). ЕС № 231-555-9;
2. Реагент Грисса (40 мг/мл воды), (Sigma-Aldrich, Германия);
3. Нитратредуктаза (0,2 ед/мл буфера), (Sigma-Aldrich, Германия). ЕС № 902-927-0;
4. NADPH 2мМ (1,66 г/л), (Sigma-Aldrich, Германия). ЕС № 264-671-1;
5. KH_2PO_4 (Лаверна, Россия).

Прибор: Многофункциональный микропланшетный фотометр Synergy MX (Bio-Tek, США).

6. Количество лейкоцитов в водянистой влаге.

Ход определения: подсчет лейкоцитов проводили под световым микроскопом в неокрашенном мазке, считали среднее количество лейкоцитов в 5 полях зрения.

Прибор: Световой микроскоп «Micros MCX 300», Austria.

7. Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистических пакетов программ "Excel" и Statistica 6.0. Данный раздел работы выполнен автором совместно с науч. сотрудником отдела патофизиологии и биохимии ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России Безнос О. В. Исследуемые выборки были подвергнуты тесту на нормальность распределения. Показатели с нормальным распределением представлены как среднее значение (M) 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.

2.2.3. Гистологические методы исследования

Гистологическое исследование глазных яблок проведено в лаборатории экспериментальной патоморфологии (зав. лаб., проф. Шехтер А.Б., Первый МГМУ им. И.М. Сеченова).

Во время третьей серии экспериментального исследования для более подробного изучения влияния СОД в составе CaPh-наночастиц 7 сутки проведено патогистологическое исследование. Эвтаназия осуществлялась с помощью воздушной эмболии, были энуклеированы глаза. Половины глазных яблок фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, проводили через спирты возрастающей концентрации, заливались в парафин. Микротомные срезы толщиной 4-5 мкм окрашивались гематоксилином и эозином. Изучение и анализ гистологических препаратов проводилось с использованием светового микроскопа Olympus BX51, оснащенного цифровой видеокамерой SDU («Спецтелетехника», Россия). Микрофотографирование гистологических

препаратов проводилось помощью этой камеры и программы Launch Cam_View.
Для контроля были использованы 2 глаза здорового животного.

ГЛАВА 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Экспериментальный увеит у кроликов

3.1.1. Оценка клинической картины

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

После введения разрешающей дозы лошадиной сыворотки в стекловидное тело у кроликов наблюдались характерные признаки переднего увеита (Табл.2, Рис.7).

Таблица 2.

Клиническая картина экспериментального увеита у кроликов (в усл. баллах)

сутки	1	2	3	7
Отек век	1,90±0,32	1,80±0,24	0,8±0,36	0,67±0,58
Гиперемия конъюнктивы	3,0±0,0	2,7±0,27	2,6±0,48	1,0±0,51
Отек роговицы	2,05±0,51	2,45±0,56	2,25±0,68	1,17±0,81
Отек радужки	2,20±0,73	2,7±0,55	2,75±0,36	2,83±0,15
Фибрин в п/к	2,55±0,78	3,20±0,6	3,09±0,63	1,75±0,71
Н/о сосуды	0,0±0,0	0,6±0,55	0,93±0,53	2,83±0,53

Внешние признаки воспаления (отек век, гиперемия конъюнктивы) были наиболее выраженными на 1 сутки после введения разрешающей дозы (Рис. 8). К 7 суткам внешние признаки воспаления были уже менее выражены.

Отек роговицы достиг наибольшей интенсивности к 2 суткам с его последующим снижением на 7 сутки (Рис. 9). В единичных случаях отмечались хлопьеобразные преципитаты на эндотелии роговицы.

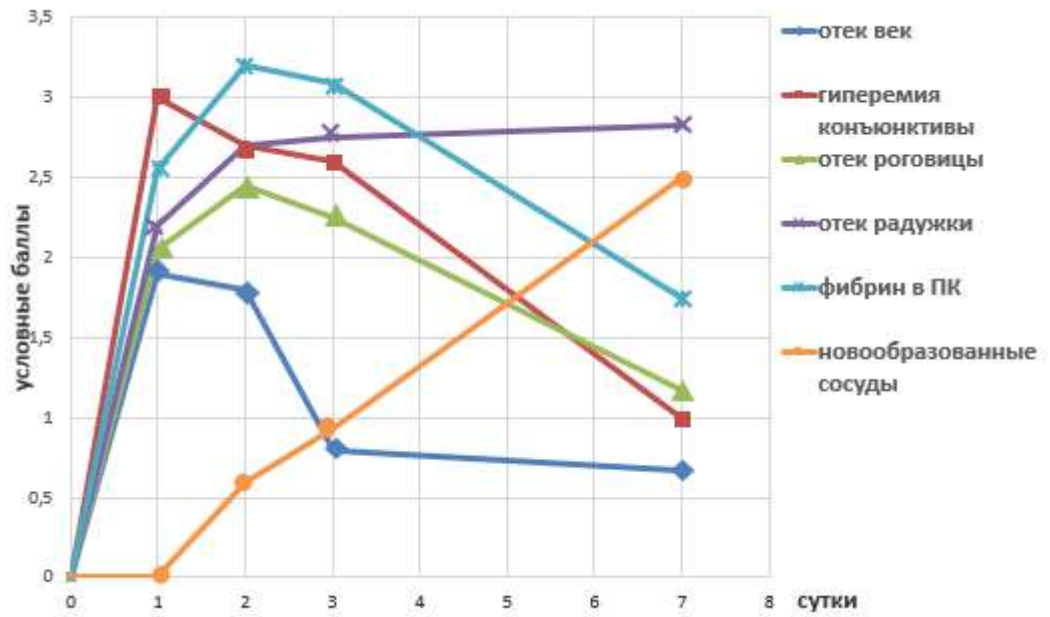


Рисунок 7. Клиническая картина экспериментального увеита у кроликов.



Рисунок 8. Гиперемия конъюнктивы на 1 сутки экспериментального увеита у кроликов.



Рисунок 9. Отек роговицы на 2 сутки экспериментального увеита у кроликов.

Со стороны радужки наблюдался выраженный отек стромы, сглаженность рисунка, расширение, извитость и полнокровность кровеносных сосудов (Рис. 10). Данные изменения продолжали нарастать на протяжении всего периода наблюдения.

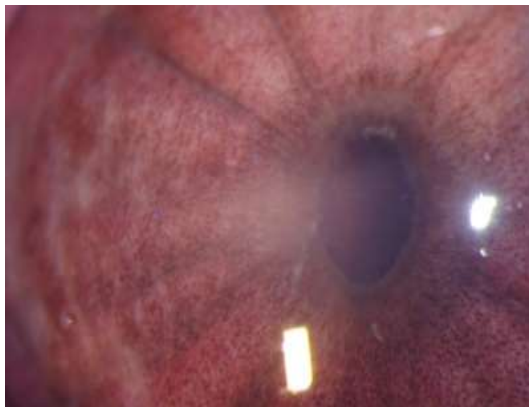


Рисунок 10. Отек радужки на 3 сутки экспериментального увеита у кроликов.

С первых же суток увеита отмечено образование пленок и хлопьев фибрина в передней камере. Наибольшее количество сгустков фибрина отмечалось на 2 сутки, к 7 суткам происходила их частичная резорбция (Рис. 11).

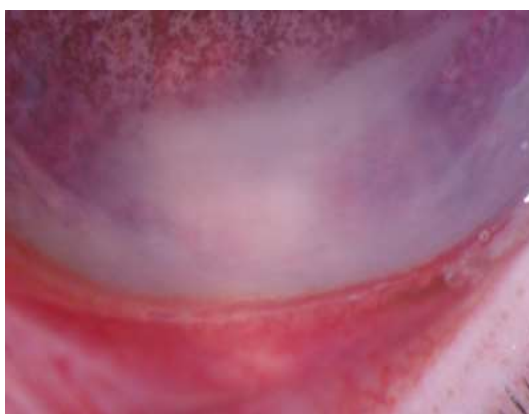


Рисунок 11. Фибрин в передней камере на 4 сутки экспериментального увеита у кроликов.

Начиная с 5 суток, в единичных случаях обнаруживалась гифема.

Формировались задние круговые синехии, зрачок не реагировал на свет и часто имел неправильную форму. На поверхности передней капсулы хрусталика обнаруживались крупные или мелкие преципитаты, сгустки фибрина, хрусталик становился диффузно мутным. Начиная с 3 суток в роговице был отмечен рост новообразованных сосудов со стороны лимба, длина которых к 7 суткам в среднем достигала 3мм (Рис. 12).

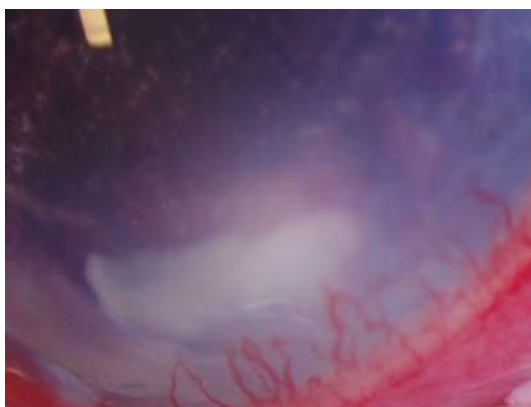


Рисунок 12. Рост новообразованных сосудов роговицы на 4 сутки экспериментального увеита у кроликов.

На поздних сроках наблюдения (6-7 сутки) пальпаторно определялось повышенное внутриглазное давление.

3.1.2. Анализ биохимических параметров в слезной жидкости и 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.

Биохимическое исследование слезы и водянистой влаги показало, что у кроликов с увеитом на 3 сутки концентрация общего белка в слезной жидкости превысила норму на 29%, однако уже на 7 сутки воспалительного процесса

концентрация снизилась ниже нормы на 32,5% (Табл. 3, Диаграмма. 1).

Таблица 3.

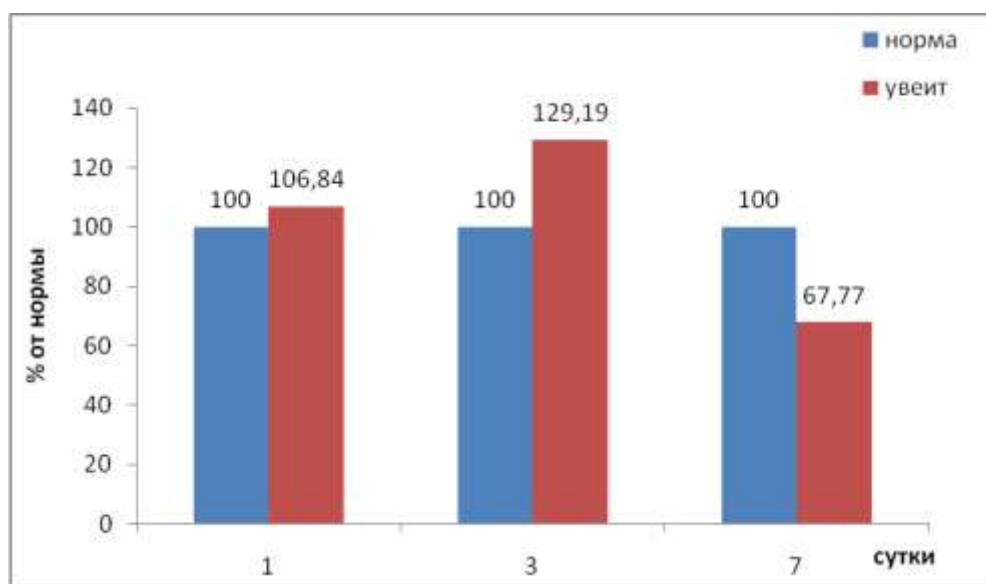
Концентрация белка в слезной жидкости при экспериментальном увеите у кроликов (в мг/мл)

сутки	1	3	7
Норма	1,19±0,1	0,92±0,17	1,60±0,07
Увеит	1,27±0,1	1,19±0,09	1,08±0,07 *

* - $p \leq 0,01$ по сравнению с интактными животными.

Диаграмма 1.

Концентрация белка в слезной жидкости при экспериментальном увеите у кроликов



У кроликов с увеитом на 3 сутки концентрация общего белка в ВПК значительно превысила норму (в 26,4 раза), к 7 суткам концентрация белка в ВПК снизилась, однако по-прежнему оставалась выше нормы (в 17,4 раза) (Табл. 4, Диаграмма 2). Повышение содержания белка в ВПК свидетельствует об увеличении проницаемости сосудов переднего отдела сосудистой оболочки глаза, т.е. о нарушении проницаемости гематоофтальмического барьера.

Таблица 4.

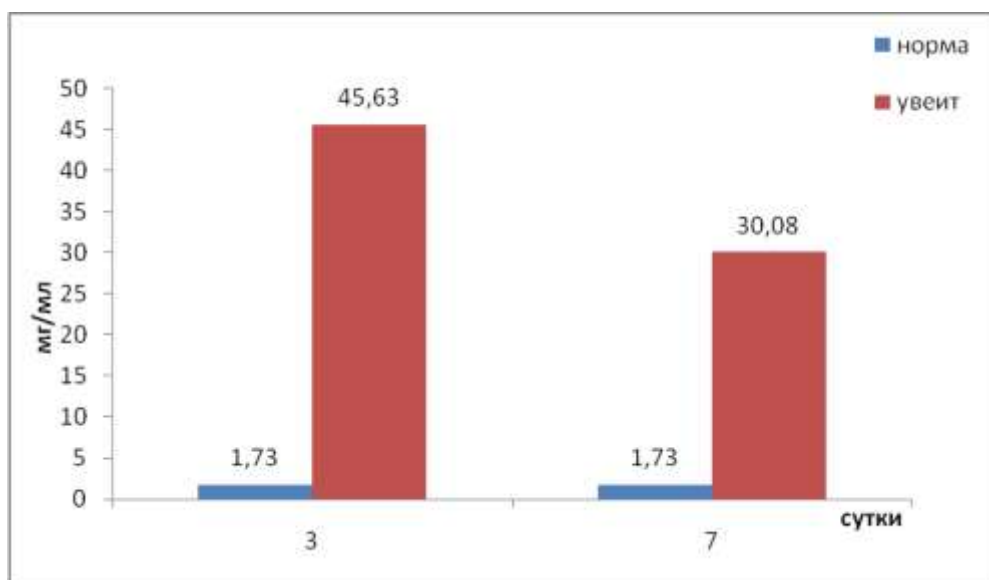
Концентрация белка во влаге передней камеры при экспериментальном увеите у кроликов (в мг/мл)

сутки	3	7
Интактные	1,73±0,17	1,73±0,17
Увеит	45,63±0,95 *	30,08±10,0

* - $p \leq 0,01$ по сравнению с интактными животными.

Диаграмма 2.

Концентрация белка во влаге передней камеры при экспериментальном увеите у кроликов



Ранее было показано, что у детей с увеитом изменяется антиокислительная активность как сыворотки крови, так и слезной жидкости соответственно фазе заболевания: снижается в период обострения, повышается в фазу ремиссии [36].

На 3 сутки экспериментального увеита нами также выявлено снижение уровня АОА в слезной жидкости до 50% от нормы. К 7 суткам отмечено незначительное повышение уровня АОА (Табл. 5, Диаграмма 3).

Нами выявлены значительные изменения со стороны антиокислительной активности и в ВПК. В ней уровень АОА на 3 сутки был ниже нормы в 5,1 раз, на 7 сутки - в 6,4 раза (Табл. 6, Диаграмма 4). Данные изменения свидетельствуют о

развитии окислительного стресса.

Таблица 5.

Уровень АОА в слезной жидкости при экспериментальном увеите у кроликов (в % от нормы)

сутки	1	3	7
Увеит	88,76±13,75	49,21±7,74	54,95±5,71

Диаграмма 3.

Уровень АОА в слезной жидкости при экспериментальном увеите у кроликов

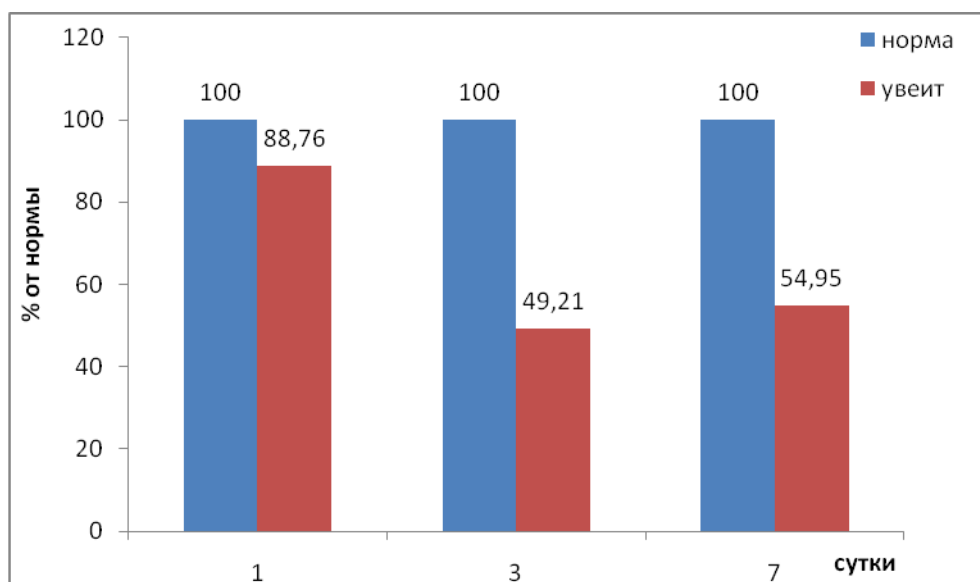


Таблица 6.

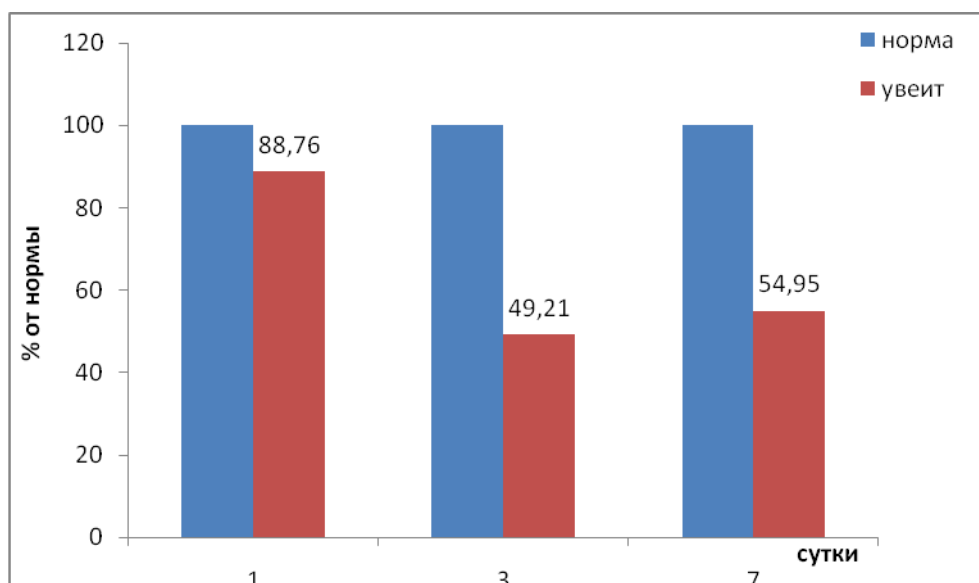
Уровень АОА во влаге передней камеры при экспериментальном увеите у кроликов (в % от нормы)

сутки	3	7
Увеит	19,26±5,50 *	15,76±5,88

* - $p \leq 0,01$ по сравнению с интактными животными.

Диаграмма 4.

Уровень АОА во влаге передней камеры при экспериментальном увеите у кроликов



В ходе эксперимента мы также отметили, что на 3 сутки увеита активность СОД в слезе незначительно повысилась, однако на 7 сутки она снизилась и оказалась на 10% ниже нормы (Табл. 7, Диаграмма 5.).

По нашим данным, лейкоциты в водянистой влаге в норме практически не обнаруживались (не более 1 в поле зрения), в острую фазу увеита (3 сутки) произошло значительное увеличение их количества (в 24,6 раза), к 7 суткам оно снизилось, и превысило норму в 7,2 раз (Табл. 8, Диаграмма 6). Выход лейкоцитов в ВПК свидетельствует о развитии воспаления во внутренних структурах глаза, а количество клеток отражает выраженность воспалительной реакции.

Таблица 7.

Активность СОД в слезной жидкости при экспериментальном увеите у кроликов (в % от нормы)

сутки	1	3	7
Увеит	102,99±9,24	114,65±12,6	91,26±12,76 *

* - $p \leq 0,01$ по сравнению с интактными животными.

Диаграмма 5.

Активность СОД в слезной жидкости при экспериментальном увеите у кроликов

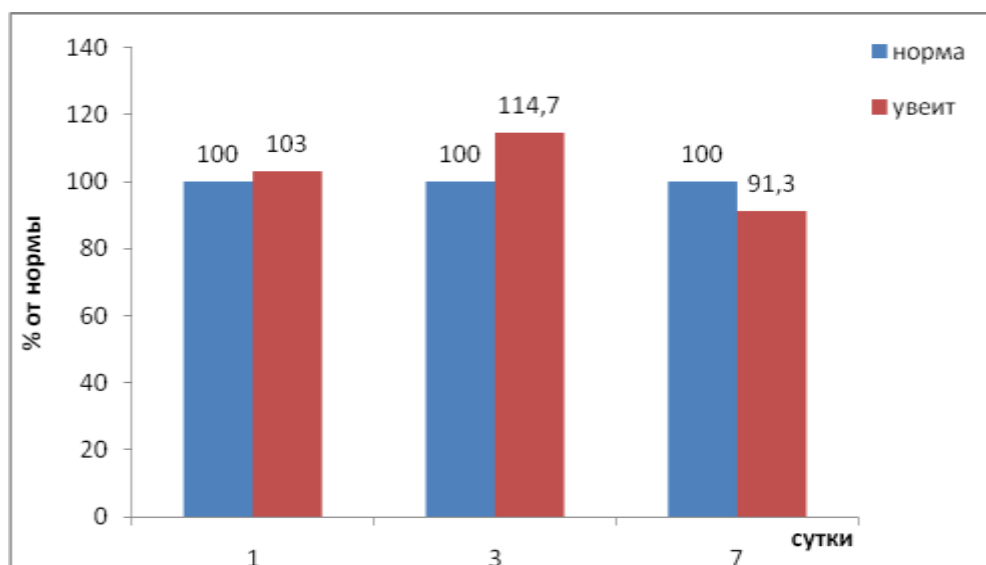


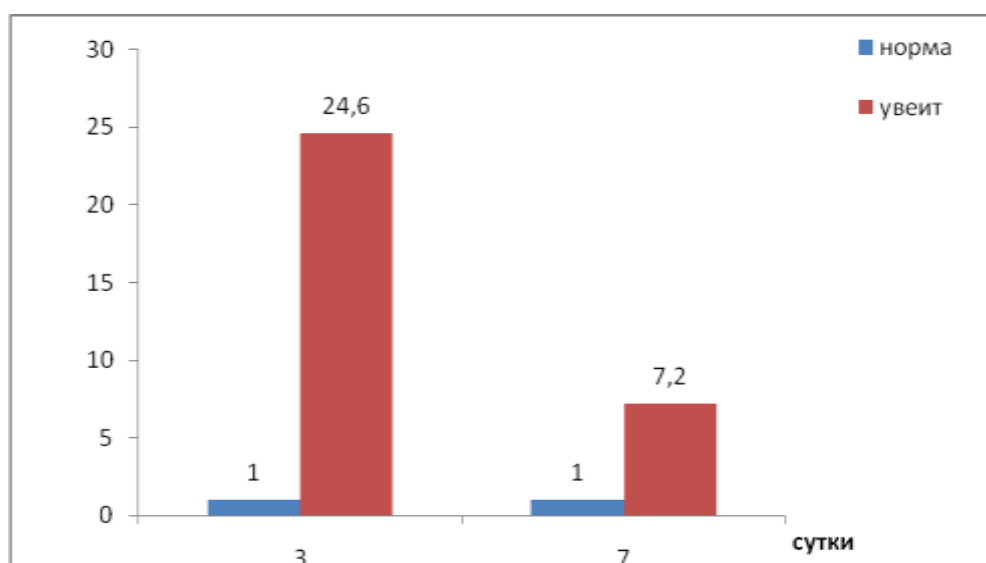
Таблица 8.

Количество лейкоцитов во влаге передней камеры при экспериментальном увеите у кроликов

сутки	3	7
Увеит	24,6±15,4	7,2±5,6

Диаграмма 6.

Количество лейкоцитов во влаге передней камеры при экспериментальном увеите у кроликов



Нами установлено, что при увеите уровень α_2 -МГ в слезной жидкости уже на 1 сутки заболевания увеличился в 4,2 раза по сравнению с нормой. На 3 сутки уровень α_2 -МГ был выше нормы в 2 раза, а к 7 суткам снизился в 1,7 раза ниже нормы (Табл. 9, Диаграмма 7). В то же время в ВПК уровень α_2 -МГ был выше нормы в среднем в 2,4 раза на 3 сутки, и на 1,9 раз 7 сутки (Табл. 10, Диаграмма 8.).

Таблица 9.

Уровень α_2 -МГ в слезной жидкости при экспериментальном увеите у кроликов (в % от нормы)

сутки	1	3	7
Увеит	420,0±92,04 *	201,7±30,28 *	49,26±10,31

Диаграмма 7.

Уровень α_2 -МГ в слезной жидкости при экспериментальном увеите у кроликов

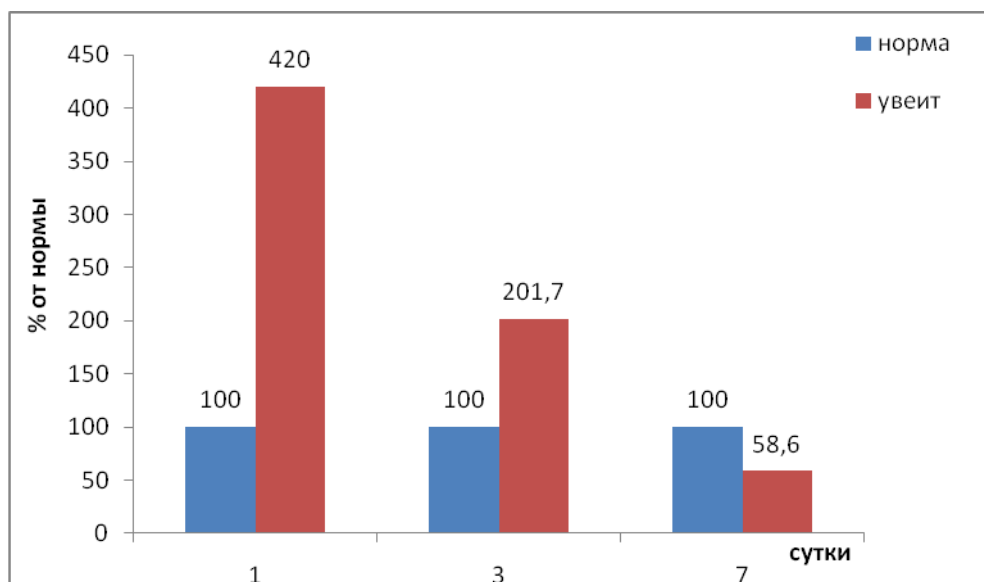


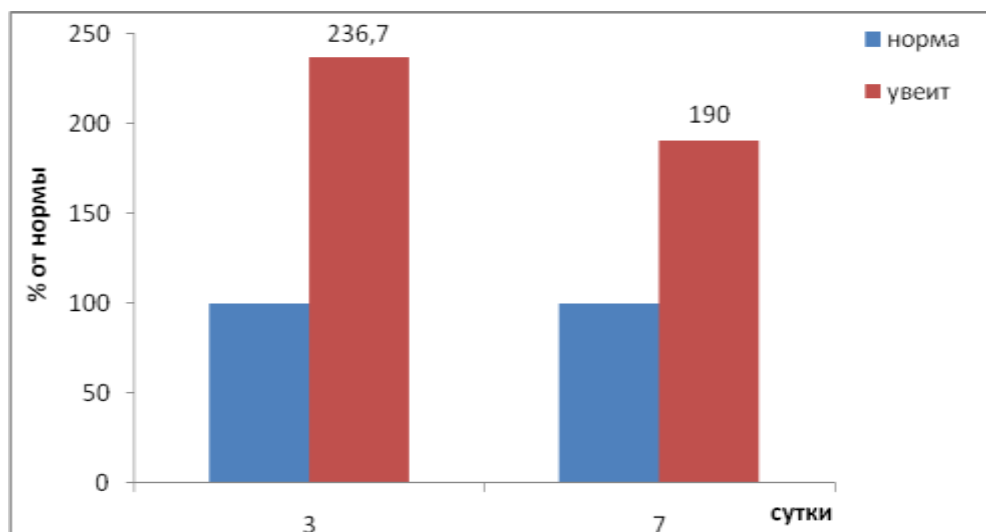
Таблица 10.

Уровень α_2 -МГ во влаге передней камеры при экспериментальном увеите у кроликов (в % от нормы)

сутки	3	7
Увеит	236,7±24,2	190,0±18,4

Диаграмма 8.

Уровень α_2 -МГ во влаге передней камеры при экспериментальном увеите у кроликов



Любой воспалительный процесс сопровождается активацией протеолитических ферментов, основными функциями которых при воспалении являются борьба с инфекционными агентами, удаление поврежденных тканевых элементов, регуляция воспалительной реакции, в том числе иммунного ответа, и репарация тканей. Активность протеаз находится под контролем ингибиторов, одним из важнейших представителей которых является α_2 -МГ. Повышение концентрации α_2 -МГ сдерживает чрезмерное повышение активности протеаз и предотвращает разрушение нативных белков [74]. Известно, что α_2 -МГ находится в тесной связи со многими факторами иммунной системы и выполняет двоякую функцию в реализации иммунного ответа: с одной стороны, он является белком-переносчиком, образуя комплексы с антителами и цитокинами, с другой стороны является супрессивным медиатором иммунной системы. Активность α_2 -МГ в ВПК отражает выраженность воспалительной реакции в переднем отрезке глаза.

Увеит вызвал увеличение концентрации продуктов метаболизма NO (нитратов и нитритов) в ВПК на 3 сутки в 2,1 раза. По мере стихания воспаления их концентрация снижалась и на 7 сутки достигла уровня нормы (Табл. 11, Диаграмма 9.). Оксид азота обладает широким спектром биологического

действия. При увеличении его концентрации при воспалении происходит расширение сосудов, что способствует выходу биологически активных веществ из плазмы крови в ткани. Оксид азота оказывает мощное противоинфекционное действие. При этом он может оказывать и цитотоксический эффект, который обусловлен действием сильнейшего окислителя пероксинитрита, образующегося в результате взаимодействия оксида азота с супероксид-анион радикалом ($O_2^{\bullet-}$) [9].

Таблица 11.

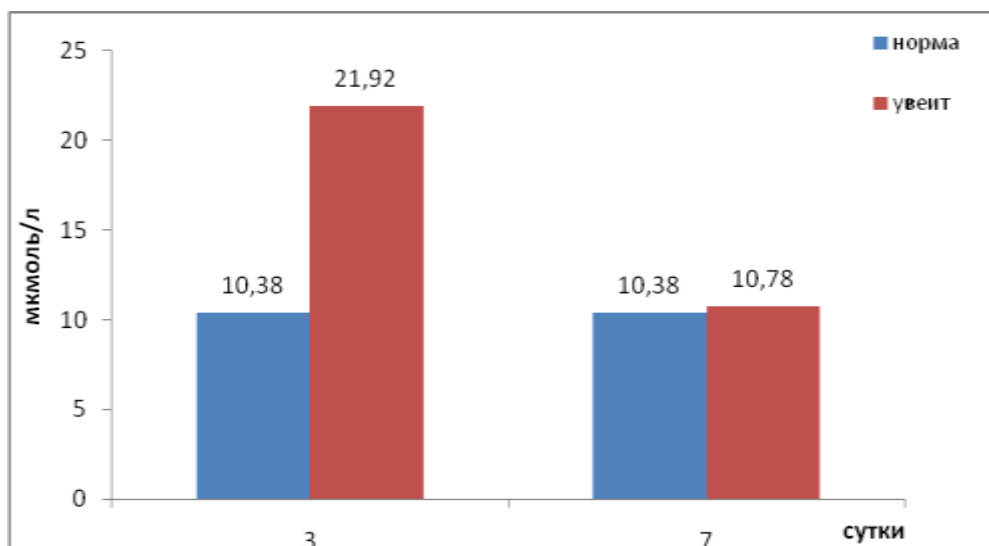
Суммарная концентрация продуктов обмена NO во влаге передней камеры при экспериментальном увеите у кроликов (в мкмоль/л)

сутки	3	7
Увеит	21,92±6,61*	10,78±2,38

* - $p \leq 0,01$ по сравнению с интактными животными.

Диаграмма 9.

Суммарная концентрация продуктов обмена NO во влаге передней камеры при экспериментальном увеите у кроликов



Таким образом, при данном способе моделирования наблюдается классическая картина острого увеита, сопровождающаяся выраженными изменениями биохимических показателей в слезе и ВПК. Резкое возрастание концентрации белка в ВПК и увеличение числа лейкоцитов свидетельствует о

нарушении гематоофтальмического барьера и повышенной проницаемости сосудов. Снижение антиокислительной активности и активности СОД в говорит о развитии выраженного окислительного стресса и об истощении эндогенного пула антиоксидантов. Повышение уровня α_2 -макроглобулина так же, как и увеличение числа лейкоцитов отражают степень остроты воспалительного процесса. Известно, что синтез α_2 -макроглобулина при воспалении увеличивается, что является фактором, сдерживающим чрезмерную активацию протеолитических ферментов. Лейкоциты мигрируют в зону воспаления и содержание этих клеток в тканях коррелирует с выраженностью воспалительного процесса. Увеличение концентрации нитратов и нитритов в ВПК также указывает на остроту воспалительного процесса при увеите, поскольку NO, метаболитами которого они являются, участвует как в механизме расширения кровеносных сосудов и повышении их проницаемости, так и в цитотоксических реакциях. Следует отметить, что изменения биохимических показателей в ВПК сохранялись дольше, чем в слезной жидкости [64, 65].

3.2. Применение супероксиддисмутазы, дексаметазона, а также их сочетания в виде глазных капель при экспериментальном увеите у кроликов

3.2.1. Оценка клинической картины

Данный раздел работы выполнен автором самостоятельно.

На 2 сутки после введения разрешающей дозы лошадиной сыворотки у всех кроликов наблюдалась характерная клиническая картина переднего увеита.

Отек век при применении дексаметазона снижается незначительно больше, чем под влиянием СОД. (Табл. 12, Рис 13, 16). По действию на гиперемию конъюнктивы лечение СОД сопоставимо с лечением дексаметазоном (Табл. 13, Рис. 14, 16). По данным признакам совместное применение СОД и дексаметазона дало несколько худший результат, чем применение препаратов по отдельности.

По такому признаку, как отек роговицы, применение СОД дало гораздо более существенный положительный эффект (в 3 раза больший), чем применение одного дексаметазона, а эффект лечения комбинацией СОД и дексаметазона сопоставим с таковым одного дексаметазона (Табл. 14, Рис 15, 16.).

Таблица 12.

Влияние инстилляций супероксиддисмутазы, дексаметазона, а также их сочетания на отек век при экспериментальном увеите у кроликов (в усл. баллах)

сутки	1	2	3	4	7
Плацебо	1,88±0,58	1,5±0,64	1,38±0,52	1,38±0,52	0,38±0,52
Дексаметазон	1,50±0,37	1,5±0,37 **	1,38±0,36	0,75±0,32	0,0±0,0
СОД	1,67±0,41	1,8±0,33	1,17±0,33	1,0±0,0	0,17±0,33
СОД + Декс.	1,5±0,37	1,4±0,36	1,38±0,36	1,38±0,36	0,63±0,36

** - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей СОД и дексаметазон.

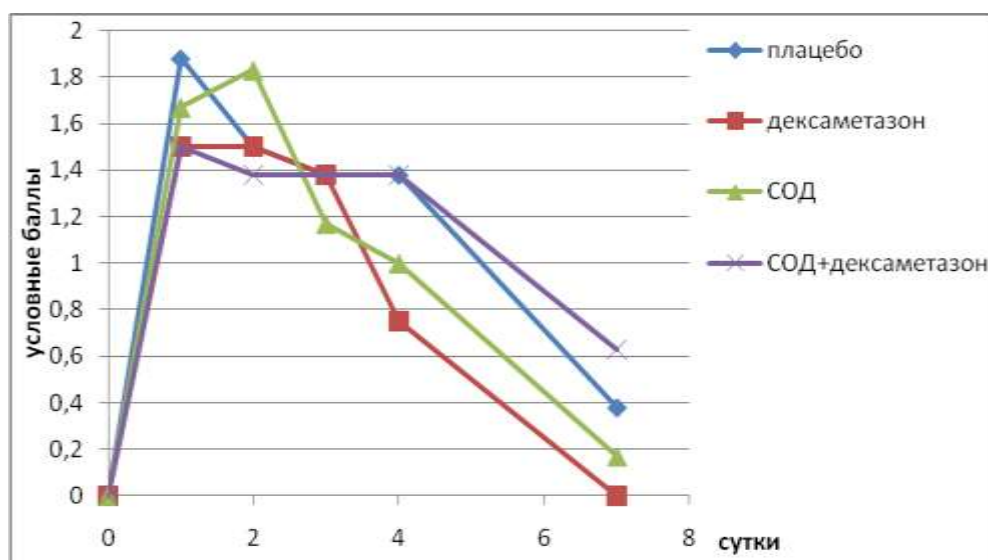


Рисунок 13. Влияние инстилляций супероксиддисмутазы, дексаметазона, а также их сочетания на отек век при экспериментальном увеите у кроликов.

Таблица 13.

Влияние инстилляций супероксиддисмутазы, дексаметазона, а также их сочетания на гиперемию конъюнктивы при экспериментальном увеите у кроликов (в усл. баллах)

сутки	1	2	3	4	7
Плацебо	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	2,25±0,49	1,13±0,25
Дексаметазон	2,5±0,37**	2,63±0,36	2,13±0,58**	1,38±0,36**	0,38±0,36**
СОД	2,83±0,33	3,0±0,0	3,0±0,0 ××	2,17±0,33 ×	0,33±0,41
СОД +Декс.	2,75±0,32	2,63±0,36	2,5±0,37 **	2,13±0,58	0,63±0,52

× - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей дексаметазон;

×× - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей СОД и дексаметазон;

** - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей плацебо.

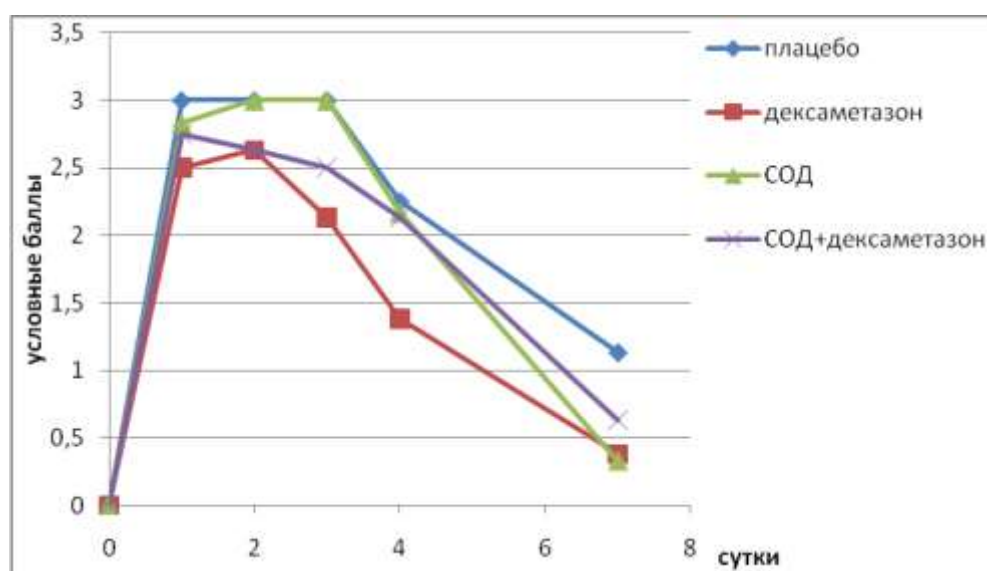


Рисунок 14. Влияние инстилляций супероксиддисмутазы, дексаметазона, а также их сочетания на гиперемию конъюнктивы при экспериментальном увеите у кроликов.

Таблица 14.

Влияние инстилляций супероксиддисмутазы, дексаметазона, а также их сочетания на отек роговицы при экспериментальном увеите у кроликов (в усл. баллах)

сутки	1	2	3	4	7
Плацебо	1,0±0,0	1,25±0,32	1,38±0,36	1,5±0,37	1,50±0,37
Дексаметазон	1,13±0,25	1,75±0,32	1,0±0,0	1,25±0,32	1,0±0,0 **
СОД	0,33±0,41	1,0±0,0	1,5±0,44 ×	1,0±0,0	0,33±0,41
СОД + Декс.	1,0±0,52	1,25±0,32	1,38±0,36	1,63±0,52	1,13±0,44

× - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей дексаметазон;

** - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей плацебо.

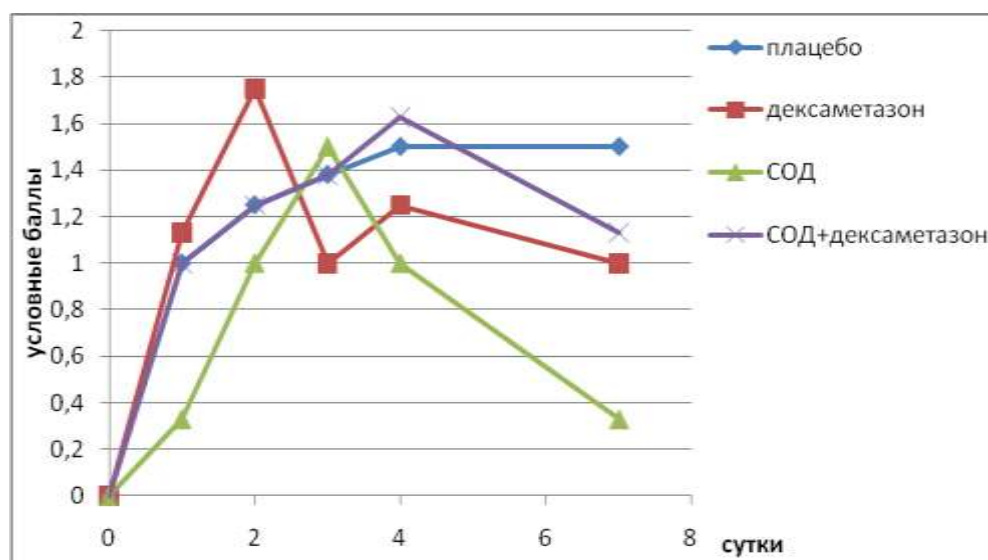


Рисунок 15. Влияние инстилляций супероксиддисмутазы, дексаметазона, а также их сочетания на отек роговицы при экспериментальном увеите у кроликов.

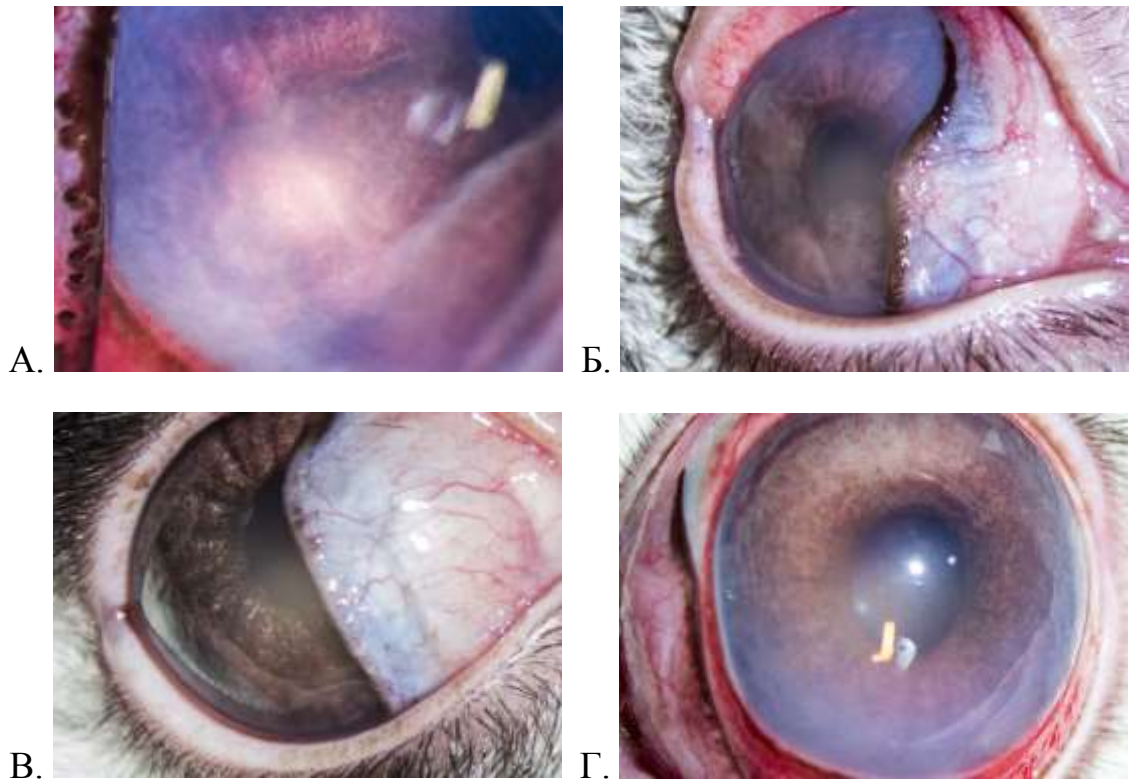


Рисунок 16. Отек век, гиперемия конъюнктивы и отек роговицы на 7 сутки экспериментального увеита у кроликов:

- А.** – влияние инстилляций плацебо;
- Б.** – влияние инстилляций дексаметазона;
- В.** – влияние инстилляций СОД;
- Г.** – влияние инстилляций СОД и дексаметазона.

Мы наблюдали выраженное синергическое действие СОД и дексаметазона на отек радужки при совместном применении уже с 3 суток. СОД влияла на отек радужки в 1.5 раза слабее дексаметазона. Группа, получавшая плацебо, по этому показателю была достоверно хуже других с 1 до 7 суток (Табл. 15, Рис. 17, 19).

На количество фибрина в передней камере все препараты до 4 суток влияли в равной степени (положительно), на 4-7 сутки заметна тенденция к снижению этого показателя. В отношении количества фибрина во влаге передней камеры лечение СОД сопоставимо с совместным лечением СОД и дексаметазоном, тогда как собственно дексаметазон влиял на содержание фибрина значительно меньше (в 1.7 раза) (Табл.16, Рис. 18, 19).

При применении СОД мы наблюдали в 1.5 раза менее выраженный рост новообразованных сосудов роговицы, чем при лечении дексаметазоном.

Отмечено явное синергическое действие СОД и дексаметазона, при котором неоваскуляризация роговицы значительно замедляется - в 7 раз по сравнению с применением одного дексаметазона (Табл.17, Рис. 20).

Таблица 15.

Влияние инстилляций супероксиддисмутазы, дексаметазона, а также их сочетания на отек радужки при экспериментальном увеите у кроликов (в усл. баллах)

сутки	1	2	3	4	7
Плацебо	1,0±0,0	2,25±0,32	2,5±0,37	2,63±0,36	2,63±0,36
Дексаметазон	0,63±0,36	1,63±0,36**	1,88±0,58	1,75±0,49**	1,5±0,30 **
СОД	0,33±0,41**	1,33±0,41**	2,17±0,60**	2,17±0,6 **	2,17±0,6 **
СОД + Декс.	0,75±0,32	1,13±0,25 ** ×	1,25±0,32**	1,25±0,32**	1,25±0,32**

× - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей дексаметазон;

×× - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей СОД и дексаметазон;

** - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей плацебо.

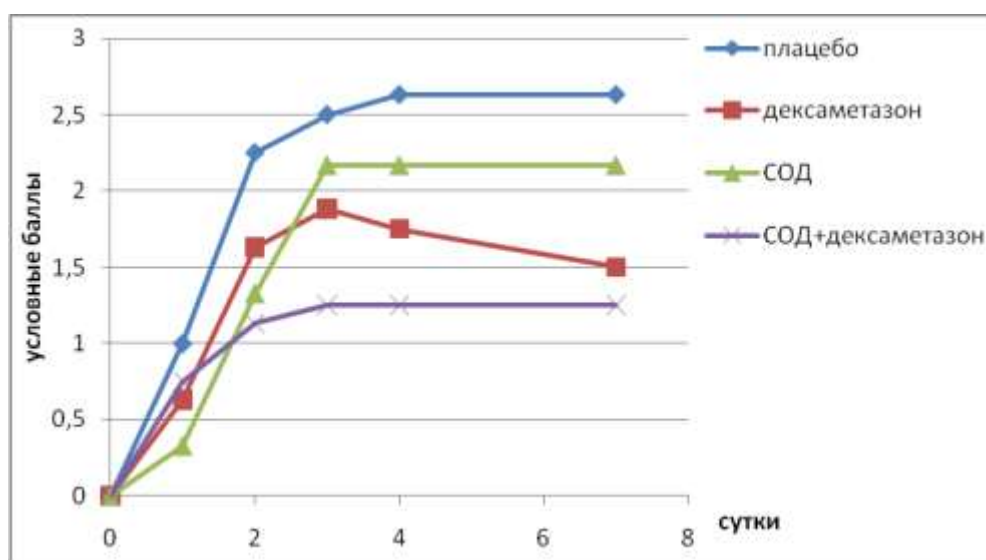


Рисунок 17. Влияние инстилляций супероксиддисмутазы, дексаметазона, а также их сочетания на отек радужки при экспериментальном увеите у кроликов.

Таблица 16.

Влияние инстилляций супероксиддисмутазы, дексаметазона, а также их сочетания на количество фибрина в передней камере при экспериментальном увеите у кроликов (в усл. баллах)

сутки	1	2	3	4	7
Плацебо	2,0±0,37	2,25±0,49	1,75±0,49	1,75±0,49	1,13±0,58
Дексаметазон	1,13±0,44**	1,13±0,25**	1,25±0,32	1,63±0,36	1,5±0,37
СОД	0,83±0,79	1,33±0,41	1,33±0,41	1,17±0,33	0,83±0,33
СОД+ Декс.	1,13±0,44**	1,38±0,36**	1,50±0,37	1,0±0,37**	0,88±0,44

** - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей плацебо.

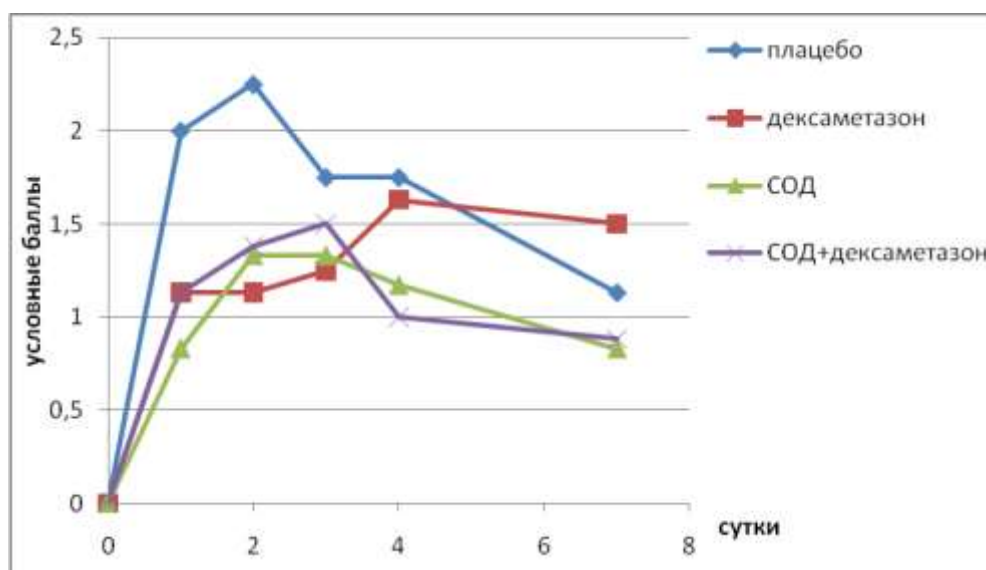


Рисунок 18. Влияние инстилляций супероксиддисмутазы, дексаметазона, а также их сочетания на количество фибрина в передней камере при экспериментальном увеите у кроликов.

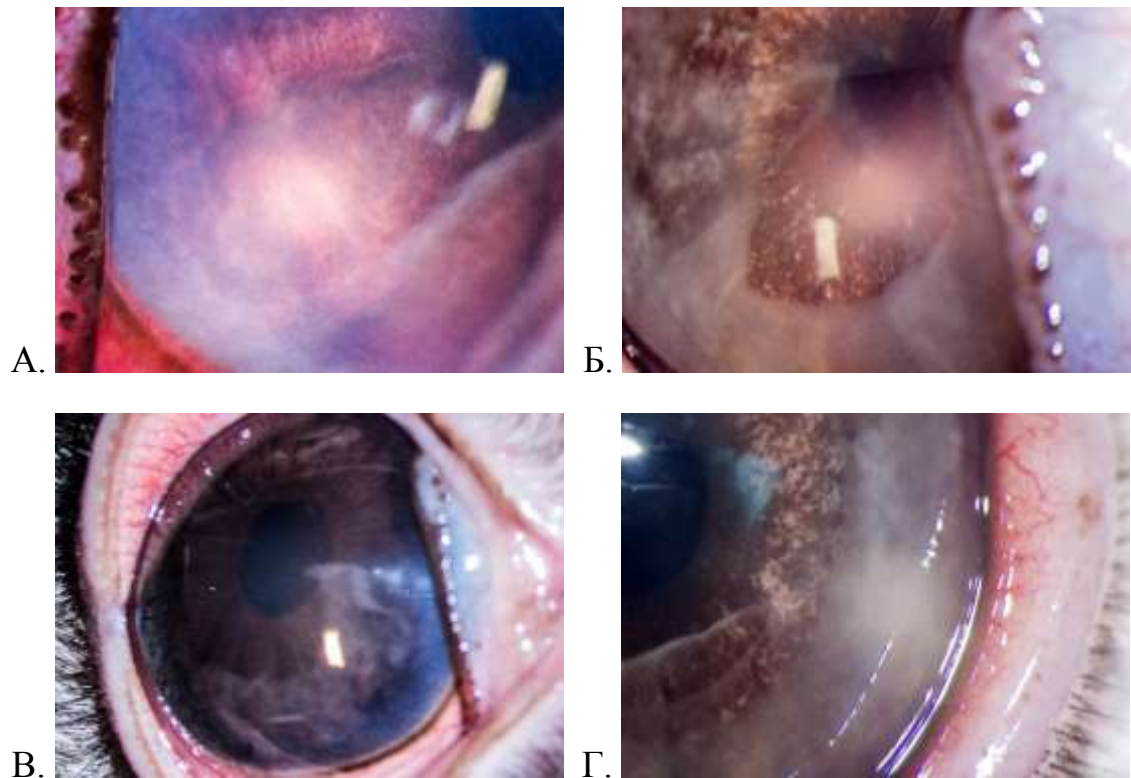


Рисунок 19. Отек радужки и фибрин в передней камере на 7 сутки экспериментального увеита у кроликов:

А. – влияние инстилляций плацебо;

Б. – влияние инстилляций дексаметазона;

В. – влияние инстилляций СОД;

Г. – влияние инстилляций СОД и дексаметазона.

Таблица 17.

Влияние инстилляций супероксиддисмутазы, дексаметазона, а также их сочетания на рост новообразованных сосудов роговицы на 7 сутки экспериментального увеита у кроликов (в усл. баллах)

Плацебо	0,75±0,15
Дексаметазон	0,44±0,18
СОД	0,31±0,26 **
СОД + Дексаметазон	0,06±0,10 **

** - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей плацебо.

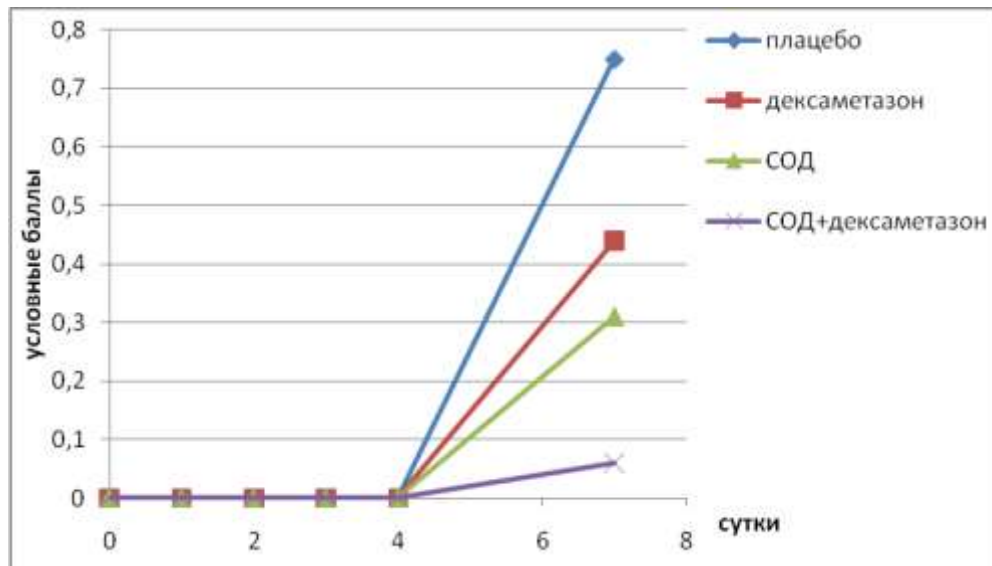


Рисунок 20. Влияние инстилляций супероксиддисмутазы, дексаметазона, а также их сочетания на рост новообразованных сосудов роговицы на 7 сутки экспериментального увеита у кроликов.

3.2.2. 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.

Содержание белка в водянистой влаге превышало норму у нелеченных животных почти в 12,5 раз, у получавших СОД или дексаметазон – в 8 раз, у леченных сочетанием препаратов – в 7 раз (Табл. 18, Диаграмма 10). Таким образом, на содержание белка в водянистой влаге СОД и дексаметазон повлияли одинаково, а сочетание их не усилило эффекта, что согласуется с данными о количестве фибрина в передней камере.

У всех животных с увеитом АОА была достоверно ниже нормы. В группе, получавшей плацебо, она была снижена в 5 раз по сравнению с нормой. Лечение СОД вызвало повышение ее почти в 3 раза по сравнению с нелечеными. Дексаметазон, напротив, снизил ее в 2 раза (почти в 10 раз ниже нормы), а сочетание препаратов дало промежуточное повышение в 1,5 раза по сравнению с

плацебо (Табл. 19, Диаграмма 11). Таким образом, дексаметазон снижает имеющийся антиоксидантный потенциал и даже несколько препятствует проявлению антиокислительного эффекта СОД.

Таблица 18.

Влияние инстилляций супероксиддисмутазы, дексаметазона, а также их сочетания на концентрацию белка во влаге передней камеры на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов (в мг/мл)

Плацебо	12,35±0,89 *
Дексаметазон	7,95±1,9 * **
СОД	7,70±2,49 * **
СОД + Дексаметазон	6,63±2,03 * **
Интактные	0,96±0,19

* - $p \leq 0,01$ по сравнению с интактными животными;

** - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей плацебо.

Диаграмма 10.

Влияние инстилляций супероксиддисмутазы, дексаметазона, а также их сочетания на концентрацию белка во влаге передней камеры на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов

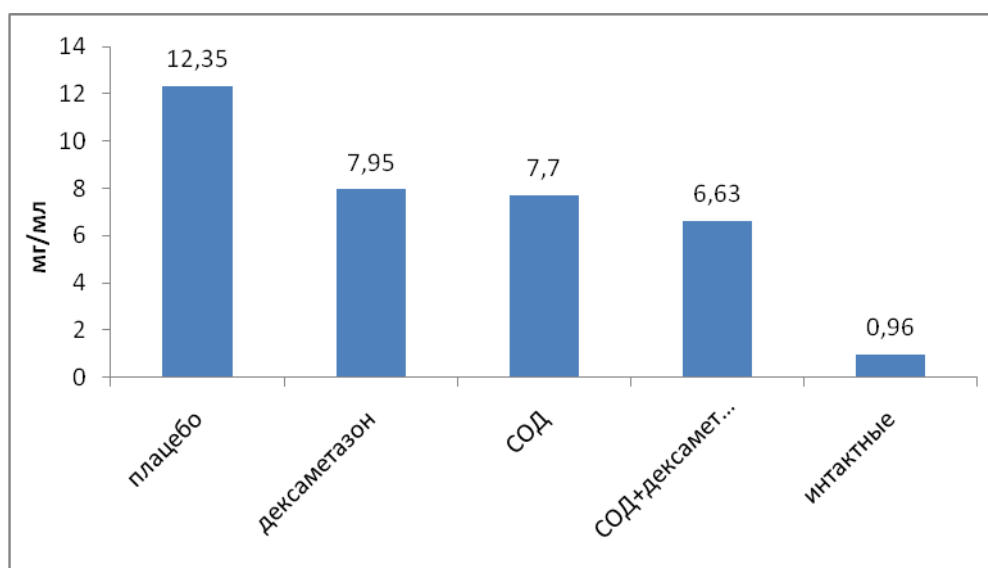


Таблица 19.

Влияние инстилляций супероксиддисмутазы, дексаметазона, а также их сочетания на уровень АОА во влаге передней камеры на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов (в мкМ тролокса)

Плацебо	114±36 *
Дексаметазон	56±23 * **
СОД	304±100* ** ×
СОД + Дексаметазон	176±122 *
Интактные	621±181

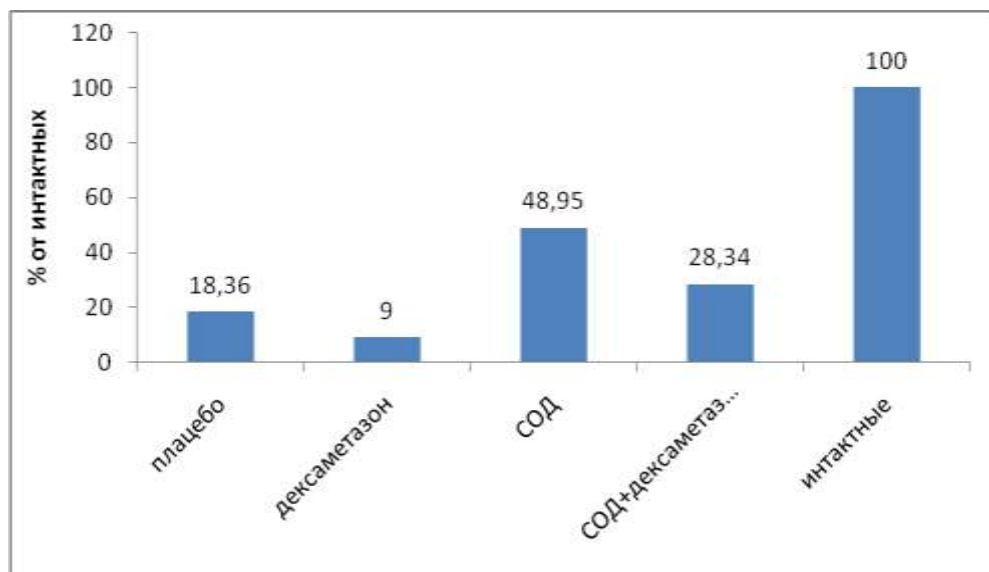
× - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей дексаметазон;

* - $p \leq 0,01$ по сравнению с интактными животными;

** - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей плацебо.

Диаграмма 11.

Влияние инстилляций супероксиддисмутазы, дексаметазона, а также их сочетания на уровень АОА во влаге передней камеры на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов



Уровень α_2 -МГ в водянистой влаге у нелеченных животных был в 5 раз выше нормы, у леченных СОД – выше в 3 раза, дексаметазоном – в 2 раза,

сочетанием препаратов – в 1,6 раза (Табл. 20, Диаграмма 12). В данном случае имеет место синергическое действие СОД и дексаметазона.

Таблица 20.

Влияние инстилляций супероксиддисмутазы, дексаметазона, а также их сочетания на уровень α_2 -МГ во влаге передней камеры на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов (в нмоль/мин*мл)

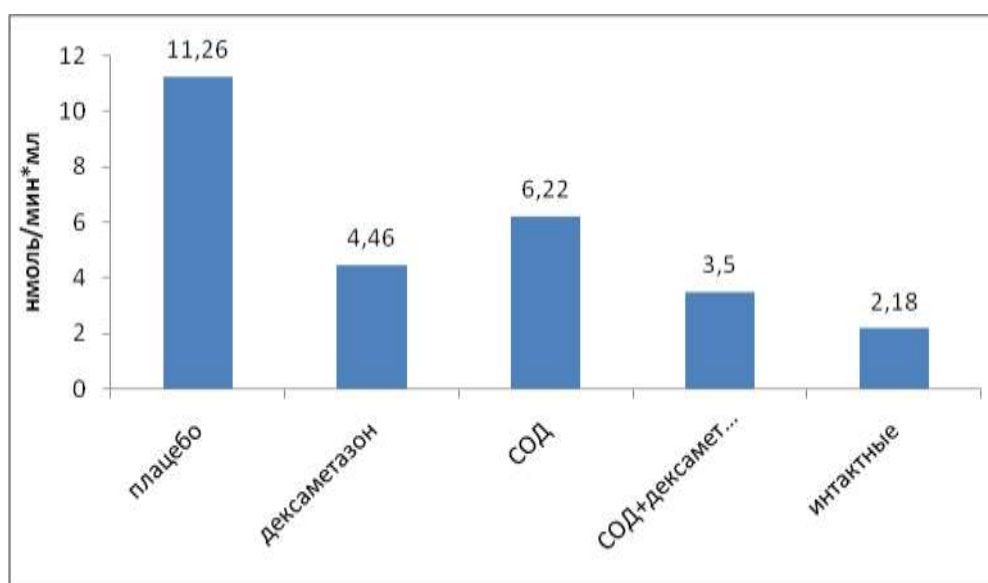
Плацебо	11,26±3,15 *
Дексаметазон	4,46±1,91 * **
СОД	6,22±1,77 * **
СОД + Дексаметазон	3,50±2,0 **
Интakтные	2,18±0,37

* - $p \leq 0,01$ по сравнению с интактными животными;

** - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей плацебо.

Диаграмма 12.

Влияние инстилляций супероксиддисмутазы, дексаметазона, а также их сочетания на уровень α_2 -МГ во влаге передней камеры на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов



Подсчет лейкоцитов во влаге передней камеры показал, что у всех

животных с увеитом их число было достоверно выше (в 30 раз), чем у здоровых. Инстилляцией СОД снижают количество лейкоцитов в 3.5 раз, тогда как инстилляцией дексаметазона – в 1.4 раза (Табл. 21, Диаграмма 13).

Таблица 21.

Влияние инстилляций супероксиддисмутазы, дексаметазона, а также их сочетания на количество лейкоцитов во влаге передней камеры на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов

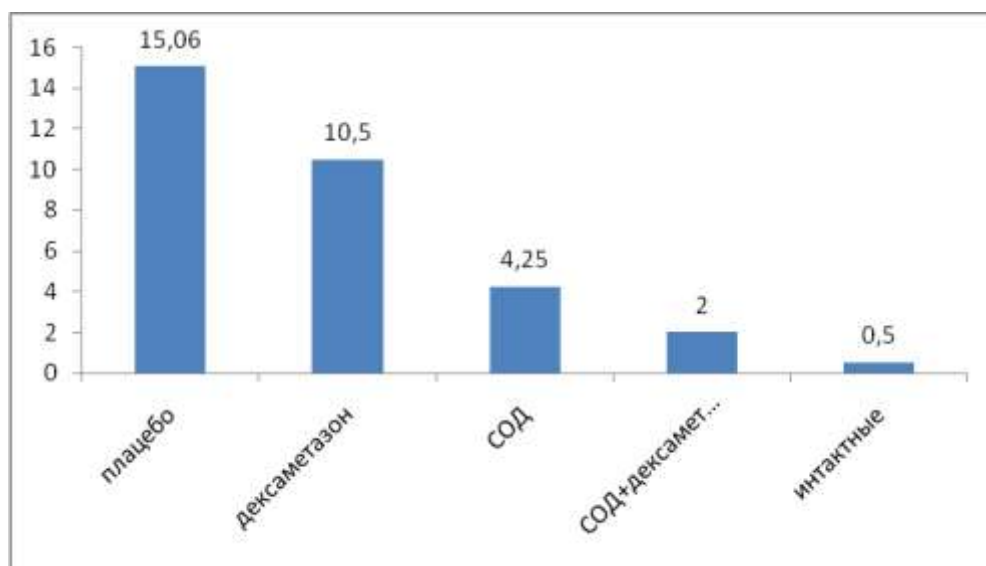
Плацебо	15,06±6,21 *
Дексаметазон	10,50±7,17 *
СОД	4,25±1,50 * **
СОД + Дексаметазон	2,0±0,35 * **
Интakтные	0,50±0,36

* - $p \leq 0,01$ по сравнению с интактными животными;

** - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей плацебо.

Диаграмма 13.

Влияние инстилляций супероксиддисмутазы, дексаметазона, а также их сочетания на количество лейкоцитов во влаге передней камеры на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов



Противовоспалительный эффект СОД по этому показателю оказался выше, чем у дексаметазона. Отмечено синергическое действие СОД и дексаметазона при совместном применении двух препаратов (количество лейкоцитов снизилось в 7.5 раз).

Таким образом, инстилляции СОД 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 СОД сильнее уменьшается количество лейкоцитов и в отличие от Дексаметазона происходит восстановление АОА. Выявлено синергическое действие дексаметазона и СОД на отек радужки, количество лейкоцитов и уровень $\alpha 2$ -МГ в водянистой влаге [11, 12].

Включение инстилляций СОД в комплексную терапию увеитов позволяет снизить окислительный стресс и тем самым повысить эффективность лечения [57].

3.3. Применение водного раствора супероксиддисмутазы и супероксиддисмутазы в составе кальций-фосфатных наночастиц в виде глазных капель при экспериментальном увеите у кроликов

3.3.1. Оценка клинической картины

Данный раздел работы выполнен автором самостоятельно.

Было выявлено, что на отек век СОД в составе кальций-фосфатных наночастиц проявляет лучшую эффективность по сравнению с СОД в водном растворе (Табл. 22, Рис. 21, 24).

СОД в составе кальций-фосфатных наночастиц проявляет в 1,4 раза лучшую эффективность по сравнению с СОД в водном растворе по действию на гиперемию конъюнктивы (Табл. 23, Рис. 22, 24).

Было выявлено, что СОД в составе CaPh-частиц сильнее снижает отек роговицы, чем водный раствор СОД (Табл. 24, Рис. 23, 24).

Было выявлено, что СОД в составе CaPh-частиц в 1,3 раза сильнее снижает отек радужки, чем СОД в водном растворе (Табл. 25, Рис. 25, 26).

Важно, что на протяжении всего периода наблюдения было отмечено значительно меньшее (в 1,4 раза) количество фибриновых сгустков в передней камере глаза при лечении СОД в составе CaPh-частиц по сравнению с раствором СОД (Табл. 26, Рис. 27).

По такому признаку как, интенсивность неоваскуляризации роговицы, не было получено достоверных различий в действии двух форм СОД (Табл. 27, Рис. 28).

Таблица 22.

Влияние инстилляций СОД в виде водного раствора и СОД в составе CaPh-наночастиц на отек век при экспериментальном увеите у кроликов (в усл. баллах)

сутки	1	2	3	4	7
Плацебо	1,4±0,48	1,4±0,48	1,2±0,39	1,2±0,39	0,6±0,48
СОД	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	0,67±0,41	0,38±0,30
наноСОД	1,0±0,0	1,33±0,41	1,17±0,33	0,67±0,41	0,0±0,0 ×

× - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей СОД.

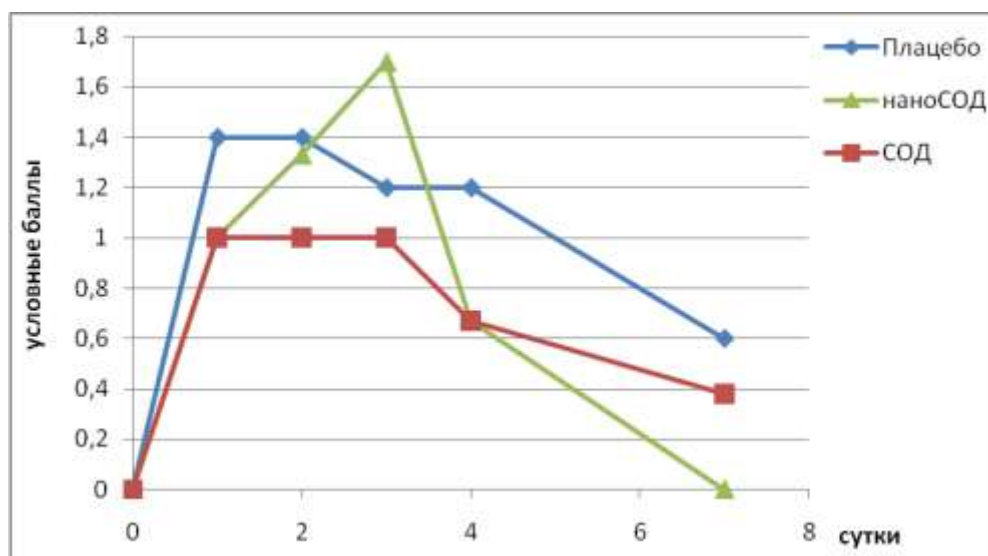


Рисунок 21. Влияние инстилляций СОД в виде водного раствора и СОД в составе CaPh-наночастиц на отек век при экспериментальном увеите у кроликов.

Таблица 23.

Влияние инстилляций СОД в виде водного раствора и СОД в составе СаPh-наночастиц на гиперемию конъюнктивы при экспериментальном увеите у кроликов (в усл. баллах)

сутки	1	2	3	4	7
Плацебо	2,6±0,48	2,6±0,48	2,4±0,48	1,8±0,78	1,4±0,39
СОД	1,83±0,33 **	2,17±0,6	1,8±0,33	1,5±0,44	1,17±0,33
наноСОД	2,5±0,44 ×	2,83±0,33	2,33±0,41	1,67±0,65	0,83±0,33

× - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей СОД;

** - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей плацебо.

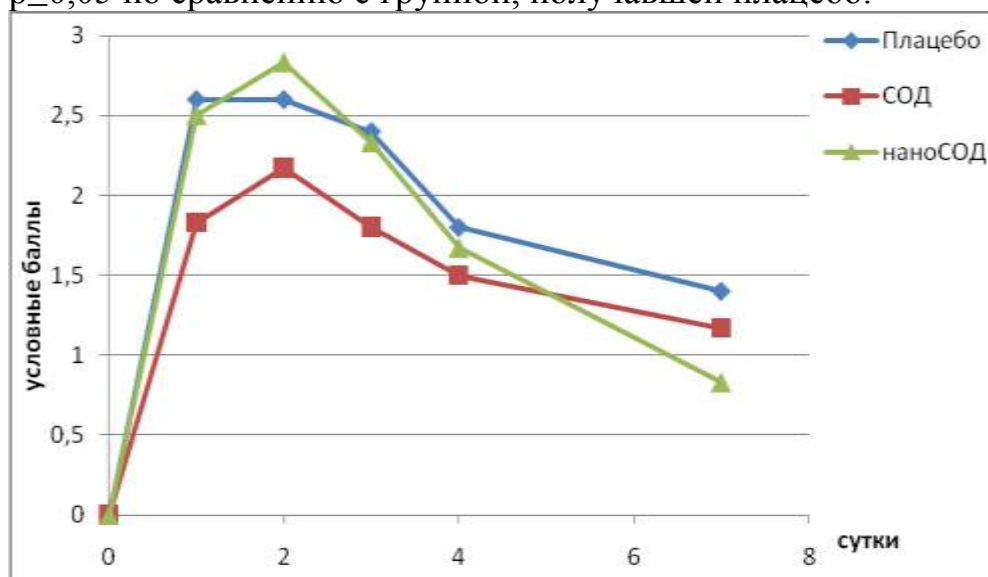


Рисунок 22. Влияние инстилляций СОД в виде водного раствора и СОД в составе СаPh-наночастиц на гиперемию конъюнктивы при экспериментальном увеите у кроликов.

Таблица 24.

Влияние инстилляций СОД в виде водного раствора и СОД в составе СаPh-наночастиц на отек роговицы при экспериментальном увеите у кроликов (в усл. баллах)

сутки	1	2	3	4	7
Плацебо	1,0±0,0	2,05±0,51	2,45±0,56	2,25±0,68	2,0±0,64
СОД	1,0±0,0	1,88±0,74	1,83±0,58	1,58±0,56	1,33±0,77
наноСОД	0,83±0,33	1,6±0,74	1,4±0,66	1,4±0,61	0,25±0,24

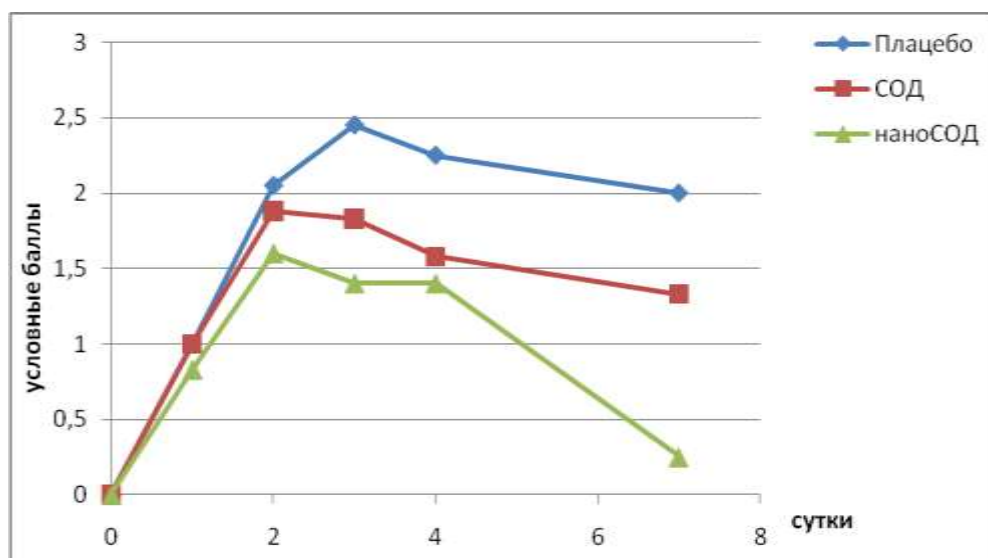


Рисунок 23. Влияние инстилляций СОД в виде водного раствора и СОД в составе CaPh-наночастиц на отек роговицы при экспериментальном увеите у кроликов.



Рисунок 24. Отек век, гиперемия конъюнктивы и отек роговицы на 7 сутки экспериментального увеита у кроликов:

- А. – влияние инстилляций плацебо;
 Б. – влияние инстилляций СОД в виде водного раствора;
 В. – влияние СОД в составе CaPh-частиц.

Таблица 25.

Влияние инстилляций СОД в виде водного раствора и СОД в составе CaPh-наночастиц на отек радужки при экспериментальном увеите у кроликов (в усл. баллах)

Сутки	1	2	3	4	7
Плацебо	1,0±0,0	1,8±0,39	2,2±0,39	2,8±0,39	2,8±0,39
СОД	1,17±0,33	2,17±0,79	2,17±0,79	2,33±0,41	2,17±0,33 **
наноСОД	1,0±0,51	1,17±0,33**	1,67±0,41	2,17±0,60	1,67±0,41

** - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей плацебо.

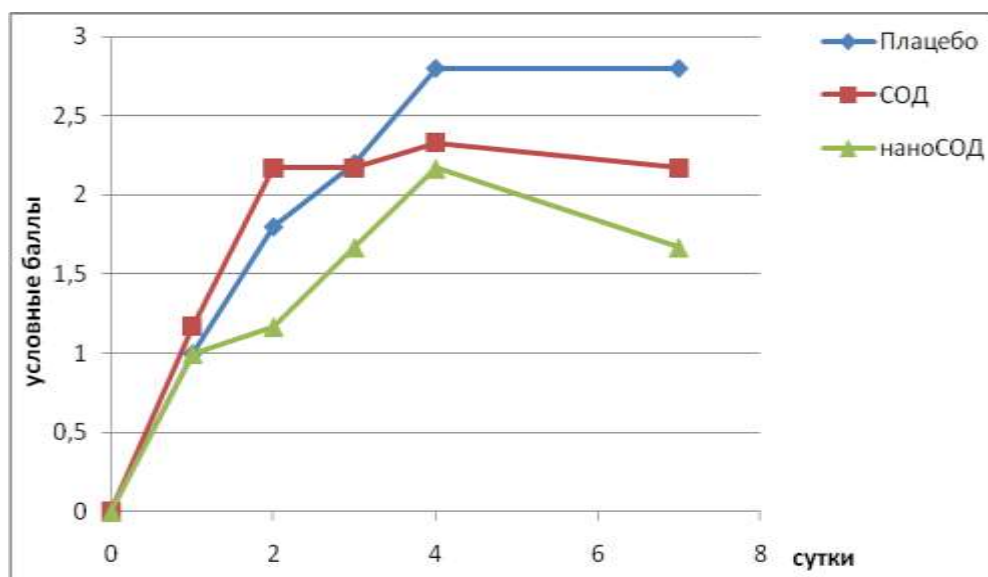


Рисунок 25. Влияние инстилляций СОД в виде водного раствора и СОД в составе CaPh-наночастиц на отек радужки при экспериментальном увеите у кроликов.



Рисунок 26. Отек радужки на 7 сутки экспериментального увеита у кроликов:
А. – влияние инстилляций плацебо;
Б. – влияние инстилляций СОД в виде водного раствора;
В. – влияние СОД в составе CaPh-частиц.

Таблица 26.

Влияние инстилляций СОД в виде водного раствора и СОД в составе CaPh-наночастиц на количество фибрина в передней камере при экспериментальном увеите у кроликов (в усл. баллах)

сутки	1	2	3	4	7
Плацебо	2,0±0,62	2,55±0,78	3,2±0,60	3,9±0,63	1,75±0,71
СОД	1,17±0,33**	2,33±0,61	2,38±0,47	2,29±0,44	0,92±0,49
наноСОД	1,3±0,83	1,6±0,53	2,8±0,58	2,25±0,54	0,67±0,15 ×

× - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей СОД;

** - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей плацебо.

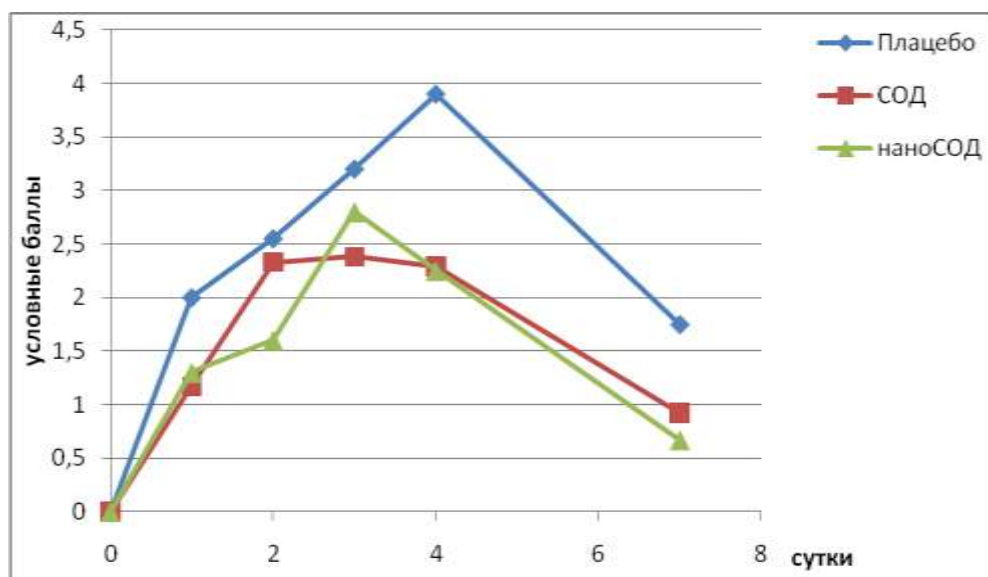


Рисунок 27. Влияние инстилляций СОД в виде водного раствора и СОД в составе СаPh-наночастиц на количество фибрина в передней камере при экспериментальном увеите у кроликов.

Таблица 27.

Влияние инстилляций СОД в виде водного раствора и СОД в составе СаPh-наночастиц на рост новообразованных сосудов роговицы при экспериментальном увеите у кроликов (в усл. баллах)

сутки	4	7
Плацебо	0,95±0,43	2,67±0,43
СОД	0,88±0,45	1,92±0,12
наноСОД	0,70±0,3	1,67±0,15

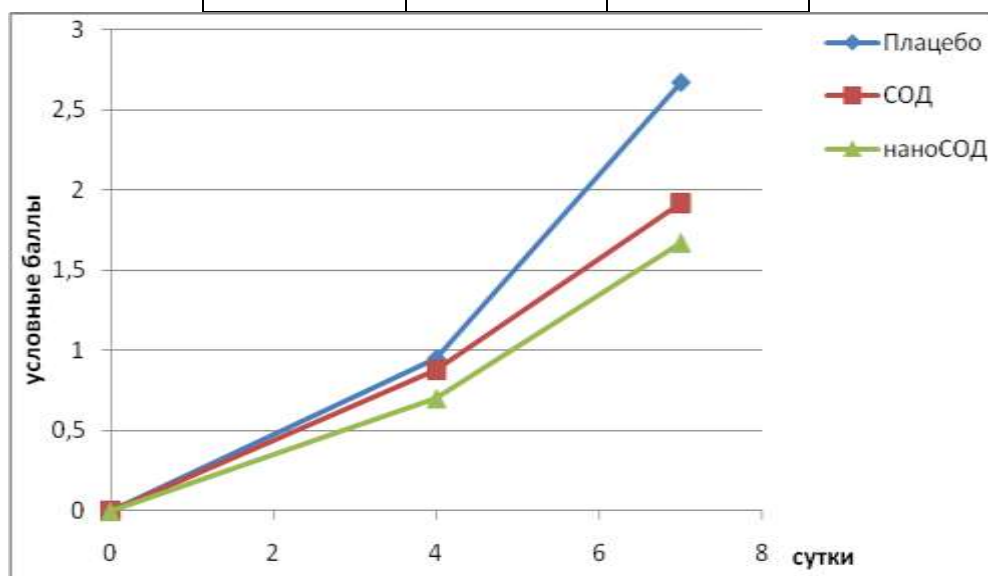


Рисунок 28. Влияние инстилляций СОД в виде водного раствора и СОД в составе СаPh-наночастиц на рост новообразованных сосудов роговицы при экспериментальном увеите у кроликов.

3.3.2. 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. Биохимический анализ ВПК показал, что на 8 сутки увеита у нелеченных животных концентрация общего белка увеличилась в 8,7 раз по сравнению с интактными, у животных, получавших инстилляцию СОД – в 7 раз, а у получавших инстилляциями СОД в составе СаPh-частиц – в 4,7 раз (Табл. 28, Диаграмма 14). Таким образом, инстилляцией СОД в составе СаPh-частиц вызвали более значительное снижение содержания белка в водянистой влаге.

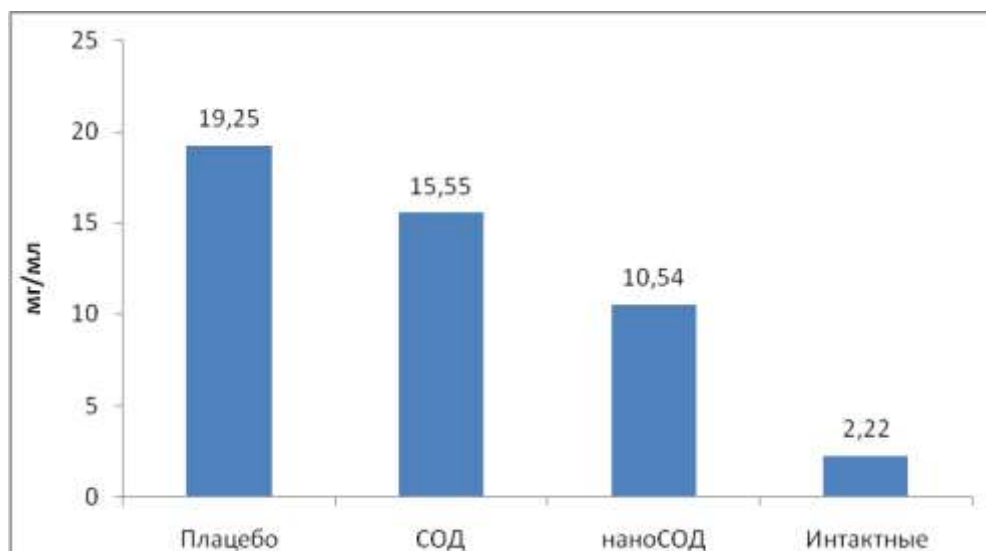
Таблица 28.

Влияние инстилляций СОД в виде водного раствора и СОД в составе СаPh-наночастиц на концентрацию белка во влаге передней камеры глаза у кроликов на 8 сутки экспериментального увеита (в мг/мл)

Плацебо	19,25±3,17
СОД	15,55±2,29 *
наноСОД	10,54±1,09 *
Интактные	2,22±0,31

Диаграмма 14.

Влияние инстилляций СОД в виде водного раствора и СОД в составе СаPh-наночастиц на концентрацию белка во влаге передней камеры на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов



Было выявлено, что на 8 сутки увеита у нелеченных животных уровень АОА в ВПК глаза снизилась в 6,4 раза по сравнению с интактными животными, у животных, получавших инстилляцию СОД уровень АОА в ВПК снизился в 4,4 раза, а у животных, леченных инстилляциями СОД в составе СаРн-частиц – в 3,9 раза (Табл. 29, Диаграмма15).

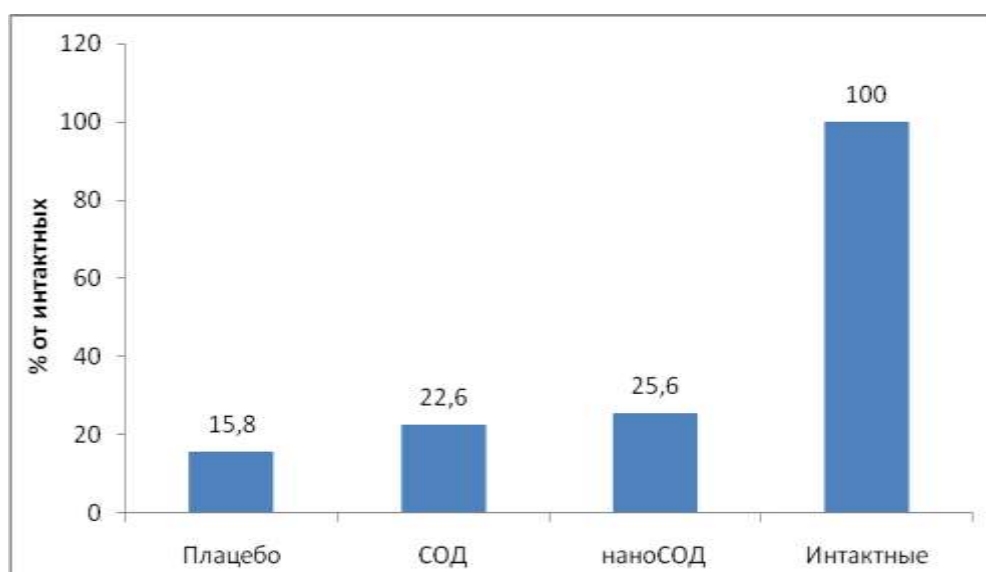
Таблица 29.

Влияние инстилляций СОД в виде водного раствора и СОД в составе СаРн-наночастиц на уровень АОА во влаге передней камеры на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов (в мкМ тролокса)

Плацебо	227±0,85
СОД	326±0,59
наноСОД	369±0,19
Интактные	1442±0,98

Диаграмма 15.

Влияние инстилляций СОД в виде водного раствора и СОД в составе СаРн-наночастиц на уровень АОА во влаге передней камеры на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов



Было выявлено, что на 8 сутки увеита у нелеченных животных уровень α_2 -

МГ во влаге передней камеры глаза повысился в 9,9 раз по сравнению с интактными животными, у животных, получавших инстилляцию СОД – в 4,3 раза, а у животных, леченных инстилляциями СОД в составе СаPh-частиц – в 4,8 раза (Табл. 30, Диаграмма 16). Таким образом, по данному признаку не было получено достоверных различий в действии двух форм СОД.

Таблица 30.

Влияние инстилляций СОД в виде водного раствора и СОД в составе СаPh-наночастиц на уровень α_2 -МГ во влаге передней камеры на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов (в нмоль/мин*мл)

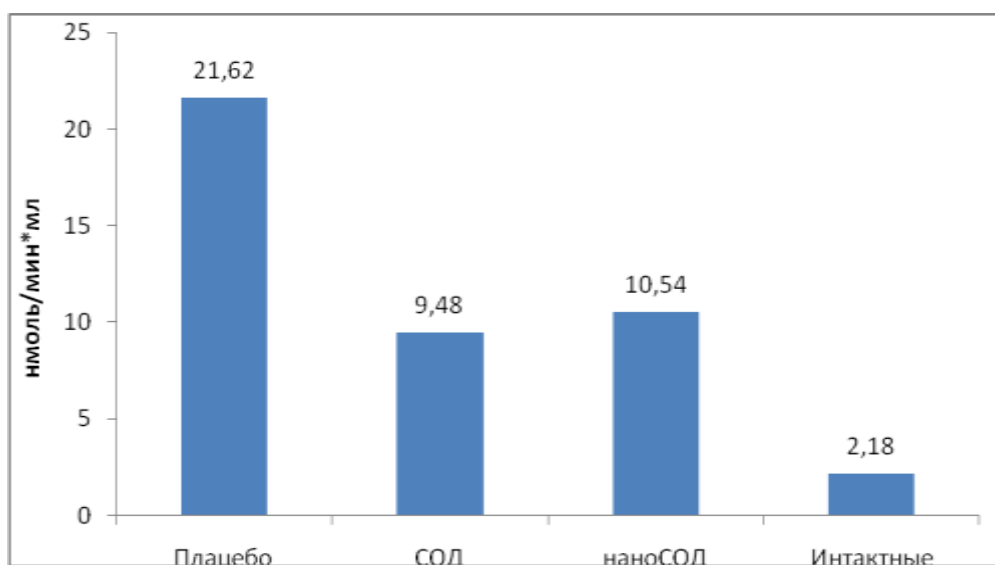
Плацебо	21,62±6,99 *
СОД	9,48±1,19 ** *
наноСОД	10,54±2,81 ** *
Интактные	2,18±0,35

* - $p \leq 0,01$ по сравнению с интактными животными.

** - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей плацебо;

Диаграмма 16.

Влияние инстилляций СОД в виде водного раствора и СОД в составе СаPh-наночастиц на уровень α_2 -МГ во влаге передней камеры на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов



В группе животных, получавших плацебо, количество лейкоцитов выросло в 9,9 раз по сравнению с нормой. Лечение СОД вызвало снижение лейкоцитов в 2,3 раза по сравнению с группой, получавшей плацебо, а лечение СОД в составе СаPh-частиц – в 2 раза. По действию на количество лейкоцитов также не было получено достоверных различий двух форм СОД (Табл. 31, Диаграмма 17).

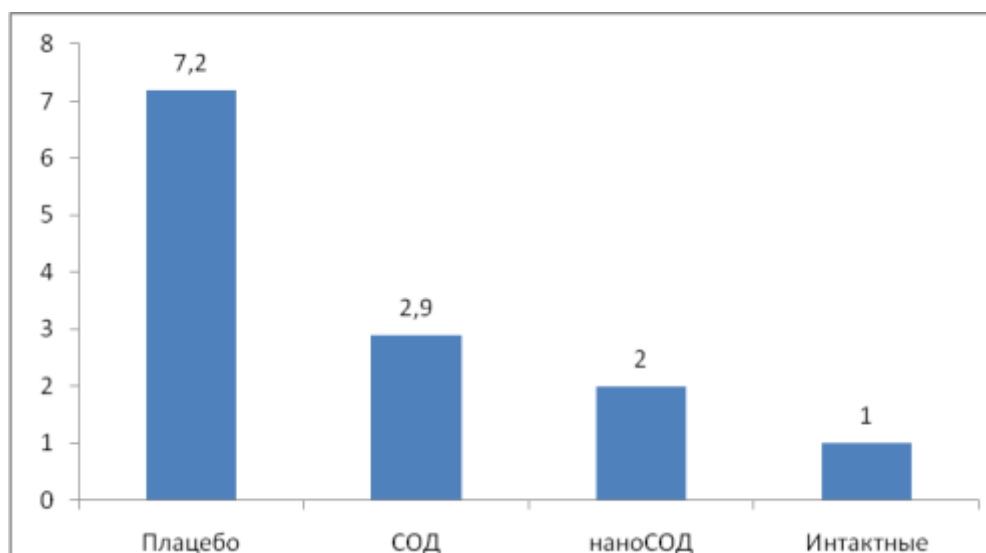
Таблица 31.

Влияние инстилляций СОД в виде водного раствора и СОД в составе СаPh-наночастиц на количество лейкоцитов во влаге передней камеры на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов

Плацебо	7,2±5,6
СОД	2,9±1,1
наноСОД	2,0±0,5
Интактные	1,0±0,5

Диаграмма 17.

Влияние инстилляций СОД в виде водного раствора и СОД в составе СаPh-наночастиц на количество лейкоцитов во влаге передней камеры на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов



3.3.3. Результаты гистологического исследования

Данный раздел работы выполнен в лаборатории экспериментальной патоморфологии, зав. лаб., проф. Шехтер А.Б., Первый МГМУ им. И.М. Сеченова).

Патогистологическое исследование показало, что у животных, не подвергавшихся лечению, на 8 сутки увеита роговица по сравнению с интактными животными имела признаки отека и разрыхления коллагеновых волокон, а также частичной десквамации эндотелия и очаговой деструкции десцеметовой мембраны (Рис. 29).

У животных, получавших инстилляцию СОД в виде водного раствора, роговица была выстлана неизмененным эпителием, десцеметова мембрана целая, эндотелий местами десквамирован, у большинства животных только в отдельных участках роговицы отмечалось разрыхление коллагеновых волокон (Рис. 30). Ранее было показано, что при применении производных СОД существенно уменьшалось количество погибших клеток при эндотоксин-индуцированном увеите у мышей [130].

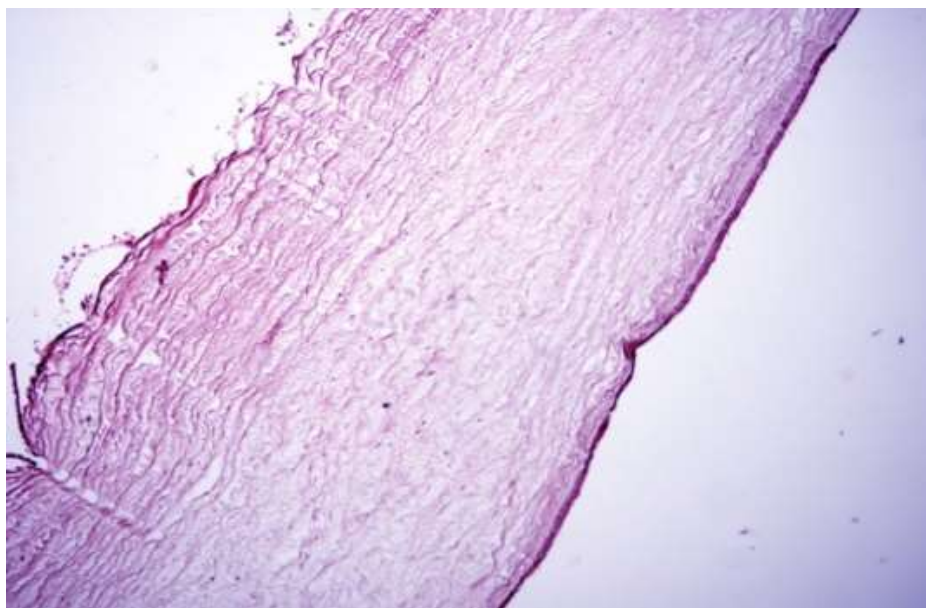


Рисунок 29. Микрофотография гистологических срезов роговиц на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов, не подвергавшихся лечению.

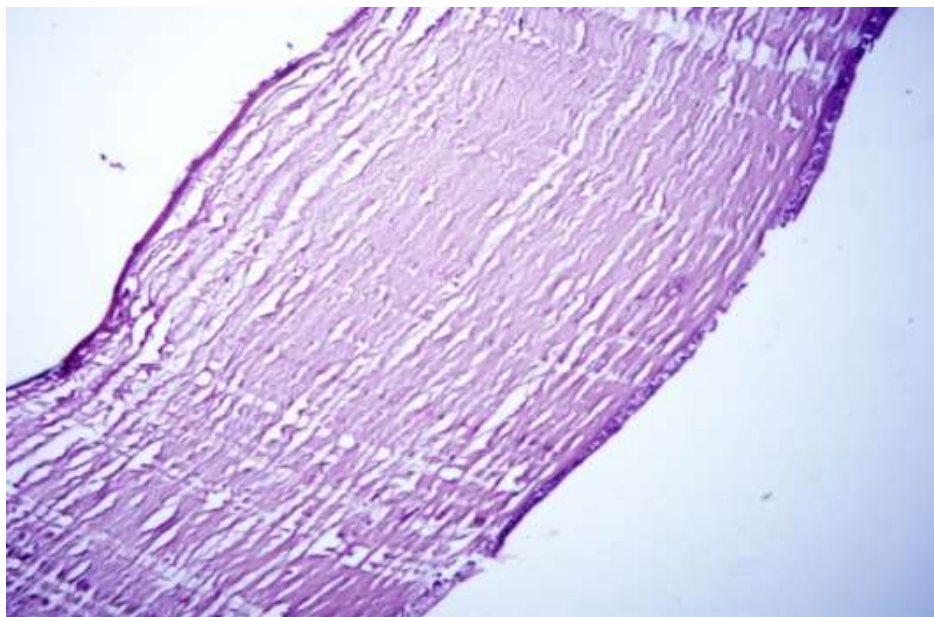


Рисунок 30. Микрофотография гистологических срезов роговиц на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов, получавших инстилляций СОД.

У животных, получавших лечение СОД в составе CaPh-наночастиц, роговица имела плотный характер, выстлана эпителием и эндотелием практически без десквамации, коллагеновые волокна не изменены (Рис. 31).

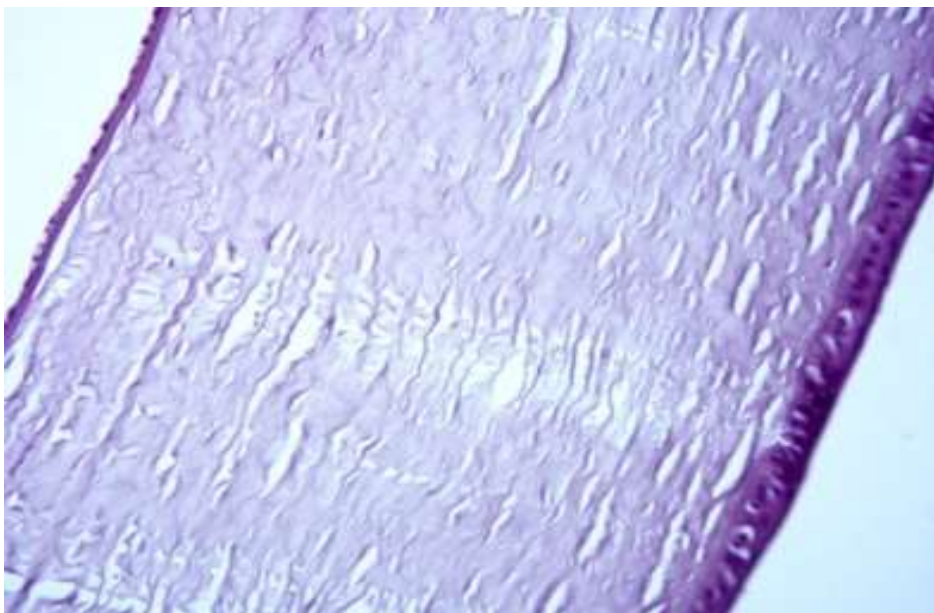


Рисунок 31. Микрофотография гистологических срезов роговиц на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов, получавших инстилляций СОД в составе CaPh-наночастиц.

Инстилляций СОД в составе CaPh-наночастиц, по сравнению с СОД в водном растворе, эффективнее снижают клинические признаки воспаления и содержание белка в водянистой влаге, а также улучшают состояние эндотелия роговицы. Внедрение СОД в CaPh-наночастицы способствует стабилизации активности фермента и увеличению сроков хранения препарата [30, 166].

Таким образом применение СОД в составе CaPh-наночастиц более эффективно защищает ткани глаза от воздействия свободных радикалов.

3.4. Применение мексидола в виде глазных капель при экспериментальном увеите у кроликов

3.4.1. Оценка клинической картины

Данный раздел работы выполнен автором самостоятельно.

Анализ клинической картины выявил, что в группе животных, получавших мексидол, на первые же сутки течения увеита отмечался резко выраженный буллезный отек и гиперемия конъюнктивы век. На вторые сутки отек уменьшился и далее постепенно спадал. В опытной группе отек был значительно меньше. На 3 сутки обе группы сравнивались по этому показателю и далее мало отличались, хотя в опытной группе отек все же был несколько больше (Табл. 32, Рис. 32).

Таблица 32.

Влияние инстилляций мексидола на отек век при экспериментальном увеите у кроликов (в усл. баллах)

Сутки	1	2	3	4	7	8	9
Мексидол	3,0±0,0**	2,0±0,0 **	1,0±0,0	1,0±0,0	0,5±0,3	0,5±0,3	0,5±0,3
Плацебо	1,7±0,47	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	0,3±0,27	0,3±0,27	0,1±0,18

** - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей плацебо;

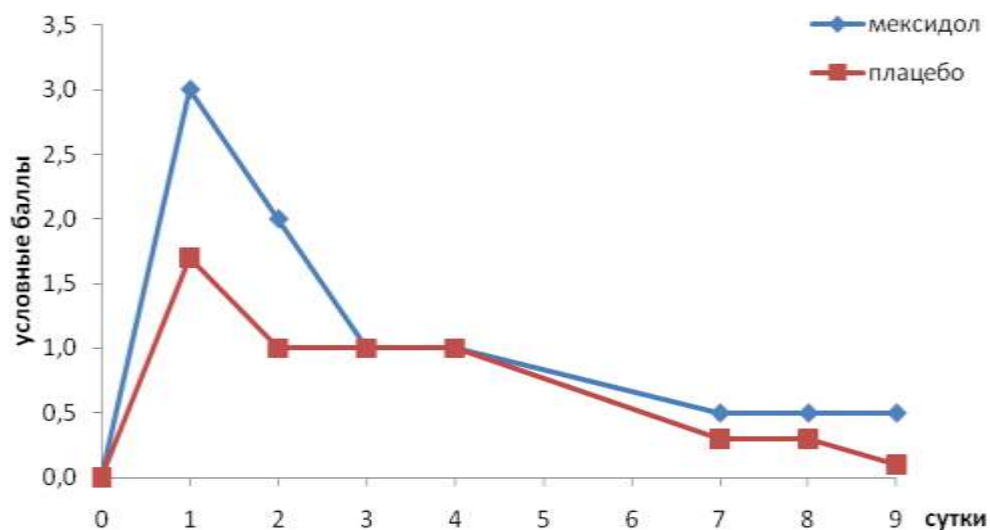


Рисунок 32. Влияние инстилляций мексидола на отек век при экспериментальном увеите у кроликов.

Выраженность гиперемии конъюнктивы в обеих группах на протяжении всего эксперимента почти не отличалась (Табл. 33, Рис. 33).

Таблица 33.

Влияние инстилляций мексидола на гиперемию конъюнктивы при экспериментальном увеите у кроликов (в усл. баллах)

Сутки	1	2	3	4	7	8	9
Мексидол	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	1,5±0,3	0,75±0,26	0,75±0,26
Плацебо	2,8±0,24	2,8±0,24	2,8±0,24	2,8±0,24	1,5±0,4	0,9±0,5	0,9±0,5

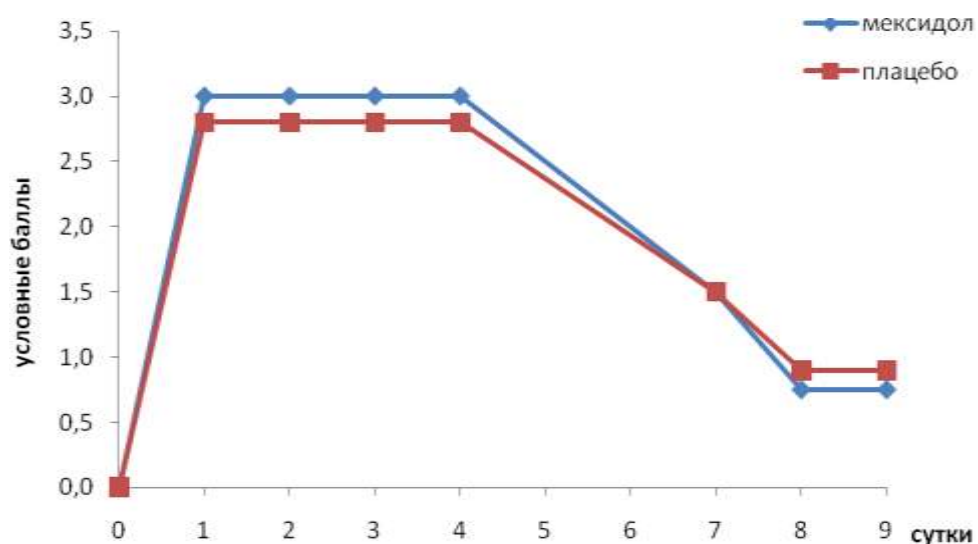


Рисунок 33. Влияние инстилляций мексидола на гиперемию конъюнктивы при экспериментальном увеите у кроликов.

Отек роговицы в опытной группе с 3 суток до конца эксперимента был больше, чем в контрольной, но статистически достоверных различий между группами не выявлено (Табл. 34, Рис. 34, 35).

Таблица 34.

Влияние инстилляций мексидола на отек роговицы при экспериментальном увеите у кроликов (в усл. баллах)

Сутки	1	2	3	4	7	8	9
Мексидол	1,31±0,3	1,75±0,3	1,94±0,4	1,81±0,5	1,19±0,4	1,0±0,5	0,81±0,3
Плацебо	1,25±0,3	1,65±0,4	1,40±0,3	1,25±0,3	0,90±0,3	0,75±0,2	0,65±0,1

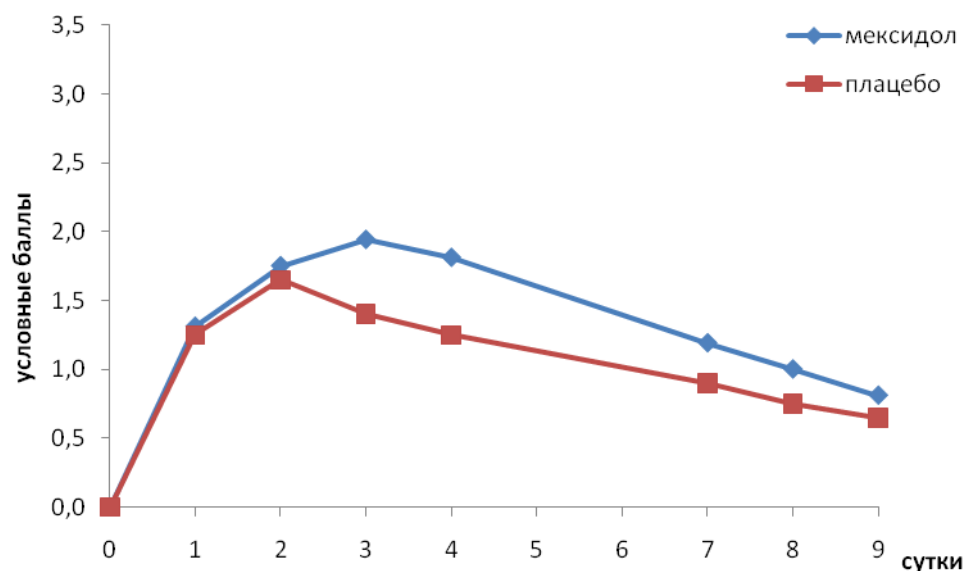


Рисунок 34. Влияние инстилляций мексидола на отек роговицы при экспериментальном увеите у кроликов.

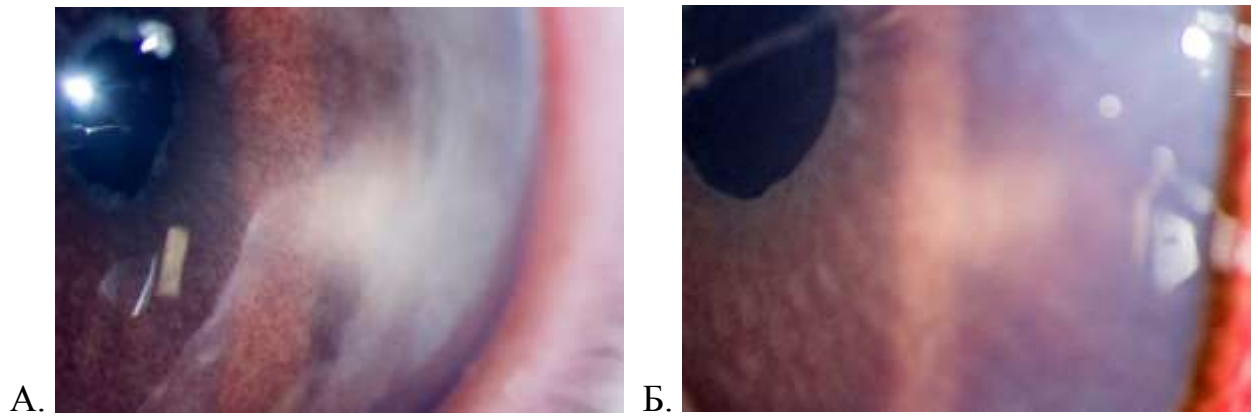


Рисунок 35. Отек роговицы на 3 сутки экспериментального увеита у кроликов:
А. – влияние инстилляций плацебо;
Б. – влияние инстилляций мексидола.

Отек радужки на 1 сутки был более выражен в опытной группе, но потом обе группы сравнялись, и на 8-9 сутки в опытной группе он оказался несколько меньше, чем в контрольной (Табл. 35, Рис. 36, 38).

Таблица 35.

Влияние инстилляций мексидола на отек радужки при экспериментальном увеите у кроликов (в усл. баллах)

Сутки	1	2	3	4	7	8	9
Мексидол	$1,2 \pm 0,34$	$1,75 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,18$	$2,56 \pm 0,3$	$2,44 \pm 0,18$	$1,88 \pm 0,3$	$1,88 \pm 0,1$
Плацебо	$0,9 \pm 0,12$	$2,25 \pm 0,3$	$2,7 \pm 0,27$	$2,75 \pm 0,3$	$2,35 \pm 0,35$	$2,35 \pm 0,4$	$2,25 \pm 0,3$

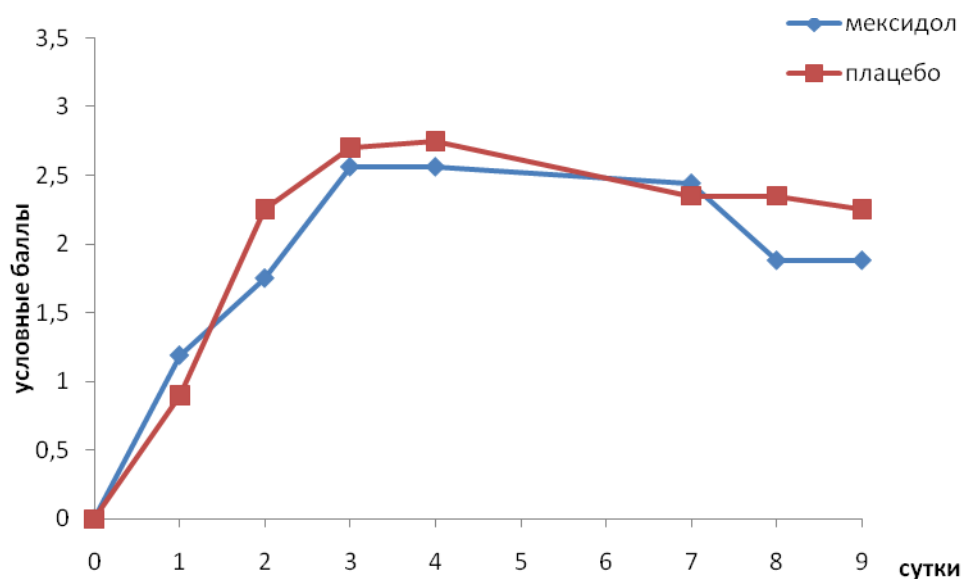


Рисунок 36. Влияние инстилляций мексидола на отек радужки при

экспериментальном увеите у кроликов.

На 1 сутки в опытной группе также отмечалось выпадение большого количества фибрина в передней камере глаза, имевшего вид сплошной пленки, покрывающей всю радужку. Количество фибрина в этой группе постоянно было в среднем на 80% больше, чем в контрольной, но снижалось почти с той же скоростью. Только на 9 сутки обе группы сравнялись по этому показателю (Табл. 36, Рис. 37, 38). В обеих группах было по 1 глазу, в котором отмечалось небольшое количество крови в передней камере.

Поскольку мексидол способен повышать проницаемость кровеносных сосудов [27], мог иметь место синергический эффект эндогенных вазодилататоров и мексидола, который привел к повышению проницаемости сосудов и выбросу в переднюю камеру большого количества компонентов плазмы крови, в том числе фибрина, в первые сутки течения увеита, что ухудшило его течение в дальнейшем. Большое содержание фибрина в передней камере приводит к развитию осложнений увеита в виде формирования задних синехий, повышения внутриглазного давления.

Таблица 36.

Влияние инстилляций мексидола на количество фибрина в передней камере при экспериментальном увеите у кроликов (в усл. баллах)

Сутки	1	2	3	4	7	8	9
Мексидол	2,25±0,6**	2,1±0,5**	2,1±0,53	1,75±0,7	1,25±0,7	0,88±0,5	0,3±0,4
Плацебо	1,4±0,59	1,2±0,2	1,3±0,27	1,15±0,3	0,65±0,3	0,7±0,27	0,3±0,2

** - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей плацебо.

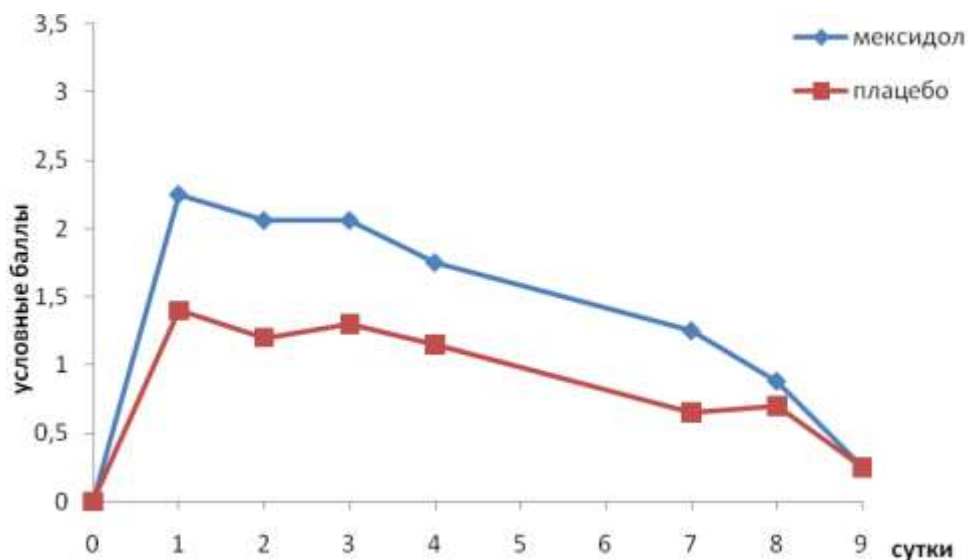


Рисунок 37. Влияние инстилляций мексидола на количество фибрина в передней камере при экспериментальном увеите у кроликов.

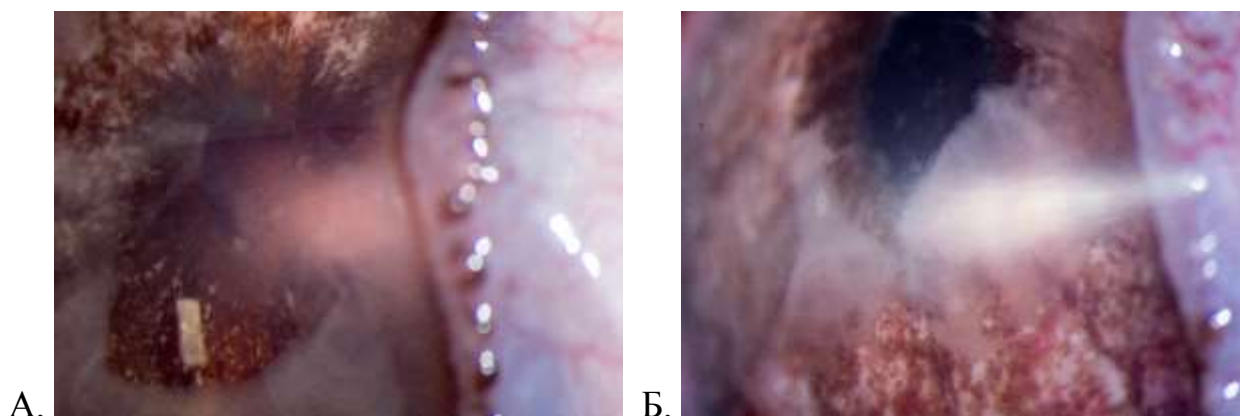


Рисунок 38. Отек радужки и фибрин в передней камере на 3 сутки экспериментального увеита у кроликов:

А. – влияние инстилляций плацебо;

Б. – влияние инстилляций мексидола.

Неоваскуляризация роговицы началась в обеих группах одновременно, но была более выражена в группе, получавшей плацебо. Длина сосудов в этой группе превышала таковую в опытной на 40-60% (Табл. 37, Рис. 39, 40). Гипоксия роговицы при увеите приводит к врастанию новообразованных сосудов в нее со стороны лимба. Несмотря на то, что отек роговицы в группе, получавшей мексидол, был несколько более выражен, чем в группе сравнения, антигипоксическое действие мексидола привело к значительно меньшему росту новообразованных сосудов.

Таблица 37.

Влияние инстилляций мексидола на рост новообразованных сосудов роговицы при экспериментальном увеите у кроликов (в усл. баллах)

сутки	4	7	8	9
Мексидол	0,75±0,4	1,25±0,21**	1,56±0,32*	1,63±0,25
Плацебо	1,25±0,52	2,05±0,36	2,55±0,43	3,0±0,55

* - $p \leq 0,01$ по сравнению с интактными животными.

** - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей плацебо;

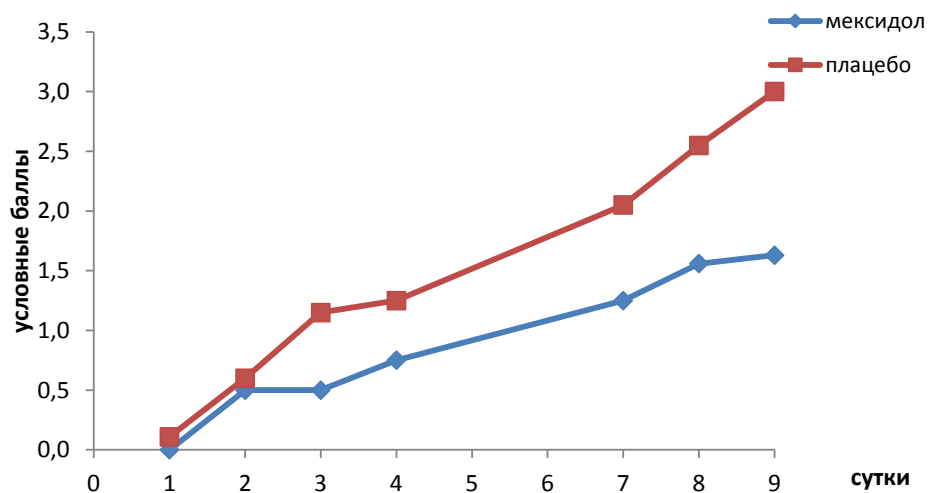


Рисунок 39. Влияние инстилляций мексидола на рост новообразованных сосудов роговицы при экспериментальном увеите у кроликов.

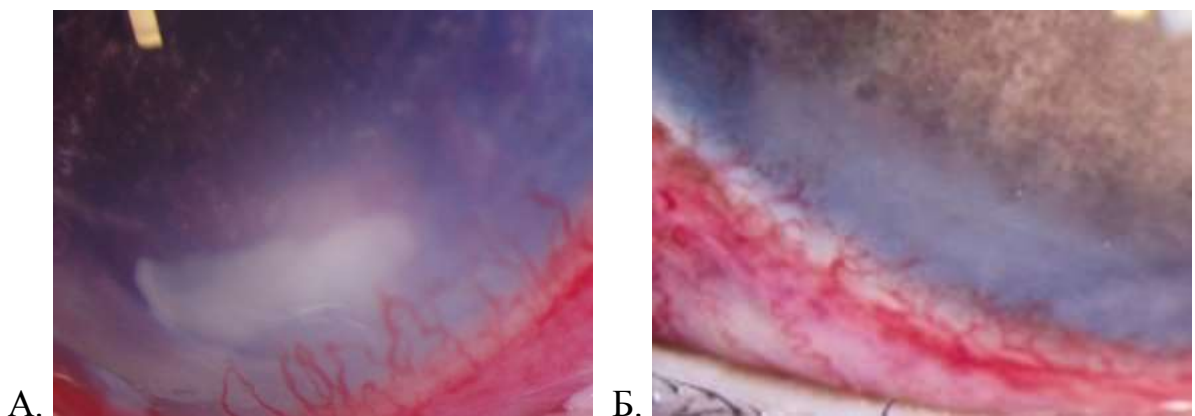


Рисунок 40. Рост новообразованных сосудов на 7-9 сутки экспериментального увеита у кроликов: **А.** — влияние инстилляций плацебо; **Б.** — влияние инстилляций

мексидола.

3.4.2. 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.

Биохимический анализ влаги передней камеры показал, что на 9 сутки течения увеита АОА в группе нелеченных животных была в 5 раз ниже нормы, тогда как в группе, получавшей мексидол АОА была в 7 раз ниже, чем у здоровых животных (Табл. 38, Диаграмма 18).

Таблица 38.

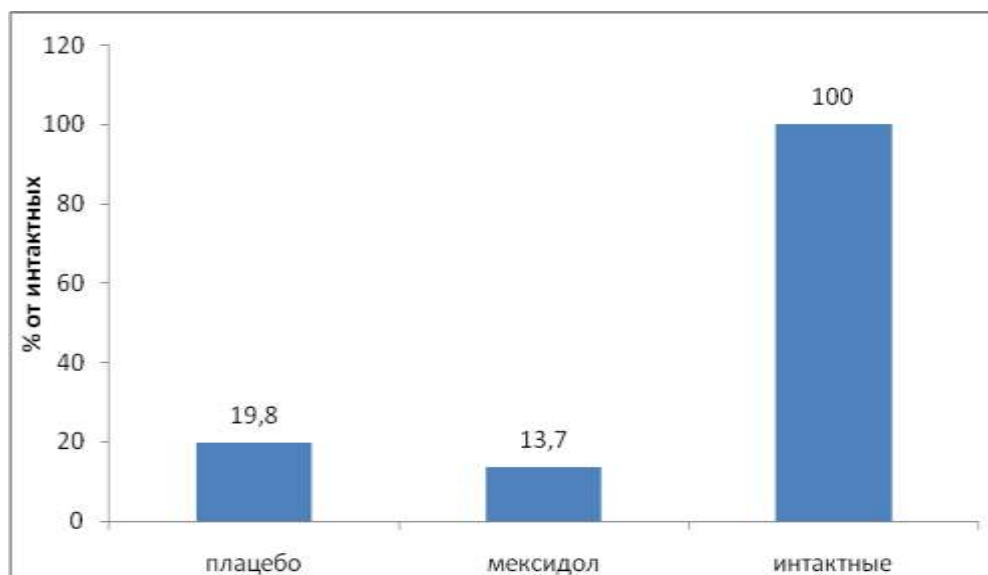
Влияние инстилляций мексидола на уровень АОА во влаге передней камеры на 9 сутки экспериментального увеита у кроликов (в мкМ тролокса)

Мексидол	192,4±28,2*
Плацебо	279,4±74,2 *
Интактные	1408,2±68,6

* - $p \leq 0,01$ по сравнению с интактными животными.

Диаграмма 18.

Влияние инстилляций мексидола на уровень АОА во влаге передней камеры на 9 сутки экспериментального увеита у кроликов



Нами не было обнаружено увеличения антиоксидантной активности влаги передней камеры на фоне лечения мексидолом, хотя известно, что его применение вызывает значительное повышение общей антиокислительной активности в крови [1] и в слезе [70]. Возможно, в данном случае негативную роль сыграл избыток NO, так как образующийся из NO пероксинитрит усиливает окислительный стресс.

Концентрация белка во влаге передней камеры кроликов с увеитом оказалось в 9 раз (контроль) и 13 раз (опыт) выше, чем у здоровых животных, что объясняется расширением и увеличением проницаемости кровеносных сосудов радужки и цилиарного тела под влиянием инстилляций глазных капель мексидола (Табл. 39, Диаграмма 19).

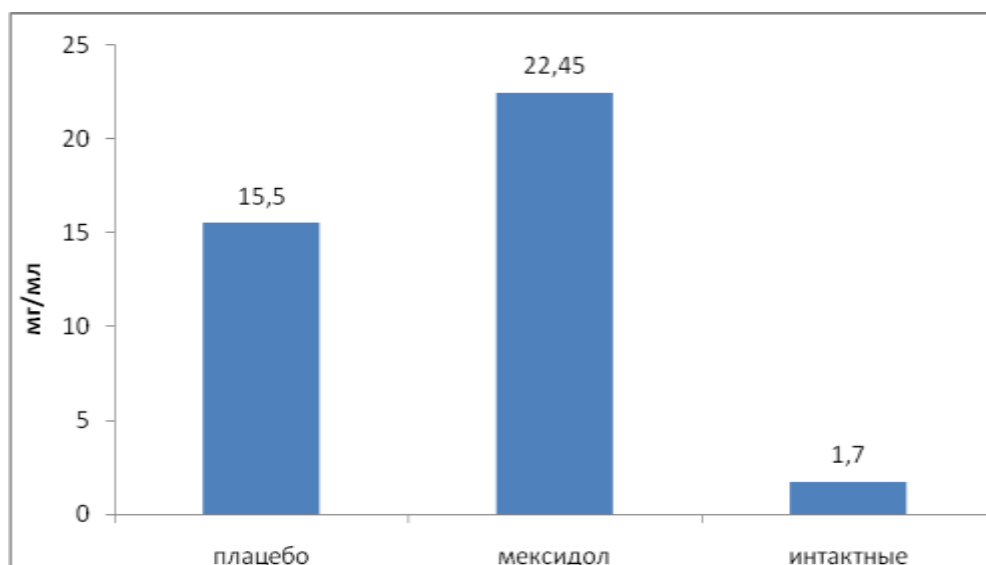
Таблица 39.

Влияние инстилляций мексидола на концентрацию белка во влаге передней камеры на 9 сутки экспериментального увеита у кроликов (в мг/мл)

Мексидол	22,4±1,2 * **
Плацебо	15,5±0,9 *
Интakтные	1,7±0,07

Диаграмма 19.

Влияние инстилляций мексидола на концентрацию белка во влаге передней камеры на 9 сутки экспериментального увеита у кроликов



Уровень α_2 -МГ во влаге передней камеры на 9 сутки в контрольной группе оказался в 2,4 раза выше и в опытной группе в 3,5 раза выше, чем у здоровых животных (Табл. 40, Диаграмма 20).

Концентрация нитратов и нитритов во влаге передней камеры на 9 сутки было в 5,7 раза (контроль) и 9 раз (опыт) выше, чем у здоровых животных (Табл. 41, Диаграмма 21).

Таблица 40.

Влияние инстилляций мексидола на уровень α_2 -МГ во влаге передней камеры на 9 сутки экспериментального увеита у кроликов

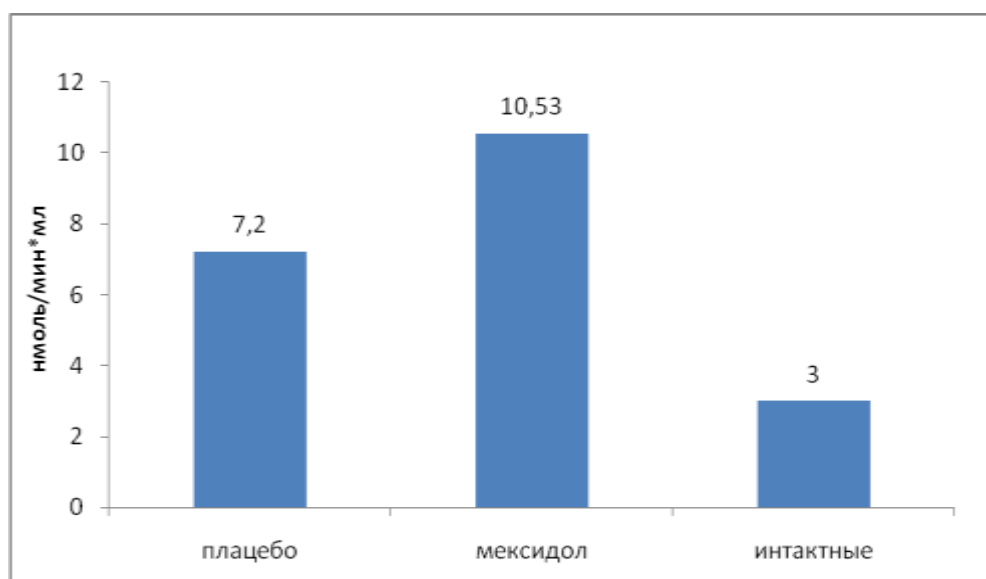
(в нмоль/мин*мл)

Мексидол	10,53±2,25 *
Плацебо	7,2 ±0,68 *
Интактные	3,0±0,08

* - $p \leq 0,01$ по сравнению с интактными животными.

Диаграмма 20.

Влияние инстилляций мексидола на уровень α_2 -МГ во влаге передней камеры на 9 сутки экспериментального увеита у кроликов



Более высокое содержание метаболитов NO в водянистой влаге у животных, получавших инстилляций мексидола, можно расценивать, как подтверждение того, что проницаемость сосудов в группе, получавшей мексидол, была выше, чем в контрольной. Вероятно, полученные в нашем эксперименте результаты связаны с расширением сосудов радужки и цилиарного тела под влиянием мексидола.

Таблица 41.

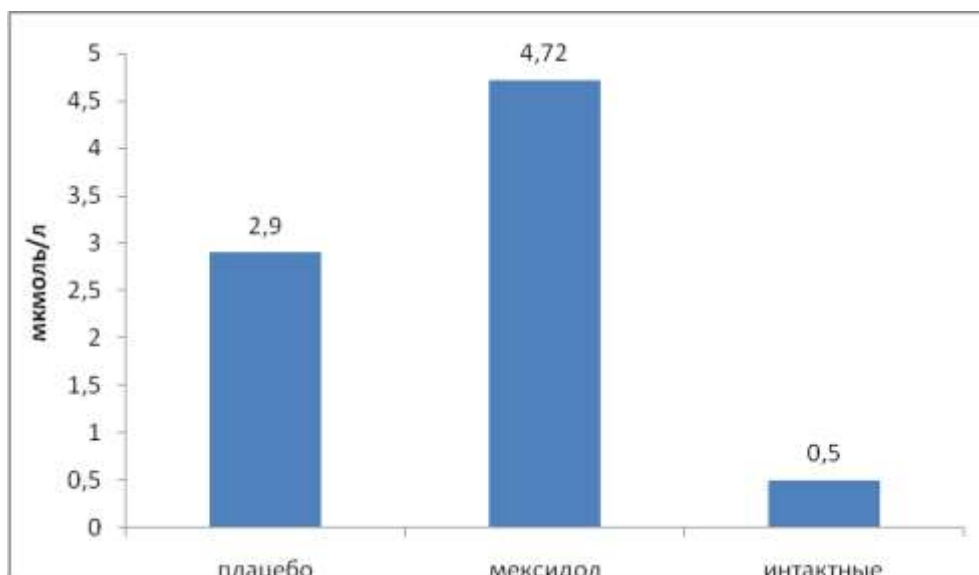
Влияние инстилляций мексидола на суммарную концентрацию продуктов обмена NO во влаге передней камеры на 9 сутки экспериментального увеита у кроликов (мкмоль/л)

Мексидол	4,72±0,72 *
Плацебо	2,90±0,45 *
Интактные	0,51±0,33

* - $p \leq 0,01$ по сравнению с интактными животными.

Диаграмма 21.

Влияние инстилляций мексидола на суммарную концентрацию продуктов обмена NO во влаге передней камеры на 9 сутки экспериментального увеита у кроликов



Способность мексидола усиливать регионарный кровоток и оказывать сосудоуспокаивающее действие показана и в других работах [16]. Показано, что мексидол существенно снижает активность индуцибельной NO-синтазы в тканях десен [85], препятствует росту продукции NO в коре головного мозга [191], [154], культуре макрофагов из перитонеального экссудата [34]. Вероятно, полученные в нашем эксперименте результаты связаны с расширением сосудов радужки и цилиарного тела под влиянием мексидола.

Среднее число лейкоцитов в поле зрения во влаге передней камеры животных, получавших мексидол, оказалось в 1.5 раза меньше, чем у получавших плацебо (Табл. 42, Диаграмма 22).

Таблица 42.

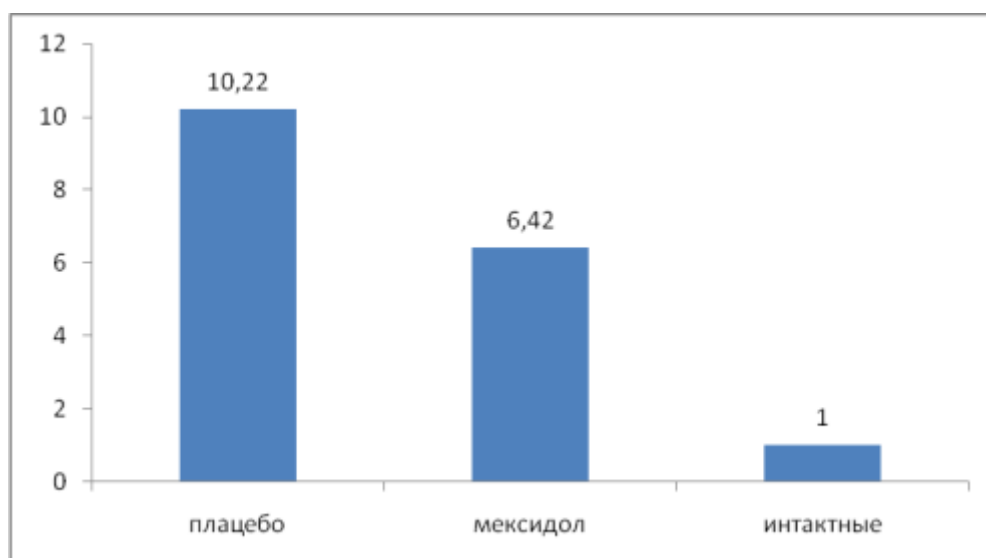
Влияние инстилляций мексидола на количество лейкоцитов во влаге передней камеры на 9 сутки экспериментального увеита у кроликов

Мексидол	6,4±1,3 *
Плацебо	10,2±2,5 *
Интakтные	1±1

* - $p \leq 0,01$ по сравнению с интактными животными.

Диаграмма 22.

Влияние инстилляций мексидола на количество лейкоцитов во влаге передней камеры на 9 сутки экспериментального увеита у кроликов



Таким образом, 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.

3.5. Применение мелатонина, дексаметазона, а также их сочетания в виде глазных капель при экспериментальном увеите у кроликов

3.5.1. Оценка клинической картины

Данный раздел работы выполнен автором самостоятельно.

После интравитреального введения разрешающей дозы лошадиной сыворотки у животных наблюдалась характерная клиническая картина острого увеита. По действию на отек век лечение инстилляциями дексаметазона сопоставимо с применением инстилляций мелатонина. Наблюдается синергический эффект дексаметазона и мелатонина на протяжении всего периода наблюдения (Табл. 43, Рис. 41, 44).

Таблица 43.

Влияние инстилляций мелатонина, дексаметазона, а также их сочетания на отек век при экспериментальном увеите у кроликов (в усл. баллах)

сутки	1	2	3	4	7
Плацебо	2,75±0,6	3,0±0,0	2,13±0,25	1,75±0,32	1,25±0,49
Дексаметазон	1,33±0,4**	1,80±0,31**	1,20±0,31**	1,40±0,62	0,20±0,31**
Мелатонин	1,38±0,7**	1,75±0,49**	1,63±0,52**	1,38±0,36**	0,38±0,36**
Мелатонин + Дексаметазон	1,0±0,0**	1,43±0,4**	1,0±0,0 **	0,43±0,4**	0,14±0,28**

xx - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей мелатонин +

дексаметазон; ** - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей плацебо.

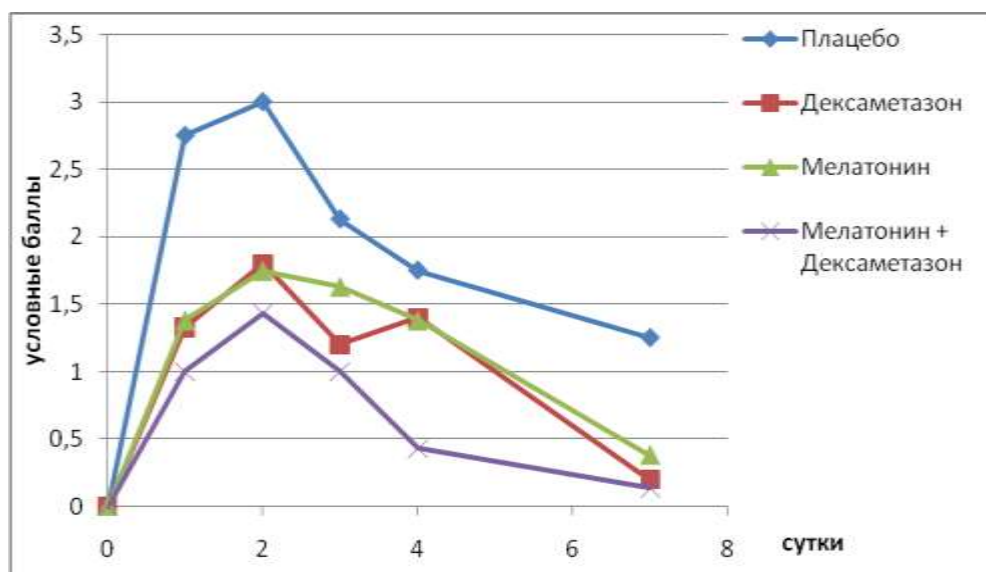


Рисунок 41. Влияние инстилляций мелатонина, дексаметазона, а также их сочетания на отек век при экспериментальном увеите у кроликов.

На гиперемии конъюнктивы инстилляции дексаметазона действуют несколько лучше, чем инстилляции мелатонина. Также наблюдается синергический эффект от совместного применения двух препаратов на протяжении всего периода наблюдения (Табл. 44, Рис. 42, 44).

Таблица 44.

Влияние инстилляций мелатонина, дексаметазона, а также их сочетания на гиперемии конъюнктивы при экспериментальном увеите у кроликов (в усл. баллах)

сутки	1	2	3	4	7
Плацебо	3,0±0,0	3,0±0,0	2,88±0,25	2,75±0,49	2,13±0,69
Дексаметазон	2,5±0,38**	2,2±0,58**	2,2±0,58	1,8±0,58**	0,6±0,38**
Мелатонин	2,88±0,2**	2,88±0,25**	2,38±0,63**	1,88±0,58**	1,5±0,91
Мелатонин + Дексаметазон	2,0±0,58**	2,14±0,2**	1,29±0,56**	1,29±0,56**	0,57±0,58**

xx - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей мелатонин + дексаметазон; ** - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей плацебо;

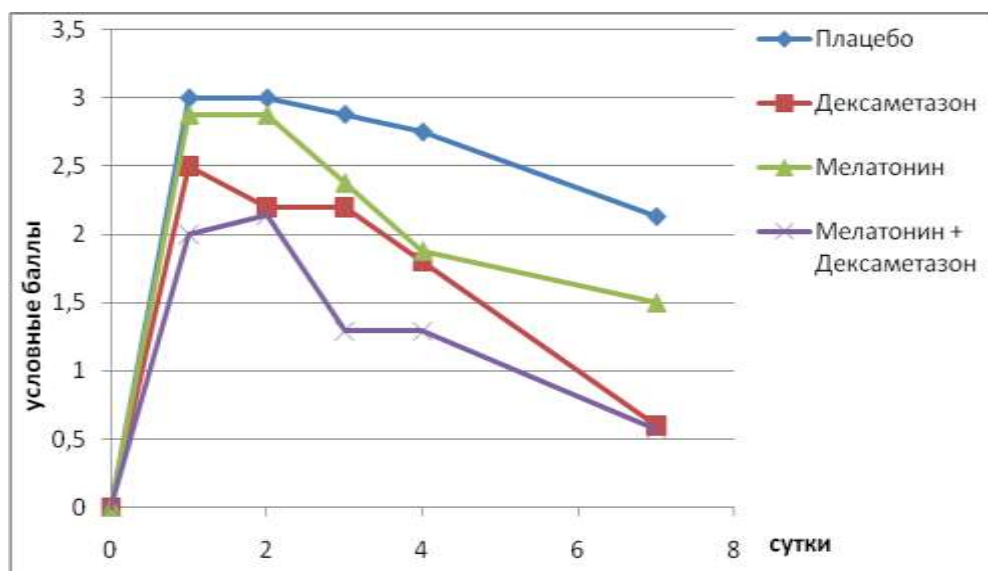


Рисунок 42. Влияние инстилляций мелатонина, дексаметазона, а также их сочетания на гиперемию конъюнктивы при экспериментальном увеите у кроликов.

Отек роговицы инстилляции дексаметазона с 3 по 7 сутки снижают сильнее, чем инстилляции мелатонина. Наблюдается синергический эффект от совместного применения мелатонина и дексаметазона на протяжении острого периода воспаления, тогда как на 7 сутки эффект от лечения дексаметазоном сопоставим с эффектом совместного применения двух препаратов (Табл. 45, Рис. 43, 44).

Таблица 45.

Влияние инстилляций мелатонина, дексаметазона, а также их сочетания на отек роговицы при экспериментальном увеите у кроликов (в усл. баллах)

сутки	1	2	3	4	7
Плацебо	1,63±0,36	2,0±0,52	2,38±0,52	2,5±0,52	2,0±0,64
Дексаметазон	1,17±0,28**	1,6±0,38	1,20±0,31**	1,20±0,31**	1,0±0,0**
Мелатонин	0,75±0,32**	1,25±0,32**	1,5±0,37** xx	1,5±0,37** xx	1,38±0,37xx
Мелатонин + Дексаметазон	1,25±0,34**	1,29±0,36	1,0±0,0**	1,0±0,0**	1,0±0,0**

xx - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей мелатонин +

дексаметазон; ** - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей плацебо.

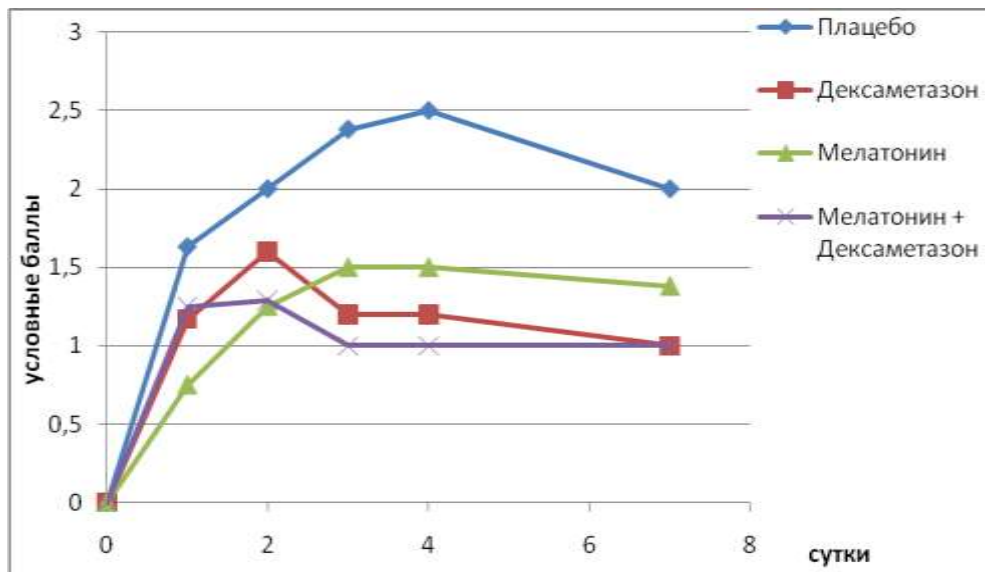


Рисунок 43. Влияние инстилляций мелатонина, дексаметазона, а также их сочетания на отек роговицы при экспериментальном увеите у кроликов.

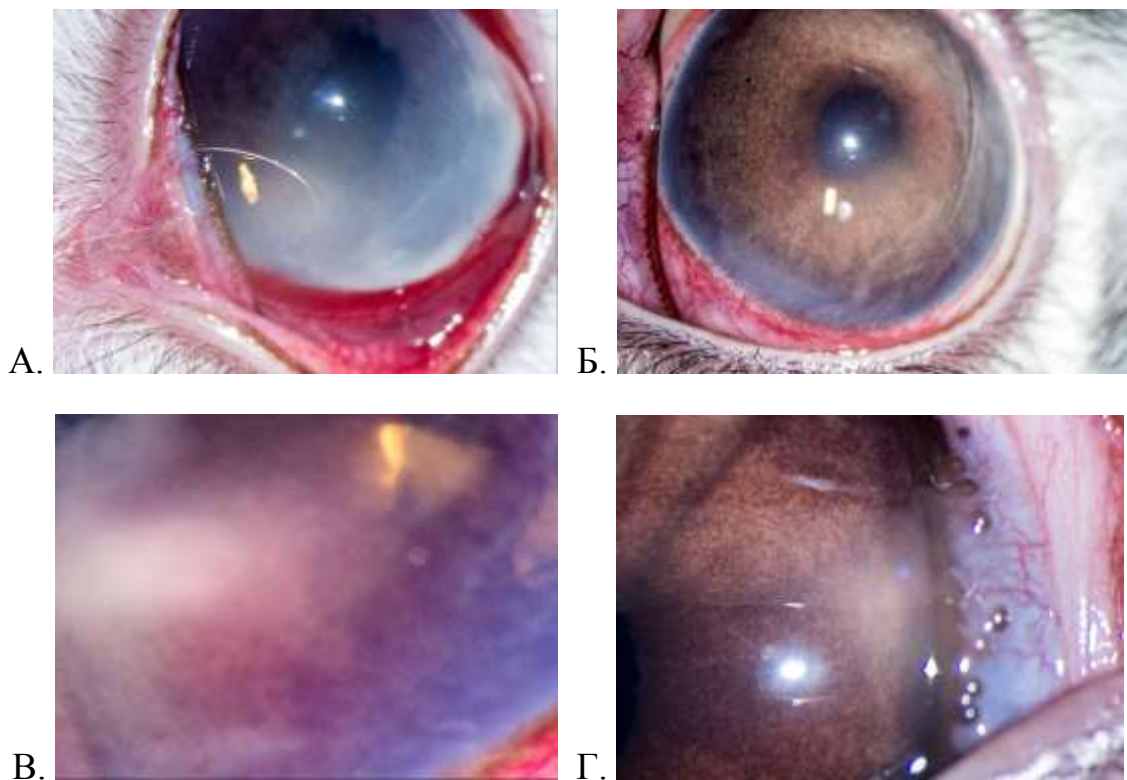


Рисунок 44. Отек век, гиперемия конъюнктивы и отек роговицы на 4 сутки экспериментального увеита у кроликов:

- А. – влияние инстилляций плацебо;
- Б. – влияние инстилляций дексаметазона;
- В. – влияние инстилляций мелатонина;
- Г. – влияние инстилляций мелатонина и дексаметазона.

Наблюдалось невыраженное синергическое действие мелатонина и дексаметазона в отношении отека радужки. Применение инстилляций одного дексаметазона сопоставимо с применением инстилляций мелатонина (Табл. 46, Рис. 45, 47).

Таблица 46.

Влияние инстилляций мелатонина, дексаметазона, а также их сочетания на отек радужки при экспериментальном увеите у кроликов (в усл. баллах)

сутки	1	2	3	4	7
Плацебо	1,67±0,36	2,5±0,38	2,67±0,36	2,67±0,36	2,86±0,48
Дексаметазон	1,5±0,38	2,2±0,58	2,2±0,31	2,2±0,58	1,8±0,31**
Мелатонин	1,0±0,0** ×	2,0±0,0**	2,25±0,32	2,5±0,37	2,38±0,36
Мелатонин + Дексаметазон	1,13±0,47	1,75±0,34**	1,86±0,51**	2,29±0,56	2,0±0,60**

× - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей дексаметазон;

** - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей плацебо.

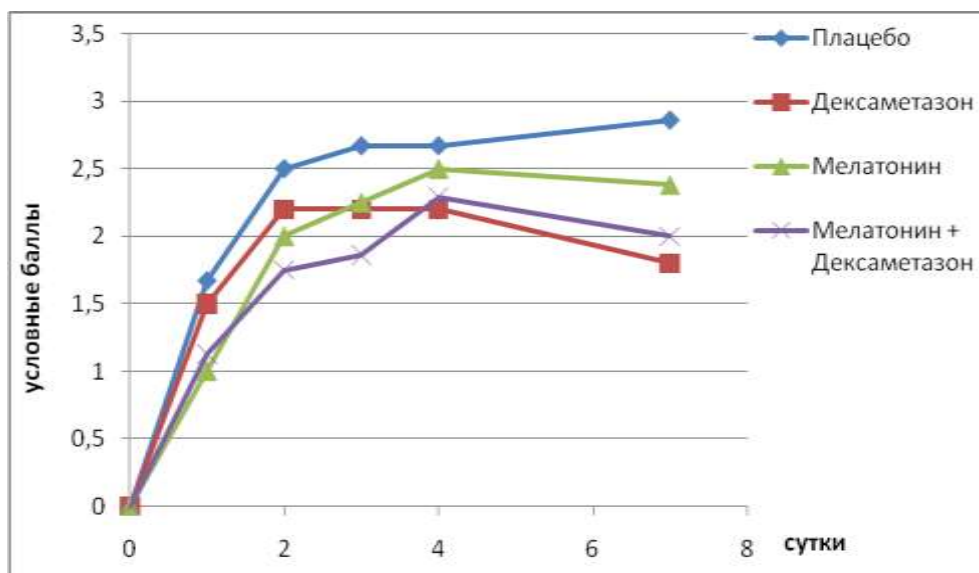


Рисунок 45. Влияние инстилляций мелатонина, дексаметазона, а также их сочетания на отек радужки при экспериментальном увеите у кроликов.

На протяжении всего периода наблюдения инстилляцией дексаметазона лучше снижали содержание фибрина во влаге передней камеры. Совместное

применение инстилляций двух препаратов сопоставимо с лечением инстилляциями одного дексаметазона (Табл. 47, Рис. 46, 47).

Таблица 47.

Влияние инстилляций мелатонина, дексаметазона, а также их сочетания на количество фибрина в передней камере при экспериментальном увеите у кроликов (в усл. баллах)

сутки	1	2	3	4	7
Плацебо	2,38±0,74	2,38±0,74	2,13±0,86	2,13±0,86	2,0±1,05
Дексаметазон	1,17±0,52**	1,2±0,31**	1,0±0,0	1,0±0,49	1,0±0,0
Мелатонин	1,38±0,36**	1,5±0,52	1,63±0,52	1,75±0,61	1,5±0,64
Мелатонин + Дексаметазон	1,5±0,89	1,29±0,59**	1,14±0,28	1,14±0,28	1,0±0,43

** - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей плацебо.

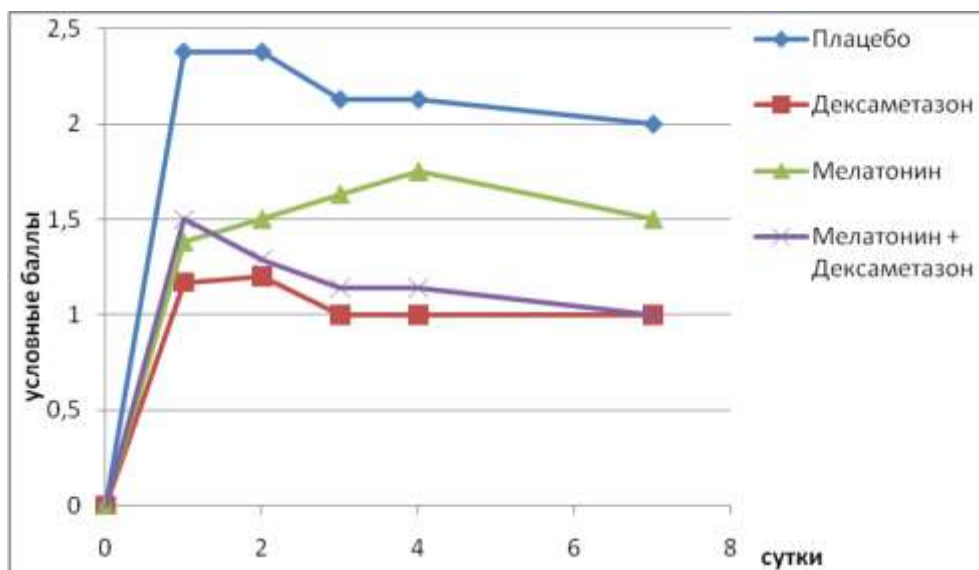


Рисунок 46. Влияние инстилляций мелатонина, дексаметазона, а также их сочетания на количество фибрина в передней камере при экспериментальном увеите у кроликов.

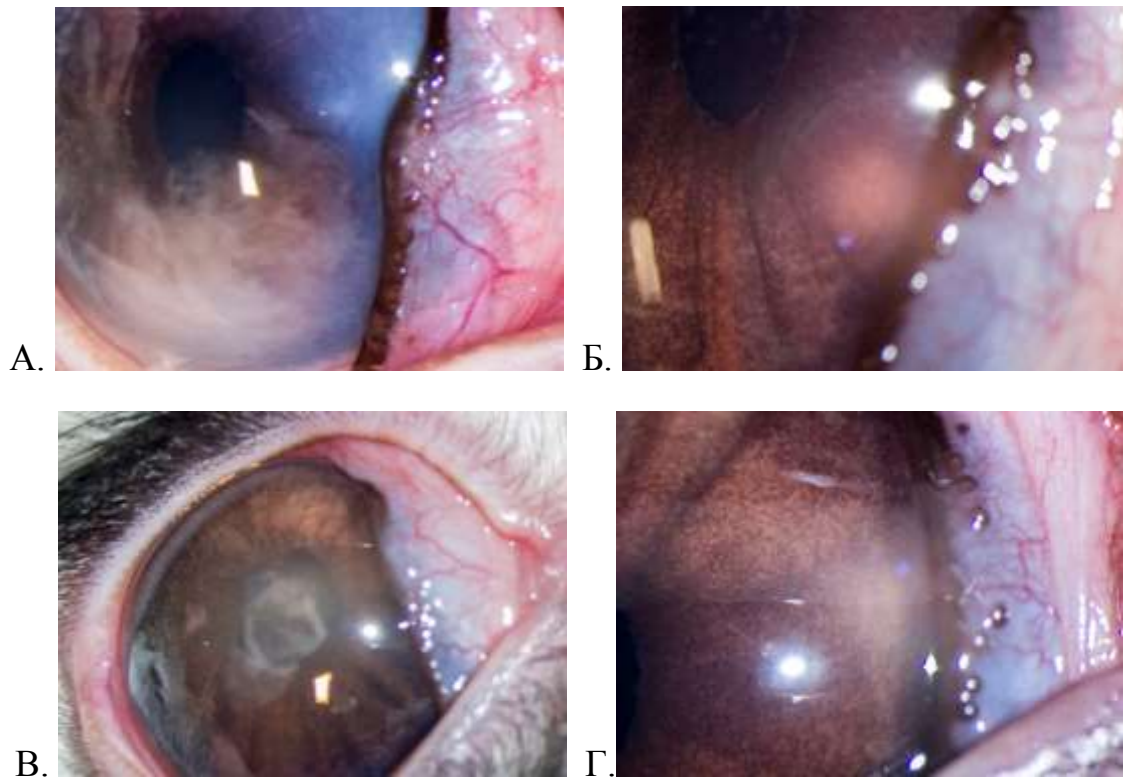


Рисунок 47. Отек радужки и фибрин в передней камере на 7 сутки экспериментального увеита:

А. – влияние инстилляций плацебо;

Б. – влияние инстилляций дексаметазона;

В. – влияние инстилляций мелатонина;

Г. – влияние инстилляций мелатонина и дексаметазона.

На 7 сутки воспалительного процесса рост новообразованных сосудов роговицы был менее выражен в группе, получавшей дексаметазон. Совместное применение инстилляций двух препаратов сопоставимо с лечением инстилляциями одного дексаметазона (Табл. 48, Рис. 48).

Таблица 48.

Влияние инстилляций мелатонина, дексаметазона, а также их сочетания на рост новообразованных сосудов роговицы при экспериментальном увеите у кроликов (в усл. баллах)

сутки	4	7
Плацебо	$0,83 \pm 0,47$	$1,29 \pm 0,33$
Дексаметазон	$0,2 \pm 0,19$	$0,56 \pm 0,29$
Мелатонин	$0,56 \pm 0,29$	$0,75 \pm 0,39$
Мелатонин + Дексаметазон	$0,29 \pm 0,36$	$0,59 \pm 0,29$

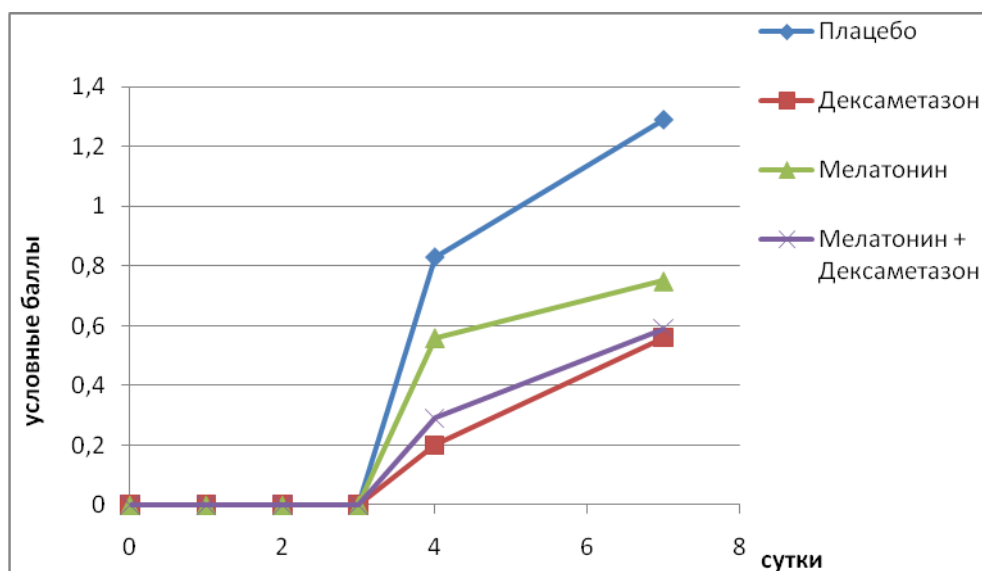


Рисунок 48. Влияние инстилляций мелатонина, дексаметазона, а также их сочетания на рост новообразованных сосудов роговицы при экспериментальном увеите у кроликов.

3.5.2. 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.

У всех животных с увеитом АОА была значительно ниже нормы. В группе, получавшей плацебо, она была снижена в 18 раз по сравнению с нормой. Лечение мелатонином вызвало повышение ее почти в 3 раза по сравнению с группой плацебо (в 6 раз ниже нормы), тогда как лечение дексаметазоном повысило ее в 1,8 раза по сравнению с группой плацебо (в 10 раз ниже нормы). Сочетание препаратов дало промежуточное повышение АОА в 2,2 раза по сравнению с плацебо (в 8 раз ниже нормы) (Табл. 49, Диаграмма 23). Таким образом, применение инстилляций мелатонина позволяет повысить антиокислительный потенциал дексаметазона.

Концентрация белка во влаге передней камере превышала норму у нелеченных животных примерно в 10 раз, у животных, получавших мелатонин – в 7,7 раза, а дексаметазон – в 5,4 раза. У животных, леченных сочетанием

препаратов, концентрация белка во влаге передней камеры превышала норму в 7 раз (Табл. 50, Диаграмма 24). Таким образом, дексаметазон больше снизил содержание белка в водянистой влаге, по сравнению с мелатонином, а сочетание их не усилило эффекта.

Таблица 49.

Влияние инстилляций мелатонина, дексаметазона, а также их сочетания на уровень АОА во влаге передней камеры на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов (в мкМ тролокса)

Плацебо	68,57±14,0
Дексаметазон	120,36±17,05 ** *
Мелатонин	203,42±19,20 ** * ×
Мелатонин + Дексаметазон	153,08±26,56 ** *
Интактные	1243,79±115,22

× - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей дексаметазон;

* - $p \leq 0,01$ по сравнению с интактными животными;

** - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей плацебо.

Диаграмма 23.

Влияние инстилляций мелатонина, дексаметазона, а также их сочетания на уровень АОА во влаге передней камеры на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов

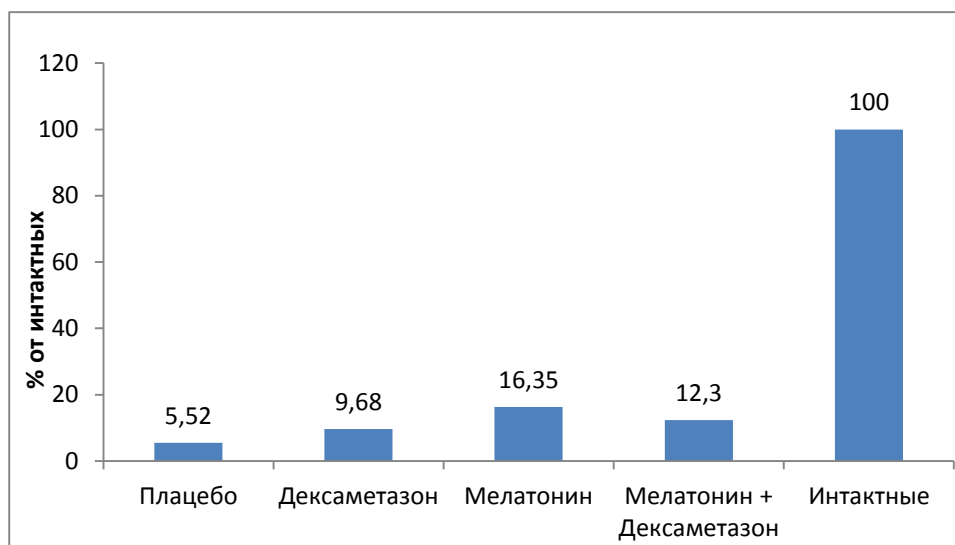


Таблица 50.

Влияние инстилляций мелатонина, дексаметазона, а также их сочетания на концентрацию белка во влаге передней камеры на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов (в мг/мл)

Плацебо	25,12±1,77 *
Дексаметазон	12,61±0,56 ** *
Мелатонин	18,26±0,67 ** * ×
Мелатонин + Дексаметазон	16,69±0,68 ** * ×
Интактные	2,35±0,16

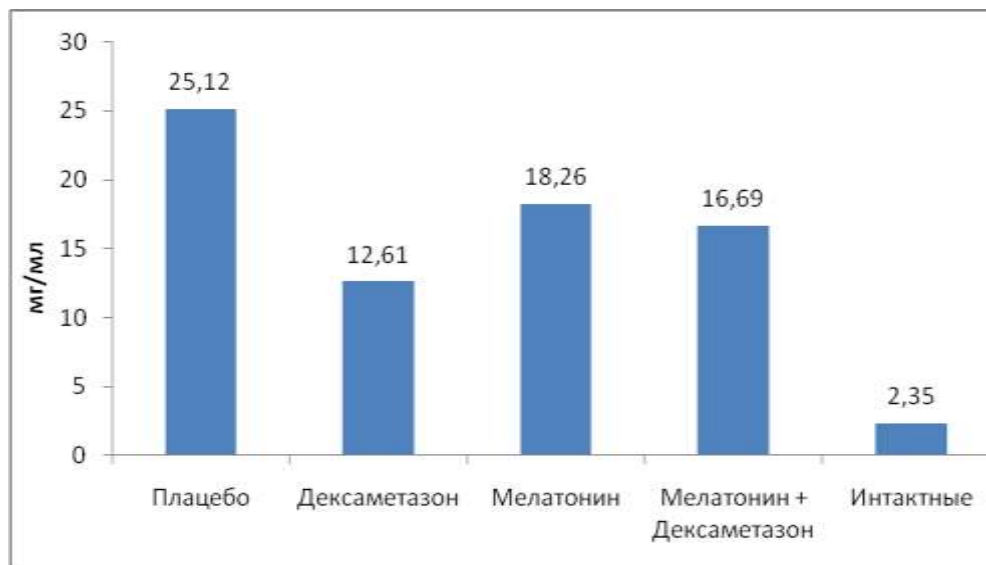
× - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей дексаметазон;

* - $p \leq 0,01$ по сравнению с интактными животными.

** - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей плацебо;

Диаграмма 24.

Влияние инстилляций мелатонина, дексаметазона, а также их сочетания на концентрацию белка во влаге передней камеры на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов



Уровень α_2 -МГ в водянистой влаге у нелеченных животных был в 5 раз выше нормы, у леченных мелатонином – выше нормы в 4,3 раза, дексаметазоном – в 2,5 раза, сочетанием препаратов – в 4,6 раза (Табл. 51, Диаграмма 25). В данном случае дексаметазон снижает уровень α_2 -МГ лучше мелатонина, а сочетание двух препаратов синергического эффекта не дает.

Подсчет лейкоцитов во влаге передней камеры показал, что у нелеченных

животных их число было в 12,5 раз выше, чем у здоровых животных. Инстилляций мелатонина снижают количество лейкоцитов в 2,2 раза по сравнению с нелечеными животными, тогда как инстилляций дексаметазона – в 1.8 раза (Табл. 52, Диаграмма 26). Из этого следует, что противовоспалительный эффект мелатонина по этому показателю оказался незначительно выше, чем у дексаметазона. По этому показателю синергическое действие мелатонина и дексаметазона при совместном применении двух препаратов отмечено не было.

Таблица 51.

Влияние инстилляций мелатонина, дексаметазона, а также их сочетания на уровень α_2 -МГ в лагере передней камеры на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов (в нмоль/мин*мл)

Плацебо	6,34±0,86 *
Дексаметазон	3,19±0,81 ** *
Мелатонин	5,44±1,12 * ×
Мелатонин + Дексаметазон	5,76±0,69 * ×
Интakтные	1,26±0,48

× - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей дексаметазон;

* - $p \leq 0,01$ по сравнению с интактными животными;

** - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой, получавшей плацебо.

Диаграмма 25.

Влияние инстилляций мелатонина, дексаметазона, а также их сочетания на уровень α_2 -МГ в лагере передней камеры на 8 сутки экспериментального увеита у кроликов (в нмоль/мин*мл)



Таблица 52.

Влияние инстилляций мелатонина, дексаметазона, а также их сочетания на количество лейкоцитов во влаге передней камеры на 8 сутки

экспериментального увеита у кроликов

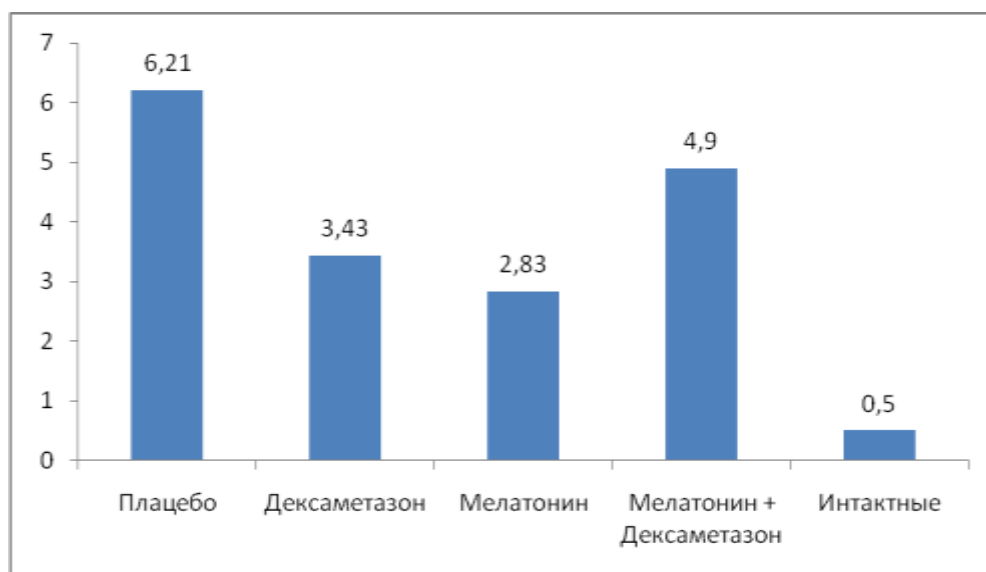
Плацебо	6,21±1,51 *
Дексаметазон	3,43±0,74 *
Мелатонин	2,83±0,74 *
Мелатонин + Дексаметазон	4,9±0,98 *
Интактные	0,5±0,25

* - $p \leq 0,01$ по сравнению с интактными животными.

Диаграмма 26.

Влияние инстилляций мелатонина, дексаметазона, а также их сочетания на количество лейкоцитов во влаге передней камеры на 8 сутки

экспериментального увеита у кроликов



Таким образом, 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 $\alpha 2$ -МГ. 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема лечения увеитов является одной из важнейших в офтальмологии. Заболеваемость увеитами в структуре глазной патологии составляет от 5 до 12%. При тяжелых формах заболевания слепота на оба глаза развивается в 10-15 % случаев, а инвалидность по зрению составляет 35%. Значимость проблемы определяется высоким инвалидизирующим эффектом и преимущественным поражением лиц трудоспособного возраста [23, 33].

ГКС препараты в настоящее время занимают ведущее место в лечении эндогенных увеитов у детей и взрослых. Однако при длительном применении препаратов этой группы, особенно в больших дозировках, частота развития побочных эффектов достигает 50% [51, 199]. Поэтому поиск новых средств для лечения увеитов относится к числу актуальных проблем офтальмологии.

Основные патогенетические факторы увеита можно разделить условно на инфекционные, аутоиммунные, а также неизвестной природы. Все они приводят к усилению образования цитокинов и хемокинов, которые в свою очередь усиливают образование свободных радикалов. Кроме повреждения функциональных и структурных молекул, свободные радикалы вызывают активацию различных факторов транскрипции, которые усиливает синтез провоспалительных агентов, также они активируют Т-клетки, усиливая иммунную реакцию. Повреждение тканей, инфильтрация тканей воспалительными клетками, усиление синтеза цитокинов и хемокинов в свою очередь стимулирует образование свободных радикалов. Возникает замкнутый круг, приводящий к неконтролируемому усилению воспалительного процесса [8].

Экспериментально доказано, что основная роль в развитии осложнений увеита (катаракта, глаукома, дегенерация сетчатки) принадлежит активации свободнорадикальных реакций и накоплению свободных радикалов [80, 43].

Однако, несмотря на то, что окислительный стресс играет одну из ключевых ролей в развитии увеита, препараты антиоксидантного действия пока еще не нашли широкого применения в комплексном лечении этого заболевания глаз. Вышесказанное определило цель нашей экспериментальной работы -

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

В качестве антиоксидантных препаратов исследовали фермент СОД, осуществляющий дисмутацию супероксиданион-радикалов с образованием перекиси водорода и кислорода. Показан терапевтический эффект применения СОД для нейропротекции при экспериментальной глаукоме [2]. Мы не нашли литературных данных о применении СОД в виде инстилляций при увеитах. Мы впервые исследовали действие СОД в составе CaPh-наночастиц. Кальций фосфатные наночастицы обладают высокой биосовместимостью и биodeградируемостью, нетоксичны и хорошо проходят через тканевые барьеры. Литературные данные свидетельствуют о перспективности их применения в различных областях биологии и медицины [122, 125, 109, 129, 113, 134].

Также исследовали Мексидол и Мелатонин – вещества, обладающие обширным спектром биологического действия, в том числе антиоксидантными свойствами. Важно отметить, что данные вещества, при длительном применении даже в больших количествах не становятся акцепторами неспаренных электронов, то есть не становятся прооксидантами. Известен терапевтический эффект внутримышечного и перорального применения Мексидола при увеите [49]. Показан терапевтический эффект подкожного и внутрибрюшинного введения мелатонина при экспериментальном увеите [110, 194]. В виде инстилляций Мелатонин ранее не исследовался.

Все исследуемые препараты, обладающие антиоксидантным действием, применяли в виде инстилляций. Их действие сравнивали с действием наиболее часто используемого для лечения увеитов кортикостероидного препарата - дексаметазона. Исследовали также совместное действие антиоксидантных препаратов и дексаметазона.

В работе была использована адаптированная и усовершенствованная модель иммуногенного увеита у кроликов, было задействовано 89 кроликов, проведено 5 серий экспериментов.

В ответ на введение разрешающей дозы лошадиной сыворотки развивалась типичная клиническая картина переднего увеита: наблюдались отек век и гиперемия конъюнктивы, отек роговицы с преципитатами на эндотелии, отек стромы радужки, извитость и полнокровность ее кровеносных сосудов, формировались задние круговые синехии, зрачок не реагировал на свет и часто имел неправильную форму, отмечалось большое количество сгустков фибрина, в роговице был отмечен рост новообразованных сосудов со стороны лимба.

В ходе проведенной работы нами было показано, что 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 [64, 65].

В слезной жидкости и во влаге передней камеры происходило возрастание концентрации общего белка, увеличение числа лейкоцитов, уровня α_2 -макроглобулина, концентрации нитратов и нитритов, значительное снижение антиокислительной активности и активности СОД.

Следует отметить, что изменения биохимических показателей в ВПК были более выраженными и сохранялись дольше, чем в слезной жидкости. Резкое возрастание концентрации белка и увеличение числа лейкоцитов свидетельствует о нарушении гематоофтальмического барьера и повышенной проницаемости сосудов. Снижение антиокислительной активности и активности СОД говорит о развитии выраженного окислительного стресса и об истощении эндогенного пула антиоксидантов. Повышение уровня α_2 -макроглобулина и концентрации нитратов и нитритов также отражает степень остроты воспалительного процесса.

Нами было установлено, что включение инстилляций антиоксидантного фермента Супероксиддисмутазы в комплексную терапию увеитов снижает

интенсивность воспаления и повышает антиокислительный потенциал в тканях глаза, способствуя снижению уровня окислительного стресса [11, 12, 57].

При применении инстилляций СОД, инстилляций дексаметазона, так же, как и сочетания препаратов при экспериментальном увеите наблюдалось снижение остроты воспаления. Инстилляции дексаметазона сильнее снижали отек век, гиперемию конъюнктивы и отек радужки, чем инстилляции СОД. В то же время, инстилляции СОД сильнее снижали отек роговицы, количество фибрина в передней камере, рост новообразованных сосудов роговицы, чем инстилляции дексаметазона. Наблюдалось выраженное синергическое действие СОД и дексаметазона при совместном применении в отношении отека радужки и неоваскуляризации роговицы.

Под влиянием инстилляций СОД и Дексаметазона концентрация белка во влаге передней камеры снижалась практически одинаково, а их сочетание не усиливало эффекта. Лечение СОД значительно повысило уровень АОА во влаге передней камеры, тогда как Дексаметазон уменьшил и так сниженный антиоксидантный потенциал и даже несколько препятствовал проявлению антиокислительного эффекта СОД. Дексаметазон лучше снизил уровень α_2 -МГ, чем СОД. В то же время в группе животных, получавших СОД, число лейкоцитов было существенно ниже, чем у получавших только Дексаметазон. Отмечено синергическое действие СОД и Дексаметазона при их совместном применении на уровень α_2 -МГ и количество лейкоцитов во влаге передней камеры.

Таким образом, инстилляции СОД позволяют повысить эффективность лечения увеитов.

Нами впервые было показано, что инстилляции СОД в составе CaPh-наночастиц более эффективны в лечении экспериментального острого увеита по сравнению с водным раствором фермента [30, 166]. СОД в составе кальций-фосфатных наночастиц по сравнению с водным раствором фермента эффективнее снижала отек век, гиперемию конъюнктивы, отек роговицы и радужки. Важно, что при лечении СОД в составе CaPh-наночастиц по сравнению с водным

раствором фермента отмечалось меньшее количество фибриновых сгустков в передней камере глаза. Инстилляции СОД в составе CaPh-наночастиц вызвали более значительное снижение содержания белка в водянистой влаге, чем инстилляции водного раствора фермента.

Гистологическое исследование роговицы показало, что у животных, не подвергавшихся лечению, на 8 сутки увеита роговица по сравнению с интактными животными имела признаки отека и разрыхления коллагеновых волокон, а также частичной десквамации эндотелия и очаговой деструкции десцеметовой мембраны. У животных, получавших инстилляции СОД в виде водного раствора, роговица была выстлана неизмененным эпителием, десцеметова мембрана целая, эндотелий местами десквамирован, у большинства животных только в отдельных участках роговицы отмечалось разрыхление коллагеновых волокон. У животных, получавших лечение СОД в составе CaPh-наночастиц, роговица имела плотный характер, была выстлана эпителием и эндотелием практически без десквамации, коллагеновые волокна были не изменены.

Таким образом применение СОД в составе CaPh-наночастиц более эффективно защищает ткани глаза от воздействия свободных радикалов.

В настоящей работе было впервые выявлено, что 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.

В группе животных, получавших Мексидол отек век и отек роговицы был более выраженным, чем в группе нелеченных животных. Интенсивность гиперемии конъюнктивы и отека радужки в обеих группах практически не отличалась. В группе, получавшей Мексидол количество фибрина в передней камере было больше, что вызвано способностью мексидола повышать проницаемость кровеносных сосудов. В то же время неоваскуляризация роговицы

была менее выражена в группе, получавшей Мексидол, что объясняется его антигипоксантным действием.

Концентрация белка, нитратов и нитритов, уровень α_2 -МГ во влаге передней камеры оказались выше на фоне лечения мексидолом, что возможно объясняется способностью мексидола усиливать регионарный кровоток и оказывать сосудоуспокаивающее действие. Не было обнаружено увеличения уровня АОА влаги передней камеры на фоне лечения мексидолом. Мексидол, тем не менее, проявил противовоспалительную активность, что выражалось в снижении количества лейкоцитов во влаге передней камеры.

Таким образом, инстилляции Мексидола в связи с усилением проницаемости внутриглазных сосудов не могут быть использованы для лечения острой фазы увеита.

Нами было выявлено, что включение местного применения Мелатонина в виде глазных капель в комплексную терапию увеитов снижает интенсивность воспаления и уровень окислительного стресса.

При применении инстилляций Мелатонина, Дексаметазона, а также их сочетания при увеите у кроликов наблюдалось снижение остроты воспалительного процесса. Дексаметазон несколько сильнее снижал гиперемию конъюнктивы, отек роговицы и радужки, количество фибрина во влаге передней камеры и рост новообразованных сосудов роговицы. Отмечался синергический эффект дексаметазона и мелатонина при совместном применении в остром периоде воспаления в отношении отека век, гиперемии конъюнктивы и отека роговицы.

Важно отметить, что инстилляции Мелатонина в отличие от Дексаметазона вызвали существенное повышение уровня АОА во влаге передней камеры, то есть, применение Мелатонина позволяет повысить антиокислительный потенциал в тканях глаза. Инстилляции Дексаметазона сильнее снижали содержание белка, уровень α_2 -МГ во влаге передней камеры, по сравнению с инстилляциями мелатонина, а сочетание препаратов не усиливало эффекта. В то же время

инстилляции мелатонина несколько сильнее снижали количество лейкоцитов во влаге передней камеры, чем инстилляции дексаметазона.

Таким образом, инстилляции Мелатонина позволяют повысить эффективность лечения увеитов.

Таким образом, нами показано, что включение антиоксидантных препаратов в виде глазных капель в комплексную терапию увеита позволяет снизить остроту воспаления и тем самым повысить эффективность лечения и снизить вероятность осложнений. При выборе антиоксиданта для лечения увеита следует учитывать возможность нежелательных проявлений, например, таких как появление прооксидантных свойств и способность увеличивать проницаемость внутриглазных сосудов. По нашим данным Супероксиддисмутаза и Мелатонин являются перспективными препаратами для местной терапии увеитов.

Все полученные в ходе данной работы результаты могут стать основой для дальнейших экспериментальных, а затем и клинических исследований в области разработки новых научно обоснованных подходов к комплексной терапии увеитов.

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 СОД, свидетельствующее о развитии воспаления, сопровождающегося окислительным стрессом. Во влаге эти изменения более выражены.

2. Инстилляции СОД 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 СОД сильнее уменьшается количество лейкоцитов и в отличие от Дексаметазона происходит восстановление антиокислительной активности. Выявлено синергическое действие дексаметазона и СОД на отек радужки, количество лейкоцитов и уровень $\alpha 2$ -МГ в водянистой влаге. Включение инстилляций СОД в комплексную терапию увеитов позволяет снизить окислительный стресс и тем самым повысить эффективность лечения.

3. Инстилляции СОД в составе CaPh-наночастиц, по сравнению с СОД 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 СОД 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 $\alpha 2$ -МГ. 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абраменко, Ю. В. Оценка клинической эффективности, вазоактивного и метаболического действия мексидола на пожилых пациентов с дисциркуляторной энцефалопатией / Ю. В. Абраменко // Жур. неврол. психиатр. – 2011. – № 111. - С. 35-41.
2. Алексеев, В. Н. Нейропротекция новым антиоксидантом Рексод при экспериментальной глаукоме / В. Н. Алексеев, В. Е. Корелина, Чжан Шаша // Клиническая офтальмол. - 2008. – Т. 9. - № 3. – С. 82-84.
3. Андреева, Н. Н. Экспериментальные и клинические аспекты применения мексидола при гипоксии / Н. Н. Андреева // Мед. альманах. – 2009. – Т. 4, № 9. – С. 193-197.
4. Анисимов, В. Н. Хронометр жизни / В. Н. Анисимов. // Природа. – 2007. - № 7. – С. 3-10.
5. Антиоксидантная активность гистохрома и некоторых лекарственных препаратов, применяемых в офтальмологии / И. В. Бабенкова [и др.] // Вест. офтальмол. – 1999. - № 4. – С. 22-24.
6. Антиоксидантные свойства производных 3-оксипиридина: мексидола, эмоксипина и проксипина / Г. И. Клебанов [и др.] // Вопр. мед. хим. - 2001. - № 3. – С. 88-300.
7. Бабенкова, И. В. Роль функциональной активности полиморфно-ядерных лейкоцитов крови и перекисного окисления липидов в патогенезе увеита: автореф. дис. ... канд. мед. наук / И. В. Бабенкова - Москва, 1991. – 24 с.
8. Бейшенова, Г. А. Роль свободнорадикального окисления в патогенезе увеитов (обзор литературы) / Г. А. Бейшенова, Н. Б. Чеснокова. // Росс. офтальмол. журнал. – 2015. – Т. 9, № 2. – С. 99-105.
9. Ванин, А.Ф. Оксид азота в биологии: история, состояние и перспективы исследований / А.Ф. Ванин // Биохимия. – 1998. – Т. 63, № 7. – С. 867-869.
10. Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы и антиоксиданты / Ю.А. Владимиров // Вестн. РАМН. – 1998. - № 7. – С. 43-51.

11. Влияние инстилляций дексаметазона и супероксиддисмутазы на течение увеита и локальные биохимические процессы (экспериментальное исследование) / Чеснокова Н. Б. [и др.] // Вест. офтальм. – 2015. – Т. 131, № 3. – С. 71-75.
12. Влияние местного применения дексаметазона и супероксиддисмутазы на характер клинического течения и биохимические параметры водянистой влаги при увеите (экспериментальное исследование) / Г. А. Бейшенова [и др.] // IX Всероссийская научная конференция молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы офтальмологии»: сб. трудов. – Москва: Офтальмология, 2014. – С. 81-83.
13. Воронина, Т. А. Антиоксидант мексидол. Основные нейropsychотропные эффекты и механизм действия / Т. А. Воронина // Психофармакология и биологическая наркология. – 2001. - № 1. – С. 2-12.
14. Гаджиев, Р. В. Влияние некоторых интраокулярных факторов и перекисного окисления липидов на течение диабетической ретинопатии: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Р. В. Гаджиев. - Москва, 1985. – 18 с.
15. Гемосорбция при лечении аутоиммунных заболеваний глаз / М. М. Краснов [и др.] // Вестн. офтальмол. – 1987. - № 5. – С. 48-49.
16. Гнездилова, А. В. ГАМК-эргический механизм цереброваскулярного эффекта Мексидола / А. В. Гнездилова, Т. С. Ганьшина, Р. С. Мирзоян // Эксп. клин. фармакол. – 2010. – Т. 73, № 10. – С. 11-13.
17. Гусева, М. Р. Диагностика и патогенетическая терапия увеитов у детей: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / М. Р. Гусева - Москва, 1996. - 65 с.
18. Давыдова, Н. Г. Результаты применения препарата Мексидола в составе комплексной терапии больных первичной открытоугольной глаукомой / Н. Г. Давыдова, Е. М. Коломойцева, И. В. Цапенко // Рос. офтальмол. журн. – 2012. – Т. 5, № 3. – С. 19-24.

19. Егоров, А. Е. Применений Мексидола у больных с оптическими нейропатиями / А. Е. Егоров, Э. М. Касимов, Б. В. Обруч // Клин. офтальмол. – 2002. – № 2. – С. 81-83.
20. Елисеева, Е. В. Интравазальное лазерное облучение аутокрови в лечении некоторых заболеваний глаз / Е. В. Елисеева // Вестн. офтальмол. – 1994. - № 2. – С. 23-24.
21. Жинко, Ю. Н. Применение перевязочных материалов с мексидолом, иммобилизированным методом текстильной печати, для лечения гнойных ран: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Ю. Н. Жинко. - Смоленск, 1999. – 25 с.
22. Журавлев, А. И. Биоантиокислители в регуляции метаболизма / А. И. Журавлев. - Москва: Наука, 1982. – 240 с.
23. Зайцева, Н. С. Итоги и перспективы развития иммунологических исследований в офтальмологии / Н. С. Зайцева // Актуальные вопросы офтальмологии: материалы науч.-практ. конф. – Москва: 1995. – С. 189-217.
24. Зборовская, И. А. Антиоксидантная система организма, ее значение в метаболизме. Клинические аспекты / И. А. Зборовская, М. В. Банникова // Вестник РАМН. – 1995. - № 6. – С. 53-60.
25. Зенков, Н. К. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты / Н. К. Зенков, В. З. Ланкин, Е. Б. Меньщикова. – Москва: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001. - 343 с.
26. Зиангирова, Г. Г. Перекисное окисление липидов в патогенезе первичной открытоугольной глаукомы / Г. Г. Зиангирова, О. В. Антонова // Вестн. офтальмол. – 2003. - № 4. – С. 54-55.
27. Иванов, Ю. В. Влияние мексидола и кортексина на течение острого панкреатита у крыс / Ю. В. Иванов, В. В. Яснецов // Эксп. клин. фармакол. – 2000. – Т. 63, № 1. – С. 41-44.

28. Изменение антиокислительной активности слезной жидкости при экспериментальной ожоговой болезни глаз / О. В. Гулидова [и др.] // Бюлл. exper. биол. и медицины. - 1999. – Т. 128, № 11. – С. 571-574.
29. Изменения субпопуляций Т-лимфоцитов при увеитах / Н. С. Зайцева [и др.]. – Москва, 1989. – 39 с.
30. Использование супероксиддисмутазы в наночастицах в лечении экспериментального увеита / Н. Б. Чеснокова [и др.] // VII Российский общенациональный офтальмологический форум: сб. науч. тр. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Москва: Апрель, 2014. – Т. 2. – С. 464-465.
31. Исследование суммарной активности трипсиноподобных протеиназ и антипротеолитической активности в слезной жидкости при воспалительных заболеваниях глаз для выбора рациональной терапии / сост.: Н. Б. Чеснокова, Т. П. Кузнецова: метод. рек. – Москва, 1995. – 10 с.
32. Камилов, Ф. Х. Активность перекисного воспаления липидов и антиоксидантных ферментов в слезной жидкости при посттравматическом увеите / Ф. Х. Камилов, Г. А. Винькова, Н. С. Орлова // Клин. лаб. диагн. – 1999. - № 7. – С. 7-9.
33. Катаргина, Л. А. Эндогенные увеиты у детей и подростков / Л. А. Катаргина, А. В. Хватова. – Москва: Медицина, 2000. - 320 с.
34. Клебанов, Г. И. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения красного диапазона на активность супероксиддисмутаза макрофагов / Г. И. Клебанов, Е. А. Полтанов, Ю. А. Владимиров // Биофизика. – 2003. – Т. 48, № 3. – С. 462-473.
35. Клинико-иммунологическое обоснование дифференцированного подхода к применению кортикостероидов при S-зависимых увеаретинитах / О. С. Слепова [и др.] // Вестн. офтальмол. – 1996. – Т. 112, № 2. – С. 45-47.
36. Клиническое значение антиокислительной активности сыворотки крови и слезной жидкости при эндогенных увеитах у детей / Л. А. Катаргина [и др.] // Вестн. офтальмол. – 2003. - № 2. – С. 20-21.

37. Комаров, О. С. Эффективность применения антиоксидантов при экспериментальном увеите / О. С. Комаров, И. В. Бабенкова, А. А. Терентьев // Вестн. РГМУ. – 2006. – Т. 3, № 50. – С. 66-71.
38. Комов, В. П. Гормональная регуляция оборота супероксиддисмутазы в печени крыс / В. П. Комов, Е. Ю. Иванова // Вопр. мед. Химии. – 1983. – Т. 29, №. 5. – С. 79-82.
39. Комплексная иммунологическая оценка состояния больных с некоторыми формами увеаретинальной патологии / О. С. Слепова [и др.] // Вестн. Офтальмол. – 1991. - № 4. – С. 49-53.
40. Кондрашева, М. Н. Терапевтическое действие янтарной кислоты / М. Н. Кондрашева. – Пущино: Наука, 1996. – 236 с.
41. Костюк, В. А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В. А. Костюк, А. И. Потапович, Ж. В. Ковалева // Вопр. мед. хим. – 1990. - № 2. – С. 88-91.
42. Кот, О. А. Роль ингибиторов протеолитических ферментов в патогенезе и лечении воспалительных заболеваний глаз / О. А. Кот, В. А. Проценко // Офтальмол. журн. – 1987. - № 6. – С. 373-378.
43. Кравчук, Е. А. Роль свободнорадикального окисления в патогенезе заболеваний глаз / Е. А. Кравчук // Вестн. офтальмол. – 2004. - № 5. – С. 48-51.
44. Логунов, Н. А. Патогенетическое обоснование применения антиоксидантов в терапии центральной хориоретинальной дегенерации: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Логунов Н. А. - Чита, 2002 – 19 с.
45. Лукьянова, Л. Д. Новые подходы к созданию антигипоксантов метаболического действия / Л. Д. Лукьянова // Вестник Росс. Акад. Мед. Наук. – 1999. - № 3. – С. 18-25.

46. Лукьянова, Л. Л. Кислородзависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние / Л. Л. Лукьянова. – Москва: Наука, 1982. - 301 с.
47. Любичкий, О. Б. Определение антиоксидантной активности биологических жидкостей хемилюминесцентным методом: автореф. дис. ... канд. биол. наук / О. Б. Любичкий. – Москва, 1999. - 21 с.
48. Малышев, В. Е. Опыт применения препарата Мексидола в комплексном амбулаторном лечении заболеваний глаз дегенеративно-дистрофического происхождения / В. Е. Малышев, О. И. Сальникова // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2006. - № 1. – С. 55-57.
49. Марачева, Н. М. Клиническая эффективность препарата Мексидол в комплексном лечении острого посттравматического увеита и его влияние на показатели локальной гемодинамики у пациентов с проникающим ранением глазного яблока / Н. М. Марачева, И. Е. Панова, Т. В. Графова // Рос. офтальмол. журн. – 2012. – Т. 5, № 1. – С. 51-56.
50. Махмутова, Т. И. Оценка иммунных и биохимических факторов в патогенезе тромбозов ретинальных вен и эффективность эндоваскулярной лазерной терапии: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Т. И. Махмутова. – Москва, 1995. - 23 с.
51. Машковский, М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский. - Изд. 13-е. Харьков: Торсинг, 1997; 2 - 339 с.
52. Маянский, А. Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге / А. Н. Маянский, Д. Н. Маянский. - Новосибирск: Наука, 1989. - 215 с.
53. Мексидол в комплексном лечении глаукомы / Е. А. Егоров [и др.] // Клин. офтальмол. – 2011. – Т. 2, № 3. – С. 107-111.
54. Нарушения иммунитета и лечение увеитов / Н. С. Зайцева [и др.] Москва: Медицина - 1991. – 29 с.
55. Насонова, В. А. Ревматические болезни. Руководство по внутренним болезням / В. А. Насонова, Н. В. Бунчук. – Москва: Медицина, 1997. – 520 с.

56. Нероев, В. В. Моделирование иммуногенного увеита у кроликов / В. В. Нероев, Г. А. Давыдова, Т. С. Перова // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2006. – Т. 142, № 11. – С. 598-600.
57. Окислительный стресс при увеите и его коррекция антиоксидантным ферментом супероксиддисмутазой (экспериментальное исследование) / Н. Б. Чеснокова [и др.] // Вест. офтальм. – 2014. – Т. 130, № 5. – С. 30-36.
58. Окислительный стресс: клинико-метаболические показатели и полиморфный маркер гена каталазы при развитии ретинопатии у больных сахарным диабетом II типа / О.С. Булатова [и др.] // Клин. эндокринол. – 1999. – Т. 45, № 4. – С. 3-7.
59. Основы иммунодиагностики. Клиническая иммунология: руководство для врачей / под ред. Е. И. Соколова. – Москва: Медицина, 1998. – С. 57-78.
60. Поберезкина, Н. Б. Биологическая роль супероксиддисмутазы / Н. Б. Поберезкина, Л. Ф. Лосинская // Укр. биохим. журн. – 1989. – Т. 61, № 2. – С. 14-27.
61. Погосян, Г. Г. Ингибирование липидной пероксидации супероксиддисмутазой и церулоплазмином / Г. Г. Погосян, Р. М. Налбандян // Биохимия. – 1983. – Т. 48, № 7. – С. 1129-1134.
62. Получение кальций-фосфатных наночастиц, содержащих тимолол, и оценка их влияния на внутриглазное давление в эксперименте / Е. В. Шимановская [и др.] // Вестн. Офтальмол. – 2012. – Т. 128, № 3. – С. 15-18.
63. Принципы оценки состояния свободнорадикальных процессов в офтальмопатологии и эффективность антиоксидантной терапии / И. В. Бабенкова [и др.] // Вестн. РГМУ. – 2005. – Т. 2, № 41. – С. 46-49.
64. Роль изменений биохимических показателей в слезе и во влаге передней камеры в патогенезе увеита у кроликов (экспериментальное исследование) / Г. А. Бейшенова [и др.] // Актуальные вопросы современной медицины: сб. трудов: Екатеринбург, 2015. – Т. 2. – С. 17-20.
65. Роль изменений биохимических показателей во влаге передней камеры

- глаза в патогенезе увеита у кроликов (экспериментальное исследование) / Н. Б. Чеснокова [и др.] // VI Российский общенациональный офтальмологический форум: сб. науч. тр. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Москва: Апрель, 2013. – Т. 2. – С. 575-580.
66. Роль перекисного окисления липидов в патогенезе развития травматического гемофтальма / А. Д. Ромашенко [и др.] // Вестн. Офтальмол. – 1981. - № 2. – С. 51-53.
 67. Слепова, О. С. Органоспецифический иммунитет при воспалительной патологии сетчатки и увеального тракта: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / О. С. Слепова. – Москва, 1991. – 47 с.
 68. Смирнов, Л. Д. 3-оксипроизводные шести членных азотистых гетероциклов. Синтез, ингибирующая активность и биологические свойства / Л. Д. Смирнов, К. М. Дюмаев // Хим. фарм. журнал. – 1982. – Т. 16, № 4. – С. 28-44.
 69. Сравнительная характеристика иммунологического статуса больных герпетическим и ревматоидным увеитом / Г. Х. Зайнутдинова [и др.] // Клини. Офтальм. – 2005. – Т. 6, № 4. – С. 144-146.
 70. Сравнительное экспериментальное исследование влияния глазных капель на основе производных 3-оксипиридина (мексидола и эмоксипина) на локальные метаболические процессы и заживление ожоговой раны глаза кролика различной локализации. Сообщение 1. Центральная рана роговицы / Н. Б. Чеснокова [и др.] // Рос. офтальм. журн. – 2013. – Т. 6, № 1. – С. 81-85.
 71. Сравнительное экспериментальное исследование влияния глазных капель на основе производных 3-оксипиридина (мексидола и эмоксипина) на локальные метаболические процессы и заживление ожоговой раны глаза кролика различной локализации. Сообщение 2. Послеожоговая ишемия конъюнктивы / Н. Б. Чеснокова [и др.] // Рос. офтальм. журн. – 2013. – Т. 6, № 2. – С. 94-99.

72. Тарусов, Б. Н. Физико-химические механизмы биологического действия ионизирующих излучений / Б. Н. Тарусов // Успехи соврем. биологии. – 1957. – Т. 44, № 2. – С. 171-185.
73. Тимическая недостаточность и ее коррекция у больных рецидивирующим офтальмогерпесом / Р. В. Петров [и др.] // Вестн. Офтальмол. – 1988. - № 6. – С. 39-41.
74. Универсальный регулятор - $\alpha 2$ -макроглобулин / Н. А. Зорин [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2004. - № 11. – С. 18-22.
75. Цитокиновый профиль слезной жидкости при разных формах офтальмопатологии и возрастные нормы / О. С. Слепова [и др.] // VII Российский общенациональный офтальмологический форум: сб. науч. тр. науч.-практ. конф. с междунар. участием, 30 сент. – 2 окт. – Москва: Апрель, 2014. – Т. 2. - С. 456-460.
76. Ченцова, О. Б. Обменный плазмаферез в комплексном лечении тяжелых увеитов / О. Б. Ченцова, М. П. Гречаный, А. В. Кильдюшевский // Вестн. офтальм. – 1989. - № 1. – С. 40-43.
77. Чеснокова, Н. Б. Роль протеолитических ферментов и их ингибиторов в патологии роговицы: дис. ... д-ра. биол. наук / Н. Б. Чеснокова. – Москва, 1991. - 308 с.
78. Шинкаренко, Н. В. Химическая основа поведения синглетного кислорода в организме человека / Н. В. Шинкаренко // Вопр. мед. химии. – 1986. - № 5. – С. 2-7.
79. Эммануэль, Н. М. Лейкоз у мышей и особенности его развития при воздействии ингибиторов цепных окислительных процессов / Н. М. Эммануэль, Л. П. Липчина // Доклады АН СССР. – 1958. – Т. 121, № 1. – С. 141-144.
80. Югай, М. Т. Роль свободнорадикального окисления в патогенезе увеальной катаракты (экспериментально-клиническое исследование): автореф. дис. ... канд. мед. наук / М. Т. Югай. - Самара, 1996. - 16 с.

81. 8-Isoprostaglandin F2a and ascorbic acid concentration in the aqueous humor of patients with exfoliation syndrome / G. G. Koliakos [et al.] // Br. J. Ophthalmol. – 2003. – V. 87, № 3. – P. 353-356.
82. A non-glycosylated extracellular superoxide dismutase variant / A. Edlund [et al.] // Biochem. J. – 1992. – V. 288. – P. 451-456.
83. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant / R. J. Reiter [et al.] // J. Pineal Res. – 1995. – V. 18. – P. 1 – 11.
84. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system / A. Carrillo-Vico [et al.] // Endocrine. – 2005. – V. 27, № 2. – P. 189–200.
85. Activity of nitric oxide synthase and concentration of nitric oxide end metabolites in the gingiva under experimental pathological conditions / V. L. Popkov [et al.] // Bull. Exp. Biol. Med. – 2005. – V. 140, № 4. – P. 391-393.
86. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluid / L.C. Green [et al.] // Annal. Biochem. – 1982. - Vol. 126. - P.131-138.
87. Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients / P. Lissoni [et al.] // Neuro Endocrinol. Lett. – 2001. – V. 22. – P. 45-47.
88. Aspirin, hydroxychloroquine and hepatic enzyme abnormalities with methotrexate in rheumatoid arthritis / J. F. Fries [et al.] // Arthritis Rheum. - 1990. – V. 33, № 11. – P. 1611-1619.
89. Babior, B. M. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent / B. M. Babior, R. S. Kipnes, J. T. Carnutte // J. Clin. Invest. – 1973. – V. 52. – P. 741-744.
90. Baldwin, H. A. An Improved Immunogenic Uveitis Test in Rabbits for Evaluation of Anti-inflammatory Compounds / H. A. Baldwin, A. R. Borgmann // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1970. – V. 133. - P. 1326-1330.
91. Barcellos-Hoff, M. H. Effects of nitric oxide on the production of transforming growth factor beta-1 by tumor cells / M. H. Barcellos-Hoff, T. A. Dix // Molec. Endocrinol. – 1996. – V. 10, № 9. - P. 1077–1083.

92. Bell, S. Therapeutic Calcium Phosphate Particles and Methods of Manufacture and Use / S. Bell, Q. He, T. Morco // US Patent № 6355271 B1; US 09/496,771; 2002.
93. Bhattacharjee. Is Internal Timing Key to Mental Health? / Bhattacharjee, Yudhijit // Science Mag (AAAS). – 2007. – V. 317. – P. 1488–1490.
94. Blood-retinal barrier disruption and ultrastructural changes in the hypoxic retina in adult rats: the beneficial effect of melatonin administration / C. Kaur [et al.] // J. Pathol. – 2007. – V. 212. – P. 429–439.
95. Brahmajothi, M. V. Heterogeneous basal expression of nitric oxide synthase and superoxide dismutase isoforms in mammalian heart: implications for mechanisms governing indirect and direct nitric oxide-related effects / M. V. Brahmajothi, D. L. Campbell // Circ. Rec. – 1999. – V. 85. – P. 575-587.
96. Calcium phosphate nanoparticles as efficient carriers for photodynamic therapy against cells and bacteria / J. Schwiertz [et al.] // Biomaterials. - 2009. – V. 30. – P. 3324-3331.
97. Calcium Phosphate Nanoparticles Induce Mucosal Immunity and Protection against Herpes Simplex Virus Type 2 / Q. He [et al.] // Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 2002. – V. 9. – P. 1021–1024.
98. Carlberg, C. The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship / C. Carlberg, I. Weisenberg // J Pineal Res. – 1995. – V. 18. – P. 171- 178.
99. Cejkova, J. The damaging effect of UV rays below 320 nm on the rabbit anterior eye segment. II. Enzyme histochemical changes and plasmin activity after prolonged irradiation / J. Cejkova, Z. Lojda // Acta Histochem. – 1995. – V. 97, № 2. – P. 183-188.
100. Congdon, N. G. Prevention strategies for age related cataract: present limitations and future possibilities / N. G. Congdon // Br. J. Ophthalmol. - 2001. – V. 85, № 5. – P. 516-520.

101. Costa, E. J. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin / E. J. Costa, R. H. Lopes, M. T. Freund // *J Pineal Res.* – 1995. – V. 18. – P. 123-126.
102. Cronstein, B. N. Molecular mechanism of methotrexate action in inflammation / B. N. Cronstein // *Inflammation.* – 1992. – V. 16, № 5. – P. 411-423.
103. Cu, Zn-superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells / G. A. Keller [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – V. 88. – P. 7381-7385.
104. Effect of antioxidant enzymes on experimental uveitis in rats / Y. Kozak [et al.] // *Ophthalmic. Res.* – 1989. – V. 21, № 3. – P. 230-234.
105. Effect of iron chelation on severity of ocular inflammation in an animal mode / N. A. Rao [et al.] // *Arch. Ophthalmol.* – 1988. – V. 104, № 11. – P. 1369-1371.
106. Effect of melatonin on the retinal glutamate/glutamine cycle in the golden hamster retina / D. A. Sáenz [et al.] // *FASEB J.* – 2004. – V. 18. – P. 1912–1913.
107. Effect of superoxide dismutase on experimental allergic uveitis / Hu, S. [et al.] // *Yan Ke Xue Bao.* – 1993. – V. 9, № 2. – P. 103-105.
108. Effect of superoxide dismutase on the autoxidation of various hydroquinones, a possible role of superoxide dismutase as a superoxide: semiquinone oxidoreductase / E. Cadenas [et al.] // *Free Radical Biol. Med.* – 1988. – Vol. 5. – P. 71-79.
109. Effective transfection of cells with multi-shell calcium phosphate-DNA nanoparticles / V. Sokolova [et al.] // *Biomaterials.* – 2006. – V. 27. – P. 3147–3153.
110. Effects of intraperitoneal vitamin E, melatonin and aprotinin on leptin expression in the guinea pig eye during experimental uveitis / A. Kukner [et al.] // *Acta Ophthalmol. Scand.* – 2006. – V. 84. – P. 54-61.
111. Encapsulation of Organic Molecules in Calcium Phosphate Nanocomposite Particles for Intracellular Imaging and Drug Delivery / T. Morgan [et al.] // *Nano. Lett.* – 2008. – V. 8. – P. 4108-4115.

112. Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease / J. T. Rosenbaum [et al.] // *Nature*. – 1980. – V. 286. – P. 611-613.
113. Evaluation of Novel Particles as Pulmonary Delivery Systems for Insulin in Rats / Garcia-Contreras [et al.] // *AAPS Pharm. Sci. L.* – 2003. – V. 5. – P. 10-20.
114. Evidence for local synthesis of melatonin in golden hamster retina / M. P. Faillace [et al.] // *Neuroreport*. - 1995; V. 6. – P. 2093–2095.
115. Extracellular superoxide dismutase activity is affected by dietary zinc intake in nonhuman primate and rodent models / K. L. Olin [et al.] // *Amer. J. Clin. Nutr.* – 1995. – V. 61. – P. 1263-1267.
116. Forrester, J. Uveitis: pathogenesis. / J. Forrester // *Lancet*. – 1991. – V. 338. – P. 1498-1501.
117. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system / R. J. Reiter [et al.] // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2001. – V. 939. – P. 200–215.
118. Fridovich, I. Superoxide dismutases / I. Fridovich // *J. Biol. Chem.* – 1989. – V. 264. – P. 7761-7764.
119. Fujikawa, L. S. Hyperosmolar hyperglycemic nonketotic coma. A complication of short-term systemic corticosteroid use / L. S. Fujikawa, D. M. Meisler, R. A. Nozik // *Ophthalmology*. – 1983. – V. 90, № 10. – P. 1239-1242.
120. Fujita, T. Formation and removal of reactive oxygen species, lipid peroxides and free radicals, and their biological effects / T. Fujita // *Yakugaku Zasshi*. - 2002. – V. 122, № 3. – P. 203-218.
121. Garner, B. Formation of Hydroxyl Radicals in the Human Lens is Related to the Severity of Nuclear Cataract / B. Garner, V. J. Davies, R.J.W. Truscott // *Exp. Eye Res.* – 2000. – V. 70. – P. 81-88.
122. Green, D. Mineralized polysaccharide capsules as biomimetic microenvironments for cell, gene and growth factor delivery in tissue engineering / D. Green, S. Mann, O. Oreffo // *Soft. Matter*. – 2006. – V. 2. - P. 732-737.

123. Guha, M. LPS induction of gene expression in human monocytes / M. Guha, N. Mackman // *Cell Signal.* – 2001. – V. 13. – P. 85-94.
124. He, Q. Biodegradable Calcium Phosphate Nanoparticles as a New Vehicle for Ocular Delivery of a Potential Ocular Hypotensive Agent / Q. He, T. C. Chu, D. Potter // *J. of Ocular Pharm. and Therap.* – 2002. – V. 18. - 507-514.
125. High-efficiency gene delivery for expression in mammalian cells by nanoprecipitates of Ca-Mg phosphate / E. Chowdhury [et al.] // *Gene.* – 2004. – V. 341. – P. 77-82.
126. Huerto-Delgadillo, L. Effects of melatonin in microtubule assembly dependent on hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist / L. Huerto-Delgadillo, F. Anton-Tay, G. Benitez-King // *J. Pineal Res.* – 1994. – V. 17. – P. 55–62.
127. Huether, G. The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates / G. Huether // *Experientia.* – 1993. – V. 49. – P. 665–670.
128. Human S-antigen: presence of multiple immunogenic and immunopathogenic sites in the Lewis rat / M. D. De Smet [et al] // *J Autoimmun.* – 1993. – V. 6, № 5. – P. 587-599.
129. Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin / D. Pozo [et al.] // *J. Cell Biochem.* – 1997. – V. 65. – P. 430- 442.
130. Inhibition of corneal inflammation by an acylated superoxide dismutase derivative / E. Ando [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 1990. - V. 31, № 10. - P. 1963-1967.
131. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by N1-acetyl-5-methoxykynuramine, a brain metabolite of melatonin / J. León [et al.] // *J. Neurochem.* – 2006. – V. 98. – P. 2023–2033.
132. Inoue, M. Targeting SOD by gene and protein engineering and inhibition of oxidative stress in various diseases. *Antioxidants in Therapy and Preventive*

- Medicine / M. Inoue, N. Watanabe // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1990. – V. 264. – P. 5-12.
133. Ischemia/reperfusion induced arrhythmias in the isolated rat heart: prevention by melatonin / D. X. Tan [et al.] // *J. Pineal. Res.* – 1998. - V. 25. – P. 184-191.
 134. Lyceum Chinense and Calcium Phosphate Nanoparticles for Ophthalmic Drug Delivery / Zhang, X. [et al.] // *Nanotech.* – 2008. – V. 2. – P. 4014.
 135. Lymphocyte responses to peptide M and retinal S-antigen in uveitis patients / S. Hirose [et al.] // *Jap. J. Ophthalmol.* – 1990. – V. 34, № 3. – P. 298-305.
 136. Malondialdehyde and antioxidant enzyme levels in the aqueous humor of rabbits in endotoxin-induced uveitis / A. Satıcı [et al.] // *Eur. J. Ophthalmol.* – 2003. – V. 9, № 10. – P. 779-783.
 137. Marklund, S. L. Expression of extracellular superoxide dismutase by human cell lines / S. L. Marklund // *J. Biochem.* – 1990. – V. 266. – P. 213-219.
 138. Marklund, S. L. Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines / S. L. Marklund // *J. Clin. Invest.* – 1984. – V. 74. – P. 1398-1403.
 139. Marklund, S. L. Extracellular-superoxide dismutase, distribution in the body and therapeutic implications. / S. L. Marklund, K. Karlsson // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1990. – V. 264. – P. 1-4.
 140. Marklund, S. L. Regulation by cytokines of extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in fibroblasts / Marklund, S. L. // *J. Biol. Chem.* – 1992. – V. 267. – P. 6696-6701.
 141. Marshall, G. E. Antioxidant enzymes in the human iris: an immunogold study / G. E. Marshall // *Br. J. Ophthalmol.* – 1997. – V. 81. - № 4. – P. 314-318.
 142. Matuszek, Z. Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radical: EPR and spin trapping investigations / Z. Matuszek, K. J. Reszka, C. F. Chignell // *Free Radical Biol. Med.* – 1997. – V. 23. – P. 367-372.
 143. McElroy, M. C. Catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities of lung and liver during human development / M. C. McElroy, A. D. Postle, F. J. Kelly // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1992. – V. 111, № 2. - 153-158.

144. Melatonin and its precursors exhibit nitric oxide scavenging activity / Y. Noda [et al.] // Pathophysiology. – 1998. – V. 5. – P. 85.
145. Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age- related diseases / R. J. Reiter [et al.] // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1994. – V. 31, № 719. – P. 1-12.
146. Melatonin as a pharmacological agent against oxidative damage to lipids and DNA / R. J. Reiter [et al.] // Proc. West Pharmacol. Soc. – 1998. – V. 41. – P. 229-236.
147. Melatonin decreases production of hydroxyl radical during cerebral ischemia-reperfusion / X. J. Li [et al.] // Acta Pharmacol. Sin. – 1997. – V. 18. – P. 394-396.
148. Melatonin in the treatment of cancer: a systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis / E. Mills [et al.] // J. of Pineal Res. – 2005. – V. 39, № 4. – P. 360.
149. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex / M. Kolter [et al.] // J. Pineal Res. – 1998. – V. 24. – P. 83-99.
150. Melatonin is a scavenger of peroxynitrite anion / E. Gilad [et al.] // Life Sci. – 1997. – V. 60. – P. 169-174.
151. Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the Alzheimer amyloid peptide / M. A. Pappolla [et al.] // J. Neurosci. – 1997. – V. 17. – P. 1683–1690.
152. Melatonin prevents increases in neural nitric oxide and cyclic GMP production after transient brain ischemia and reperfusion in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) / J. M. Guerrero [et al.] // J. Pineal. Res. - 1997. – V. 23. – P. 24 - 31.
153. Melatonin reduces gamma radiation-induced primary DNA damage in human blood lymphocytes / Vijayalaxmi [et al.] // Mutat Res. – 1998. – V. 397. – P. 203-208.

154. Model corasol-induced seizures are followed by increase of nitric oxide generation and are abolished by mexidol and alphatocopherol / G. Iu. Vitskova [et al.] // *Eksp. Klin. Farmakol.* – 2003. – V. 66, № 4. – P. 3-5.
155. Molecular tools to study melatonin pathways and actions / J. A. Boutin [et al.] // *Trends in Pharmacological Sciences.* - 2005. – V. 26, № 38. – P. 412–419.
156. Nagata, M. Inflammatory cells and oxygen radicals / M. Nagata // *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* – 2005. – V. 4. – P. 503-504.
157. Non-enzymic glycation of human extracellular superoxide dismutase / T. Adachi [et al.] // *Biochem. J.* – 1991. – V. 279. – P. 263-267.
158. Nussenblatt, R. B. Experimental autoimmune uveitis and its relationship to clinical ocular inflammatory disease / R. B. Nussenblatt, I. J. Gery // *Autoimmun.* – 1996. – V. 9, № 5. – P. 575-585.
159. Oxidative damage and protection of the RPE / J. Cai [et al.] // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2000. – V. 19, № 2. – P. 205-221.
160. Photophysical properties of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl) porphyrin-(m-THPP), 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl) chlorin (m-THPC) and 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)bacteriochlorin (m-THPBC): a comparative study / R. Bonnett [et al.] // *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* – 1999. – V. 2. – P. 325–328.
161. Photophysics of Cy3-Encapsulated Calcium Phosphate Nanoparticles / H. Muddana [et al.] // *Nano Lett.* – 2009. – V. 9. – P. 1559-1566.
162. Photoreceptor mitochondrial tyrosine nitration in experimental uveitis / G. S. Wu [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2005. – V. 46. – P. 2271-2281.
163. Physiological concentrations of melatonin inhibit the nitridergic pathway in the Syrian hamster retina / D. A. Sáenz [et al.] // *J. Pineal Res.* – 2002. – V. 33. – P. 31–36.
164. Pineal melatonin rhythm: reduction in aging Syrian hamsters / R. J. Reiter [et al.] // *Science.* – 1980. – V. 210. – P. 1372-1373.

165. Potent protective effect of melatonin on chromium (VI) induced DNA single strand breaks, cytotoxicity, and lipid peroxidation in primary cultures of rat hepatocytes / N. Susa [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1997. – V. 144. – P. 377-384.
166. Preparation and investigation of calcium-phosphate particles containing superoxide dismutase for ophthalmology applications / V. Galitskiy [et al.] // “Science of the future conference”: сб. трудов. – Санкт-Петербург, 2014. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.p220conf.ru/abstracts/download/8-chem/365-n-klyacnko> (дата обращения 28.12.2014).
167. Protective effect of melatonin against hippocampal DNA damage induced by intraperitoneal administration of kainate to rats / T. Uz [et al.] // *Neuroscience.* – 1996. – V. 73. – P. 631- 636.
168. Protective effect of melatonin in a non-septic shock model induced by zymosan in the rat / S. Cuzzocrea [et al.] // *J Pineal Res.* – 1998. – V. 25. – P. 24-33.
169. Protective effects of melatonin in experimental free radical-related ocular diseases / A. W. Siu [et al.] // *J. Pineal Res.* – 2006. – V. 40. – P. 101–109.
170. Protein measurement with the folin phenol reagent / O. Lowry [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1951. – V. 193 . – P. 265-275.
171. Quantitative analysis of extracellular-superoxide dismutase in serum and urine by ELISA with monoclonal antibody / T. Adachi [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 1992. – V. 212. – P. 89-102.
172. Raizman, M. Corticosteroid therapy of eye disease / M. Raizman // *Arch. Ophthalmol.* – 1996. – V. 114, № 8. – P. 1000-1001.
173. Rao, N. A. Free radical mediated photoreceptor damage in uveitis / N. A. Rao, G. S. Wu // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2000. – V. 19. – P. 41-68.
174. Rao, N. A. Mechanism of tissue injury in uveitis / N. A. Rao, G. S. Wu, G. Pararajasegaram // *Reg. Immunol.* – 1994. – V. 6. – P. 95-100.

175. Reiter, R. J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain / R. J. Reiter // *FASEB J.* – 1995. – V. 9. – P. 526-533.
176. Reiter, R. J. Oxidative toxicity: in models of neurodegeneration: responses to melatonin / R. J. Reiter, J. Pie, J. Garcia // *J. Restr. Neurol. Neurosci.* – 1998. – V. 12. – P. 135-142.
177. Relationship between the Ligand Structure of Copper and the Stability of Superoxide Dismutase / Kajihara J. [et al.] // *Agric. Biol. Chem.* – 1990. – V. 54. – P. 495-499.
178. Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light / M. I. Pablos [et al.] // *Neurochem. Int.* – 1998. – V. 32. – P. 69-75.
179. Steve, B. Intraocular Delivery Compositions and Methods Cross-Reference to Related Application / B. Steve, Q. He, T. Chu // *US Patent № WO 2004050065 (A1); PCT/US2003/036335; 2004.*
180. Saraswathy, S. Photoreceptor mitochondrial oxidative stress in experimental autoimmune uveitis / S. Saraswathy, N. A. Rao // *Ophthalmic. Rec.* – 2008. – V. 40. – P. 160-164.
181. Shida, C. S. High melatonin solubility in aqueous medium / C. S. Shida, A. ML. Castrucci, M. T. Limy-Freund // *J. Pineal Res.* – 1994. – V. 16. – P. 198-201.
182. Spectral Responses of the Human Circadian System Depend on the Irradiance and Duration of Exposure to Light / J. G. Joshua [et al.] // *Science Translational Medicine.* – 2010. – V. 2, № 31. – P. 31-33.
183. Srivastava, S. K. Focus on molecules: nuclear factor-kappa B / S. K. Srivastava, K. V. Ramana // *Exp. Eye Res.* – 2009. – V. 88. – P. 2-3.
184. Stasica, P. Melatonin as a hydroxyl radical scavenger / P. Stasica, P. Ulanski, J. M. Rosiak // *J. Pineal Res.* – 1998. – V. 25. – P. 65-66.
185. Steinman, H. M. Chemical aspects of structure, function and evolution among superoxide dismutases: The general scenario and the bacteriocuprein exceptions.

- Oxy Radicals and Their Scavenger Systems / H. M. Steinman // N.Y.: Elsevier. – 1983. – V. 1. – P. 167-178.
186. Study of Structural and Photoluminescent Properties of $\text{Ca}_8\text{Eu}_2(\text{PO}_4)_6\text{O}_2$ / C. Silva [et al.] // J. Fluoresc. – 2008. – V. 18. – P. 253–259.
 187. Superoxide dismutase isoforms in the human eye / A. Behndig [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. - 1998. - Vol. 39, № 3. – P. 471-475.
 188. Superoxide dismutase isoenzymes in the normal and diseased human cornea / A. Behndig [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2001. – V. 42. – P. 2293-2296.
 189. Superoxide in ocular inflammation: human and experimental uveitis / M. Yamada [et al.] // J. Free Radic. Biol. Med. – 1986. – V. 2, № 2. – P. 111-117.
 190. Tan, D. X. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. D. X. Tan // Endocr. J. - 1993. – V. 1. – P. 57-60.
 191. The influence of anticonvulsant and antioxidant drugs on nitric oxide level and lipid peroxidation in the rat brain during pentylenetetrazole-induced epileptiform model seizures/ V. Bashkatova [et al.] // A. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. – 2003. – V. 27, № 3. – P. 487-492.
 192. The interstitium of human arterial wall contains very large amounts extracellular superoxide dismutase. Arterioscler / P. Stralin [et al.] // Thromb. and Vasc. Biol. – 1995. – V. 15. – P. 2032-2036.
 193. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances / R. Hardeland [et al.] // Neurosci. Biobehav. Rev. – 1993. – V. 17. – P. 347-357.
 194. Therapeutic Effect of Melatonin in Experimental Uveitis / P. H. Sande [et al.] // Am. J. Pathol. – 2008. – V. 173, № 6. – P. 1702–1713.
 195. Torel, J. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical / J. Torel, J. Gillard, P. Gillard // Phytochemistry. – 1986. – V. 25, № 4. – P. 383-385.
 196. Treatment of persistent glaucoma secondary to periocular corticosteroids / L. Akduman [et al.] // Am. J. Ophthalmol. – 1996. – V. 122, № 2. – P. 275-277.

197. Ulceration is correlated with degradation of fibrin and fibronectin at the corneal surface / M. Berman [et al.] // Invest. Ophthalmol. – 1983. – V. 24, № 10. – P. 1358-1366.
198. Vijayalaxmi. Melatonin protects human blood lymphocytes from radiation-induced chromosome damage / Vijayalaxmi, R. J. Reiter, M. Meltz // Mutat Res. – 1995. – V. 346. – P. 23-31.
199. Wendel, A. Enzymes acting against reactive oxygen. Enzymes – Tool and Targets / A. Wendel // Basel: Karger. – 1988. – P. 161-167.
200. Yadav, U. C. Emerging role of antioxidants in the protection of uveitis complications / U. C. Yadav, N. M. Kalariya, K. V. Ramana // Curr Med. Chem. – 2011. – V. 18, № 6. – P. 931-942.
201. Zanma, A. Conjugates of superoxide dismutase with Fc fragment of immunoglobulin G / A. Zanma // J. Biochem. – 1991. – V. 110. – P. 868-872.