

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«РЯЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

КОЛЕСНИКОВ АЛЕКСАНДР ВЯЧЕСЛАВОВИЧ

**СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ПРИ РАЗНЫХ ТИПАХ  
ПАТОЛОГИИ ГЛАЗА И СПОСОБЫ ЕГО КОРРЕКЦИИ**

03.01.04 – Биохимия

14.01.07 – Глазные болезни

Диссертация на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Научные консультанты:

доктор медицинских наук,

профессор М.Г. Узбеков,

доктор медицинских наук,

профессор М.М. Шишкин

Рязань – 2020

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	20
1.1. Свободнорадикальные процессы в норме и при офтальмологической патологии.....	20
1.1.1. Свободнорадикальные реакции в физиологических условиях.....	20
1.1.2. Источники образования активных форм кислорода в организме...	21
1.1.3. Антиоксидантная система защиты.....	23
1.1.4. Свободнорадикальные реакции в патогенезе катаракты.....	25
1.1.5. Свободнорадикальные реакции в патогенезе гнойной язвы роговицы.....	29
1.1.6. Свободнорадикальные реакции в патогенезе тромбозов сосудов сетчатки.....	34
1.2. Вещества с антиоксидантной активностью и их применение с терапевтической целью.....	37
1.2.1. Современная классификация веществ с антиоксидантной активностью, используемых в медицинской практике.....	37
1.2.2. Антиоксидантные и другие биологические свойства 2,6-ди- <i>трет</i> -бутил-4-метилфенола.....	40
1.2.3. Антиоксидантные и другие биологические свойства лактоферрина.....	45
1.2.4. Антиоксидантные, нейропротекторные и другие биологические свойства этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина.....	47
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	52
2.1. Тест-система.....	52
2.2. Биохимические методы исследования.....	52
2.3. Офтальмологические методы исследования.....	54
2.4. Электрофизиологические методы исследования.....	54
2.5. Микробиологические методы исследования.....	55
2.6. Морфологические методы исследования.....	55

2.7. Исследование биохимических и терапевтических эффектов 2,6-ди- <i>трет</i> -бутил-4-метилфенола при экспериментальной катаракте.....	56
2.7.1. Дизайн исследования.....	56
2.7.2. Моделирование катаракты.....	58
2.7.3. Методы оценки полученных биологических эффектов.....	59
2.8. Исследование биохимических и терапевтических эффектов лактоферрина при экспериментальной гнойной язве роговицы.....	59
2.8.1. Дизайн исследования.....	59
2.8.2. Моделирование гнойной язвы роговицы.....	61
2.8.3. Методы оценки полученных биологических эффектов.....	61
2.9. Исследование биохимических и терапевтических эффектов этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина при экспериментальном тромбозе сосудов сетчатки.....	62
2.9.1. Дизайн исследования.....	62
2.9.2. Моделирование тромбоза сосудов сетчатки.....	64
2.9.3. Методы оценки полученных биологических эффектов.....	65
2.10. Метод статистического анализа полученных результатов.....	65
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>67</b>
3.1. Биологические эффекты применения 2,6-ди- <i>трет</i> -бутил-4-метилфенола при экспериментальной катаракте.....	67
3.1.1. Определение эффективной и безопасной антиоксидантной дозы 2,6-ди- <i>трет</i> -бутил-4-метилфенола для ткани хрусталика.....	67
3.1.2. Влияние 2,6-ди- <i>трет</i> -бутил-4-метилфенола на выраженность окислительного стресса в хрусталике при экспериментальной катаракте.....	70
3.1.3. Влияние 2,6-ди- <i>трет</i> -бутил-4-метилфенола на клиническую картину экспериментальной катаракты.....	84
3.2. Биологические эффекты лактоферрина при экспериментальной гнойной язве роговицы.....	95

3.2.1. Влияние лактоферрина на свободнорадикальный статус роговицы при экспериментальной гнойной язве.....	95
3.2.2. Влияние лактоферрина на микробиологический статус роговицы при экспериментальной гнойной язве.....	109
3.2.3. Влияние лактоферрина на клиническую и патоморфологическую картину экспериментальной гнойной язвы роговицы.....	112
3.3. Биологические эффекты этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина при экспериментальном тромбозе сосудов сетчатки...	137
3.3.1. Влияние этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина на выраженность окислительного стресса при экспериментальном тромбозе сосудов сетчатки.....	137
3.3.2. Влияние этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина на концентрацию нейромедиаторов в сетчатке при экспериментальном тромбозе ее сосудов.....	142
3.3.3. Влияние этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина на клиническую и патоморфологическую картину экспериментального тромбоза сосудов сетчатки.....	146
3.3.4. Влияние этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина на электроретинограмму при экспериментальном тромбозе сосудов сетчатки.....	158
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....</b>	<b>167</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>204</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>205</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>	<b>208</b>
<b>ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....</b>	<b>209</b>
<b>ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ....</b>	<b>210</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>212</b>
<b>БЛАГОДАРНОСТИ.....</b>	<b>245</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Снижение остроты зрения является одной из наиболее важных и социально значимых проблем медицины. Согласно систематическому обзору и мета-анализу 288 исследований, включающему 3 983 541 участников из 98 стран, в 2015 году число людей со слабым зрением составляло примерно 216,6 млн (от 98,5 до 359,1 млн). Из них 36,0 млн (от 12,9 до 65,4 млн) являлись слепыми [154].

Наиболее часто встречающимися патологическими процессами в глазу являются дегенеративно-дистрофические, воспалительные и дисциркуляторные состояния. Эти патологии характеризуются большой частотой распространения, тяжестью исходов, недостаточной эффективностью существующего лечения [60, 154, 198]. К заболеваниям, представляющим указанные типичные патологические процессы, относятся: возрастная катаракта (дегенеративно-дистрофический процесс) [29], гнойная язва роговицы (воспаление) [209] и острое нарушение кровообращения в системе собственных сосудов сетчатки (дисциркуляция) [231].

Возрастная катаракта занимает одно из ведущих мест в структуре снижения зрения у лиц пожилого возраста. Примерно 52,6 млн (от 18,2 до 109,6 млн) в мире страдают катарактой, при этом 12,6 млн (от 3,4 до 28,7 млн) являются слепыми [154]. Порядка 90% пациентам с катарактой при первичном обращении назначается консервативное лечение, хотя вопрос об его эффективности в настоящее время остается открытым [23, 30].

Воспалительные заболевания глаз инфекционной природы относятся к числу наиболее распространенных патологий человека. В Российской Федерации на долю бактериальной язвы роговицы приходится до 47,3% всей воспалительной патологии роговой оболочки [28]. Несмотря на применение современных антибактериальных лекарственных препаратов, эффективность лечения не является 100%. Частота осложнений бактериальных язв роговицы

в виде развития десцеметоцеле, перфораций, абсцессов роговицы, эндофтальмита и панофтальмита варьирует от 2,5% до 37,9% [7].

Широко распространена и офтальмопатология сосудистого генеза. В частности, окклюзия вен сетчатки имеет стандартизированный по возрасту и полу показатель распространенности 5,2 на 1000 населения (или 16,4 млн человек), из них 4,4 на 1000 (13,9 млн человек) приходится на окклюзию региональных вен, а 0,8 на 1000 (2,5 млн) – центральных [232]. В России имеет место тенденция к омоложению данной патологии: в 2000 году на группу лиц 41-60 лет приходилось 25% от общего количества, а в 2009 году – уже 39% [76]. В то же время, эффективных способов лечения данной патологии в настоящее время не существует.

Исследования, проведенные в 60–80-х годах XX века, показали, что в патогенезе наиболее распространенных заболеваний человека (патология сердечно-сосудистой, дыхательной, эндокринной систем, злокачественные новообразования, инфекционные заболевания) важную роль играют активные формы кислорода (АФК) [32, 37, 39, 58, 161]. Они являются инициаторами реакций свободнорадикального окисления, которые, в свою очередь, вызывают окислительную модификацию липидов, белков, нуклеиновых кислот, что, в ходе развития патологического процесса, может приводить к гибели клетки по апоптотическому или некротическому механизму [48, 161, 226]. Кроме того, было обосновано представление об общебиологической роли АФК, определенное количество которых образуется нейрохимическими и биоэнергетическими системами клетки в нормальных условиях, играя существенную роль в различных сторонах ее жизнедеятельности [6, 161].

В настоящее время описана активация свободнорадикального окисления при развитии катаракты [90, 278], гнойной язвы роговицы [129] и нарушениях кровоснабжения сетчатки [135, 140].

Однако, целесообразность использования антиоксидантов при данных патологиях не доказана, методология их применения в настоящее время не

разработана. Имеются лишь отдельные, несистематизированные работы по применению преимущественно природных антиоксидантов (витамин Е, витамин С, каротиноиды) [199, 252].

Вопрос эффективного применения веществ, ингибирующих свободнорадикальные реакции, для лечения определённого патологического состояния может быть решён только комплексным подходом с изучением заболевания по двум направлениям.

Первое направление отвечает на вопрос – «ГДЕ?», где произошли нарушения. Ответ на этот вопрос можно получить при помощи различных визуализационных методов, таких как офтальмоскопия, биомикроскопия, а также физиологических, нейрофизиологических, морфологических и микробиологических исследований [26]. Однако, эти методы не вскрывают сущности нарушений.

Второе направление отвечает на вопрос – «КАК?», каким образом, по каким механизмам происходят эти нарушения. На этот вопрос информацию можно получить только с использованием биохимических подходов и биохимических исследований. Биохимические методы позволяют получить информацию о нарушениях, происходящих в ферментах и ферментативных системах, рецепторах, метаболических путях и т.д. [45, 94]. Эти исследования выявляют тонкие молекулярные нарушения при различных заболеваниях, которые в дальнейшем являются мишенью для фармакологических воздействий. Более того, полученные биохимические данные дают информацию, которая служит для создания новых фармакологических препаратов.

В связи с вышесказанным актуальной и практически значимой проблемой современной биохимии и офтальмологии является детальное изучение состояния оксидантной и антиоксидантной систем глаза при катаракте, гнойной язве роговицы и нарушении кровоснабжения сетчатки, а также разработка подходов для дифференцированного назначения антиоксидантов при данных патологиях.

## Степень разработанности проблемы

Свободнорадикальное окисление и гиперпродукция АФК играют важную роль в патогенезе катаракты [278], гнойной язвы роговицы [129] и нарушений кровоснабжения сетчатки [135]. Однако, единичные исследования были посвящены оценке влияния антиоксидантов на течение данных патологий.

Показано, что розмариновая кислота (сложный эфир кофейной кислоты и 3,4-дигидроксифениллактовой кислоты) [261], бетаин (N, N, N-триметилглицин) [98] и ресвератрол [243] замедляли прогрессирование экспериментальной катаракты.

Супероксиддисмутаза ускоряла заживление повреждения роговицы, вызванное аппликацией 1 н раствора гидроксида натрия, но ухудшала течение гнойной язвы, вызванной *Staphylococcus aureus* [1995], а антиоксидант винкамин при экспериментальном кератите, вызванном липополисахаридами на эпителиальных клетках роговицы человека (HCECs), повышал жизнеспособность клеток [274].

В ряде исследований продемонстрирована эффективность антиоксидантов, таких как витамин E [132], аскорбиновая кислота [170] и хелатор железа дефероксамин [150] для защиты сетчатки от ишемического-реперфузионного повреждения.

На кафедре глазных болезней ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России в течение многих лет изучаются свободнорадикальные процессы при разных типах офтальмологической патологии и разрабатываются способы их фармакологической коррекции. В совместных работах с кафедрой фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России и ФГБНУ НИИ пчеловодства протестирована антиоксидантная активность продуктов пчеловодства (маточное молочко, прополис, перга), растительных экстрактов (экстракты из смолёвки поникшей и смолевки татарской), а также некоторых синтетических веществ (ацетилцистеин, витамин-E, убихинон). Показано, что при разных типах офтальмологической



патологии окислительный стресс имеет свои особенности, а также установлено, что разные лекарственные средства влияют на разные этапы свободнорадикального окисления. На основании полученных данных высказано предположение, что назначение антиоксидантов должно быть дифференцированным в зависимости от типа патологии и от характеристик лекарственного средства. Экспериментальному подтверждению данной гипотезы и посвящена диссертационная работа.

**Цель исследования** – изучить в эксперименте активность и характер свободнорадикального окисления при развитии типичных патологических процессов – дегенеративно-дистрофического, воспалительного и дисциркуляторного – на моделях заболеваний глаза – катаракты, гнойной язвы роговицы, острой окклюзии сосудов сетчатки – с разработкой обоснованной тактики применения разных видов антиоксидантных соединений в соответствии с особенностями патогенеза изучаемых патологий.

#### **Задачи исследования**

- В эксперименте на здоровых кроликах определить эффективную и безопасную антиоксидантную дозу для ткани хрусталика 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола при инстилляции его раствора в конъюнктивальную полость.

- Изучить активность свободнорадикального окисления и состояние антиоксидантной защиты в ткани хрусталика при экспериментальной дикват дибромид индуцированной катаракте.

- Комплексно изучить биологические эффекты 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола биохимическими, клиническими и морфологическими методами с оценкой свободнорадикального статуса хрусталика и терапевтического потенциала соединения при экспериментальной катаракте.

- Исследовать активность свободнорадикального окисления и состояние антиоксидантной защиты в ткани роговицы при экспериментальной гнойной язве роговицы.

- Комплексно изучить биологические эффекты местного применения разных доз лактоферрина при инстилляции его раствора в конъюнктивальную полость биохимическими, микробиологическими, клиническими и морфологическими методами с оценкой свободнорадикального статуса роговицы и терапевтического потенциала белка при экспериментальной гнойной язве роговицы.

- Оценить биохимическую и терапевтическую эффективность совместного применения лактоферрина и синтетического противомикробного препарата ципрофлоксацина при экспериментальной гнойной язве роговицы.

- Изучить активность свободнорадикального окисления, состояние антиоксидантной защиты и изменения аминокислотного статуса в ткани сетчатки при остром экспериментальном тромбозе магистральных сосудов сетчатки.

- Комплексно изучить биологические эффекты этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина биохимическими, электрофизиологическими, клиническими и морфологическими методами с оценкой свободнорадикального статуса, аминокислотного состава сетчатки и терапевтического потенциала соединения при остром экспериментальном тромбозе магистральных сосудов сетчатки.

### **Научная новизна**

В ходе выполнения работы впервые:

- Выявлена эффективная и безопасная для ткани хрусталика антиоксидантная доза 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола при инстилляции в конъюнктивальную полость в эксперименте на здоровых кроликах.

- Показан патологический характер повышения активности свободнорадикального окисления в ткани хрусталика при развитии экспериментальной дикват дибромид индуцированной катаракты по результатам сопоставления формирования морфологических признаков

развития заболевания с изменениями показателей свободнорадикального статуса изучаемой ткани.

- Доказана антиоксидантная и терапевтическая эффективность местного применения 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола в концентрациях 0,22% и 2,2% при экспериментальной дикват дибромид индуцированной катаракте, превосходящая препараты сравнения – «Офтан Катахром» и масляный раствор  $\alpha$ -токоферола ацетата.

- Показан патологический характер повышения активности свободнорадикального окисления в ткани роговицы при моделировании экспериментальной стафилококковой гнойной язвы роговицы по результатам сопоставления формирования морфологических признаков развития заболевания с изменениями показателей свободнорадикального статуса изучаемой ткани.

- Установлено в ткани роговицы дозозависимое антиоксидантное действие, антимикробная и репаративная активность местного применения водного раствора лактоферрина при экспериментальной гнойной язве роговицы.

- Разработана оптимальная схема местного применения водного раствора лактоферрина в комбинации с ципрофлоксацином при экспериментальной гнойной язве роговицы, заключающаяся в инстилляции в конъюнктивальную полость по 2 капли 4 раза в день раствора в концентрации 0,5 мг/мл до момента окончания формирования полноценного слоя эпителия на дне язвы.

- Разработана экспериментальная модель острой окклюзии (интравазального тромбоза) магистральных ретинальных сосудов, заключающаяся во внутривенном введении бенгальского розового и последующем фокальном освещении сосудов сетчатки белым светом и воспроизводящая основные звенья патогенеза данной патологии: метаболическую дисфункцию нейронов сетчатки, накопление глутамата и развитие окислительного стресса.

- Показан патологический характер повышения активности свободнорадикального окисления в ткани сетчатки при полученной экспериментальной модели острой окклюзии магистральных ретинальных сосудов по результатам сопоставления формирования морфологических признаков развития заболевания, электрофизиологических изменений, аминокислотного дисбаланса с изменениями показателей свободнорадикального статуса изучаемой ткани.

- Доказано, что применение этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина при экспериментальном тромбозе сосудов сетчатки оказывает антиоксидантное действие, улучшает функциональное состояние нейронов, нормализует концентрацию глутамата, аспартата, ГАМК и глицина, обладает протекторным эффектом в отношении гистологической структуры сетчатки.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

В работе изучена активность и установлен патологический характер окислительного стресса при разных видах патологии глаза: катаракте, гнойной язве роговицы и тромбозе сосудов сетчатки.

На основании полученных результатов и особенностей патогенеза данных патологий для коррекции окислительного стресса и достижения высокого терапевтического результата подобраны вещества в эффективных и безопасных дозах, обладающие антиоксидантной активностью.

Экспериментально доказана антиоксидантная и терапевтическая эффективность применения 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола при терапии дикват дибромид индуцированной катаракты, лактоферрина – при стафилококковой гнойной язве роговицы, этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина – при тромбозе сосудов сетчатки. Стоит отметить, что протестированные вещества по биологическим эффектам не уступали препаратам сравнения (лактоферрин – ципрофлоксацину) или даже их превосходили (2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол – «Офтан Катахром» и  $\alpha$ -

токоферола ацетат, этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина – пирацетам).

Полученные результаты позволяют рекомендовать изученные вещества (2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол, лактоферрин и этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина) для разработки лекарственных препаратов и тестирования в клинической практике в комплексной терапии катаракты, гнойной язвы роговицы и тромбоза сосудов сетчатки соответственно.

### **Методы исследования**

Исследование выполнено на половозрелых кроликах самцах породы Шиншилла.

Экспериментальную катаракту моделировали по методу K.C. Bhuyan et al. (1991), в собственной модификации, введением диквата дибромида в стекловидное тело (рацпредложение «Модификация свободнорадикальной модели катаракты» №1209 от 3.10.2006 г.).

Экспериментальную гнойную язву роговицы моделировали по методике Н.А. Адамовой (1990). Для этого в сформированный дефект роговицы втирали чистую культуру золотистого стафилококка.

Тромбоз сосудов сетчатки моделировали внутривенным введением фотосенсибилизатора бенгальского розового с последующим фокальным освещением белым светом височной сосудистой аркады в месте перегиба сосудов через край диска зрительного нерва (рацпредложение «Способ моделирования экспериментальной ишемии сетчатки» №1305 от 27.12.2010 г.).

Выраженность окислительного стресса при указанных патологиях оценивали по концентрации малонового диальдегида, уровню безбелковых тиоловых групп, активности Se-зависимой глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы, супероксиддисмутазы в хрусталике, роговице или сетчатке в зависимости от экспериментальной модели.

Для оценки эффективности проводимой терапии выполняли клинические, морфологические, микробиологические и электрофизиологические исследования.

Все проведенные эксперименты были рассмотрены и одобрены локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, протокол №12 от 08.04.2016 г.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Инстилляции в конъюнктивальную полость глаз здоровых кроликов 22% и 10% растворов 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола оказывают прооксидантное действие, в то же время концентрации 2,2% и 0,22% проявляют антиоксидантную активность.

2. Моделирование прогрессирующей корковой катаракты при помощи однократного введения в стекловидное тело глаза кролика диквата дибромида приводит к активации свободнорадикального окисления, истощению антиоксидантного потенциала в ткани хрусталика и формированию типичной клинической и патоморфологической картины корковой катаракты. Инстилляции в конъюнктивальную полость глаз кроликов 2,2% и 0,22% растворов 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола оказывают выраженное антиоксидантное и антикатарактальное действие, существенно превосходящее эффект от использования препаратов сравнения – «Офтан Катахрома» и  $\alpha$ -токоферола ацетата.

3. Моделирование экспериментальной гнойной язвы роговицы с использованием культуры золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus* (АТСС 25923) сопровождается активацией свободнорадикального окисления и истощением антиоксидантного потенциала в ткани роговицы, формированием типичной клинической и патоморфологической картины острого гнойного воспаления роговицы.

4. Растворы лактоферрина в концентрациях от 0,5 до 5 мг/мл проявляют дозозависимое антиоксидантное действие и антимикробную активность, ускоряют заживление дефекта и предотвращают развитие

осложнений при экспериментальной гнойной язве роговицы. В то же время растворы в концентрациях 1,5 – 5 мг/мл нарушают последовательность развития этапов воспаления, а растворы всех изученных концентраций на этапе рубцевания способствуют чрезмерному развитию соединительной ткани. При этом наилучший биологический эффект в составе комплексной терапии с ципрофлоксацином дает лактоферрин в концентрации 0,5 мг/мл при инстилляции в конъюнктивальную полость в течение 14 дней – до момента окончания формирования полноценного слоя эпителия на дне язвы, то есть до начала формирования рубца.

5. Острая окклюзия магистральных ретинальных сосудов, вызванная интравенозным введением бенгальского розового и фокальным освещением сосудов сетчатки белым светом, сопровождается развитием каскада биохимических изменений в ткани сетчатки – активацией свободнорадикального окисления, истощением антиоксидантного потенциала, метаболической дисфункцией нейронов, накоплением глутамата, формированием типичной клинической, патоморфологической и электрофизиологической картины. При этом внутривенное введение этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина в дозе 0,5 мг/кг массы, с последующим его внутрижелудочным введением в дозе 10 мг/кг массы три раза в день снижает выраженность окислительного стресса, улучшает функциональное состояние нейронов, нормализует концентрацию глутамата, аспартата, ГАМК и глицина и уменьшает патологические морфологические изменения сетчатки.

6. Экспериментально доказано дифференцированное, патогенетически обоснованное применение с терапевтической целью веществ с антиоксидантной активностью в зависимости от типа офтальмологической патологии (дегенеративно-дистрофическая, воспалительная или дисциркуляторная).

### **Степень достоверности результатов**

Высокая степень достоверности полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментальных данных, полученных с использованием современных методов исследования с последующей систематизацией и статистической обработкой в соответствии с современными подходами к изучению свободнорадикальных реакций и оценки антиоксидантной активности лекарственных препаратов (Миронов и др., 2012).

### **Апробация результатов**

Основные положения диссертации доложены, обсуждены и опубликованы в материалах: Научно-практической конференции молодых учёных, посвящённой 60-летию РГМУ (Рязань, 2004); 9-й международной школы-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2005); XIII Российского Национального Конгресса «Человек и Лекарство» (Москва, 2006); Всероссийской научной конференции молодых учёных «Актуальные проблемы офтальмологии» (Москва, 2006); Всероссийской конференции, посвящённой 105-летию со дня рождения Т.И. Ерошевского (Самара, 2007); Всероссийской юбилейной научно-практической конференции «Фёдоровские чтения – 2007» (Москва, 2007); Российского общенационального офтальмологического форума (Москва, 2009); Международной научно-практической конференции по офтальмохирургии «Восток-Запад» (Уфа, 2010); III Российского общенационального офтальмологического форума (Москва, 2010); VI Международной Крымской конференции «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии» (Судак, Крым, Украина, 2010); Конференции по офтальмохирургии с международным участием «Восток-Запад» (Уфа, 2011); VI Всероссийской научной конференции молодых учёных с участием иностранных специалистов «Актуальные проблемы офтальмологии» (Москва, 2011); IV Всероссийского Общенационального офтальмологического форума (Москва, 2011); Всероссийской научно-



практической конференции «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2012); Научно-практической конференции по офтальмологии с международным участием «Федоровские чтения-2012» (Москва, 2012); Научно-практической конференции по офтальмологии с международным участием «Восток-Запад» (Уфа, 2012); Научно-практической конференции с международным участием «V Российский общенациональный офтальмологический форум» (Москва, 2012); III Всероссийского научного конгресса с международным участием «Роль и место фармакотерапии в современной офтальмологической практике» (Санкт-Петербург, 2012); Научно-практической конференции с международным участием «VI Всероссийский общенациональный офтальмологический форум» (Москва, 2013); Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (Новосибирск, 2013); IX Международной Крымской конференции «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии» (Судак, Крым, Украина, 2013); Первой Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств» (Москва, 2013); IX Всероссийской научной конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы офтальмологии» (Москва, 2014); Пироговского офтальмологического форума (Москва, 2018); Пироговского офтальмологического форума с международным участием (Москва, 2019).

Апробация работы состоялась 16 ноября 2020 года на заседании кафедр биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО, глазных болезней, нормальной физиологии с курсом нейрофизиологии, фармакологии с курсом фармации ФДПО, патофизиологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации №МК-4993.2012.7.

### **Внедрение результатов исследования в практику**

Основные положения работы используются в учебном процессе при обучении студентов, клинических ординаторов на кафедре глазных болезней, фармакологии с курсом фармации ФДПО, биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

### **Личный вклад автора**

Автором диссертационной работы выдвинута идея работы, разработан дизайн исследования, самостоятельно подготовлен аналитический обзор литературы по изучаемой проблеме, составлена программа исследования, проведены эксперименты с животными, выполнены биохимические, электрофизиологические исследования, собран материал для гистологического исследования, выполнена обработка и интерпретация полученных данных, подготовлены публикации по диссертационной работе. В целом его личный вклад в исследование превышает 85%.

### **Связь задач исследования с основным планом научно-исследовательских работ университета**

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

### **Сведения о публикациях по теме диссертации**

Соискатель имеет 170 опубликованных работ, из них по теме диссертации 66 печатных работ, в том числе 14 – в журналах, включенных Высшей аттестационной комиссией при Минобрнауки России в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций, из них 5 – в журналах, входящих в международные цитатно-аналитические базы данных. Соискателем по теме диссертации оформлено 3 рацпредложения, получено 2 патента Российской Федерации на изобретение.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 246 страницах и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы (глава 1), материалы и методы исследования (глава 2), результаты исследования (глава 3), обсуждение полученных результатов (глава 4), заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, перечень сокращений и условных обозначений, список литературы, благодарности.

Диссертация иллюстрирована 59 рисунками и 25 таблицами. Список литературы включает 86 источников отечественной и 192 – зарубежной литературы.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Свободнорадикальные процессы в норме и при офтальмологической патологии

#### 1.1.1. Свободнорадикальные реакции в физиологических условиях

Свободные радикалы – это молекулы/молекулярные фрагменты, содержащие один или несколько неспаренных электронов, присутствие которых делает их высокоактивными.

Активные формы кислорода (АФК) – термин, включающий в себя производные кислорода, обладающие большей реакционной активностью по сравнению с молекулярным кислородом за счет наличия неспаренного электрона [161].

В физиологических условиях клетки производят до  $10^{11}$  свободных радикалов в день.

К числу наиболее важных АФК относят гидроксильный радикал ( $^*\text{OH}$ ), супероксидный анион-радикал ( $\text{O}_2^{*-}$ ) и пероксильные радикалы ( $\text{ROO}^*$ ) [103, 111], а также нерадикальные соединения, такие как перекись водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), синглетный кислород ( $^1\text{O}_2$ ), хлорноватистая кислота ( $\text{HOCl}$ ) и пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ) [146, 271]. Известно, что АФК играют двойную роль как частицы, которые могут быть вредными или полезными для живых систем [146].

Благоприятные эффекты АФК проявляются при низких и умеренных концентрациях и включают их участие в различных физиологических процессах и в многочисленных клеточных сигнальных путях [143].

Вредное воздействие свободных радикалов происходит в биологических системах, когда, с одной стороны, происходит гиперпродукция АФК, а с другой – дефицит антиоксидантных ферментов или низкомолекулярных антиоксидантов. Устойчивый баланс между полезными и вредными эффектами АФК является важным аспектом здоровых организмов и достигается за счет набора механизмов, которые описаны как «окислительно-восстановительная регуляция» [146]. Окислительный стресс является

результатом дисбаланса между образованием активных форм кислорода и нарушенной способностью организма детоксифицировать эти реактивные интермедиаты или восстанавливать ущерб, который они вызвали [217].

В настоящее время установлено, что окислительный стресс играет важную роль в патогенезе фиброза легких, эпилепсии, болезни Паркинсона, артериальной гипертензии, сахарного диабета, атеросклероза и внезапной смерти, а также ряда глазных заболеваний, таких как возрастная дегенерация желтого пятна, катаракта, глаукома, тромбозы сосудов сетчатки, гнойная язва роговицы [37, 39, 58, 59, 161, 250].

### **1.1.2. Источники образования активных форм кислорода в организме**

АФК в клетках образуются как из эндогенных, так и из экзогенных источников. В эндогенном процессе большая часть АФК продуцируется как побочный продукт нормального метаболизма [175].

Митохондрии потребляют более 90% клеточного кислорода в аэробных организмах в физиологических условиях. Из этого количества примерно 1-5% кислорода превращается в АФК [262].

В митохондриях цепь переноса электронов находится во внутренней мембране, где электроны переносятся от НАДН<sub>2</sub> / ФАДН<sub>2</sub> на кислород с образованием Н<sub>2</sub>О. Однако, некоторые электроны просачиваются до того, как достигают последней стадии, преждевременно реагируя с О<sub>2</sub> с образованием супероксидного анион-радикала вместо Н<sub>2</sub>О [260].

Пероксисомы – это однослойные везикулы диаметром 0,5–1,0 мкм, которые обычно присутствуют в эукариотических клетках. Пероксисомы содержат флавоферменты и оксидоредуктазы. Эти ферменты либо участвуют в окислении жирных кислот, катаболизме и анаболизме D-аминокислот, метаболизме глиоксилата/дикарбоксилата, либо в выработке спермидина – аутофагистического, продлевающего жизнь вещества [236].

Пероксисомы производят Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> как побочный продукт [236], а также выделяют О<sub>2</sub><sup>\*-</sup>, генерируемый в основном ферментом ксантиноксидазой,

который также содержится в цитозоле и необходим для расщепления пурина [162].

Считается, что митохондрии являются основным продуцентом АФК в клетке, однако все большее число исследований за последнее десятилетие показывают, что эндоплазматический ретикулум, а также пероксисомы генерируют столько же или даже больше АФК, чем митохондрии [236].

В эндоплазматическом ретикулуме АФК в основном продуцируются монооксигеназой и цитохромом P450. Цитохром P450 отвечает за синтез и распад эндогенных веществ (жирных кислот и гормонов) и детоксикацию ксенобиотиков и липофильных соединений. В этом процессе электроны переносятся из НАДФН<sub>2</sub> на цитохром P450 через редуктазу цитохрома P450, что приводит к гидроксигированию ксенобиотиков. Утечка электронов из этой системы может привести к образованию кислородных радикалов, в частности O<sub>2</sub><sup>\*-</sup> [87, 227].

Эндоплазматический ретикулум является основной органеллой, ответственной за процессинг белка. На ранней стадии процесса развертывания белка увеличивается уровень дисульфид-изомеразы, фермента, исправляющего неправильно свернутые белки путем формирования правильных дисульфидных связей. Посредством процесса сворачивания белка протеин-дисульфид-изомераза восстанавливается, и электрон переносится в молекулярный кислород и глутатион. Неполный перенос приводит к производству супероксидного анион-радикала [97, 139].

Супероксидный анион-радикал может образовываться в митохондриальных и плазматических мембранах вследствие активности НАДФН-оксидаз [114, 180, 203]. Супероксид, образующийся в этих мембранах, действует как защитный фактор от микроорганизмов [275]. Электроны переходят из НАДФН в ФАД и в два гема b-типа и, в конце, в O<sub>2</sub>, что приводит к образованию супероксидного анион-радикала.

В цитозоле АФК могут образовываться как побочный продукт метаболизма арахидоновой кислоты. Из НАДН или НАДФН супероксид

генерируется ферментами циклооксигеназой и липоксигеназой, которые используют арахидоновую кислоту для синтеза простагландинов или лейкотриенов соответственно [216].

Кроме того, в цитозоле двухвалентное железо реагирует с  $H_2O_2$  и через реакцию Фентона образует трехвалентное железо, очень реакционноспособный гидроксильный радикал ( $OH^*$ ) и гидроксид ( $OH^-$ ) [59].

Из экзогенных источников АФК важную роль играют инфракрасный, ультрафиолетовый (УФ) и видимый свет. Процесс УФ-облучения может влиять на ДНК, особенно митохондриальную ДНК (мтДНК). Это часто приводит к «обычной» делеции мтДНК длиной 4977 п.н., которая может увеличить выработку митохондриальных АФК. Увеличение уровня АФК также может привести к увеличению уровня повреждения мтДНК. Инфракрасный свет поглощается митохондриальной цепью переноса электронов, особенно в комплексе IV, что приводит к увеличению утечки АФК в митохондриальный матрикс [206].

Кроме того, рентгеновские лучи, некоторые экологически токсичные компоненты и некоторые лекарственные средства могут вызвать окислительное повреждение [211, 237].

### **1.1.3. Антиоксидантная система защиты**

Молекулы антиоксидантов, которые составляют систему антиоксидантной защиты в живых системах, действуют на разных этапах развития окислительного стресса. Условно их подразделяют на четыре линии защиты [40, 99].

*Первая линия защиты* – антиоксиданты, инактивирующие или предотвращающие образование свободных радикалов или их предшественников. Они очень быстро нейтрализуют молекулу с потенциалом превращения в свободный радикал или свободный радикал со способностью индуцировать образование других радикалов. К этой линии защиты относят три ключевых антиоксидантных фермента: супероксиддисмутазу, каталазу и глутатионпероксидазу. Эти ферменты

дисмутируют супероксидный анион-радикал, расщепляют пероксид водорода и гидропероксиды до безвредных молекул ( $\text{H}_2\text{O}_2$  / спиртов и  $\text{O}_2$ ) соответственно. Эта линия защиты также включает белки, связывающие ионы металлов переменной валентности, такие как трансферрин и церулоплазмин, которые хелатируют или изолируют железо и медь соответственно, предотвращая тем самым образование свободных радикалов.

*Вторая линия защиты* представлена антиоксидантами, инактивирующими свободные радикалы, ингибирующими инициацию или разрывающими цепь свободнорадикальных реакций. Они нейтрализуют или удаляют свободные радикалы, донируя им электроны, при этом сами становятся радикалами, но с меньшей реакционной способностью. Эти «новые радикалы» легко нейтрализуются и становятся безвредными. К данной линии защиты относятся гидрофильные (аскорбиновая кислота, мочевиная кислота, глутатион) и липофильные (альфа-токоферол (витамин E) и убихинол) вещества.

*Третья линия защиты* образована ферментами, которые восстанавливают повреждения биомолекул (белков, липидов и нуклеиновых кислот), вызванные свободными радикалами, а при невозможности регенерации расщепляют их, предотвращая их накопление. Типичными представителями данной линии защиты являются ферменты репарации ДНК (полимеразы, гликозилазы и нуклеазы), протеолитические ферменты (протеиназы, протеазы и пептидазы), которые расположены как в цитозоле, так и в митохондриях клеток млекопитающих, а также глутатион-S-трансфераза – семейство ферментов, обеспечивающих конъюгацию продуктов пероксидации с глутатионом (с образованием менее реакционноспособных и более водорастворимых соединений).

*Четвертая линия защиты* представлена веществами, активирующими транскрипционные факторы (например, Nrf2), обеспечивающими защиту клеток от воздействия свободных радикалов [99].

Nrf2 – редокс-чувствительный транскрипционный фактор, который



реагирует на изменение соотношения восстановленных и окисленных SH-групп в белках. Его экспрессия повышается при развитии окислительного стресса и направлена на защиту клетки от воздействия свободных радикалов [176]. Nrf2 регулирует экспрессию [3]:

- 1) ферментов инактивации и эффлюкса из клеток токсических веществ, а также ферментов репарации/утилизации поврежденных макромолекул;
- 2) ферментов антиоксидантной системы защиты;
- 3) регуляторов апоптоза, клеточного цикла и дифференцировки.

В физиологических условиях данный транскрипционный фактор находится в комплексе с белком-репрессором Keap 1, который, с одной стороны, способствует убиквитированию и протеосомальной деградации Nrf2, а с другой – предотвращает его проникновение из цитоплазмы в ядро [176].

После активации комплекс Keap1-Nrf2 диссоциирует, и Nrf2 транслоцируется в ядро, где связывается с antioxidant-response elements и активирует транскрипцию защитных ферментов. Известно, что нокаут гена Nrf2 в организме мышей не только нарушает усиление работы генов защитных белков в условиях окислительного стресса, но также приводит к падению уровня транскрипции некоторых (но не всех) из этих генов в нормальных условиях [3].

#### **1.1.4. Свободнорадикальные реакции в патогенезе катаракты**

Катаракта – заболевание, сопровождающееся снижением прозрачности (помутнением) хрусталика [254]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), это главная причина обратимой потери зрения. Во всем мире катаракта является причиной примерно 50% случаев слепоты [218, 219]. По оценкам Национального института глаз, в связи с увеличением продолжительности жизни и, соответственно, с увеличением возраста населения, число людей в США с катарактой удвоится к 2050 году с нынешних 24,4 млн до 50 млн случаев.

Свободнорадикальное окисление и гиперпродукция АФК играют важную роль в патогенезе катаракты. Несмотря на то, что метаболическая активность хрусталика довольно низкая (хрусталик в основном состоит из белка-кристаллина с низким содержанием клеток), он постоянно подвергается воздействию света, что приводит к генерации свободных радикалов [221, 267, 278,].

При катаракте зафиксировано увеличение концентрации пероксида водорода, угнетение активности антиоксидантных ферментов: каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатионтрансферазы, супероксиддисмутазы, альдозоредуктазы. Обнаружен повышенный уровень первичных (диеновые и триеновые конъюгаты), вторичных (кетодиены, в том числе и малоновый диальдегид) и конечных (Шиффовы основания) продуктов перекисного окисления липидов [5, 158, 261]. Выявлено снижение содержания антиоксидантных витаминов [46].

В то же время в исследовании J. Shahinfar et al. (2018) было показано, что у пациентов с сенильной катарактой при увеличении выраженности окислительного стресса в сыворотке крови, активность супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы повышалась [239].

Пищевые антиоксиданты (витамин E, кверцетин) играют важную роль в снижении частоты помутнения хрусталика, что продемонстрировано в моделях *in vitro* [123, 222], а также в клинических и экспериментальных исследованиях [272].

Защита от ультрафиолета в хрусталике основана на группе молекул, синтезируемых из триптофана, основной из которых является 3-гидроксикинуруенин глюкозид [268]. Этот глюкозид и несколько его гомологов разрушаются под воздействием ультрафиолетового излучения, а затем удаляются антиоксидантами, защищая другие молекулы хрусталика от повреждения. Снижение уровня восстановленного глутатиона и недостаточная антиоксидантная защита хрусталика приводят к ускоренному

образованию гидроксильных радикалов и к повреждению его белков [122, 258, 273].

Тиольные группы кристаллинов хрусталика легко окисляются с образованием дисульфидных сшивок между полипептидами и последующей агрегацией белка и снижением его прозрачности [196].

Перекисное окисление липидов также является важным фактором катарактогенеза [106], хотя свободнорадикальному окислению в данном случае подвергаются преимущественно клеточные мембраны эпителиальных клеток хрусталика [210]. Мембраны клеток хрусталика уникальны тем, что содержат высокий уровень холестерина, плазмогена и дигидросфингомиелина. Липидный состав существенно меняется с возрастом, что особенно влияет на текучесть мембран. Перекисное окисление липидов приводит к образованию альдегидов, которые опосредуют многие последствия окислительного стресса, выступая в качестве токсичных посредников [163, 234].

Повреждение ДНК и апоптоз в эпителиальных клетках хрусталика, вызванные окислительным стрессом, также являются важным звеном в патогенезе катаракты [118]. Облучение ультрафиолетом В вызывает фрагментацию ДНК и апоптотическую гибель иммортализованных клеток хрусталика, тогда как некроз наблюдается при воздействии на клетки пероксида водорода или гидроперекиси-трет-бутила [194].

Важную роль в развитии катаракты может играть транскрипционный фактор Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2). Этот белок защищает хрусталик, связываясь с antioxidant response elements и повышая транскрипцию антиоксидантных ферментов, в том числе и гемоксигеназы-1 [208]. На возрастных хрусталиках с катарактой, было показано значительное снижение экспрессии Nrf2. Аналогичные результаты были получены на хрусталиках пациентов в возрасте от 65 до 80 лет [149].

В ряде исследований оценивалась эффективность применения антиоксидантов для профилактики и замедления прогрессирования катаракты.

Внутрибрюшинное введение розмариновой кислоты (сложный эфир кофейной кислоты и 3,4-дигидроксифениллактовой кислоты) в дозах 5, 10 и 50 мг/кг при экспериментальной селениндуцированной катаракте замедляло прогрессирование заболевания и оказывало антиоксидантное действие, которое проявлялось в повышении активности антиоксидантных ферментов, уровня глутатиона и экспрессии Nrf2 [261].

Применение бетаина (N, N, N-триметилглицина) у эмбрионов цыплят на модели гидрокортизониндуцированной катаракты замедляло прогрессирование патологии и повышало уровень глутатиона [98].

В аналогичной модельной системе антиоксидант пиперин дозозависимо оказывал антиоксидантное действие, которое проявлялось повышением уровня глутатиона, общего антиоксидантного статуса и снижением концентрации МДА в ткани хрусталика [100].

Антиоксидант ресвератрол (20 и 40 мг/кг/день, внутрибрюшинно) в экспериментальной модели нафталининдуцированной катаракты (1 г/кг/день, перорально) на крысах значительно замедлял лентикулярную непрозрачность хрусталика, повышая активность антиоксидантных ферментов каталазы, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и содержание глутатиона [243].

Таким образом, гиперпродукция свободных радикалов и развитие окислительного стресса играют важную роль в формировании катаракты, а применение антиоксидантов для ее профилактики и лечения является патогенетически оправданным, причем первостепенную роль имеют вещества, являющиеся прямыми антиоксидантами и влияющие на глутатионзависимое звено.

### **1.1.5. Свободнорадикальные реакции в патогенезе гнойной язвы роговицы**

Роговица представляет собой прозрачную аваскулярную ткань, что позволяет ей пропускать свет к заднему отрезку глаза. Эта ткань постоянно подвергается воздействию всего спектра света, в том числе и ультрафиолетового диапазона, являющегося известным фактором, который способствует образованию свободных радикалов [264, 266].

Ультрафиолетовый (УФ) свет можно классифицировать по длине волны следующим образом: УФА (315–400 нм), УФВ (280–315 нм) и УФС (100–280 нм). Весь УФС и большая часть УФВ света поглощаются роговицей. Только ультрафиолетовые волны длиной более 295 нм могут передаваться через роговицу в переднюю камеру. Таким образом, водянистая влага и трабекулярная сеть подвергаются воздействию только небольшого количества УФА. Однако, даже такое небольшое количество УФА приводит к образованию АФК, которые являются одной из основных причин окислительного стресса в трабекулярной сети [206, 245].

В здоровой роговице эволюционно выработался ряд защитных механизмов, препятствующих вредному воздействию АФК. Установлено, что 20-40% растворимых белков роговицы приходится на альдегиддегидрогеназы (ALDH3), которые непосредственно поглощают УФ свет и инактивируют цитотоксические альдегиды (в том числе малоновый диальдегид), образующиеся в результате УФ индуцированного перекисного окисления липидов [124]. Кроме того, установлено, что альдегиддегидрогеназа является поставщиком НАДН в роговице, который является поставщиком протонов, необходимых для функционирования антиоксидантных ферментов [131].

В эксперименте показано, что мыши с недостаточностью альдегиддегидрогеназы особенно восприимчивы к УФ-индуцированной патологии [215].

Помимо этого, роговица богата антиоксидантными ферментами, такими как супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза и

глутатионредуктаза, а также низкомолекулярными антиоксидантами – аскорбиновой кислотой, глутатионом, витамином Е, ферритином, которые участвуют в защите роговицы от свободных радикалов [116].

Из них наибольшую роль в антиоксидантной защите, как было показано, играет аскорбиновая кислота (содержится в высоких концентрациях в центре роговицы, прямо напротив зрачка) и супероксиддисмутаза. Каталаза и глутатионпероксидаза играют второстепенную роль [233]. Однако, при развитии окислительного стресса, сначала снижается активность каталазы, затем, глутатионпероксидазы, и в конце супероксиддисмутазы, тем самым увеличивая содержания  $H_2O_2$ , и вызванное им повреждение роговицы [266]. Причем, снижение активности супероксиддисмутазы предшествует повышению уровня малонового диальдегида – конечного продукта перекисного окисления липидов [223].

Недавно обнаружено, что ряд белков, выделенных в роговице и названных кристаллинами из-за высокой гомологии с белками хрусталика, помимо структурной функции еще участвует и в защите роговицы от свободных радикалов. В частности показано, что кристаллины могут самостоятельно связывать свободные радикалы, а также продуцировать НАДФН [256].

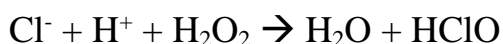
При бактериальном кератите в роговице можно выделить две основные группы источников свободных радикалов – экзогенные и эндогенные. Из экзогенных генераторов свободных радикалов, как и в здоровой роговице, основную роль играет ультрафиолетовое излучение солнечного света [246]. Повреждение эпителия роговицы, развитие воспалительного процесса сопровождается значительным снижением активности антиоксидантной системы эпителия, что приводит к чрезмерной генерации АФК и, как следствие, к развитию окислительного стресса.

К эндогенным источникам свободных радикалов относятся макрофаги крови, инфильтрирующие ткань роговицы при воспалении [133], а также моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, эндотелиальные, гладкомышечные и

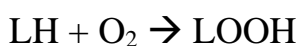
другие клетки [96]. В них в ходе функционирования НАДФН<sub>2</sub>-оксидазного комплекса, молекула кислорода восстанавливается за счет НАДФН<sub>2</sub> до супероксидного анион-радикала:



Другой мощный эндогенный окислитель – хлорноватистая кислота (НСlО) – образуется в процессе активации нейтрофилов-микрофагов и моноцитов-макрофагов в результате функционирования фермента миелопероксидазы [40]:



Кроме того, при воспалении, в ходе образования арахидоновой кислоты при действии фосфолипаз и ее метаболизма через цикло- и липооксигеназный пути при синтезе простагландинов и лейкотриенов происходит образование АФК, в том числе, наиболее короткоживущего и токсичного гидроксилрадикала [40, 166]. Синтезируемые при липоксигенажном окислении, липидные гидропероксиды также могут легко разлагаться с образованием агрессивных алкоксильных (LO<sup>•</sup>) радикалов:



АФК вызывают непосредственное повреждение стромальных гликозаминогликанов, с последующим нарушением их свойств [117], что приводит, в конечном итоге, к разрушению роговицы и язвообразованию [197].

После атаки стромальных гликозаминогликанов АФК они становятся менее устойчивыми к протеолизу тканевыми ферментами и фагоцитирующими клетками. В норме тройная спиральная структура коллагена, основного структурного вещества роговицы, резистентна к деградации большинством протеаз. АФК вызывают окислительную деструкцию коллагеновых фибрилл типа 1, что является первым этапом разрушения коллагена, а на втором этапе происходит энзиматический протеолиз этих окисленно-модифицированных молекул [201].

Исходя из изложенного, становится понятным целесообразность применения антиоксидантов при гнойной язве роговицы.

В то же время на культуре клеток роговичного эпителия и клеток хрусталика показано, что  $H_2O_2$  в низких концентрациях стимулирует рост и заживление эпителиальных клеток роговицы с активацией EGF-рецептора и снижением активности Src (pY416), FAK (Y576), и vinculin (Y1065) [255].

В настоящее время известно большое количество антиоксидантных лекарственных препаратов, которые воздействуют как на разные свободные радикалы, так и на разные этапы развития окислительного стресса. Учитывая ведущую роль супероксиддисмутазы в антиоксидантной системе защиты роговицы, именно ее изучению посвящено наибольшее количество исследований.

При местном применении 0,2% раствора супероксиддисмутазы при кератите, вызванном аппликацией 1 н раствора гидроксида натрия, происходило ускорение заживления повреждения роговицы, на основании чего авторы сделали вывод об ее положительном влиянии [102].

Но применение теми же авторами 0,2% раствора супероксиддисмутазы при экспериментальной гнойной язве, вызванной *Staphylococcus aureus*, на фоне снижения выраженности окислительного стресса, определяемого по хемилюминесценции люминола, приводило к усилению инфильтрации роговицы и существенно не влияло на клиническое течение репаративных процессов [130].

С другой стороны, в исследовании [192] применение препаратов супероксиддисмутазы в течение первых 6 дней улучшало течение кератита, вызванного *Pseudomonas aeruginosa* у морских свинок, предотвращая пенетрацию роговицы и уменьшая повреждение эпителия под воздействием полиморфноядерных лейкоцитов.

Аналогичные результаты получены и в исследовании [167], при применении препаратов супероксиддисмутазы и ацетилированной супероксиддисмутазы (дольше удерживается на поверхности клеток) при



экспериментальном кератите, вызванном липополисахаридом. На фоне введения антиоксидантов происходило снижение воспаления только в течение 6 дней эксперимента, в остальные сроки данный показатель от значений контроля не отличался.

Антиоксидант винкамин при экспериментальном кератите, вызванном липополисахаридами на эпителиальных клетках роговицы человека (HCECs), повышал жизнеспособность клеток за счет выраженной антиоксидантной активности, которая проявлялась в снижении уровня АФК и нормализации активности супероксиддисмутазы и концентрации МДА. Винкамин также оказывал противовоспалительное действие, уменьшая экспрессию IL-6, IL-8, IL-1, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  [274].

Окислительный стресс – важнейший экологический стимул для многих патогенных бактерий. В течение инфекционного процесса бактерии часто подвергаются воздействию реактивных форм кислорода, продуцируемых иммунной системой хозяина. Поэтому, для выживания как в условиях макроорганизма, так и в окружающей среде, они выработали разнообразные механизмы защиты [119].

Разные ферменты, участвующие в нейтрализации свободных радикалов, такие как каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза и т.п., защищают микроорганизмы от экзогенных и эндогенных свободных радикалов. После внедрения в макроорганизм микроорганизмы сталкиваются с первой линией защитной системы организма — неспецифическими факторами, одним из которых является фагоцитоз. При этом фагоциты уничтожают поглощенные микроорганизмы с помощью свободных кислородных радикалов, таких как супероксидный анион-радикал, гидроксильный радикал, синглетный кислород, оксид азота и др. Они же, в свою очередь, могут нейтрализоваться антиоксидантной системой микроорганизмов, в частности каталазой и СОД. Таким образом, микроорганизмы приобретают резистентность и адаптируются к

характерному для фагоцитов окислительному стрессу, вследствие чего они выживают в очаге воспаления, а нередко и внутри фагоцитов [35, 72].

Установлено также, что в ходе инфекционного процесса (при переходе из фазы альтерации к фазе персистенции) активность супероксиддисмутазы и каталазы-пероксидазы *Staphylococcus aureus* увеличивается. Это указывает на важную роль данных ферментов в устойчивости стафилококков к кислородозависимым бактерицидным механизмам нейтрофилов [9].

Для штаммов *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans*, обладающих максимальной активностью каталазы и супероксиддисмутазы, характерна относительно высокая выживаемость внутри макрофагов по сравнению со штаммами с минимальной активностью этих ферментов [36].

Таким образом, гиперпродукция свободных радикалов и развитие окислительного стресса играют важную роль в патогенезе повреждения роговицы, в частности при развитии гнойной язвы. Однако, учитывая то обстоятельство, что развитие окислительного стресса при данной патологии играет защитную роль и направлено на борьбу с микроорганизмами, применение антиоксидантов оправдано только при чрезмерной активации свободнорадикальных процессов, приводящей к развитию осложнений, например пенетрации в фазу альтерации. Кроме того, желательно, чтобы применяемый препарат также обладал антибактериальной активностью.

#### **1.1.6. Свободнорадикальные реакции в патогенезе тромбозов сосудов сетчатки**

Сетчатка является одной из наиболее чувствительных тканей к окислительному повреждению по многим причинам [224]. Во-первых, нейроны обладают высокой метаболической активностью [93, 145, 156]. Во-вторых, на границе сетчатки и сосудистой оболочки создается большой градиент кислорода [173, 257]. В-третьих, фоторецепторы сетчатки богаты полиненасыщенными жирными кислотами, которые являются основными мишенями для перекисного окисления липидов [204, 230]. Наконец, ишемия

сетчатки также приводит к образованию свободных радикалов и играет важную роль в ее повреждении [115].

Описано несколько реакций, в ходе которых могут генерироваться АФК при ишемии-реперфузии сетчатки.

Во время ишемии снижение уровня АТФ приводит к образованию гипоксантина, а повышение внутриклеточного кальция в нейронах активирует  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую протеазу кальпаин. Кальпаин превращает ксантиндегидрогеназу в ксантиноксидазу, и после реперфузии последний фермент окисляет накопленный гипоксантин до мочевой кислоты, что приводит к выделению  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Эти две молекулы реагируют по механизму Хабера-Вейса с образованием высокотоксичного гидроксильного радикала ( $\text{OH}^{\bullet}$ ). Эта реакция катализируется железом, которое высвобождается из связи с белком при низком рН, образующимся во время ишемии. Кроме того,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  взаимодействует с оксидом азота (NO), который образуется в значительных количествах после ишемии, что приводит к образованию пероксинитрита, нитрозильного радикала и, в конечном итоге,  $\text{OH}^{\bullet}$  [101].

Активность ксантиноксидазы увеличивается после реперфузии ишемической сетчатки и усиливает образование свободных радикалов [276], при этом, концентрации гипоксантина и ксантина (субстрата и продукта соответственно) увеличиваются после ишемии-реперфузии [148].

Кроме того, введение аллопуринола или оксипуринола (блокаторов ксантиноксидазы) приводит к значительному улучшению электроретинограммы после ишемии [121].

Другим источником свободных радикалов в сетчатке при ишемии-реперфузии являются полиморфноядерные лейкоциты, окисляющие НАДФН с образованием супероксида [235]. В сетчатке инфильтрация нейтрофилами происходит во время ранней фазы реперфузии, вероятно, в ответ на повышение уровня цитокинов и образование свободных радикалов. Хотя прямых доказательств увеличения образования свободных радикалов из

нейтрофилов нет, было показано, что блокирование накопления лейкоцитов обеспечивает защиту ишемической сетчатки [229].

Хотя из всех этих исследований можно сделать вывод, что после ишемии в сетчатке наблюдается повышенный уровень свободных радикалов, прямое измерение образования свободных радикалов было выполнено только Мюллером и его коллегами [147], которые показали увеличение образования свободных радикалов, как во время, так и после ишемии.

М.Е. Szabo et al. показали, что во время ишемии-реперфузии сетчатки супероксидный анион-радикал генерируется в таких количествах, что эндогенные уровни супероксиддисмутазы не способны защитить ткань от окислительного повреждения, вызванного этим радикалом [171]. Последующие исследования выявили участие не только супероксида, но также и пероксида водорода и гидроксильного радикала при ишемическом повреждении сетчатки [147, 148, 276].

Кроме того, неспособность эндогенной антиоксидантной системы справиться с гиперпродукцией свободных радикалов, возникающей после ишемии, подтверждается эффективностью применения антиоксидантных препаратов, таких как экстракт гинкго билоба [171], а-липоевая кислота [113], витамин Е [113, 132], тиоредоксин [193], аскорбиновая кислота [170] и хелатор железа дефероксамин [150] для защиты сетчатки от ишемического-реперфузионного повреждения.

Четкая связь между гибелью нейрональных клеток и образованием свободных радикалов и перекисей липидов в сетчатке, подвергнутой ишемии-реперфузии, была продемонстрирована только недавно [132, 148, 193]. Во всех этих исследованиях ишемия-реперфузия вызывала образование свободных радикалов, перекисное окисление липидов и повреждение нейронов и была в значительной степени предотвращена путем введения поглотителей свободных радикалов [132, 193] и хелатора ионов металла [148].

Многие биохимические каскады, запускаемые избытком глутамата, также приводят к образованию свободных радикалов [141]. Глутамат – главный возбуждающий нейротрансмиттер в сетчатке. Он высвобождается фоторецепторами, биполярными и ганглиозными клетками [241]. Если уровень глутамата остается повышенным достаточно долго, это может привести возбужденные нейроны к гибели [53]. Подобный механизм клеточной гибели относят к эксайтотоксичности.

Таким образом, гиперпродукция свободных радикалов и развитие окислительного стресса играют важную роль в патогенезе повреждения сетчатки при ишемии-реперфузии. Однако, учитывая важную роль глутаматной эксайтотоксичности в повреждении нейронов сетчатки, в эффективной терапии данной патологии целесообразно использовать антиоксиданты, блокирующие также эффекты глутамата.

## **1.2. Вещества с антиоксидантной активностью и их применение с терапевтической целью**

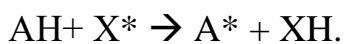
### **1.2.1. Современная классификация веществ с антиоксидантной активностью, используемых в медицинской практике**

Антиоксиданты – вещества, способные задерживать или подавлять свободнорадикальное окисление субстратов в более низких концентрациях по сравнению с концентрациями окисляемых субстратов [161].

На данный момент единой классификации антиоксидантных соединений и лекарственных препаратов на их основе не существует. В зависимости от механизма действия антиоксиданты подразделяют на вещества прямого и непрямого действия [4, 20, 21, 43, 144].

*1. Антиоксиданты прямого действия* – вещества, обладающие прямой непосредственной антирадикальной активностью, то есть способностью связывать свободные радикалы. Эту активность можно обнаружить в исследованиях *in vitro*:

1. Доноры протона – вещества, перехватывающие свободные радикалы, за счет легкоподвижного атома водорода:



- 1.1. Фенолы (токоферолы, инол, пробукол, флавоноиды).
- 1.2. Азот-содержащие гетероциклические вещества (мелатонин, производные 1,4-дигидропиридина).
- 1.3. Тиолы (глутатион, цистеин, гомоцистеин).
- 1.4.  $\alpha, \beta$  – диенолы (аскорбиновая кислота).
- 1.5. Порфирины (билирубин).
2. Полиены – вещества, имеющие ненасыщенные связи. Они легко взаимодействуют с АФК и свободными радикалами, защищая биомолекулы от окисления. К данным веществам относят ретиналь, ретиноевую кислоту.
3. Катализаторы – вещества, катализирующие удаление АФК и интермедиатов свободнорадикального окисления, без генерации новых свободных радикалов («имитаторы ферментов»):
  - 3.1. Имитаторы супероксиддисмутазы – вещества, катализирующие реакцию дисмутации супероксидного анион-радикала (нитроксилы, аминоксилы).
  - 3.2. Имитаторы глутатионпероксидазы – вещества, катализирующие превращение гидропероксидов и пероксида водорода в низкорекреационные гидроксисоединения и воду соответственно, с использованием тиол-содержащего пептида глутатиона. К таким веществам относится эбселен.
4. Ловушки радикалов – молекулы, образующие при взаимодействии со свободными радикалами аддукты радикальной природы с низкой реакционной активностью (спиновые метки – фенил-*трет*-бутилнитрон).
5. Хелаторы (комплексообразователи) – вещества, подавляющие металлозависимые реакции свободнорадикального окисления за счет связывания катионов металлов переходной валентности (ЭДТА, дефероксамин, лактоферрин).
6. Препараты антиоксидантных ферментов (СОД, каталаза).

## *II. Антиоксиданты непрямого действия:*

1. Вещества, принимающие участие в образовании прямых антиоксидантов или антиоксидантных ферментов (глутаминовая кислота используется в синтезе глутатиона).
2. Вещества, индуцирующие активность антиоксидантных ферментов или являющиеся их коферментами (селен).
3. Вещества, улучшающие метаболические процессы, связанные с развитием свободнорадикального окисления или окислительного стресса (янтарная кислота, ноопепт).
4. Вещества, влияющие на экспрессию (гиперэкспрессия/ингибирование) отдельных генов, кодирующих белки, сопряженные с антиоксидантной системой, механизмами антиокислительной репарации молекул ДНК и др. (например, стимуляторы Nrf2).

Таким образом, под термином «антиоксиданты непрямого действия» могут быть объединены все соединения, подавляющие развитие окислительного стресса.

Тем не менее, приоритетное значение в фармакологии антиоксидантов имеет поиск и разработка соединений, обладающих прямой антиоксидантной активностью [21].

Не менее важны для выбора конкретного антиоксиданта при фармакотерапии заболеваний их физико-химические свойства, в частности полярность. Например, липофильные антиоксиданты – фенолы и полиеновые антиоксиданты, являясь липофильными веществами, могут встраиваться в билипидные мембраны клеток и подавляют преимущественно свободнорадикальное окисление липидов, и в меньшей степени белков и нуклеиновых кислот.

Напротив, тиолсодержащие антиоксиданты, являясь гидрофильными веществами, более выражено снижают окислительную модификацию протеинов [43].

Таким образом, понимая механизмы индукции и промоции оксидативного стресса при разных типах патологических процессов, понимая первичные мишени атаки свободных радикалов, роль окислительных процессов в жизнедеятельности клетки и механизмах ее защиты, учитывая фармакодинамику и физико-химические свойства существующих антиоксидантов нами были выбраны в качестве перспективных фармакологических агентов для коррекции свободнорадикального звена патогенеза развития экспериментальной катаракты – 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол, гнойной язвы роговицы – лактоферрин, острого нарушения кровообращения в системе магистральных сосудов сетчатки – этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина.

### **1.2.2. Антиоксидантные и другие биологические свойства 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола**

2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол (ионол, дибунол) – синтетический пространственно затрудненный фенол, производное 2,6-ди-*трет*-бутилфенола, обладающий прямой антиоксидантной активностью [22].

Особенности антиоксидантных свойств этого соединения связаны с экранированием ароматической ОН-группы *трет*-бутильными заместителями в орто- положении (рисунок 1). Природных соединений аналогичного строения нет, что связано с отсутствием в живых организмах трансфераз, способных перенести *трет*-бутильные группы на бензольное кольцо [79].

В дальнейшем в тексте мы будем использовать наименование «**ИОНОЛ**» считая его сокращённым и более воспринимаемым наименованием изучаемого соединения – 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола.

Ионол – классический синтетический фенольный жирорастворимый антиоксидант, обладающий ярко выраженной антирадикальной активностью и в большинстве модельных систем превосходящий по эффективности другие пространственно затрудненные фенолы.



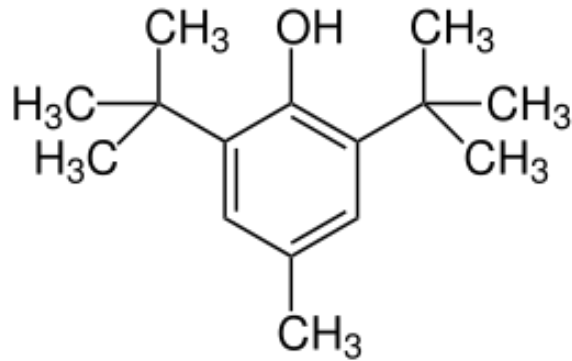


Рисунок 1 – Структура 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола (ионола)

2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол относится к классу малотоксичных соединений ( $LD_{50}$  для мышей составляет 2 г/кг; для крыс – 1,6-3,2 г/кг). После длительного приёма ионола не обнаруживается нарушений гемопоэза и морфологических изменений в органах животных [22].

Антиоксидантная и антирадикальная активность ионола исследована на разных моделях *in vitro* и *in vivo*. В концентрации 10 мкМ ионол значительно увеличивал лаг-фазу (с 80 до 500 минут) окисления липопротеинов низкой плотности [95], в концентрации 100 мкМ полностью ингибировал вызванное гипохлоритом окисление липидов в составе липопротеинов очень низкой плотности и липосом [165]. Ионол подавлял окисление связанных с гепарином липопротеинов низкой плотности в системах "миелопероксидаза –  $H_2O_2$ " и "пероксидаза хрена –  $H_2O_2$ ", в которых витамин E и урат были неэффективны [265]. В концентрации 20 мкМ 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол не только угнетал окисление липопротеинов, но и предотвращал апоптоз эндотелиальных клеток аорты и эндокарда, а также вызванный окисленными липопротеинами апоптоз макрофагов [159, 205], снижал синтез коллагена в гладкомышечных клетках при их инкубации с окисленными липопротеинами [213]. Ионол обладает высокой растворимостью и подвижностью в липидной фазе, что определяет потенциал инактивации радикала внутри липопротеиновой частицы и миграции на границу фаз, где возможно его восстановление аскорбатом, глутатионом или токоферолом.

На модели ишемии/реперфузии изолированного сердца крыс показано, что введение ионола в составе однослойных липосом в перфузат за 10 минут до начала ишемии в концентрациях 1, 3 и 10 мкМ оказывает защитный эффект в постишемический период. Позитивный эффект ионола наблюдался также при введении его на стадии реперфузии, но в более высоких концентрациях (3 и 10 мкМ). В концентрациях 30 и 100 мкМ препарат оказывал токсическое действие [50].

В экспериментальных исследованиях ионол снижал эффект многих токсинов, предотвращал развитие острых ишемических повреждений органов и постишемических расстройств. Введение крысам ионола (30 мг/кг массы) на 1-й, 3-й, 6-й и 9-й день после введения окисленной олеиновой кислоты более, чем в 5 раз уменьшало образование малонового диальдегида в печени и предотвращало гибель животных [79]. На модели острой интоксикации крыс  $\text{CCl}_4$  внутрибрюшинное введение ионола (25 мг/кг) за 12 часов до введения токсина и через 12 часов после снижало площадь некроза печени в 3 раза, при этом удельная площадь, занятая гепатоцитами в состоянии паранекроза, снижалась с 40,5% до 14,3% [24]. Внутрижелудочное введение крысам ионола (600 мг/кг массы в день) в течение 2 дней оказывало защитное действие при введении тиофенолов. В клетках повышалось содержание глутатион-S-трансферазы и глутатионредуктазы, снижалась активность ПОЛ в эритроцитарных мембранах и сыворотке крови, однако, значительно возрастал уровень ТБК-реактивных продуктов в микросомах печени [17].

При моделировании у крыс инфаркта миокарда предварительное введение ионола в течение 4 суток (per os по 60 мг/кг массы тела в день) оказывало антиаритмическое действие. На аналогичной модели у собак внутривенное назначение ионола (0,2 мг/кг массы в час) снижало повреждение миоцитов и предотвращало выход в кровь миоглобина и креатинкиназы. Ионол уменьшал зону некроза миокарда, при этом

увеличивался уровень  $\alpha$ -токоферола в мембранах эритроцитов и плазме крови [15].

На моделях язвы желудка показано, что препарат, вводимый в желудок в виде 10% масляного раствора, уменьшал частоту образования язв и сокращал сроки заживления язвенных поражений [22], при этом, эффект ионола был в 2 раза выше, чем  $\alpha$ -токоферола. Антиканцерогенная эффективность препарата показана на моделях развития рака кожи у животных под действием УФ-излучения [112] и химических канцерогенов [244].

В условиях эксперимента *in vitro* установлено, что предварительное инкубирование хрусталиков крыс с ионолом (10 мкМ) в течение 24 часов снижало катарактогенное действие 4-гидроксиноненаля (промежуточный продукт ПОЛ), при этом в эпителиоцитах хрусталика наблюдалась индукция глутатион-S-трансферазы [105]. Добавление в рацион ионола повышало уровень глутатиона в хрусталике, сетчатке и роговице глаз крыс [251].

Токсический эффект высоких доз ионола (200 мг/кг внутрибрюшинно) сопровождался быстрым (40 минут) снижением содержания в лёгких протеинкиназы С и кальцийзависимых протеаз [200]. В качестве одной из причин цитотоксического и проканцерогенного действия соединения может выступать образование при микросомальном окислении высокотоксичных метаболитов, причём гидроксилирование трет-бутильной группы преимущественно наблюдается в микросомах лёгких [212]. Токсический эффект ионола проявляется также и в отношении печени. После 30-дневного содержания крыс на диете с ионолом (0,2 %) наблюдалось не только увеличение веса печени, но и в сыворотке повышалось содержание ТБК-реактивных продуктов [127]. Гепатотоксический эффект ионола, по-видимому, также связан с образованием его метаболитов при микросомальном окислении. Одноразовое внутрибрюшинное введение мышам препарата (100 мг/кг)

приводило к снижению активности Mn-SOD в митохондриях печени, в результате чего значительно (в 3-6 раз) возрастала концентрация супероксид-аниона в митохондриальной и ядерной фракциях [10]. На модели ишемии/реперфузии мозга у монгольских песчанок было показано, что ионол, вводимый 3 раза внутривентриально в дозе 30 мг/кг за 12-14 часов до ишемии, а также через 2-3 и 6-8 часов после начала реперфузии, значительно снижал образование ТБК-реактивных продуктов при кратковременной (3 мин) ишемии, но повышал их уровень при длительной (24 ч) ишемии, что может быть связано с действием продуктов его метаболизма, накапливающихся в ткани мозга при нарушении кровообращения [78]. Как правило, канцерогенные или токсические свойства ионола и его анизольного аналога 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метокси-фенола проявлялись при состояниях напряжения физиологических, в том числе антиоксидантных, механизмов защиты тканей и органов [172], что указывает на возможность неоднозначного эффекта применения антиоксидантной терапии при патологических процессах, сопровождающихся развитием окислительного стресса.

Таким образом, 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол (ионол) является высокоактивным липидным прямым антиоксидантом, который при хроническом применении в высоких дозах может вызывать повреждение клеток. При этом, нежелательные эффекты ионола, по-видимому, связаны с образованием его метаболитов при микросомальном окислении. Поэтому для успешного использования данного вещества в офтальмологической практике желательно (чтобы избежать биотрансформации) применять его местно (в виде инстилляций) с предварительным подбором эффективной и безопасной дозы для целевой ткани. Наиболее патогенетически оправдано применять ионол при патологии, при которой отмечается первичная активация свободнорадикального окисления с повреждением мембранных липидов и белков, например, как при катаракте.

### 1.2.3. Антиоксидантные и другие биологические свойства лактоферрина

Лактоферрин представляет собой высококонсервативную мономерную одиночную полипептидную цепь 80 кДа, содержащуюся в большинстве экзокринных секретов млекопитающих, таких как молоко, слюна и слезы, бронхиальный и кишечный секреты. Лактоферрин обнаружен также во вторичных гранулах нейтрофилов. Первичная структура лактоферрина хорошо охарактеризована для нескольких видов [202, 259]. Лактоферрин представляет собой одну полипептидную цепь, состоящую из 692 аминокислот, организованных в две высоко гомологичные структурированные доли, которые обозначены как N- и C-доля. Каждая доля способна связывать один ион железа ( $Fe^{3+}$ ). Существует две первичные формы человеческого лактоферрина, одна содержится в экзокринных выделениях, а другая – находится во вторичных гранулах нейтрофилов. При этом обе формы являются продуктами одного и того же гена [182].

Лактоферрин играет важную роль в защите макроорганизмов от микробных инфекций [238, 195] и развитии системного воспалительного ответа (SIRS) [109, 191].

После инфицирования система моноцитов/макрофагов начинает продуцировать медиаторы воспаления, которые, в свою очередь, индуцируют костный мозг для генерации новых иммунных клеток и активируют дегрануляцию зрелых нейтрофилов. Впоследствии огромное количество лактоферрина выделяется из вторичных гранул нейтрофилов для борьбы с инфекцией.

Антимикробная активность лактоферрина хорошо изучена и состоит из двух механизмов. Лактоферрин оказывает бактериостатическое действие в отношении грамположительных бактерий, за счет связывания  $Fe^{3+}$ , необходимого для роста микроорганизмов [184]. В отношении грамотрицательных бактерий он оказывает бактерицидное действие, за счет

взаимодействия с липидом А поверхностного бактериального полисахарида (LPS) [88, 89, 174].

Также лактоферрин, связываясь с LPS, может мешать адгезии бактерий, тем самым подавляя один из наиболее важных факторов вирулентности микроорганизмов [184, 190].

Кроме того, взаимодействие лактоферрина с веществами микробного происхождения способствует высвобождению провоспалительных медиаторов, включая цитокины (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 и TNF- $\alpha$ ), липидные медиаторы и АФК [184].

В многочисленных исследованиях лактоферрин доказал свою высокую активность против широкого спектра микроорганизмов: *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Legionella pneumophila* и *Mycobacterium tuberculosis* [184].]

Лактоферрин может защитить клетки макроорганизма также и от вирусов, ингибируя связывание последних с клетками-мишенями и препятствуя, тем самым, их последующей внутриклеточной репликации [187]. Различные механизмы были предложены, для объяснения противовирусного эффекта лактоферрина. Наиболее распространены утверждения, что лактоферрин связывает и блокирует вирусные рецепторы, такие как гликозаминогликаны, особенно гепарансульфат (HS). Таким образом, взаимодействие лактоферрина с гепарансульфатом позволяет избежать первого контакта между клеткой-хозяином и вирусом, предотвращая развитие вирусной инфекции [92]. У лактоферрина выявлена также и антиоксидантная активность. Благодаря секвестрации железа лактоферрин контролирует физиологический баланс производства АФК и скорость их элиминации, что естественным образом предотвращает прямое повреждение клеток свободными радикалами. Также он способен повышать активность ключевых антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы) [181, 207].

Кроме того, в более ранних исследованиях на эндотоксемических мышцах было продемонстрировано, что лактоферрин снижал уровни внутриклеточного окислительного стресса, индуцированного LPS, посредством снижения дисфункции митохондрий [186]. Лактоферрин ослаблял дисфункцию митохондрий в печени животных, получавших LPS, что проявлялось уменьшенным выбросом  $H_2O_2$  из митохондрий, а также снижением повреждения митохондриальной ДНК.

Таким образом, лактоферрин является хелатирующим антиоксидантом, проявляющим антибактериальную активность и не обладающим прямым ингибирующим влиянием на оксидативный механизм антимикробной защиты. Учитывая то обстоятельство, что по структуре лактоферрин является полипептидом и имеет низкую биодоступность, оправдано его местное (инстилляционное) применение с предварительным подбором эффективной и безопасной дозы, поскольку данный способ введения ранее не тестировался. Указанные выше тезисы обосновывают патогенетически ориентированное применение лактоферрина как для коррекции окислительного стресса, так и для комплексного подхода в лечении гнойной язвы роговицы.

#### **1.2.4. Антиоксидантные, нейропротекторные и другие биологические свойства этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина**

Этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина (лекарственный препарат «Ноопепт») – оригинальное отечественное соединение, обладающее выраженной антиоксидантной, ноотропной, антиамнестической и нейропротекторной активностью [61, 66] (рисунок 2).

Препарат был синтезирован в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН на основе оригинальной гипотезы, которая может быть охарактеризована как дизайн коротких пептидов на основании имитации структуры непептидного нейротропного средства [64].

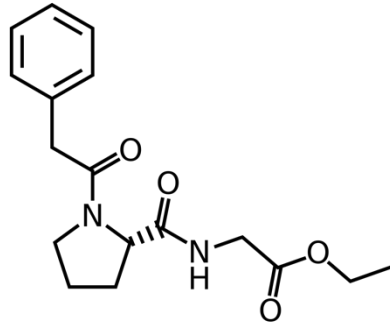


Рисунок 2 – Структура этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина

Дизайн пептидов, облегчающих когнитивные функции, основан на представлении о пептидергическом механизме действия пирацетама и о роли олигопептидов, содержащих одну из эндогенных пирролидин-карбоновых аминокислот, пироглутаминовую или пролин, в качестве эндогенных лигандов гипотетических мест связывания пирацетама [61, 64].

Механизм действия этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина активно изучается. Показано, что соединение усиливает экспрессию NGF (фактора роста нервов) и BDNF (нейротрофического фактора мозга) в гиппокампе [54, 56], проявляет холинопозитивные свойства на поведенческом и нейрональном уровне, ингибирует, индуцируемые стрессом киназы pSAPK/JNK и pERK1 [27, 47].

Недавно было показано, что этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина (10 мкМ) увеличивает ДНК-связывающую активность HIF-1 и не влияет на активность CREB, NFAT, NF-κB, p53, STAT1, GAS, VDR и HSF1. В условиях стабилизации HIF-1, вызванной индуктором гипоксии  $\text{CoCl}_2$ , этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина обеспечивает дополнительное повышение ДНК-связывающей активности HIF-1 [49].

При этом, этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина не изменяет распределение клеток линий HEK293 и SH-SY5Y по фазам G1, S, G2 клеточного цикла и не влияет на относительный уровень маркера



пролиферации Ki-67, что свидетельствует об отсутствии у соединения способности усиливать клеточный рост [57].

Этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина в виде лекарственного препарата «Ноопепт» обладает выраженными ноотропными и нейропротективными свойствами в дозах на несколько порядков ниже, чем пирацетам, и, при этом, характеризуется значительно более многообразной фармакодинамикой. Различные повреждающие воздействия вызывают комплекс метаболических сдвигов, включающих: субстратный дефицит, снижение мембранного потенциала, накопление глутамата (за счет его усиленного высвобождения и угнетения обратного захвата), возрастание внутриклеточного содержания ионов кальция, активацию кальций-зависимых протеаз, усиление липолиза и протеолиза, повреждение липидных и протеиновых мембран. В ряде исследований продемонстрировано воздействие ноопепта на все перечисленные звенья патологического метаболического каскада [27, 62, 69]. Показано также наличие противовоспалительного, антикоагулянтного, фибринолитического, холиносенсибилизирующего эффектов, также принимающих участие в реализации нейропротективного действия препарата [62].

С помощью математического моделирования предсказано холиномиметическое действие этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина [52].

В нейронах культивируемых срезах гиппокампа радиального слоя поля CA1 крысы этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина вызывал увеличение частоты спонтанных кальциевых транзиентов, в то же время, в нейронах пирамидного слоя не было выявлено значимого влияния соединения на внутриклеточную концентрацию кальция или ее динамику [12]. При этом, этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина не оказывал существенного действия на вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через активированные протончувствительные каналы [31].

Этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина обладает выраженной антиоксидантной активностью. Показано, что соединение в концентрации  $10^{-6}$  M предотвращало развитие окислительного стресса и значительно повышало выживаемость нейронов, выделенных из кортикальной ткани 17-21 недельного здорового плода человека и плода с синдромом Дауна при воздействии пероксида водорода и  $\text{FeSO}_4$  [160]. На модели иммобилизационного стресса была показана способность этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина повышать активность супероксиддисмутазы и других антиоксидантных ферментов в ткани мозга и плазме крови экспериментальных животных при его профилактическом введении [67]. На модели  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированной хемилюминесценции липопротеинов сыворотки крови здоровых доноров *in vitro* изучена антиоксидантная активность этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина. Показано, что он увеличивал длительность латентного периода хемилюминесценции (в 3,4 раза по отношению к контролю), отражающего эндогенный антиоксидантный потенциал [77]. При экспериментальном стрептозотоциновом преддиабете этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина (0,5 мг/кг внутривнутрибрюшинно) нормализовал повышенный уровень МДА и оказывал антигенотоксический эффект, оцененный в тесте ДНК-комет [55].

Таким образом, этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина оказывает не прямое антиоксидантное действие, сочетающееся с выраженной нейропротекторной активностью, реализуемой за счет воздействия на все основные звенья глутаматной эксайтотоксичности. Учитывая патогенез развития повреждения нейронов в условиях острой и хронической гипоксии, считаем патогенетически оправданным применение данного вещества для коррекции окислительного стресса и протекции повреждения нейронов сетчатки в условиях острых нарушений кровоснабжения в ее магистральных сосудах.

В работе был использован лекарственный препарат «Ноопепт», содержащий в качестве единственного биологически активного компонента этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина. В дальнейшем в тексте мы будем использовать наименование «ноопепт» считая его сокращённым и более воспринимаемым наименованием изучаемого соединения – этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина.

## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1. Тест-система**

В качестве тест-системы в исследованиях использовали 431 кролика самца породы Шиншилла, массой 3500-4000 г, в возрасте 10-13 месяцев.

Животные закупались в специализированном питомнике «Касимов-миахро» (г. Касимов, Рязанская область) и имели необходимые ветеринарные свидетельства.

Кролики содержались в конвенциональном виварии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России в индивидуальных клетках.

Работу с животными проводили в соответствии с международными правилами (Директива 86/609/ЕЕС) и правилами надлежащей лабораторной практики (приказ МЗ РФ №199н от 01.04.16) [71].

Протокол эксперимента был рассмотрен и утвержден на заседании локального этического комитета ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (протокол №12 от 08.04.2016 г). Исследование выполнялось в три этапа. На первом этапе изучалось влияние ионола на развитие экспериментальной катаракты, на втором этапе оценивалась эффективность лактоферрина в комплексной терапии экспериментальной гнойной язвы роговицы, на третьем этапе проверялась возможность применения ноопепта в терапии экспериментального тромбоза сосудов сетчатки.

### **2.2. Биохимические методы исследования**

В исследовании использовали реактивы фирмы «Sigma Aldrich» (Германия).

Для определения свободнорадикального статуса исследуемых тканей оценивали концентрацию малонового диальдегида (МДА), содержание восстановленных небелковых тиоловых групп (GSH), активность глутатионпероксидазы (GPx), глутатион-S-трансферазы (GT), супероксиддисмутазы (SOD).

Концентрацию МДА оценивали по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Принцип метода основан на способности некоторых

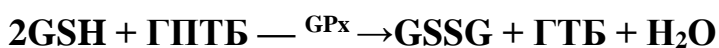
конечных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в кислой среде реагировать с ТБК, с эквимольным образованием окрашенного комплекса, который имеет максимум поглощения при 532 нм. Принято считать, что этой реакцией определяется содержание малонового диальдегида (МДА), хотя, по данным ряда исследователей, с ТБК реагирует не только непосредственный предшественник МДА – эндопероксид, но и некоторые другие продукты ПОЛ. Во избежание разночтений, в дальнейшем мы будем говорить об определении количества МДА, так как данное допущение существенно сути полученных результатов не меняет [13, 73].

Уровень GSH определяли по реакции восстановления дисульфид 5,5-дителиобис(2-нитробензоата) с образованием эквивалентного количества окрашенных жёлтых анионов 2-нитро-5-тиобензоата, имеющих максимум поглощения при 412 нм [138].

Активность GPx определяли по скорости окисления НАДФН<sub>2</sub>.

Принцип метода: НАДФН<sub>2</sub> служит донором протонов для реакции ферментативного восстановления глутатиона, который окисляется в реакции ферментативного восстановления гидроперекиси третбутила (гидроперекись третбутила (ГПТБ) – специфический субстрат для действия Se-зависимой глутатионпероксидазы). Чем выше активность глутатионпероксидазы, тем интенсивнее будет окисляться НАДФН<sub>2</sub>, что приведет к снижению оптической плотности при 340 нм [38, 214].

В модельной системе протекают следующие реакции:



Активность GT оценивали по реакции ферментативной конъюгации глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом с образованием [177] комплекса, имеющего максимум поглощения при 340 нм.

Активность SOD оценивали по регистрации степени торможения реакции окисления кверцетина, фиксируемой по изменению оптической плотности реакционной смеси при длине волны  $\lambda=406$  нм [34].

При экспериментальном тромбозе сосудов сетчатки для оценки метаболического статуса нейронов определяли содержание глутамата (Glu), аспартата (Ast), глицина (Gly), таурина (Tau), гамма-аминомасляной кислоты (GABA). Для этого образец сетчатки измельчали в гомогенизаторе в 1 мл 0,1 н HClO<sub>4</sub> и хроматографировали, используя ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией (длина волны возбуждения – 230 нм, длина волны испускания – 392 нм) на хроматографе Agilent 1100 (США) с аналитической колонкой HYPERSIL ODS, 4,6 × 250 мм, 5 мкм [134].

### **2.3. Офтальмологические методы исследования**

Для клинической оценки состояния изучаемых структур переднего отрезка глаза – роговицы и хрусталика, использовали стандартные офтальмологические методы: фокальное освещение, метод осмотра в проходящем свете и биомикроскопия. Метод фокального освещения применяли в стандартной технике с использованием лампы накаливания 100 Вт и собирающей линзы оптической силой в 20D. Осмотр хрусталика в проходящем свете осуществляли с использованием прямого офтальмоскопа. Биомикроскопию производили на щелевой лампе ЩЛ-2Б в белом свете. Для оценки площади язвенного дефекта его предварительно окрашивали 1% раствором флюоресцеина. Глаза кроликов фотографировали цифровой камерой Canon Power Shot G5. Ввод и анализ изображений осуществляли с использованием программы Adobe Photoshop CS 2.0.

Для клинической оценки состояния структур глазного дна – диска зрительного нерва, ретинальных сосудов, сетчатки применяли метод непрямой бинокулярной офтальмоскопии с использованием бинокулярного офтальмоскопа Neitz Ю-α и собирающих линз 14D и 20D в белом и зелёном свете.

### **2.4. Электрофизиологические методы исследования**

Электрофизиологические исследования (ЭФИ) проводились на приборе Нейрософт (Россия). После местной анестезии 0,5% раствором проксиметакаина («Алкаин», «Alcon-Couvreur N.V.S.A», Бельгия) на

роговицу помещался биполярный контактный электрод. Заземляющий электрод располагался в коже за ушами. Исследование выполнялось в темном помещении после 20 минутной темновой адаптации. Частота стимуляции составила 1Гц, тип стимуляции – вспышка света, усиление 100 мВ [153].

Результаты оценивали по амплитуде (мкВ) и лаг-фазе (мсек) волны *a*, отражающей функцию фоторецепторов (I нейрон), и волны *b*, характеризующей активность II и III нейронов (биполярных клеток, клеток Мюллера, ганглионарных клеток).

### **2.5. Микробиологические методы исследования**

Для выполнения бактериологического исследования производился соскоб со дна язвенного дефекта роговицы бактериологической петлей материала, который в дальнейшем помещался в пробирку с 0,5 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Пипеткой 0,1 мл полученного раствора переносился на чашку Петри с желточно-солевым агаром и тщательно растирался шпателем. Инкубирование проводили в термостате при 37 °С в течение 48 часов.

### **2.6. Морфологические методы исследования**

Объектами морфологического изучения были хрусталик (катаракта), роговица (гнойная язва роговицы) и сетчатка (тромбоз ретинальных сосудов).

Хрусталик после энуклеации глазного яблока выделяли тупым путем от цинновых связок, затем фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и заливали в целлоидин по модифицированному нами методу (рацпредложение №1133 от 02.04.2003 «Модификация обработки и заливки хрусталика глаза в целлоидин»). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, после чего микропрепараты фотографировали с помощью цифровой камеры ЛОМО ТС-500 (Россия) с использованием объективов ×10, ×20, ×40.

Роговицу после энуклеации глазного яблока высекали с участком склеры в 1 мм от лимба, разделяли на 2 части. Из них одна часть использовалась для гистологического исследования. Образцы роговицы

фиксируют в 10% растворе нейтрального формалина, обезживают, заливают в парафин и из полученных блоков готовят срезы толщиной 6-7 мкм, которые окрашивают гематоксилином и эозином. Микропрепараты фотографируют с помощью цифровой камеры ЛОМО ТС-500 (Россия) с использованием объективов  $\times 10$ ,  $\times 20$ ,  $\times 40$ .

Для гистологического исследования сетчатки после энуклеации глазное яблоко фиксируют в 10% растворе нейтрального формалина, удаляют хрусталик и заливают в парафин. Для визуализации структур сетчатки используют полихромное окрашивание. Микропрепараты фотографируют с помощью цифровой камеры ЛОМО ТС-500 (Россия) с использованием объективов  $\times 20$ ,  $\times 40$ ,  $\times 60$  раз.

## **2.7. Исследование биохимических и терапевтических эффектов 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола при экспериментальной катаракте**

### **2.7.1. Дизайн исследования**

В рамках выполнения первого этапа исследования осуществлялся подбор эффективной и безопасной дозы 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола (ионола) для инстилляций в конъюнктивальную полость, а в дальнейшем выбранные дозы использовались для фармакотерапии катаракты. Экспериментальные животные были рандомизированы на следующие группы и серии:

*Первая группа* – подбор эффективной и безопасной дозы ионола, включала пять серий опытов, по 5 кроликов (10 глаз) в каждой серии:

Первая серия – интактные кролики – без моделирования патологии и экспериментальных воздействий (n=10);

Вторая серия – инстилляцией растворителя (контроль) – стерильного рафинированного оливкового масла (n=10);

Третья серия – инстилляцией 22% масляного раствора ионола («Sigma», Германия) (n=10);

Четвертая серия – инстилляцией 10% масляного раствора ионола (n=10);

Пятая серия – инстилляцией 2,2% масляного раствора ионола (n=10);



Шестая серия – инстилляцией 0,22% масляного раствора ионола (n=10).

Растворитель и тестируемые растворы инстиллировали в оба глаза 3 раза в день с интервалом 6 часов (в 9<sup>00</sup>, 15<sup>00</sup> и 21<sup>00</sup>) в течение 30 суток. В конце исследования животных выводили из эксперимента передозировкой золетила («Золетил 100», Virbac С.А., Франция) в дозе 30 мг/кг массы, для биохимических исследований забирали хрусталик.

*Вторая группа* – изучение влияния ионола на развитие экспериментальной катаракты, включала пять серий опытов:

Первая серия – контроль патологии – животные, у которых моделировали катаракту и инстиллировали в конъюнктивальную полость стерильное рафинированное оливковое масло (n=30);

Вторая серия – стандартное лечение – инстилляцией раствора «Офтан Катахрома» («Santen ОУ», Финляндия) животным на фоне экспериментальной катаракты (n=24);

Третья серия – стандартное лечение – инстилляцией 10% масляного раствора  $\alpha$ -токоферола ацетата (ООО «Фармамед», Россия) животным на фоне экспериментальной катаракты (n=24);

Четвертая серия – инстиляция 0,22% масляного раствора ионола животным на фоне экспериментальной катаракты (n=24);

Пятая серия – инстиляция 2,2% масляного раствора ионола животным на фоне экспериментальной катаракты (n=24).

Исследуемые вещества инстиллировали в конъюнктивальную полость обоих глаз. Кратность закапывания препаратов составляла 3 раза в день с интервалом 6 часов (в 9<sup>00</sup>, 15<sup>00</sup> и 21<sup>00</sup>). Терапию начинали на 7 сутки от момента индукции катарактогенеза, что соответствовало времени появления начальных помутнений хрусталика во всех глазах подопытных животных и проводили до конца эксперимента, длительность которого составляла 56 суток.

В серии контроля катаракты животных выводили из эксперимента для проведения биохимического анализа хрусталика на 7 (время начала терапии),

14, 28, 42 и 56 сутки. Во всех остальных сериях животных выводили из опыта на 14, 28, 42 и 56 сутки. На каждый срок из каждой серии биохимическому анализу подвергалось 3 животных (6 глаз).

### 2.7.2. Моделирование катаракты

Экспериментальную катаракту моделировали по методу К.С. Bhuyan et al. в собственной модификации (рацпредложение «Модификация свободнорадикальной модели катаракты» №1209 от 3.10.2006 г.) [110]. Для этого кроликов наркотизировали внутримышечным введением золетила и ксилазина, для местного обезболивания инстиллировали в конъюнктивальную полость глаза 2% раствор лидокаина. Веки фиксировали векоподъёмниками, после чего в верхне-наружном секторе глаза в 5-6 мм от лимба однократно инъецировали в стекловидное тело стерильный раствор диквата дибромида (6,7-дигидродипиридол[1,2- $\alpha$ :2',1'- $\alpha'$ ]пиразинадиимин•Br<sub>2</sub>) в физиологическом растворе в дозе 600 нмоль в объеме 30 мкл. Направление движения иглы – к центру глаза. После инъекции однократно инстиллировали в конъюнктивальную полость глаза раствор ципрофлоксацина. Методом биомикроскопии исключали повреждение задней капсулы хрусталика.

Дикват дибромид – водорастворимый контактный неселективный гербицид, использующийся для борьбы с плавающими водными макрофитами и другими типами нитчатых водорослей в стоячей и слабоподвижной воде (Aquatic Plant Identification and Herbicide Use Guide, 1988). К.С. Bhuyan et al. обнаружили, что введение раствора диквата дибромида в стекловидное тело глаза кролика вызывает увеличение концентрации супероксидного и гидроксильного радикалов в хрусталике, сетчатке, стекловидном теле и камерной влаге в несколько раз и сопровождается формированием корковой катаракты [110].

Экспериментальная катаракта воспроизводилась на обоих глазах кроликов.

### **2.7.3. Методы оценки полученных биологических эффектов**

Для оценки степени помутнения хрусталика использовали стандартные офтальмологические методы: фокальное освещение, метод осмотра в проходящем свете и биомикроскопию. Течение катаракты оценивали по динамике помутнений хрусталика: прогресс, стабилизация и регресс.

Для биохимических исследований животных выводили из опыта методом воздушной эмболии под золетилловым наркозом через 4 – 6 часов после последней инстилляцией исследуемого вещества. Сразу после эвтаназии животным производили энуклеацию. Хрусталик от цинновых связок отделяли тупым путём стерильным шпателем. Навеску ткани хрусталика гомогенизировали в изотоническом фосфатном буфере с pH 7,4.

Для оценки течения катаракты и эффективности проводимой терапии были проведены биохимические исследования выраженности окислительного стресса в гомогенатах хрусталика. Для этого определяли концентрацию МДА, уровень GSH, активность GPx и GT.

## **2.8. Исследование биохимических и терапевтических эффектов лактоферрина при экспериментальной гнойной язве роговицы**

### **2.8.1. Дизайн исследования**

В ходе выполнения второго этапа исследования оценивалось влияние разных доз (концентраций) лактоферрина на течение экспериментальной гнойной язвы роговицы. Кролики были рандомизированы на 9 групп:

*1 группа* – интактные кролики – без моделирования патологии и экспериментальных воздействий (n=6);

*2 группа* – контроль патологии – животные, у которых моделировали экспериментальную гнойную язву роговицы и инстиллировали в конъюнктивальную полость физиологический раствор (n=48);

*3 группа* – стандартное лечение – инстилляцией 0,3% раствора ципрофлоксацина («Ципролет», «Д-р Редди'с Лабораторис Лтд», Индия) животным на фоне экспериментальной гнойной язвы роговицы (n=48);

*4 группа* – инстилляция раствора (0,5 мг/мл) лактоферрина («лактофтал», ООО «НТфарма», Россия) [63] животным на фоне экспериментальной гнойной язвы роговицы (n=36);

*5 группа* – инстилляция раствора (1,5 мг/мл) лактоферрина животным на фоне экспериментальной гнойной язвы роговицы (n=36);

*6 группа* – инстилляция раствора (2,5 мг/мл) лактоферрина животным на фоне экспериментальной гнойной язвы роговицы (n=36);

*7 группа* – инстилляция раствора (5 мг/мл) лактоферрина животным на фоне экспериментальной гнойной язвы роговицы (n=36);

*8 группа* – животные, которым к стандартной терапии ципрофлоксацином прибавляли инстилляцию раствора (0,5 мг/мл) лактоферрина (n=48);

*9 группа* – животные, которым к стандартной терапии ципрофлоксацином прибавляли инстилляцию раствора (0,5 мг/мл) лактоферрина, но вводили его только в течение 14 дней (n=12).

Перед инстилляциями лактоферрин разводили в физиологическом растворе до необходимых концентраций. Используемые растворы применяли в виде инстилляций в конъюнктивальную полость по две капли четыре раза в день.

Вторая, третья и восьмая группы – включали в себя 8 серий опытов – 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21 и 28 сутки эксперимента (или 2, 3, 4, 6, 8, 15, 22, 29 сутки после внесения бактериальной культуры).

Четвертая, пятая, шестая и седьмая группы – состояли из 6 серий опытов – 1, 3, 5, 7, 14 и 21 сутки эксперимента (или 2, 4, 6, 8, 15, 22 сутки после внесения бактериальной культуры).

Девятая группа была представлена двумя сериями – 21 и 28 сутки эксперимента (или 22 и 29 сутки после внесения бактериальной культуры).

В каждой серии было по 3 кролика (6 глаз). Патология воспроизводилась на обоих глазах.

### **2.8.2. Моделирование гнойной язвы роговицы**

Для моделирования гнойной язвы роговицы использовали чистую культуру стафилококка, *Staphylococcus aureus* (АТСС 25923), предоставленную кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Патологию воспроизводили по методике Н.А. Адамовой (1990) [2]. После инстилляционной анестезии 0,5% раствором проксиметакаина («Алкаин», «Alcon-Couvreur N.V.S.A», Бельгия) в центральных отделах роговицы трепаном диаметром 5 мм наносили насечку на глубину 150 мкм, в пределах которой роговица расслаивалась, и отсепарованные слои удалялись. В полученный дефект втирали одну стандартную петлю ( $10^7$ - $10^8$  КОЕ) чистой культуры золотистого стафилококка. Через сутки после нанесения микробов на всех глазах развивались типичные гнойные язвы роговицы. С этого момента начинали вводить исследуемые лекарственные препараты. Патология воспроизводилась на обоих глазах животных. В указанные сроки животных выводили из эксперимента методом воздушной эмболии под золетиловым наркозом.

### **2.8.3. Методы оценки полученных биологических эффектов**

С целью оценки эффективности проводимой фармакотерапии гнойной язвы роговицы проводили бактериологический посев мазка со дна язвенного дефекта, определение площади язвенного дефекта, гистологическое исследование роговицы в проекции язвенного дефекта, а также оценку выраженности окислительного стресса в ткани роговицы.

Учет выросших колоний осуществлялся через 48 часов инкубации в термостате при 37 °С.

Для оценки площади язвенного дефекта учитывали относительную площадь дефекта, которую рассчитывали, как отношение площади дефекта роговицы, прокрашенного флюоресцеином, к площади дефекта формируемого первоначально трепаном.

Для оценки антиоксидантного статуса роговицы в полученном гомогенате определяли следующие параметры: концентрацию МДА, уровень GSH, активность SOD, активность GPx, активность GT.

## **2.9. Исследование биохимических и терапевтических эффектов этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина при экспериментальном тромбозе сосудов сетчатки**

### **2.9.1. Дизайн исследования**

В ходе выполнения третьего этапа исследования изучалось влияние этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина (ноопепта) на течение экспериментального тромбоза сосудов сетчатки. На данном этапе животные были рандомизированы на три группы.

*Первая группа* – изучение влияния ноопепта на выраженность окислительного стресса при экспериментальном тромбозе сосудов сетчатки, включала четыре серии:

Первая серия – интактные животные – без моделирования патологии и экспериментальных воздействий (n=6);

Вторая серия – контроль патологии – животные, у которых моделировали тромбоз сосудов сетчатки и вводили воду для инъекций (n=42);

Третья серия – стандартное лечение – введение пирацетама (ЗАО «Фармацевтический завод ЭГИС», Венгрия) животным на фоне экспериментального тромбоза сосудов сетчатки (n=42);

Четвертая серия – введение ноопепта (АО «Отисифарм», Россия) на фоне экспериментального тромбоза сосудов сетчатки (n=42).

Животные выводились из эксперимента через 1, 3, 6 ч, 1, 3, 7 и 14 сутки после развития тромбоза сосудов сетчатки. На каждую временную точку приходилось по 3 кролика, то есть 6 глаз (n=6).

*Вторая группа* – изучение влияния ноопепта на гистологическое строение сетчатки при экспериментальном тромбозе ее сосудов включала четыре серии:

Первая серия – интактные животные – без моделирования патологии и экспериментальных воздействий (n=6);

Вторая серия – контроль патологии – животные, у которых моделировали тромбоз сосудов сетчатки и вводили воду для инъекций (n=36);

Третья серия – стандартное лечение – введение парацетама (ЗАО «Фармацевтический завод ЭГИС», Венгрия) животным на фоне экспериментального тромбоза сосудов сетчатки (n=36);

Четвертая серия – введение ноопепта (АО «Отисифарм», Россия) на фоне экспериментального тромбоза сосудов сетчатки (n=36).

Животные, выводились из эксперимента через 1, 3, 7, 14, 28 и 84 сутки после развития тромбоза сосудов сетчатки. На каждую временную точку приходилось по 3 кролика, то есть 6 глаз (n=6).

*Третья группа* изучение влияния ноопепта на аминокислотный состав сетчатки при экспериментальном тромбозе ее сосудов, включала три серии:

Первая серия – интактные животные – без моделирования патологии и экспериментальных воздействий (n=9);

Вторая серия – контроль патологии – животные, у которых моделировали тромбоз сосудов сетчатки и вводили воду для инъекций аналогичным ноопепту способом. Кролики выводились из эксперимента через 6 ч (n=14), 12 ч (n=11), 1 день (n=5), 3 дня (n=6), 5–7 дней (n=14) и 14 дней (n=10) после моделирования патологии;

Третья серия – введение ноопепта на фоне экспериментального тромбоза сосудов сетчатки. Кроликов выводили из эксперимента через 6 ч (n=8), 12 ч (n=8), 1 день (n=8), 3 дня (n=8), 5–7 дней (n=15) и 14 дней (n=8) после моделирования патологии.

Ноопепт во всех группах вводили в виде субстанции (НИИ фармакологии имени В.В. Закусова), растворённой в воде для инъекций, сразу после моделирования тромбоза сосудов сетчатки в дозе 0,5 мг/кг массы внутривенно, а затем три раза в день внутрижелудочно в дозе 10 мг/кг массы

(«Ноопепт», АО «Отисифарм», Россия) [19] на протяжении всего эксперимента. Пирацетам вводили сразу после моделирования тромбоза сосудов сетчатки в дозе 2000 мг/кг массы внутривенно [242], а затем три раза в день внутрижелудочно в дозе 250 мг/кг массы [269]. Животным второй серии (контроль патологии) по той же схеме вводили воду для инъекций в эквивалентном объеме.

### **2.9.2. Моделирование тромбоза сосудов сетчатки**

Тромбоз сосудов сетчатки моделировали под наркозом, который осуществляли в/м введением ксилазина гидрохлорида («Рометар», «СПОФА», Чехия) в дозе 4,0-6,0 мг/кг массы и золетила-50 («Virbac», Франция) в дозе 5-10 мг/кг массы [68]

Перед началом опыта зрачок расширяли путем трехкратного закапывания 1% раствора тропикамида («Мидриацил», «Алкон лабораториз Инк», США) и 1% раствора циклопентолата («Цикломед», «Сентисс Фарма Пвт. Лтд.», Индия). Для формирования тромбоза сосудов сетчатки использовали фотосенсибилизирующий краситель бенгальский розовый («Sigma», США) ( $\lambda$  индукции 560 нм). Фотосенсибилизатор вводили в ушную вену в дозе 40 мг/кг массы. Сразу после введения в вену бенгальского розового транспупиллярно производили фокальное освещение белым светом височной сосудистой аркады в месте перегиба сосудов через край диска зрительного нерва с помощью бинокулярного офтальмоскопа Скепенса и собирающей линзы + 14,0 D. Освещение проводилось в среднем в течение 10 минут под визуальным контролем формирования окклюзии ретинальных сосудов. Для профилактики высыхания роговицу омывали 0,9% раствором NaCl (рацпредложение «Способ моделирования экспериментальной ишемии сетчатки» №1305 от 27.12.2010 г).

В основе данной модели лежит способность фотосенсибилизатора бенгальского розового под воздействием света  $\lambda=560$  нм генерировать активные формы кислорода, что приводит к повреждению сосудистой стенки и тромбированию сосудов. Преимуществами данной модели являются



селективность, направленность воздействия, малая травматичность, лёгкая воспроизводимость, фокальное освещение белым светом. При этом избирательно поражаются клетки эндотелия сосудов, и происходит минимальное воздействие на окружающие ткани [270]. Данная модель дисциркуляторного состояния сетчатки позволяет вызвать транзиторную ишемию смешанного артерио-венозного характера, что подтверждено результатами морфологических исследований.

### **2.9.3. Методы оценки полученных биологических эффектов**

У животных всех групп во все сроки эксперимента проводили бинокулярную офтальмоскопию и электроретинографию. Для оценки антиоксидантного статуса сетчатки определяли следующие параметры: концентрацию МДА, уровень GSH, активность SOD, активность GPx, активность GT. У животных третьей группы для оценки метаболического статуса нейронов сетчатки определяли содержание Glu, Gly, Tau, Ast, GABA.

В конце эксперимента эвтаназию животных осуществляли методом воздушной эмболии под золетилловым наркозом.

### **2.10. Метод статистического анализа полученных результатов**

Полученные результаты обрабатывали с помощью программы «StatSoft Statistica 13.0» (США, номер лицензии JPZ811I521319AR25ACD-W) и Microsoft Excel for MAC ver. 16.24 (ID 02984-001-000001) [14, 70]. Характер распределения полученных данных определяли по критерию Шапиро-Уилка.

При нормальном распределении данных в независимых выборках статистическую значимость различий оценивали дисперсионным анализом (ANOVA), парные сравнения осуществляли по критерию множественного сравнения Ньюмена-Кейлса. При распределении данных, отличном от нормального, в независимых выборках статистическую значимость различий оценивали по критерию Крускала-Уоллиса. При наличии статистической значимости, парные сравнения выполняли по критерию Манна–Уитни с поправкой Бонферрони.

В связанных выборках при нормальном распределении данных достоверность различий оценивали дисперсионным анализом повторных измерений (ANOVA), парные сравнения выполняли по критерию Ньюмена-Кейлса. При ненормальном распределении в связанных выборках достоверность различий оценивали с помощью критерия Фридмана, парные сравнения выполняли по критерию Вилкоксона с поправкой Бонферрони.

Данные на графиках и в таблицах представлены в виде среднего арифметического и его стандартного отклонения – при нормальном распределении или в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей – при распределении, отличном от нормального.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1. Биологические эффекты применения 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола при экспериментальной катаракте

##### 3.1.1. Определение эффективной и безопасной антиоксидантной дозы 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола для ткани хрусталика

В ходе изучения влияния 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола (ионола) на развитие экспериментальной катаракты вначале осуществлялся подбор эффективной и безопасной дозы антиоксидантного вещества. Для этого в конъюнктивальную полость глаз интактных кроликов закапывали масляный раствор ионола в концентрациях 22%, 10%, 2,2% и 0,22% три раза в сутки в течение 30 суток. Контрольные кролики аналогичным курсом получали инстилляцию стерильного рафинированного оливкового масла. Полученные результаты представлены в таблице 1. Введение стерильного рафинированного оливкового масла кроликам в течение 30 суток достоверно не влияло на все изучаемые показатели свободнорадикального окисления. Изучаемые параметры статистически значимо не отличались от показателей интактных животных.

Месячный курс инстилляций растворов ионола высоких концентраций (22% и 10%) индуцировал ПОЛ в ткани хрусталика, тогда как введение низких доз ионола (2,2% и 0,22%) не сопровождалось изменением активности этого процесса.

После инстилляций 22% раствора ионола концентрация малонового диальдегида (МДА) в ткани хрусталика была достоверно выше, чем у контрольных животных на 344,1% ( $p < 0,01$ ). Введение 10% раствора также вызывало достоверное увеличение содержания МДА относительно контроля на 167,6% ( $p < 0,05$ ). Применение ионола в концентрациях 2,2% и 0,22% достоверно не влияло на данный показатель.

Таблица 1 – Выраженность окислительного стресса в ткани хрусталика при применении разных концентраций ионола (M±SD)

Серии эксперимента	МДА, мкмоль/мг белка	GSH, мкмоль/мг белка	Активность GPx, нмоль НАДФН/ мин× мг белка	Активность GT, мкмоль ХДНБ/ мин× мг белка
Интактные кролики (норма)	0,0034±0,00055	39,41±5,33	6,53±1,37	15,98±1,92
Контроль	0,0034±0,0016	39,28±3,32	6,43±0,45	15,86±2,44
Ионол 22%	0,0151±0,0110*	13,25±2,90*	9,60±2,40*	13,43±3,27
Ионол 10%	0,0091±0,0050*	16,31±4,63*	7,52±0,59*	18,14±0,45
Ионол 2,2%	0,0036±0,0025 <sup>#,&amp;</sup>	51,04±5,28 <sup>*,#,&amp;</sup>	6,26±0,25 <sup>#,&amp;</sup>	27,69±1,25 <sup>*,#,&amp;</sup>
Ионол 0,22%	0,0036±0,0016 <sup>#,&amp;</sup>	53,17±2,86 <sup>*,#,&amp;</sup>	6,24±0,38 <sup>#,&amp;</sup>	25,82±0,87 <sup>*,#,&amp;</sup>

\* -  $p < 0,05$  – достоверные различия по сравнению с показателями интактных животных;

# -  $p < 0,05$  – достоверные различия по сравнению с показателями животных, получавших ионол в концентрации 22%

& -  $p < 0,05$  – достоверные различия по сравнению с показателями животных, получавших ионол в концентрации 10%

При введении 22% и 10% растворов ионола концентрация МДА превосходила показатели животных, получавших тестируемое вещество в концентрациях 2,2% и 0,22% на 319,4% и 152,8% ( $p < 0,05$ ) соответственно (в концентрации 2,2% и 0,22% были получены идентичные значения уровня МДА 0,0036 мкмоль/мг белка).

Применение 22% и 10% растворов ионола сопровождалось существенным снижением уровня GSH в хрусталике на 66,3% и 58,5% ( $p < 0,05$ ) соответственно по сравнению со значением контрольных кроликов. Напротив, использование 2,2% и 0,22% растворов вызывало достоверное увеличение содержания GSH в ткани хрусталика на 29,9% и 35,4% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

При сравнении уровня GSH между сериями применения разных концентраций ионола было показано, что введение 2,2% и 0,22% растворов ионола проявлялось достоверно более высоким уровнем GSH относительно применения 22% раствора (на 285,2% и 301,3% соответственно) и 10% (на 212,9% и 225,9% соответственно) ( $p < 0,05$ ).

Причем разница между уровнем GSH на фоне использования 22% и 10% растворов ионола, а также между применением 2,2% и 0,22% растворов была не достоверна.

Применение ионола в концентрации 22% приводило к увеличению активности GPx на 49,3% по сравнению с контролем, на 53,4% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями кроликов, получавших ионол в концентрации 2,2% и на 53,8% по сравнению со значениями животных, получавших ионол в концентрации 0,22%. Аналогичным образом введение ионола в концентрации 10% вызывало увеличение активности данного антиоксидантного фермента по сравнению с контролем, 2,2% раствором ионола и 0,22% раствором ионола на 16,9%, 20,1%, 20,5% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

В то же время, применение тестируемого антиоксиданта в концентрации 2,2% и 0,22% достоверно не влияло на активность GPx.

Инстилляцией ионола в концентрации 22% и 10% достоверно не влияли на активность GT по сравнению с показателями контроля, при этом, применение антиоксиданта в концентрации 2,2% и 0,22% вызывало повышение активности фермента на 74,6% и 62,8% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Активность GT на фоне введения ионола в концентрации 2,2% была выше значений животных, получавших препарат в концентрации 22% и 10% на 106,2% и 52,6% ( $p < 0,05$ ), а при введении в концентрации 0,22% - на 92,3% и 42,3% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Таким образом, показано, что эффективными и безопасными для хрусталика являются инстилляцией 0,22 и 2,2% растворов 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола (ионола). Поэтому для дальнейших экспериментов использовались именно эти концентрации. В то же время, местное применение 22% и 10% растворов антиоксиданта оказывает прооксидантное действие на ткани хрусталика.

### **3.1.2. Влияние 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола на выраженность окислительного стресса в хрусталике при экспериментальной катаракте**

Экспериментальную катаракту моделировали по методу K.C. Vhuayan и et al. в собственной модификации введением в стекловидное тело раствора диквата дибромида [110].

Развитие экспериментальной катаракты сопровождалось активацией процессов свободнорадикального окисления в хрусталике.

Концентрации МДА – конечного продукта перекисного окисления липидов, в хрусталике интактных животных составила  $0,0034 \pm 0,00055$  мкмоль/мг белка. Введение диквата дибромида вызывало значительное увеличение содержания МДА в ткани хрусталика. Уровень исследуемого показателя активно нарастал до 28 суток эксперимента, после чего было зафиксировано его уменьшение. Так, на 7 сутки после введения индуктора катарактогенеза концентрация МДА достоверно увеличилась в 5,8 раза, на 14 сутки – в 7,7 раза ( $p < 0,001$ ). На 28 сутки был зарегистрирован максимум

концентрации МДА – она превышала уровень нормы в 20,6 раза ( $p < 0,001$ ). К 42 и 56 суткам имело место некоторое снижение исследуемого показателя, он превышал содержание МДА в изучаемой ткани интактных животных в 16,4 раза и 8,3 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно (таблица 2).

В течение всего эксперимента концентрация GSH неуклонно снижалась и достигала минимальных значений на 56 сутки эксперимента. Через 14 суток после введения раствора диквата дибромида содержание GSH уменьшилось на 60,4% ( $p < 0,01$ ) по сравнению с показателями интактных кроликов, а на 28, 42 и 56 сутки на 91,8%, 96,8% и на 93,7% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Активность GPx в хрусталике интактных животных составила  $6,53 \pm 1,37$  нмоль НАДФН/ мин $\times$ мг белка. На 7-28 сутки эксперимента данный показатель статистически значимо не отличался от значений интактных кроликов. На 42 и 56 сутки опыта активность GPx снижалась на 58,9% и 74,7% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Активность GT в ткани хрусталика интактных животных в среднем была равна  $15,98 \pm 1,92$  мкмоль ХДНБ/ мин $\times$  мг белка. Введение индуктора катарактогенеза в начале опыта (7 – 14 сутки) достоверно не влияло на активность данного фермента, она не отличалась от значений у интактных животных.

К 28 суткам было отмечено наиболее существенное уменьшение активности – до  $4,95 \pm 1,89$  мкмоль ХДНБ/ мин $\times$  мг белка, что было меньше активности фермента в ткани интактных животных на 69,0% ( $p < 0,05$ ). К 42 и 56 суткам активность GT продолжала снижаться, но менее активно, снижение составило 75,3% и 87,4% ( $p < 0,05$ ) соответственно по сравнению с показателями интактных кроликов (таблица 2).

При изучении свободнорадикального статуса хрусталика на фоне применения препаратов сравнения при экспериментальной катаракте были получены следующие результаты (таблицы 3 и 4).

Таблица 2 – Выраженность окислительного стресса в ткани хрусталика при экспериментальной катаракте (M±SD)

Серии эксперимента	МДА, мкмоль/мг белка	GSH, мкмоль/мг белка	Активность GPx, нмоль НАДФН/ мин× мг белка	Активность GT, мкмоль ХДНБ/ мин× мг белка
Интактные кролики (норма)	0,0034±0,00055	39,41±5,33	6,53±1,37	15,98±1,92
7 сутки эксперимента	0,0199±0,0049*	34,19±4,56	7,51±2,55	17,81±1,07
14 сутки эксперимента	0,0262±0,0046*	15,62±2,22*	8,07±0,26	13,06±0,88
28 сутки эксперимента	0,07±0,0091*	3,24±0,43*	5,91±0,16	4,95±1,89*
42 сутки эксперимента	0,0556±0,007*	1,25±0,16*	2,68±0,30*	3,94±0,76*
56 сутки эксперимента	0,0283±0,0038*	2,47±0,18*	1,65±0,22*	2,02±0,66*

\* -  $p < 0,05$  – достоверные различия по сравнению с показателями интактных животных



Концентрация МДА в ткани хрусталика при использовании «Офтан Катахрома» и раствора  $\alpha$ -токоферола ацетата достоверно не отличалась от величины этого параметра в серии контроля катаракты и была достоверно выше уровня нормы во все сроки наблюдения: на 14 сутки в 8,4 и 8,5 раза, на 28 сутки – в 20,3 и 19,1 раза, на 42 сутки – в 16,5 и 15,8 раза и на 56 сутки – в 8,3 и 8,2 раза соответственно ( $p < 0,001$ ).

При использовании «Офтан Катахрома» концентрация GSH в хрусталике была достоверно выше показателей серии контроля катаракты на 42 сутки – в 2,8 раза, а на 56 сутки – в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно. Тогда как при использовании  $\alpha$ -токоферола ацетата уровень GSH статистически значимо от них не отличался.

Применение препаратов сравнения не вызывало нормализации концентрации GSH на протяжении всего опыта: при использовании «Офтан Катахрома» и  $\alpha$ -токоферола ацетата их содержание было достоверно ниже уровня нормы на 14 сутки в 2,4 и 2,6 раза ( $p < 0,05$ ), на 28 сутки – в 9,8 и 14,3 раза ( $p < 0,01$ ), на 42 сутки – в 11,1 и 26,9 раза ( $p < 0,01$ ), на 56 сутки – в 11,2 и 30,4 раза ( $p < 0,01$ ) соответственно.

При использовании «Офтан Катахрома» и  $\alpha$ -токоферола ацетата до 42 суток эксперимента активность GPx хрусталика достоверно не отличалась от этого показателя у животных серии контроля, в то же время на 56 сутки опыта активность GPx хрусталика была выше его на 75,2% и 30,3% соответственно ( $p < 0,05$ ).

Лечение препаратами сравнения не вызвало существенного изменения активности GPx относительно уровня нормы на 14-28 сутки. На 42 сутки активность данного антиоксидантного фермента при лечении «Офтан Катахромом» и  $\alpha$ -токоферолом ацетатом была достоверно ниже уровня нормы на 52,9% и 49,5%, а на 56 сутки – на 55,7% и 67,1% соответственно ( $p < 0,01$ ).

Таблица 3 – Выраженность окислительного стресса в ткани хрусталика при экспериментальной катаракте на фоне лечения «Офтан Катахромом» (M±SD)

Серии эксперимента	МДА, мкмоль/мг белка	GSH, мкмоль/мг белка	Активность GPx, нмоль НАДФН/ мин× мг белка	Активность GT, мкмоль ХДНБ/ мин× мг белка
Интактные кролики (норма)	0,0034±0,00055	39,41±5,33	6,53±1,37	15,98±1,92
14 сутки эксперимента	0,0287±0,0096*	16,33±0,51*	8,19±0,90	13,51±1,01
28 сутки эксперимента	0,0692±0,0155*	4,03±0,20*	5,84±0,25	5,21±0,74*
42 сутки эксперимента	0,0561±0,0027*	3,54±0,71*#	3,07±0,28*	4,14±0,41*
56 сутки эксперимента	0,0282±0,0043*	3,51±0,17*#	2,89±0,36*#	2,62±0,78*

\* -  $p < 0,05$  – достоверные различия по сравнению с показателями интактных животных

# -  $p < 0,05$  – достоверные различия по сравнению с показателями животных серии контроля катаракты

Таблица 4 – Выраженность окислительного стресса в ткани хрусталика при экспериментальной катаракте на фоне лечения раствором  $\alpha$ -токоферола ацетата ( $M \pm SD$ )

Серии эксперимента	МДА, мкмоль/мг белка	GSH, мкмоль/мг белка	Активность GPx, нмоль НАДФН/ мин× мг белка	Активность GT, мкмоль ХДНБ/ мин× мг белка
Интактные кролики (норма)	0,0034±0,000554	39,41±5,33	6,53±1,37	15,98±1,92
14 сутки эксперимента	0,0288±0,0059*	15,45 ±1,83*	8,06±0,33	13,02±0,48
28 сутки эксперимента	0,0648±0,0046*	2,75±0,31*	5,76±0,26	5,85±0,84*
42 сутки эксперимента	0,0539±0,008*	1,46±0,16*	3,3±0,69*	3,95±0,42*
56 сутки эксперимента	0,028±0,004*	1,3±0,33*	2,15±0,28*#	2,26±0,84*

\* -  $p < 0,05$  – достоверные различия по сравнению с показателями интактных животных

# -  $p < 0,05$  – достоверные различия по сравнению с показателями животных серии контроля катаракты

На фоне терапии препаратами сравнения достоверного изменения активности GT хрусталика относительно значений животных серии контроля патологии в течение всего опыта зафиксировано не было.

При использовании «Офтан Катахрома» и раствора  $\alpha$ -токоферола ацетата активность GT была ниже уровня показателей интактных животных: на 28 сутки – на 67,4% и 63,4% ( $p<0,05$ ), на 42 сутки – на 74,1% и 75,3% ( $p<0,05$ ) и на 56 сутки – на 83,6% и 85,8% ( $p<0,01$ ) соответственно.

При изучении влияния 0,22% раствора ионола на выраженность окислительного стресса в хрусталике при экспериментальной катаракте были получены следующие результаты (таблица 5).

Терапия 0,22% раствором ионола снизила концентрацию МДА в ткани хрусталика по сравнению со значениями в серии контроля катаракты: на 14 сутки опыта в 1,8 раза, на 28 сутки – в 3,2 раза, на 42 сутки – в 3,7 раза, а на 56 сутки – в 3,65 раза соответственно ( $p<0,01$ ).

При использовании раствора ионола после 28 суток исследования была зафиксирована чёткая тенденция к снижению концентрации МДА в ткани хрусталика и приближению к уровню в интактной ткани, однако достоверной нормализации этого показателя достигнуто не было: на 14 сут опыта содержание МДА в ткани хрусталика было выше, чем в интактной ткани в 4,2 раза, на 28 сутки – в 6,3 раза, на 42 сутки – в 4,4 раза и на 56 сутки – в 2,3 раза ( $p<0,01$ ) соответственно.

Концентрация GSH в ткани хрусталика у животных при использовании 0,22% раствора ионола была выше, чем у животных серий контроля катаракты на протяжении всего исследования: на 14 сутки – в 1,8 раза, на 28 сутки – в 8,2 раза, на 42 сутки – в 20,7 раза, на 56 сутки – в 10,7 раза ( $p<0,01$ ) соответственно.

Таблица 5 – Выраженность окислительного стресса в ткани хрусталика при экспериментальной катаракте на фоне лечения 0,22% раствором ионола (M±SD)

Серии эксперимента	МДА, мкмоль/мг белка	GSH, мкмоль/мг белка	Активность GPx, нмоль НАДФН/ мин× мг белка	Активность GT, мкмоль ХДНБ/ мин× мг белка
Интактные кролики (норма)	0,0034±0,000554	39,41±5,33	6,53±1,37	15,98±1,92
14 сутки эксперимента	0,0142±0,0021*#	28,29±2,29*#	8,14±0,33	19,17±1,02#
28 сутки эксперимента	0,0215±0,0027*#	26,53±2,08*#	7,82±0,33#	18,03±0,63#
42 сутки эксперимента	0,0151±0,001*#	25,88±2,28*#	7,75±0,27#	18,77±0,93#
56 сутки эксперимента	0,0077±0,001*#	26,56±2,27*#	5,94±0,53#	18,64±0,83#

\* -  $p < 0,05$  – достоверные различия по сравнению с показателями интактных животных

# -  $p < 0,05$  – достоверные различия по сравнению с показателями животных серии контроля катаракты

Однако, при этом во все сроки наблюдения уровень GSH при использовании ионола был достоверно меньше, чем в интактной ткани: на 14 сутки опыта на 28,2% ( $p<0,05$ ), на 28 сутки – на 32,7% ( $p<0,05$ ), на 42 сутки – на 34,3% ( $p<0,05$ ), на 56 сутки – на 32,6% ( $p<0,05$ ) соответственно.

То есть, терапия 0,22% раствором ионола вызвала значительное уменьшение степени истощения концентрации GSH, но не сопровождалась нормализацией этого показателя на протяжении всего эксперимента.

Активность GPx при применении 0,22% раствора ионола была достоверно выше на 28, 42 и 56 сутки эксперимента, чем у животных серии контроля патологии на 32,3%, 189,0% и 260,0% ( $p<0,05$ ) соответственно.

В то же время использование ионола предотвратило характерное для контрольной серии значительное истощение фермента к 42 и 56 суткам эксперимента. Данный показатель достоверно не отличался от значений интактных животных. То есть, применение 0,22% раствора ионола позволило сохранить активность GPx хрусталика в течение всего исследования на уровне нормы.

Активность GT хрусталика при использовании 0,22% раствора ионола была достоверно выше, чем в серии контроля катаракты на 14 сутки опыта на 46,8%, на 28 сутки – на 264,2%, на 42 сутки – на 376,3%, на 56 сутки – на 822,8% ( $p<0,05$ ) соответственно.

В то же время активность GT на протяжении всего эксперимента достоверно не отличалась от показателей интактных животных ( $p>0,05$ ), то есть терапия 0,22% раствором ионола позволила нормализовать сниженную при катаракте активность данного антиоксидантного фермента.

При сравнении показателей выраженности окислительного стресса в хрусталике животных, получавших 0,22% раствор ионола, и кроликов, получавших «Офтан Катахром» были получены следующие результаты.

Концентрация МДА у животных, получавших ионол, на протяжении всего эксперимента была ниже показателей животных, которым вводили

«Офтан Катахром» на 14 сутки на 50,5% ( $p < 0,05$ ), на 28 сутки – на 68,9% ( $p < 0,05$ ), на 42 сутки – на 73,1% ( $p < 0,05$ ), на 56 сутки – на 72,7% ( $p < 0,05$ ).

Уровень GSH у кроликов, получавших ионол, превосходил показатели животных, которым вводили препарат сравнения на 14, 28, 42 и 56 сутки – на 73,2%, 558,3%, 631,1%, 656,7% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Активность GPx на фоне введения ионола превышала активность данного фермента на фоне введения «Офтан Катахрома» на 42 сутки на 152,4% ( $p < 0,05$ ) и на 56 сутки на 105,5% ( $p < 0,05$ ), а активность GT на 28 сутки – на 246,1% ( $p < 0,05$ ), на 42 сутки – на 353,4% ( $p < 0,05$ ), на 56 сутки – на 611,5% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Аналогичные результаты были получены и при сравнении биохимических показателей на фоне введения ионола и раствора  $\alpha$ -токоферола ацетата.

Концентрация МДА у кроликов, получавших ионол, на протяжении всего эксперимента была ниже показателей животных, которым вводили  $\alpha$ -токоферол на 14 сутки на 50,7% ( $p < 0,05$ ), на 28 сутки – на 66,8% ( $p < 0,05$ ), на 42 сутки – на 71,9% ( $p < 0,05$ ), на 56 сутки – на 72,5% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Содержание GSH у животных, которым вводили ионол, превышало значения животных, которым вводили раствор  $\alpha$ -токоферола ацетата на 14 сутки на 83,1% ( $p < 0,05$ ), на 28 сутки – на 864,7% ( $p < 0,05$ ), на 42 сутки – на 1672,6% ( $p < 0,001$ ), на 56 сутки – на 1943,1% ( $p < 0,001$ ) соответственно.

Активность GPx на фоне введения ионола превышала активность данного фермента на фоне введения  $\alpha$ -токоферола на 42 сутки на 134,8% ( $p < 0,01$ ) и на 56 сутки – на 176,3% ( $p < 0,01$ ), а активность GT на 14 сутки – на 47,2% ( $p < 0,05$ ), на 28 сутки – на 208,2% ( $p < 0,01$ ), на 42 сутки – 375,2% ( $p < 0,01$ ), на 56 сутки – на 724,8% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

В заключение была оценена антиоксидантная активность 2,2% раствора ионола при экспериментальной катаракте (таблица б).

Концентрация МДА в ткани хрусталика на фоне терапии 2,2% раствором ионола была достоверно ниже, чем у животных серии контроля

патологии в течение всего исследования: на 14 сутки наблюдения на 69,5%, на 28 сутки – на 90,1%, на 42 сутки – на 88,1%, на 56 сутки – на 80,2% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Однако при этом, во все сроки эксперимента, концентрация МДА в хрусталике была достоверно выше уровня нормы: на 14 сутки – на 135,2%, на 28 сутки – на 102,9%, на 42 сутки – на 94,1% и на 56 сутки – на 64,7% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Концентрация GSH в ткани хрусталика при использовании ионола была достоверно выше показателей серии контроля катаракты в течение всего опыта: на 14 сутки эксперимента в 2,0 раза, на 28 суток – в 9,7 раза, на 42 сутки – 27,6 раз, на 56 сутки – в 13,8 раза ( $p < 0,001$ ) соответственно. В то же время при сравнительном анализе полученных данных было обнаружено, что на фоне терапии 2,2% раствором ионола исследуемый показатель достоверно не отличался от значений интактных кроликов.

На фоне применения 2,2% раствора ионола активность GPx на 42 сутки опыта была выше, чем в серии контроля катаракты на 183,9% ( $p < 0,05$ ), на 56 сутки – на 306,7% ( $p < 0,05$ ) соответственно. При этом активность данного фермента достоверно не отличалась от показателей интактных животных во все сроки эксперимента.

Лечение ионолом сопровождалось значительно более высокой активностью GT на протяжении всего эксперимента относительно серии контроля катаракты: на 14 сутки опыта в 1,9 раза, на 28 суток – в 7,6 раза, на 42 сутки – в 7,0 раза, на 56 суток – в 13,1 раз ( $p < 0,001$ ) соответственно.

В то же время во все сроки наблюдения на фоне терапии 2,2% раствором ионола активность GT была также выше, чем в интактной ткани: на 14 сутки – в 1,58 раз, на 28 суток – в 2,36 раз, на 42 суток – в 1,7 раз, на 56 суток – в 1,66 раза ( $p < 0,01$ ) соответственно.

То есть, лечение 2,2% раствором ионола предотвратило истощение GT при развитии катаракты и вызвало существенное увеличение активности данного фермента относительно уровня нормы.



Таблица 6 – Выраженность окислительного стресса в ткани хрусталика при экспериментальной катаракте на фоне лечения 2,2% раствором ионола (M±SD)

Серии эксперимента	МДА, мкмоль/мг белка	GSH, мкмоль/мг белка	Активность GPx, нмоль НАДФН/ мин× мг белка	Активность GT, мкмоль ХДНБ/ мин× мг белка
Интактные кролики (норма)	0,0034±0,000554	39,41±5,33	6,53±1,37	15,98±1,92
14 сутки эксперимента	0,008±0,0028*#	31,72±2,05#	7,05±0,91	25,27±1,16*#
28 сутки эксперимента	0,0069±0,002*#	31,41±2,18#	6,96±0,31	37,75±3,37*#
42 сутки эксперимента	0,0066±0,0016*#	34,49±2,49#	7,61±0,32#	27,67±0,53*#
56 сутки эксперимента	0,0056±0,0005*#	34,11±2,41#	6,71±1,15#	26,48±2,32*#

\* -  $p < 0,05$  – достоверные различия по сравнению с показателями интактных животных

# -  $p < 0,05$  – достоверные различия по сравнению с показателями животных серии контроля катаракты

При сравнении показателей выраженности окислительного стресса в хрусталике животных, получавших 2,2% раствор ионола, и кроликов, получавших «Офтан Катахром» были получены следующие результаты.

Содержание МДА в хрусталике животных, которым вводили ионол, было ниже значений кроликов, которым инстиллировали «Офтан Катахром» на 14 сутки – в 3,6 раза, на 28 сутки – в 10,0 раз, на 42 сутки – в 8,5 раза, на 56 сутки – в 5,0 раз ( $p < 0,01$ ) соответственно.

Концентрация GSH в хрусталике на фоне введения ионола превосходила показатели животных, которым вводили препарат сравнения на 14 сутки в 1,9 раз, на 28 сутки – в 7,8 раза, на 42 сутки – в 9,7 раза, на 56 сутки – в 9,7 раза ( $p < 0,001$ ) соответственно.

Активность GPx на фоне введения 2,2% раствора ионола была выше показателей животных, которым вводили «Офтан Катахром» на 42 сутки в 2,5 раза, на 56 сутки – в 2,3 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Активность GT при применении ионола на протяжении всего исследования была выше значений кроликов на фоне применения препарата сравнения: на 14 сутки – в 1,87 раза, на 28 сутки – в 7,2 раза, на 42 сутки – в 6,68 раза, на 56 сутки – в 10,1 раза ( $p < 0,05$ ).

Аналогичные результаты были получены при сравнении биохимических показателей на фоне введения 2,2% раствора ионола и раствора  $\alpha$ -токоферола ацетата.

Концентрация МДА у кроликов, получавших ионол, на протяжении всего эксперимента была ниже показателей животных, которым вводили  $\alpha$ -токоферола ацетат на 14 сутки в 3,6 раза ( $p < 0,05$ ), на 28 сутки – в 9,4 раза, на 42 сутки – в 8,17 раза, на 56 сутки – в 5 раз ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Содержание GSH у животных, которым вводили ионол, превышало значения животных, которым вводили препарат сравнения на 14 сутки в 2,1 раза, на 28 сутки – в 11,4 раза, на 42 сутки – в 23,6 раза, на 56 сутки – в 26,2 раза ( $p < 0,01$ ) соответственно.

Активность GPx на фоне введения ионола превышала активность данного фермента на фоне введения  $\alpha$ -токоферола ацетата на 42 сутки в 2,3 раза, на 56 сутки – в 3,12 раз соответственно ( $p < 0,05$ ), а активность GT на 14 сутки – в 1,94 раза, на 28 сутки – в 6,5 раза, на 42 сутки – в 7,0 раз, на 56 сутки – в 11,7 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно.

При сравнении свободнорадикального статуса хрусталика после введения раствора ионола в концентрации 2,2% и после введения 0,22% раствора на фоне катаракты были получены следующие результаты.

На фоне применения ионола в концентрации 0,22% содержание МДА в хрусталике было выше показателей животных, которым вводили 2,2% раствор на 28 сутки эксперимента на 211,6% ( $p < 0,05$ ), а на 42 сутки – на 128,8% ( $p < 0,01$ ).

Содержание GSH, напротив, при использовании 0,22% раствора ионола было ниже значений кроликов получавших 2,2% раствор на 42 сутки – на 24,9%, а на 56 сутки – на 22,1% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Активность GPx во все сроки эксперимента достоверно между сравниваемыми сериями не различалась, а активность GT была выше у животных, получавших 2,2% раствор на 14 сутки на 31,8% ( $p < 0,05$ ), на 28 сутки – на 109,4% ( $p < 0,01$ ), на 42 сутки – 47,4% ( $p < 0,05$ ), на 56 сутки – на 42,1% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Таким образом, показано, что развитие экспериментальной дикват дибромид индуцированной катаракты сопровождается развитием окислительного стресса в ткани хрусталика. Местное применение 0,22% и 2,2% растворов ионола оказывает выраженное антиоксидантное действие, существенно превосходящее эффект от использования препаратов сравнения «Офтан Катахрома» и  $\alpha$ -токоферола ацетата. При этом по антиоксидантной активности 2,2% раствор ионола превосходит 0,22% раствор.

### **3.1.3. Влияние 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола на клиническую картину экспериментальной катаракты**

Экспериментальную катаракту моделировали по методу К.С. Вhuyan et al. в собственной модификации введением в стекловидное тело раствора диквата дибромида [110]. На 2 сутки после введения гербицида у части животных возникали начальные признаки катаракты, тогда как к 7 суткам начальные катарактальные изменения наблюдались у всех подопытных кроликов. Методами фокального освещения и биомикроскопии было отмечено появление мелких субкапсулярных и кортикальных вакуолей, небольших белковых агрегатов в задних и передних корковых слоях (рисунки 3 и 4). В проходящем свете на фоне розового рефлекса были видны единичные точечные затемнения. Все детали глазного дна визуализировались чётко.

С 7 до 14 суток опыта во всех глазах (100%) количество мелких вакуолей в коре несколько увеличилось при неизменном размере уже имевшихся, появились симптомы диссоциации и зияния швов коры хрусталика. Размеры и количество белковых агрегатов практически не изменились (рисунок 5). В проходящем свете были зафиксированы точечные помутнения на фоне розового рефлекса. Мелкие детали глазного дна при офтальмоскопии были видны под лёгким флёротом.

С 14 до 28 суток во всех случаях (100%) было зафиксировано слияние вакуолей, увеличение размеров и числа белковых агрегатов. Площадь зон диссоциации коры увеличилась, зияние швов коры стало больше. Было отмечено формирование водяных щелей, причем к 28 суткам их содержимое начало мутнеть. Появились участки разрушения волокон в местах выраженной диссоциации. Набухание ткани хрусталика увеличилось, что проявилось некоторым уменьшением глубины передней камеры. В проходящем свете на фоне снижения яркости рефлекса было отмечено появление облаковидных и линейных затемнений низкой интенсивности. Линейные затемнения соответствовали расположению водяных щелей, а облаковидные – участкам диссоциированной коры (рисунок 6). К 28 суткам детали глазного дна при

офтальмоскопии визуализировались, но под умеренным флёротом. Было возможно различить сосуды до 3 – 4 порядка ветвления. Отдельные миелиновые волокна были различимы с трудом.

В интервале исследования от 28 до 42 суток в 11 глазах (91,7% случаев) было зафиксировано значительное разрушение волокон и упорядоченной структуры кортекса изучаемой ткани. Количество белковых агрегатов и их размеры, так же как и вакуолей, практически не изменилось. Содержимое водяных щелей помутнело, их границы стали трудно различимы. Зоны разрушения волокон коры хрусталика заняли всю площадь диссоциации (рисунок 7). Набухание хрусталика не нарастало, но и не уменьшалось – глубина передней камеры оставалась мельче средней. В проходящем свете яркость рефлекса существенно снизилась, площадь затемнений значительно увеличилась, также было отмечено увеличение их интенсивности. Достаточно чётко на глазном дне были видны границы сосудов до 3 порядка ветвления, более мелкие детали визуализировать было затруднительно; сосуды, диск зрительного нерва и миелиновые волокна были видны под флёротом. В 1 случае (8,3%) за этот период катаракта оставалась без динамики.

С 42 до 56 сутки эксперимента в 5 случаях (83,3%) нарастала дезорганизация и разрушение волокон кортекса, белковые агрегаты существенно увеличились. Число вакуолей уменьшилось, а размеры увеличились за счёт слияния соседних. Водяные щели как морфологический элемент исчезли, на их месте сформировались участки помутнения коры (рисунок 8). Рефлекс с глазного дна был тусклый, мелкие детали глазного дна не визуализировались. В 1 глазу (16,7%) динамики катарактальных изменений хрусталика отмечено не было.



Рисунок 3 – Хрусталик интактного кролика (объектив  $\times 10$ )

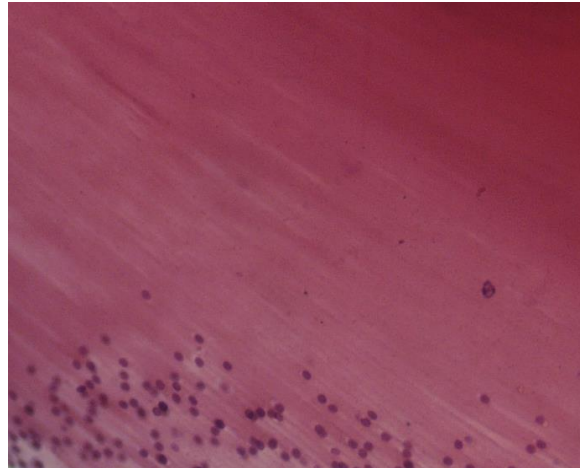


Рисунок 4 – Хрусталик кролика серии контроля катаракты на 7 сутки опыта (объектив  $\times 10$ )

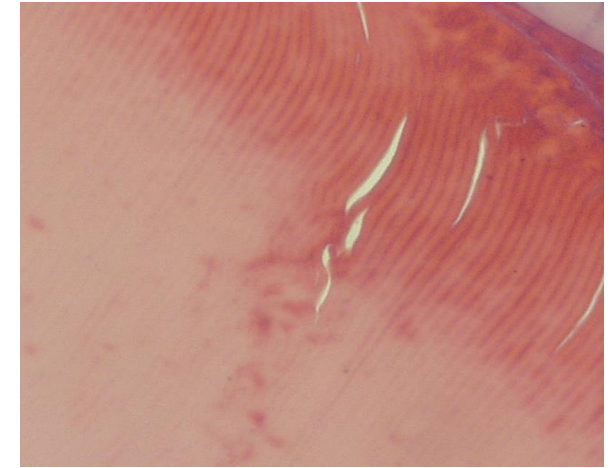


Рисунок 5 – Хрусталик кролика серии контроля катаракты на 14 сутки опыта (объектив  $\times 10$ ).

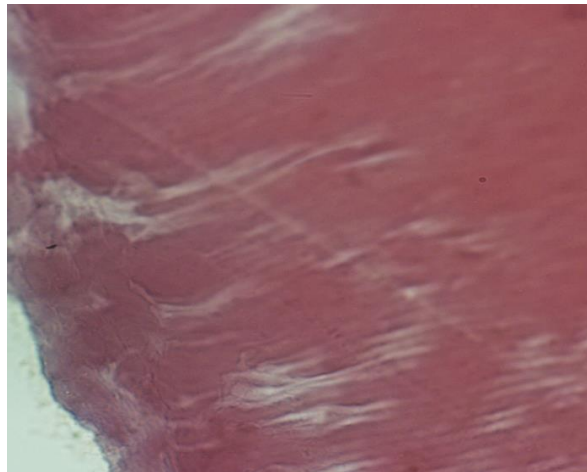


Рисунок 6 – Хрусталик кролика серии контроля катаракты на 28 сутки опыта (объектив  $\times 10$ )

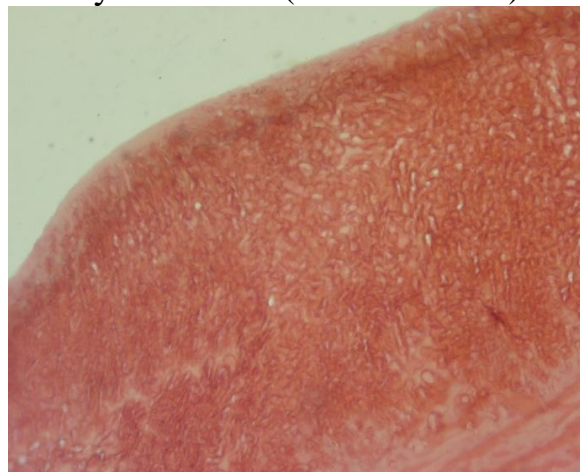


Рисунок 7 – Хрусталик кролика серии контроля катаракты на 42 сутки опыта (объектив  $\times 10$ )

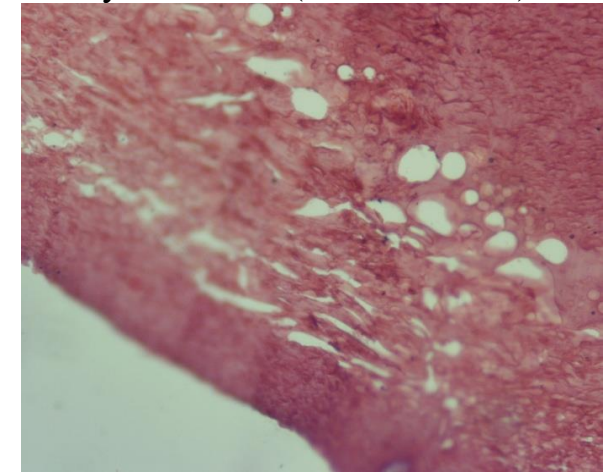


Рисунок 8 – Хрусталик кролика серии контроля катаракты на 56 сутки опыта (объектив  $\times 10$ )

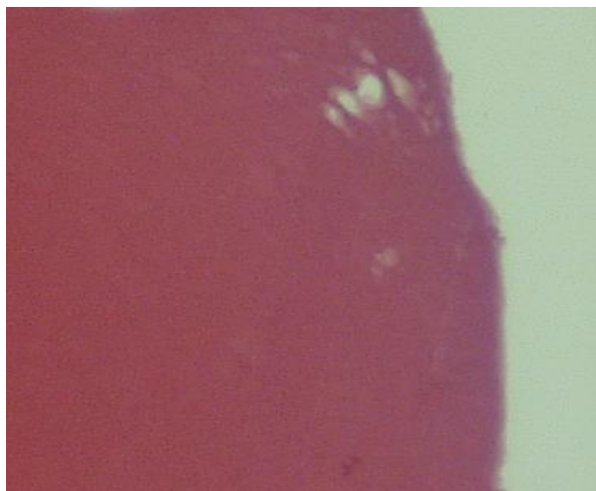


Рисунок 9 – Хрусталик кролика серии лечения Офтан Катахромом на 14 сутки опыта (объектив  $\times 10$ )

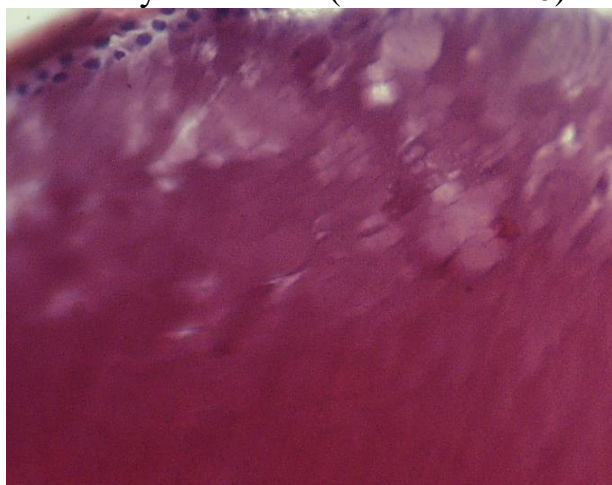


Рисунок 12 – Хрусталик кролика серии лечения Офтан Катахромом на 28 сутки опыта (объектив  $\times 10$ )

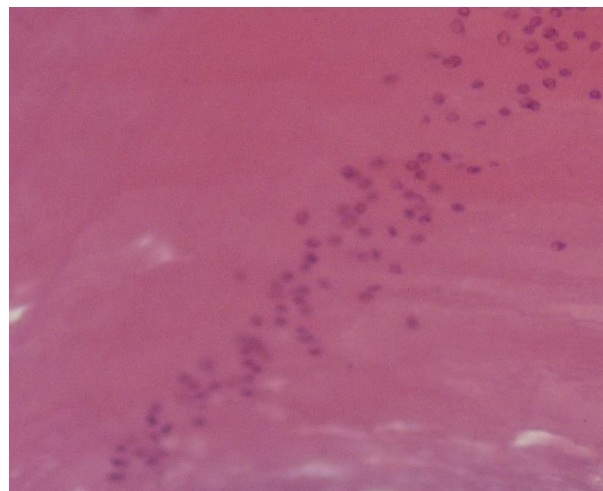


Рисунок 10 – Хрусталик кролика серии лечения 0,22% раствором ионола на 14 сутки опыта. (объектив  $\times 10$ )

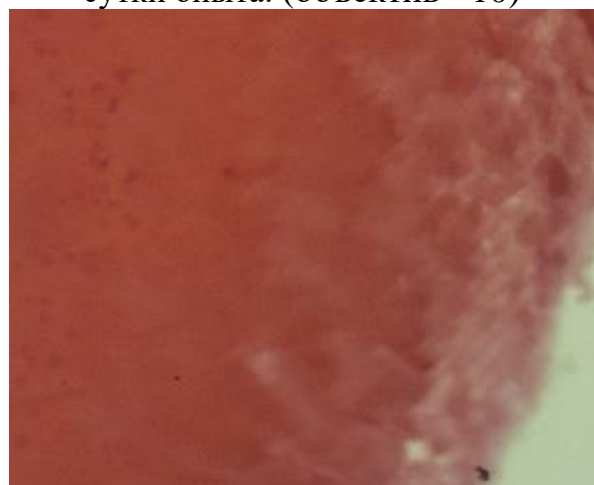


Рисунок 13 – Хрусталик кролика серии лечения 0,22% раствором ионола на 28 сутки опыта. (объектив  $\times 10$ )

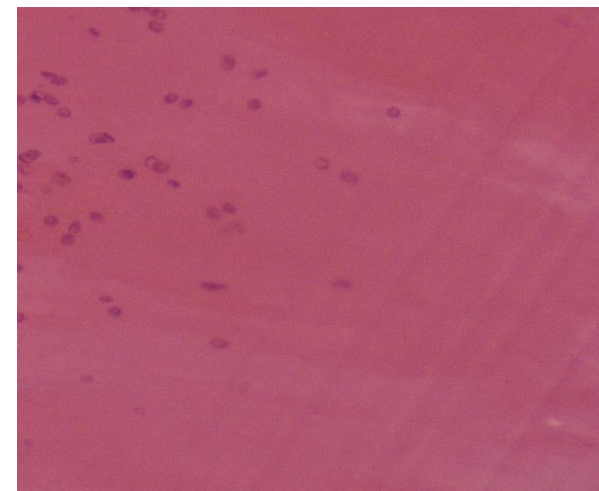


Рисунок 11 – Хрусталик кролика серии лечения 2,2% раствором ионола на 14 сутки опыта. (объектив  $\times 10$ )

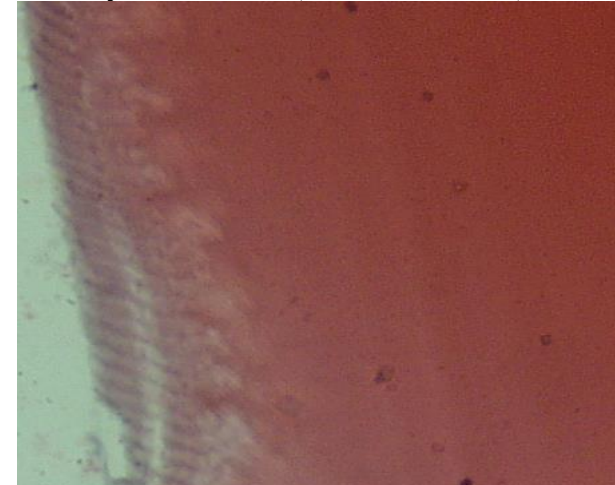


Рисунок 14 – Хрусталик кролика серии лечения 2,2% раствором ионола на 28 сутки опыта. (объектив  $\times 10$ )

У всех животных интравитреальная инъекция раствора диквата дибромида не вызывала воспалительной реакции сосудистой оболочки. Отсутствовала перикорнеальная инъекция, влага передней камеры и стекловидное тело были прозрачны, структура и цвет радужки не менялись. Преципитатов на эндотелии роговицы, очаговых воспалительных изменений задних отделов увеального тракта обнаружено не было (в том числе, и в месте введения раствора диквата дибромида). Внутриглазной гипертензии зафиксировано не было.

В качестве стандартной терапии использовали инстилляции в конъюнктивальную полость раствора «Офтан Катахром» и 10% масляного раствора  $\alpha$ -токоферола ацетата.

Терапия «Офтан Катахромом» до 14 суток опыта не вызывала существенного изменения процесса формирования катарактальных изменений хрусталика в сравнении с контрольной серией (рисунки 9, 15). В интервале наблюдения с 7 до 14 суток эксперимента во всех глазах была примерно одинаковая картина: увеличилось количество вакуолей в коре хрусталика, сформировались симптомы диссоциации коры и зияния швов коры. Единичные белковые агрегаты не увеличивались, число их не нарастало. В проходящем свете рефлекс с глазного дна был розовый, на фоне которого были видны единичные затемнения в проекции хрусталика. При офтальмоскопии все детали глазного дна были видны достаточно чётко.



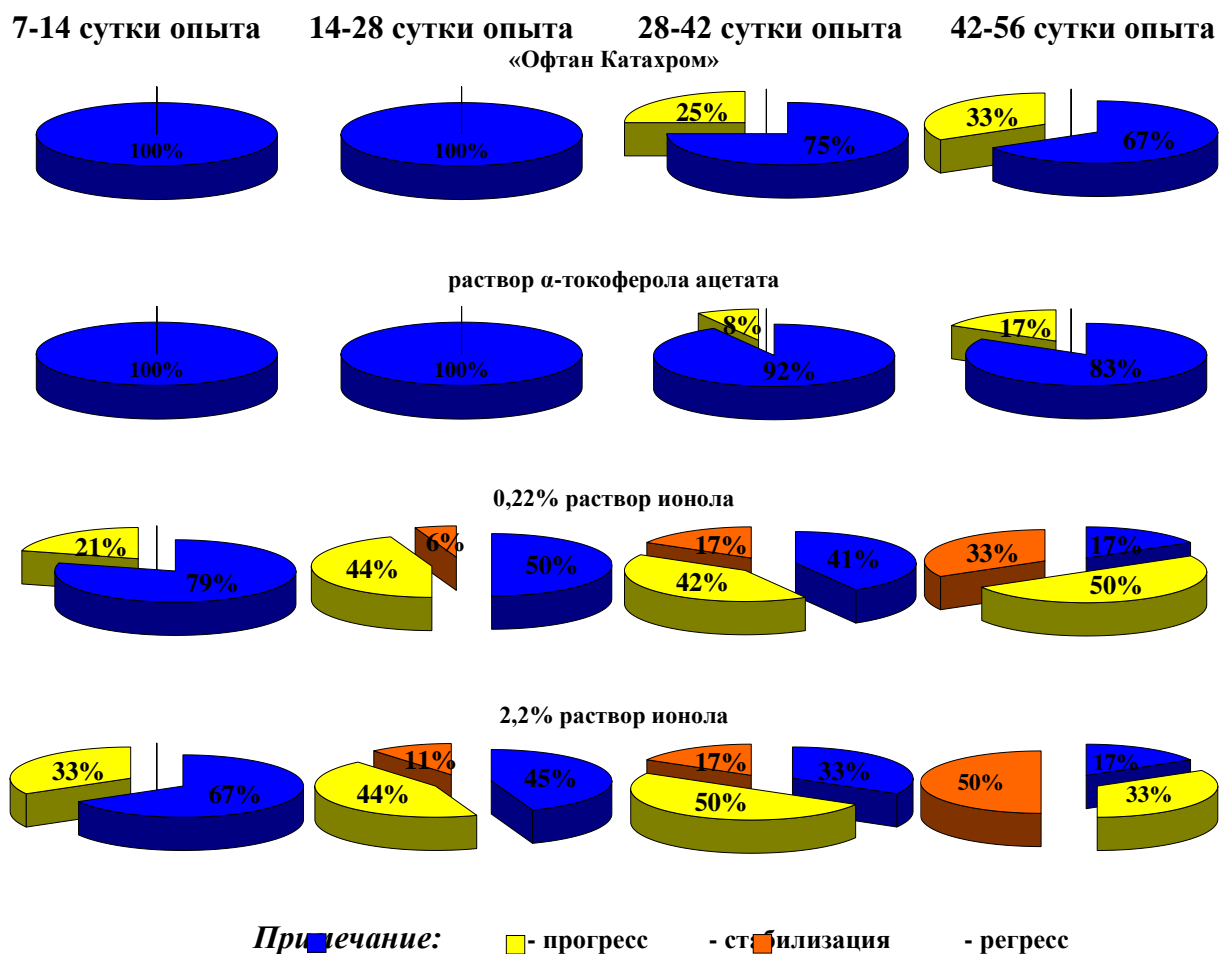


Рисунок 15 – Влияние тестируемых веществ на клиническую картину экспериментальной катаракты

В интервале с 14 до 28 суток опыта во всех глазах имело место слияние рядом расположенных вакуолей, увеличение размеров белковых агрегатов в коре. Диссоциация коры и зияние швов коры увеличились. В корковых отделах хрусталика сформировались водяные щели. В местах диссоциации коры появились участки разрушения хрусталиковых волокон, а также набухание хрусталика – глубина передней камеры несколько уменьшилась (рисунок 12). В проходящем свете на фоне розового рефлекса были видны единичные точечные затемнения высокой интенсивности и облаковидные и линейные затемнения низкой интенсивности. Детали глазного дна были видны достаточно чётко, но под лёгким флёром, не позволявшим различить сосуды после 3 – 4 порядков ветвления.

С 28 до 42 суток исследования в хрусталиках 9 глаз было отмечено существенное разрушение волокон коры, которое заняло к 42 суткам практически всю площадь зон диссоциации. Размеры и число белковых агрегатов и вакуолей оставались неизменными. Было зафиксировано помутнение содержимого водяных щелей. Отёк хрусталика оставался на прежнем уровне (рисунок 16). В проходящем свете в этих глазах яркость рефлекса значительно снизилась, площадь и интенсивность затемнений увеличилась. Офтальмоскопически можно было различить только достаточно крупные детали глазного дна – границы сосудов до 3 порядка ветвления. В 3 глазах за этот интервал наблюдения катарактальные изменения хрусталиков были без заметной динамики (рисунок 15). В дальнейшем, до конца эксперимента, с 42 до 56 суток в 4 случаях деструкция и дезорганизация волокон корковых отделов хрусталиков нарастала. Было отмечено слияние рядом расположенных вакуолей. Размеры белковых агрегатов увеличились. На месте водяных щелей сформировались помутнения (рисунок 19). Рефлекс с глазного дна был розовый, но не яркий. При офтальмоскопии достаточно чётко можно было различить диск зрительного нерва и сосудистые аркады, мелкие детали глазного дна видны не были. В 2 глазах на протяжении этого интервала исследования катарактальные изменения хрусталиков были стабильны (рисунок 15).

При терапии 10% масляным раствором  $\alpha$ -токоферола ацетата картина формирования катаракты была идентична серии контроля патологии во все сроки наблюдения (рисунок 15).

Использование 0,22% раствора ионола приводило к следующим результатам.

С 7 до 14 суток опыта в 19 случаях (79,2%) катаракта прогрессировала: увеличилось количество вакуолей коры, но размер ранее появившихся оставался прежним. Число и размер белковых агрегатов не изменились (рисунок 10). В проходящем свете были видны точечные затемнения на фоне розового рефлекса. Все мелкие детали глазного дна при офтальмоскопии были

видны достаточно чётко. В 5 случаях (20,8%) катарактальные изменения хрусталиков оставались без динамики (рисунок 15).

В интервале наблюдения с 14 до 28 суток эксперимента в хрусталиках 9 глаз (50,0% случаев) было обнаружено формирование зон диссоциации коры. К концу этого периода исследования было зафиксировано появление участков разрушения волокон коры. Степень зияние швов коры, число, размеры вакуолей и белковых агрегатов за этот промежуток исследования оставались неизменными. Набухания ткани хрусталика зафиксировано не было (рисунок 13). В проходящем свете было отмечено лёгкое снижение яркости рефлекса, на фоне которого были видны интенсивные точечные затемнения и слабой интенсивности облаковидные затемнения. На глазном дне детали были видны хорошо, чётко визуализировались сосуды до 4 порядка ветвления. В 8 глазах (44,4% случаев) катаракта была стационарна. В 1 случае (5,6%) было зафиксировано рассасывание части вакуолей, за этот период отсутствовала тенденция к формированию диссоциации коры (рисунок 15).

С 28 до 42 суток опыта в 5 случаях (41,7%) было отмечено нарастание степени и размеров диссоциации коры хрусталика, некоторое увеличение зон разрушения волокон. Размеры, количество вакуолей и белковых агрегатов за этот интервал эксперимента оставались неизменными. Степень зияния швов коры оставалась без изменений. Явных признаков набухания ткани хрусталика не было (рисунок 17). В проходящем свете было зафиксировано снижение яркости рефлекса, увеличение площади зон затемнений при практически прежней их интенсивности. Офтальмоскопически четко были различимы границы сосудов до 4 порядка ветвления. В 5 глазах (41,7%) катарактальные изменения хрусталиков в течение этого интервала оставались без изменений. В хрусталиках 2 глаз (16,6%) было отмечено рассасывание вакуолей, уменьшение площади диссоциации и степени зияния швов коры (рисунок 15).

С 42 до 56 суток исследования в хрусталике 1 глаза (16,7% случаев) было зафиксировано увеличение площади участков разрушения волокон коры и появление в этих местах скоплений тканевого детрита. Несколько увеличились

в размере белковые агрегаты. Число и размер вакуолей оставались без динамики (рисунок 20). Рефлекс с глазного дна был розовым, но не ярким, на его фоне были виды участки затемнения средней интенсивности, различной формы. В 3 глазах (50,0%) катаракта оставалась без динамики. В 2 случаях (33,3%) было отмечено рассасывание части вакуолей и белковых агрегатов, уменьшение площади участков разрушения волокон. Рефлекс с глазного дна стал более ярким, детали глазного дна стали видны лучше (рисунок 15).

Лечение 2,2% раствором ионола также было высокоэффективно при экспериментальной катаракте в течение всего эксперимента.

С момента начала терапии до 14 суток опыта в хрусталиках 16 глаз (66,6%) количество вакуолей в коре несколько увеличилось, а размер уже имевшихся оставался без изменений. Размер и число белковых агрегатов оставались прежними (рисунок 11). На фоне розового рефлекса были видны точечные затемнения. Все детали глазного дна были видны чётко. В 8 глазах за этот интервал наблюдения (33,2%) катаракта оставалась стационарной (рисунок 15).

С 14 до 28 суток эксперимента в 8 случаях (44,4%) было обнаружено формирование небольших зон диссоциации коры хрусталика. К концу этого периода исследования было зафиксировано появление единичных участков разрушения волокон коры. Симптом зияние швов коры отсутствовал. Число, размеры вакуолей и белковых агрегатов за этот промежуток исследования оставались неизменными. Признаки набухания ткани хрусталика отсутствовали (рисунок 14). В проходящем свете было отмечено некоторое снижение яркости рефлекса, на фоне которого были видны единичные точечные затемнения средней интенсивности и облаковидные затемнения слабой интенсивности. При офтальмоскопии детали глазного дна были видны достаточно чётко, визуализировались сосуды до конечных артериол и венул. В 8 глазах (44,4%) катарактальные изменения хрусталиков были без динамики. В 2 случаях (11,2%) было зафиксировано уменьшение числа белковых агрегатов и вакуолей (рисунок 15).

В интервале наблюдения с 28 до 42 суток опыта в 4 глазах (33,3%) катаракта прогрессировала: было отмечено увеличение размеров диссоциации коры хрусталика, некоторое нарастание объёма разрушения волокон. Размеры, количество вакуолей и белковых агрегатов за этот период эксперимента оставались неизменными. Степень зияния швов коры оставалась без динамики. Явных признаков набухания ткани хрусталика не было (рисунок 18). Было зафиксировано снижение яркости рефлекса, увеличение площади зон затемнений при неизменной их интенсивности. Офтальмоскопически четко были различимы границы сосудов до 4 порядка ветвления. В 6 случаях (50,0%) катаракта оставалась без изменений. В хрусталиках 2 глаз (16,7%) было отмечено рассасывание части вакуолей, уменьшение площади диссоциации и степени зияния швов коры (рисунок 15).

С 42 до 56 дня исследования в хрусталике 1 глаза (16,7%) было зафиксировано расширение площади деструкции волокон коры и появление в этих местах тканевого детрита. Также было отмечено незначительное увеличение в размере белковых агрегатов. Количество и размер вакуолей оставались прежними (рисунок 21). Яркость рефлекса с глазного дна была несколько снижена, на его фоне были виды участки затемнения средней интенсивности различной формы. В 2 глазах (33,3%) катаракта оставалась без динамики. В 3 случаях (50,0%) было отмечено рассасывание части вакуолей и белковых агрегатов, сокращение площади участков дезорганизации кортекса, симптом зияния швов коры исчез. Рефлекс с глазного дна стал более ярким, детали глазного дна стали видны чётче (рисунок 15).

Таким образом, показано, что введение в стекловидное тело раствора диквата дибромида вызывает развитие типичной клинической картины катаракты, а применение 0,22% и 2,2% растворов ионола оказывает выраженное антикатарактальное действие, существенно превосходящее эффект от использования препаратов сравнения – «Офтан Катахрома» и  $\alpha$ -токоферола ацетата.

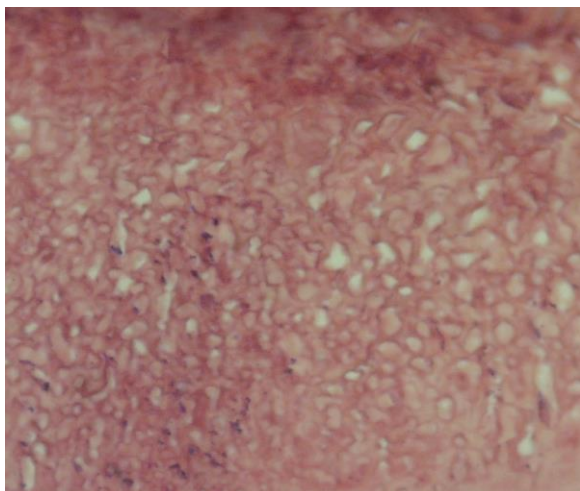


Рисунок 16 – Хрусталик кролика серии лечения Офтан Катахромом на 42 сутки опыта (объектив  $\times 10$ )

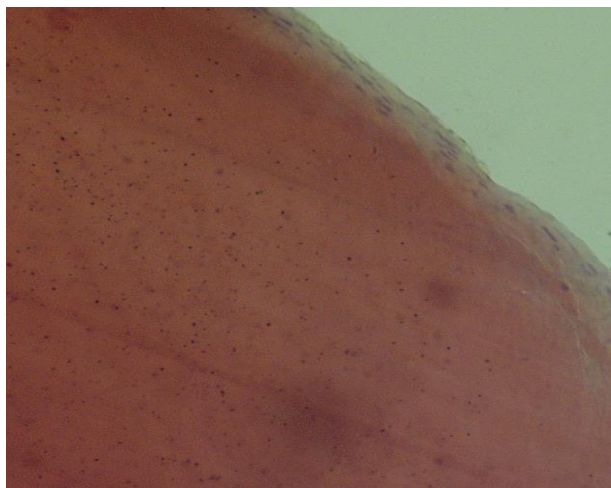


Рисунок 17 – Хрусталик кролика серии лечения 0,22% раствором ионола на 42 сутки опыта (объектив  $\times 10$ )

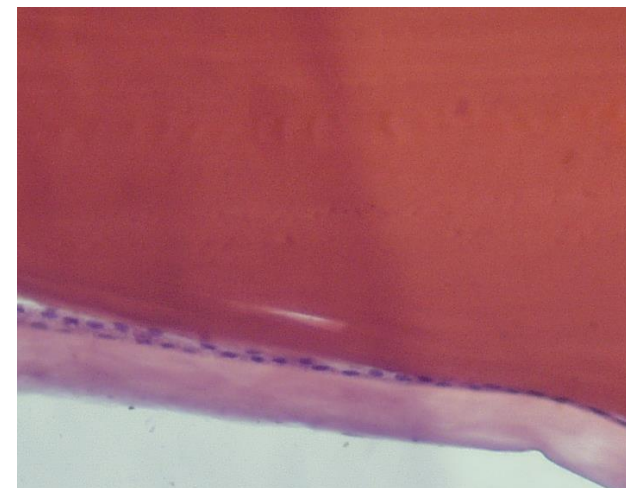


Рисунок 18 – Хрусталик кролика серии лечения 2,2% раствором ионола на 42 сутки опыта (объектив  $\times 10$ )



Рисунок 19 – Хрусталик кролика серии лечения Офтан Катахромом на 56 сутки опыта (объектив  $\times 10$ )

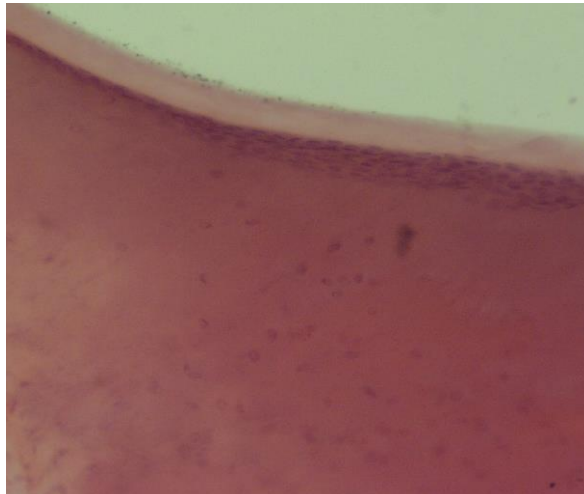


Рисунок 20 – Хрусталик кролика серии лечения 0,22% раствором ионола на 56 сутки опыта (объектив  $\times 10$ )

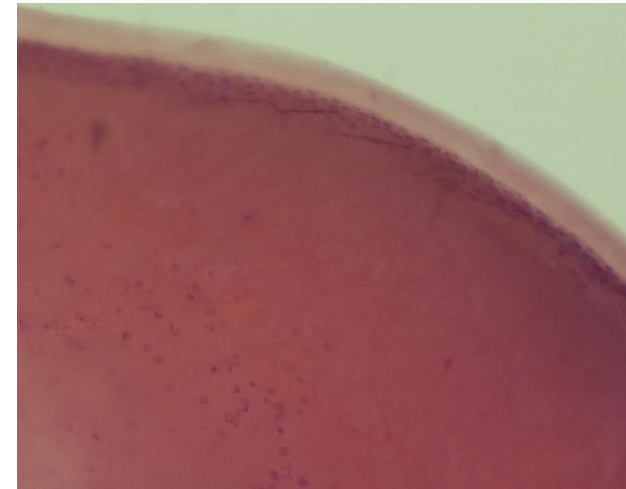


Рисунок 21 – Хрусталик кролика серии лечения 2,2% раствором ионола на 56 сутки опыта (объектив  $\times 10$ )

## **3.2. Биологические эффекты лактоферрина при экспериментальной гнойной язве роговицы**

### **3.2.1. Влияние лактоферрина на свободнорадикальный статус роговицы при экспериментальной гнойной язве**

На втором этапе исследования изучалась возможность применения лактоферрина в различных концентрациях для лечения гнойной язвы роговицы.

Патологию моделировали внесением чистой культуры золотистого стафилококка, *Staphylococcus aureus* (АТСС 25923), в искусственно сформированный дефект роговицы диаметром 5 мм [2].

Развитие экспериментальной гнойной язвы роговицы сопровождалось активацией процессов перекисного окисления липидов. Концентрация МДА – конечного продукта пероксидации – в роговице повышалась с третьего дня патологии на 70,0% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями интактных животных, достигала своего максимума на 5 сутки эксперимента, превышая исходные значения на 100,0% ( $p < 0,05$ ), и нормализовалась к 14 дню патологии ( $p > 0,05$ ). Уровень GSH снижался на 15,7% ( $p < 0,05$ ) начиная с 1 дня патологии, достигал минимального значения (на 53,8%,  $p < 0,05$  ниже исходной концентрации) на 7 сутки эксперимента и нормализовался только к 28 дню развития гнойной язвы (таблица 7). Происходили изменения и в активности антиоксидантных ферментов. Так, активности SOD и GPx уменьшались на 5 сутки язвы на 53,1% ( $p < 0,05$ ) и 32,5% ( $p < 0,05$ ) соответственно по сравнению с показателями интактных животных, и оставались сниженными вплоть до 21 суток эксперимента. Стоит также отметить, что активность GPx повышалась на 3 сутки исследования на 19,1% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями нормы. Активность GT повышалась на 23,1% ( $p < 0,05$ ) на 2 сутки патологии, затем снижалась на 34,6% ( $p < 0,05$ ) и 26,9% ( $p < 0,05$ ) на 5 и 7 сутки исследования и нормализовалась к 14 дню язвы (таблица 7).

Таблица 7 – Выраженность окислительного стресса в ткани роговицы при развитии стафилококковой гнойной язвы  
(M±SD)

Серии эксперимента	МДА нмоль/мг белка	GSH мкмоль/мг белка	Активность SOD ЕА/мг белка	Активность GPx нмоль НАДФН/ мин× мг белка	Активность GT мкмоль ХДНБ/ мин× мг белка
Интактные кролики	3,0±0,25	19,7±0,79	3,2±0,08	19,4±0,78	0,26±0,02
Язва 1 сутки	3,5±0,2	16,6±0,56*	2,9±0,2	18,1±0,60	0,24±0,019
Язва 2 сутки	4,1±0,25	17,4±0,58	2,9±0,13	21,4±0,57	0,32±0,019*
Язва 3 сутки	5,1±0,37*	14,8±0,53*	2,7±0,13	23,1±0,64*	0,21±0,016
Язва 5 сутки	6,0±0,36*	10,5±0,52*	1,5±0,14*	13,1±0,50*	0,17±0,018*
Язва 7 сутки	5,3±0,29*	9,1±0,45*	1,4±0,14*	16,6±0,63*	0,19±0,010*
Язва 14 сутки	4,2±0,36	15,8±0,78*	2,2±0,19*	17,2±0,55*	0,24±0,009
Язва 21 сутки	3,1±0,34	17,4±1,15*	3,15±0,08	19,6±0,63	0,29±0,007
Язва 28 сутки	3,4±0,22	20,8±1,04	3,2±0,17	21,0±0,39	0,26±0,015

\* - p<0,05 – достоверные различия по сравнению с показателями интактных животных



Таблица 8 – Выраженность окислительного стресса в ткани роговицы при развитии стафилококковой гнойной язвы на фоне лечения ципрофлоксацином (M±m)

Серии эксперимента	МДА нмоль/мг белка	GSH мкмоль/мг белка	Активность SOD ЕА/мг белка	Активность GPx нмоль НАДФН/ мин× мг белка	Активность GT мкмоль ХДНБ/ мин× мг белка
Интактные кролики	3,0±0,25	19,7±0,79	3,2±0,08	19,4±0,78	0,26±0,02
Язва 1 сутки	4,3±0,26*	19,5±0,80#	2,4±0,24*	19,2±0,60%	0,26±0,018
Язва 2 сутки	4,9±0,43*	15,4±0,67*	2,3±0,22*#%	17,1±0,88#%	0,24±0,021#%
Язва 3 сутки	5,3±0,33*#%	14,6±0,75*	2,0±0,21*#%	20,1±1,25	0,18±0,018*#%
Язва 5 сутки	4,7±0,42*#%	13,7±1,07*#%	2,1±0,25*#	15,5±0,6*#	0,17±0,020*#%
Язва 7 сутки	3,8±0,33#	14,6±1,06*#	2,4±0,22*#	15,9±0,49*	0,22±0,021
Язва 14 сутки	3,3±0,32	17,3±1,11	2,8±0,23	18,3±0,94	0,26±0,019
Язва 21 сутки	2,7±0,19	19,5±0,74	3,3±0,2	19,3±0,79	0,26±0,015
Язва 28 сутки	3,3±0,25	20,1±0,79%	3,2±0,18	19,5±0,81	0,27±0,02

\* - p<0,05 – достоверные различия по сравнению с показателями интактных животных.

# - p<0,05 – достоверные различия по сравнению с показателями животных с экспериментальной гнойной язвой

% - p<0,05 – достоверные различия по сравнению с показателями животных, получавшими лечение комбинацией ципрофлоксацина и лактоферрина в концентрации 0,5 мг/мл при экспериментальной гнойной язве

На фоне лечения глазными каплями, содержащими ципрофлоксацин, уровень МДА повышался уже с 1 суток язвы на 43,3% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями интактных животных, достигал максимума на 3 сутки (на 76,6%,  $p < 0,05$  выше показателей нормы) и нормализовался к 7 суткам эксперимента. Концентрация GSH снижалась на 2 сутки исследования на 21,8% ( $p < 0,05$ ), достигала минимальных значений на 5 сутки лечения (на 30,5%,  $p < 0,05$ ) и нормализовалась на 14 сутки. Активность SOD снижалась с 1 по 7 сутки исследования с максимумом снижения на 3 сутки на 37,5% ( $p < 0,05$ ). Активность GPx уменьшалась на 5 и 7 сутки эксперимента на 20,1% ( $p < 0,05$ ) и на 18,0% ( $p < 0,05$ ) соответственно, а активность GT уменьшалась на 3 и 5 сутки исследования на 30,8% ( $p < 0,05$ ) и 34,6% ( $p < 0,05$ ) соответственно (таблица 8).

Применение лактоферрина в концентрации 0,5 мг/мл проявлялось следующими изменениями свободнорадикального статуса роговицы. Концентрация МДА повышалась только на 3 и 5 сутки эксперимента, превышая показатели интактных животных на 46,6% и 40,0% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Уровень GSH снижался с 1 суток патологии на 17,3% ( $p < 0,05$ ), достигал минимального значения на 3 сутки (на 19,3%,  $p < 0,05$ ) и нормализовывался к 7 суткам. Активность SOD снижалась только на 5 сутки патологии на 15,6% ( $p < 0,05$ ), а активность GT на 3 и 5 сутки – на 23,1% и 19,2% ( $p < 0,05$ ) соответственно по сравнению со значениями у интактных кроликов. Активность GPx снижалась с 1 суток гнойной язвы, достигала минимального значения на 5 сутки (на 11,9%,  $p < 0,05$ ) и оставалась сниженной до 14 суток эксперимента (таблица 9).

Использование лактоферрина в концентрации 0,5 мг/мл по сравнению с животными 2 группы (гнойная язва без лечения) приводило к снижению содержания МДА на 5, 7 и 14 сутки эксперимента на 30,0% ( $p < 0,05$ ), 33,9% ( $p < 0,05$ ) и 21,2% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Уровень GSH превышал показатели контрольных животных в те же сроки на 40,0% ( $p < 0,05$ ), 104,4% ( $p < 0,05$ ) и 27,2% ( $p < 0,05$ ) соответственно, а на 21 сутки – на 17,5% ( $p < 0,05$ ).

Таблица 9 – Выраженность окислительного стресса в ткани роговицы при развитии стафилококковой гнойной язвы на фоне лечения лактоферрином в концентрации 0,5 мг/мл (M±SD)

Серии эксперимента	МДА нмоль/мг белка	GSH мкмоль/мг белка	Активность SOD ЕА/мг белка	Активность GРх нмоль НАДФН/ мин× мг белка	Активность GT мкмоль ХДНБ/ мин× мг белка
Интактные кролики	3,0±0,25	19,7±0,79	3,2±0,08	19,4±0,78	0,26±0,02
Язва 1 сутки	3,4±0,14	16,3±0,55*	3,2±0,07	17,9±0,38*	0,21±0,01
Язва 3 сутки	4,4±0,14*	15,9±0,61*	3,3±0,1#	17,7±0,70*#	0,20±0,01*
Язва 5 сутки	4,2±0,18*#	17,5±0,57*#	2,7±0,13*#	17,1±0,30*#	0,21±0,01*#
Язва 7 сутки	3,5±0,18#	18,6±0,62#	2,9±0,13#	17,4±0,30*	0,23±0,01#
Язва 14 сутки	3,3±0,17#	20,1±0,55#	3,0±0,08#	18,1±0,35*	0,23±0,01
Язва 21 сутки	3,4±0,21	21,1±0,55#	3,2±0,05	21,5±0,56	0,28±0,02

\* - p<0,05 – достоверные различия по сравнению с показателями интактных животных

# - p<0,05 – достоверные различия по сравнению с показателями животных с экспериментальной гнойной язвой

Активность SOD была выше у животных, получавших лактоферрин на 3, 5, 7 и 14 сутки на 22,2%, 80,0%, 107,1% и 36,4% ( $p < 0,05$ ) соответственно, также как и активность GT на 5 и 7 сутки – на 23,5% ( $p < 0,05$ ) и 21,1% ( $p < 0,05$ ). Активность GPx на 3 сутки патологии у животных, получавших лактоферрин в концентрации 0,5 мг/мл, была ниже показателей контрольных животных на 23,4% ( $p < 0,05$ ), а на 5 сутки превышала их на 30,5% ( $p < 0,05$ ) (таблица 9).

При применении лактоферрина (концентрация 1,5 мг/мл) при экспериментальной гнойной язве роговицы уровень МДА достоверно повышался только на 3 сутки эксперимента, превышая исходные показатели на 40,0% ( $p < 0,05$ ), а концентрация GSH также снижалась только на 3 сутки на 29,9% ( $p < 0,05$ ). Активность SOD повышалась на 7 сутки на 15,625% ( $p = 0,07$ ), активность GPx повышалась на 3 сутки на 9,8% ( $p = 0,07$ ), активность GT повышалась на 7 сутки на 15,4% по сравнению с показателями интактных животных ( $p = 0,09$ ) (таблица 10).

При введении лактоферрина в концентрации 1,5 мг/мл по сравнению с контролем гнойной язвы концентрация МДА была достоверно ниже с 3 по 14 сутки с максимумом различий на 5 сутки на 46,7% ( $p < 0,05$ ). Уровень GSH был достоверно выше показателей контрольных животных с 5 по 21 сутки с максимумом различий на 7 сутки на 115,4% ( $p < 0,05$ ). Активность SOD достоверно превышала показатели контрольных животных на 3-14 сутки с максимумом выраженности различий на 7 сутки на 164,3% ( $p < 0,05$ ). Активности GPx и GT достоверно превышали показатели контрольных животных на 5 сутки на 32,15% и 52,9% ( $p < 0,05$ ) и на 7 сутки на 14,5% ( $p = 0,09$ ) и 57,9% ( $p < 0,05$ ) соответственно (таблица 10).

При введении лактоферрина (концентрация 2,5 мг/мл) активности GPx и GT достоверно от показателей интактных животных не отличались. Активность SOD достоверно снижалась на 1 сутки эксперимента на 15,625% ( $p < 0,05$ ) и повышалась на 7 сутки на 9,375% ( $p = 0,1$ ) (таблица 11).

Таблица 10 – Выраженность окислительного стресса в ткани роговицы при развитии стафилококковой гнойной язвы на фоне лечения лактоферрином в концентрации 1,5 мг/кг (M±SD)

Серии эксперимента	МДА нмоль/мг белка	GSH мкмоль/мг белка	Активность SOD ЕА/мг белка	Активность GPx нмоль НАДФН/ мин× мг белка	Активность GT мкмоль ХДНБ/ мин× мг белка
Интактные кролики	3,0±0,25	19,7±0,79	3,2±0,08	19,4±0,78	0,26±0,02
Язва 1 сутки	3,4±0,22	17,3±0,54	2,9±0,10	18,1±0,62	0,24±0,01
Язва 3 сутки	4,2±0,19*#	15,0±0,88*	3,4±0,11#	21,3±0,79*	0,24±0,02
Язва 5 сутки	3,2±0,15#	17,9±0,84#	3,2±0,14#	17,3±0,77*#	0,26±0,01#
Язва 7 сутки	3,4±0,18#	19,6±1,26#	3,7±0,18*#	19,0±0,98#	0,30±0,03*#
Язва 14 сутки	2,8±0,14#	19,1±0,74#	3,1±0,15#	17,7±0,49	0,26±0,03
Язва 21 сутки	3,5±0,24	22,3±0,81#	3,1±0,2	19,1±0,78	0,30±0,04

\* - p<0,05 – достоверные различия по сравнению с показателями интактных животных

# - p<0,05 – достоверные различия по сравнению с показателями животных с экспериментальной гнойной язвой

Таблица 11 – Выраженность окислительного стресса в ткани роговицы при развитии стафилококковой гнойной язвы на фоне лечения лактоферрином в концентрации 2,5 мг/мл (M±SD)

Серии эксперимента	МДА нмоль/мг белка	GSH мкмоль/мг белка	Активность SOD ЕА/мг белка	Активность GPx нмоль НАДФН/ мин× мг белка	Активность GT мкмоль ХДНБ/ мин× мг белка
Интактные кролики	3,0±0,25	19,7±0,79	3,2±0,08	19,4±0,78	0,26±0,02
Язва 1 сутки	2,8±0,14#	16,7±0,63	2,7±0,14*	21,2±1,37	0,22±0,02
Язва 3 сутки	2,9±0,21#	19,3±0,96#	3,1±0,12	20,4±0,89	0,21±0,01
Язва 5 сутки	3,2±0,22#	18,8±1,14#	3,0±0,13#	18,2±0,80#	0,22±0,02#
Язва 7 сутки	3,5±0,17#	18,7±1,93#	3,5±0,09*#	19,6±0,71#	0,29±0,01#
Язва 14 сутки	3,4±0,16#	22,0±1,20#	3,0±0,12#	18,9±0,70	0,24±0,02
Язва 21 сутки	3,6±0,22*	24,0±1,50*#	3,3±0,15	20,9±1,70	0,29±0,03

\* - p<0,05 – достоверные различия по сравнению с показателями интактных животных

# - p<0,05 – достоверные различия по сравнению с показателями животных с экспериментальной гнойной язвой

Концентрации МДА и GSH превышали показатели интактных животных на 21 сутки эксперимента – на 20,0% и 21,8% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

При введении лактоферрина (концентрация 2,5 мг/мл) содержание МДА было ниже показателей контрольных животных с 1 по 14 сутки исследования с максимумом выраженности различий на 5 сутки на 46,7% ( $p < 0,05$ ). Содержание GSH было выше показателей контрольных животных с 3 по 21 сутки с максимумом различий на 7 сутки на 105,5% ( $p < 0,05$ ). Активность SOD превышала показатели контрольных животных с 5 по 14 сутки максимально на 7 сутки на 150,0% ( $p < 0,05$ ). Активность GPx превышала показатели контрольных животных на 5 и 7 сутки на 38,9% и 18,1% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Активность GT превышала показатели контрольных животных в те же сроки на 29,4% и 52,6% ( $p < 0,05$ ) соответственно (таблица 11).

При применении лактоферрина в концентрации 5 мг/мл исследуемые показатели оксидантной-антиоксидантной системы на протяжении всего эксперимента достоверно от значений интактных животных не отличались (таблица 12). Лишь концентрация МДА и GSH и активность GT превышали их на 21 сутки эксперимента – на 20,0%, 26,9% и 23,1% соответственно ( $p < 0,05$ ).

При введении лактоферрина в концентрации 5 мг/мл уровень МДА достоверно снижался на 3 – 14 сутки с максимумом выраженности изменений на 5 сутки на 53,3% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями контрольных животных. Концентрация GSH превышала аналогичный показатель у контрольных животных на 3-21 сутки с максимумом выраженности на 7 сутки – на 124,2% ( $p < 0,05$ ). Активность SOD превышала показатели контрольных животных на 5-14 сутки, максимально на 7 сутки на 107,1% ( $p < 0,05$ ). Активность GPx была ниже значений контрольных животных на 3 сутки на 25,9% ( $p < 0,05$ ), но превышала их на 5-14 сутки, максимально на 45,8% ( $p < 0,05$ ). Активность GT превышала активность фермента у контрольных животных на 3 и 5 сутки на 47,6% и 32,0% ( $p < 0,05$ ) (таблица 12).

Таблица 12 – Выраженность окислительного стресса в ткани роговицы при развитии стафилококковой гнойной язвы на фоне лечения лактоферрином в концентрации 5 мг/мл ( $M \pm m$ )

Серии эксперимента	МДА нмоль/мг белка	GSH мкмоль/мг белка	Активность SOD ЕА/мг белка	Активность GPx нмоль НАДФН/ мин× мг белка	Активность GT мкмоль ХДНБ/ мин× мг белка
Интактные кролики	3,0±0,25	19,7±0,79	3,2±0,08	19,4±0,78	0,26±0,02
Язва 1 сутки	3,3±0,18	18,8±0,76	2,9±0,15	18,7±0,97	0,28±0,016
Язва 3 сутки	3,4±0,15#	19,9±1,02#	2,8±0,12	17,1±0,67#	0,31±0,021#
Язва 5 сутки	2,8±0,14#	17,9±1,27#	2,9±0,11#	19,1±0,45#	0,25±0,018#
Язва 7 сутки	3,7±0,17#	20,4±1,73#	2,9±0,16#	21,7±1,15#	0,22±0,019
Язва 14 сутки	3,3±0,23#	20,4±1,09#	2,9±0,09#	20,0±0,57#	0,23±0,019
Язва 21 сутки	3,6±0,25*	25,0±1,50*#	3,1±0,15	21,9±1,70	0,32±0,021*

\* -  $p < 0,05$  – достоверные различия по сравнению с показателями интактных животных

# -  $p < 0,05$  – достоверные различия по сравнению с показателями животных с экспериментальной гнойной язвой



На фоне применения лактоферрина (концентрация 0,5 мг/мл) в комбинации с ципрофлоксацином в составе комплексной терапии экспериментальной гнойной язвы в сравнении с показателями интактных животных отмечались следующие изменения. Уровень МДА повышался на 2 и 3 сутки гнойной язвы на 50,0% ( $p < 0,05$ ) и 36,7% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Концентрация GSH повышалась на 28 сутки исследования на 22,3% ( $p < 0,05$ ). Активность SOD уменьшалась на 5 сутки гнойной язвы на 18,8% ( $p < 0,05$ ) и на 7 сутки на 28,1% ( $p < 0,05$ ). Активность GPx снижалась на 17,5% ( $p < 0,05$ ) только на 7 сутки гнойной язвы, в остальные периоды эксперимента достоверно от показателей интактных животных не отличалась. Активность GT увеличивалась на 26,9% ( $p < 0,05$ ) на 3 сутки патологии, оставалась повышенной на 5 сутки и снижалась на 19,2% ( $p < 0,05$ ) на 7 сутки по сравнению с показателями интактных животных и нормализовывалась к 14 суткам (таблица 13). В сравнении с показателями животных контрольной группы (моделирование экспериментальной гнойной язвы) у кроликов, получающих комбинацию лактоферрина и ципрофлоксацина на фоне экспериментальной патологии, наблюдались следующие изменения. Уровень МДА на 5 и 7 сутки был ниже показателей контрольных животных на 38,3%, и 39,6% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Концентрация GSH превышала показатели контрольных животных на 1 сутки на 12,0% ( $p < 0,05$ ), на 5 сутки – на 70,5% ( $p < 0,05$ ), на 7 сутки – на 81,3% ( $p < 0,05$ ), а на 28 сутки – на 15,9% ( $p < 0,05$ ). Активность SOD превышала активность данного фермента у животных контрольной группы на 5 сутки на 73,3% ( $p < 0,05$ ), на 7 сутки – на 64,3% ( $p < 0,05$ ), на 14 сутки – на 54,5% ( $p < 0,05$ ). Активность GPx превышала активность данного фермента у животных контрольной группы на 1 сутки эксперимента на 19,9% ( $p < 0,05$ ), на 5 сутки – на 32,8% ( $p < 0,05$ ). Активность GT превышала активность данного фермента у животных контрольной группы на 3 сутки – на 57,1% ( $p < 0,05$ ), на 5 сутки – на 94,1% ( $p < 0,05$ ) (таблица 13).

При сравнении показателей оксидантной-антиоксидантной систем у животных, получавших стандартную терапию ципрофлоксацином, с

животными, получавшими дополнительно лактоферрин, были получены следующие результаты. У животных, на фоне стандартной терапии, на 3 и 5 сутки экспериментальной патологии уровень МДА превышал показатели кроликов, получавших комбинацию лактоферрина и ципрофлоксацина, на 29,3% и на 27,0% ( $p < 0,05$ ) соответственно, а концентрация GSH была меньше их на 5 и 28 сутки на 30,7% ( $p < 0,05$ ) и на 19,9% ( $p < 0,05$ ). У животных, получавших комбинацию препаратов, активность SOD превосходила данный показатель кроликов, получавших стандартную терапию, на 2 и 3 сутки на 21,7% ( $p < 0,05$ ) и 55,0% ( $p < 0,05$ ), активность GPx – на 1 и 2 сутки – на 13,0% ( $p < 0,05$ ) и 19,3% ( $p < 0,05$ ), а активность GT – на 2, 3 и 5 сутки – на 29,2% ( $p < 0,05$ ), 83,3% ( $p < 0,05$ ) и 94,1% ( $p < 0,05$ ) соответственно (таблица 13).

Введение комбинации ципрофлоксацина и лактоферрина в концентрации 0,5 мг/мл в течение 14 дней приводило к нормализации показателей оксидантной-антиоксидантной систем (концентрация МДА, GSH, активность SOD, GPx, GT) роговицы на 21 и 28 сутки патологии по сравнению со значениями интактных животных (таблица 14).

При сравнении показателей свободнорадикального статуса роговицы животных, получавших комбинацию препаратов в течение 14 дней, с показателями контрольных кроликов (гнойная язва без лечения), достоверные различия получены только на 21 сутки гнойной язвы: активность GT животных на фоне лечения была меньше на 10,3% ( $p < 0,05$ ) (таблица 14).

При сравнении изучаемых биохимических показателей кроликов, получавших ципрофлоксацин и лактоферрин (концентрация 0,5 мг/мл в течение 14 дней), с показателями животных на фоне терапии ципрофлоксацином, достоверных различий на 21 и 28 сутки получено не было (таблица 14).

Таким образом, применение лактоферрина в концентрациях 0,5 мг/мл, 1,5 мг/мл, 2,5 мг/мл и 5 мг/мл, а также комбинации лактоферрина 0,5 мг/мл и ципрофлоксацина для лечения экспериментальной гнойной язвы роговицы дозозависимо подавляет развитие окислительного стресса.

Таблица 13 – Выраженность окислительного стресса в ткани роговицы при развитии стафилококковой гнойной язвы на фоне лечения ципрофлоксацином и лактоферрином (концентрация 0,5 мг/мл) (M±SD)

Серии эксперимента	МДА нмоль/мг белка	GSH мкмоль/мг белка	Активность SOD ЕА/мг белка	Активность GPx нмоль НАДФН/ мин× мг белка	Активность GT мкмоль ХДНБ/ мин× мг белка
Интактные кролики	3,0±0,25	19,7±0,79	3,2±0,08	19,4±0,78	0,26±0,02
Язва 1 сутки	3,8±0,21	18,6±0,58#	3,1±0,08	21,7±0,80#%	0,29±0,008
Язва 2 сутки	4,5±0,23*	15,6±0,55	2,8±0,05%	20,4±1,17%	0,31±0,08%
Язва 3 сутки	4,1±0,30*%	15,7±0,6	3,1±0,14%	21,9±0,73	0,33±0,008*#%
Язва 5 сутки	3,7±0,15#%	17,9±0,64#%	2,6±0,08*#	17,4±1,1#	0,33±0,01*#%
Язва 7 сутки	3,2±0,21#	16,5±0,83#	2,3±0,18*#	16,0±0,49*	0,21±0,017*
Язва 14 сутки	2,9±0,29	18,8±0,44	3,4±0,16#	17,0±0,38	0,26±0,019
Язва 21 сутки	3,3±0,26	22,4±2,62	3,0±0,12	18,3±0,67	0,26±0,016
Язва 28 сутки	4,0±0,21	24,1±0,82*#%	3,0±0,11	19,5±0,81	0,31±0,01

\* - p<0,05 – достоверные различия по сравнению с показателями интактных животных

# - p<0,05 – достоверные различия по сравнению с показателями животных с экспериментальной гнойной язвой

% - p<0,05 – достоверные различия по сравнению с показателями животных, получавшими лечение ципрофлоксацином при экспериментальной гнойной язве

Таблица 14 – Выраженность окислительного стресса в ткани роговицы при развитии стафилококковой гнойной язвы на фоне лечения ципрофлоксацином и лактоферрином (концентрация 0,5 мг/мл) в течение 14 дней (M±SD)

Серии эксперимента	МДА нмоль/мг белка	GSH мкмоль/мг белка	Активность SOD ЕА/мг белка	Активность GPx нмоль НАДФН/ мин× мг белка	Активность GT мкмоль ХДНБ/ мин× мг белка
Интактные кролики	3,0±0,25	19,7±0,79	3,2±0,08	19,4±0,78	0,26±0,02
Язва 21 сутки	2,90±0,11	19,0±0,47	2,9±0,05	20,1±0,56	0,26±0,04#
Язва 28 сутки	2,95±0,08	20,6±0,52	3,1±0,06	20,5±0,41	0,28±0,009

\* -  $p < 0,05$  – достоверные различия по сравнению с показателями интактных животных

# -  $p < 0,05$  – достоверные различия по сравнению с показателями животных с экспериментальной гнойной язвой

% -  $p < 0,05$  – достоверные различия по сравнению с показателями животных, получавшими лечение ципрофлоксацином при экспериментальной гнойной язве

### **3.2.2. Влияние лактоферрина на микробиологический статус роговицы при экспериментальной гнойной язве**

Результаты микробиологического исследования мазков с дна гнойной язвы роговицы представлены в таблице 15, рисунке 22.

Инстилляция ципрофлоксацина проявлялась снижением количества колоний золотистого стафилококка при посеве в первый день на 92,0% ( $p < 0,05$ ), на второй день – на 95,7% ( $p < 0,05$ ), на третий день – на 97,8% ( $p < 0,05$ ), на четвертый день – на 97,8% ( $p < 0,05$ ), а на шестой день – полностью подавляло рост золотистого стафилококка по сравнению со значениями у контрольных кроликов.

Применение лактоферрина в концентрации 0,5 мг/мл приводило к снижению количества колоний золотистого стафилококка при посеве в первый день – на 87,8% ( $p < 0,05$ ), на второй день – на 92,7% ( $p < 0,05$ ), на третий день – на 92,0% ( $p < 0,05$ ), на четвертый день – на 95,5%, а на шестые сутки – на 93,5% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями животных контрольной группы.

Использование лактоферрина в концентрациях 1,5 мг/мл, 2,5 мг/мл и 5 мг/мл приводило к снижению количества колоний золотистого стафилококка при посеве в первый день – на 93,3% ( $p < 0,05$ ), 94,1% ( $p < 0,05$ ), 94,1% ( $p < 0,05$ ) соответственно, во второй день – на 95,3% ( $p < 0,05$ ), 97,5% ( $p < 0,05$ ) и 98,3% ( $p < 0,05$ ) соответственно, а с третьего дня полностью подавляло рост микроорганизма по сравнению с показателями животных контрольной группы.

Использование комбинации ципрофлоксацина и лактоферрина в концентрации 0,5 мг/мл сопровождалось снижением количества колоний золотистого стафилококка при посеве на первый день на 96,2% ( $p < 0,05$ ), на вторые сутки – на 97,9% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями контроля, а на третьи сутки полностью подавляло рост микроорганизма.

При сравнении антибактериального действия ципрофлоксацина и лактоферрина были получены следующие результаты. Количество колоний золотистого стафилококка было достоверно ниже у животных, получавших ципрофлоксацин, по сравнению с показателями животных на фоне терапии

лактоферрином в концентрации 0,5 мг/мл на первые сутки гнойной язвы на 34,5% ( $p<0,05$ ), на вторые сутки – на 41,2% ( $p<0,05$ ), на третьи сутки – на 72,7% ( $p<0,05$ ), на четвертые сутки – на 50,0% ( $p<0,05$ ). На шестые сутки показатели данных групп достоверно не различались.

В то же время применение лактоферрина в концентрациях 2,5 и 5 мг/мл проявлялось достоверным снижением количества колоний на 2 сутки гнойной язвы по сравнению с показателями животных, получавшими ципрофлоксацин, на 40,0% и 60,0% ( $p<0,05$ ) соответственно.

Совместное применение ципрофлоксацина и лактоферрина (концентрация 0,5 мг/мл) снижало количество высеваемых колоний золотистого стафилококка на 1 сутки язвы по сравнению с показателями животных, получавшими лактоферрин в концентрации 0,5 мг/мл – на 68,9% ( $p<0,05$ ), в дозе 1,5 мг/мл – на 43,8% ( $p<0,05$ ), в дозах 2,5 и 5 мг/мл – на 35,7% ( $p<0,05$ ), и животными, получавшими ципрофлоксацин, – на 52,6% ( $p<0,05$ ). На 2 сутки язвы количество колоний снижалось по сравнению с показателями животных, получавшими лактоферрин в дозе 0,5 мг/мл – на 70,6% ( $p<0,05$ ), в дозе 1,5 мг/мл – на 54,5% ( $p<0,05$ ), и животными, получавшими ципрофлоксацин, – на 50,0% ( $p<0,05$ ). На 3 и 4 сутки язвы по сравнению с показателями животных, получавшими лактоферрин в дозе 0,5 мг/мл, – на 100,0% ( $p<0,05$ ).

Таблица 15 – Влияние лактоферрина, ципрофлоксацина и их комбинации на количество колоний золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*) при посеве с поверхности роговицы в разные сроки гнойной язвы

Группы эксперимента	Количество колоний золотистого стафилококка				
	1 сутки	2 сутки	3 сутки	4 сутки	6 сутки
Гнойная язва	119,0 (112,0; 132,0)#%	116,5 (110,0; 123,0)#	69,0 (66,0; 78,0)#%	44,5 (41,0; 53,0)#%	15,5 (10,0; 19,0)#%
Лактоферрин 0,5 мг/мл	14,5 (10,0; 19,0)*#%	8,5 (8,0; 11,0)*#%	5,5 (4,0; 8,0)*#%	2,0 (2,0; 4,0)*#%	1,0 (0,0; 2,0)*
Лактоферрин 1,5 мг/мл	8,0 (8,0; 9,0)*#	5,5 (5,0; 6,0)*#	0,5 (0,0; 1,0)*	0,0 (0,0; 1,0)*	0,0 (0,0; 0,0)*
Лактоферрин 2,5 мг/мл	7,0 (7,0; 8,0)*#	3,0 (2,0; 3,0)*%	0,0 (0,0; 1,0)*	0,0 (0,0; 0,0)*	0,0 (0,0; 0,0)*
Лактоферрин 5 мг/мл	7,0 (6,0; 8,0)*#	2,0 (1,0; 3,0)*%	0,5 (0,0; 1,0)*	0,0 (0,0; 0,0)*	0,0 (0,0; 0,0)*
Ципрофлоксацин	9,5 (7,0; 11,0)*#	5,0 (3,0; 6,0)*#	1,5 (1,0; 2,0)*	1,0 (0,0; 1,0)*	0,0 (0,0; 0,0)*
Ципрофлоксацин и лактоферрин 0,5 мг/мл	4,5 (3,0; 5,0)*	2,5 (2,0; 3,0)*%	0,0 (0,0; 1,0)*	0,0 (0,0; 0,0)*	0,0 (0,0; 0,0)*

\* -  $p < 0,05$  – достоверные различия с показателями животных контрольной группы (гнойная язва без лечения)

% -  $p < 0,05$  – достоверные различия с показателями животных, получавших ципрофлоксацин

# -  $p < 0,05$  – достоверные различия с показателями животных получавших ципрофлоксацин и лактоферрин



Рисунок 22 – Колонии золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*) при посеве с поверхности роговицы в разные сроки гнойной язвы

Таким образом, лактоферрин, в тестируемых концентрациях (0,5 мг/мл, 1,5 мг/мл, 2,5 мг/мл и 5 мг/мл) по антибактериальной активности сопоставим с препаратом сравнения ципрофлоксацином, а их комбинация (ципрофлоксацин и лактоферрин в концентрации 0,5 мг/мл) оказывает потенцирующее действие.

### **3.2.3. Влияние лактоферрина на клиническую и патоморфологическую картину экспериментальной гнойной язвы роговицы**

Характер патологического процесса, осложнения, течение репаративных процессов, исходы репарации ткани роговицы представлены в таблице 16.

Процентное соотношение площади прокрашиваемого флюоресцеином дефекта к площади первично наносимого повреждения роговицы представлено в таблице 17, рисунке 23.

У животных второй группы (контроль патологии, гнойная язва без лечения) гнойная язва сформировалась в течение 24 часов после внесения культуры *Staphylococcus aureus*. С 1 по 3 сутки опыта клиническая картина соответствовала стадии инфильтрации, с 3 по 7 сутки – изъязвления, с 7 по 21 сутки – эпителизации, с 21 по 28 сутки – формирования рубца. Из стадии инфильтрации в стадию изъязвления перешли все глаза. В 46,7% случаев в



фазах инфильтрации и изъязвления воспалительные изменения в виде инфильтрации, отёка стромы роговицы, эпителиопатии распространялись за зону нанесения первичного дефекта. В стадии изъязвления на 9 глазах сформировалось десцеметоцеле, закончившееся в 5 случаях перфорацией глаза. Средний срок начала эпителизации составил  $10,65 \pm 2,72$  суток, срок формирования полной фасетки (выстилание дна дефекта очагами регенерирующего эпителия) –  $15,7 \pm 2,89$  суток, полной эпителизации (формирование замкнутого слоя эпителия без участков прокрашивания флюоресцеином) составил  $19,4 \pm 3,29$  суток. В среднем с  $20,3 \pm 2,63$  суток начиналось формирование рубца (замещение дефекта роговицы фиброцеллюлярной тканью). В результате репаративных процессов в 16,7% случаев сформировалось облаковидное помутнение, в 50% случаев – помутнение средней интенсивности и в 33,3% случаев – интенсивное помутнение.

Анализ процентного соотношения площади прокрашиваемого флюоресцеином дефекта к площади первично наносимого повреждения роговицы показал следующие результаты. Площадь прокрашиваемого дефекта на 3 сутки патологии у животных этой группы составила  $51,9 \pm 1,6\%$ . На 7 сутки площадь дефекта была максимальной, увеличившись на 86,1% относительно 3 суток, и составляла  $96,6 \pm 2,1\%$ . На 14 сутки площадь дефекта уменьшилась относительно 7 суток на 19,1% и составляла  $78,2 \pm 2,1\%$ , тогда как на 21 сутки дефект уменьшился относительно 7 суток на 80,7% и составлял  $18,6 \pm 0,9\%$ .

На фоне лечения ципрофлоксацином стадия инфильтрации в 16,7% случаев перешла в стадию эпителизации, в 82,3% случаев язвенный дефект сформировался. В стадии изъязвления на 5 глазах сформировалось десцеметоцеле, закончившееся в 1 случае перфорацией роговицы. В 26,6% случаев в фазах инфильтрации и изъязвления воспалительные изменения в виде инфильтрации, отёка стромы роговицы, эпителиопатии распространялись за зону нанесения первичного дефекта. Согласно

проведённому статистическому анализу в этой группе, средний срок начала эпителизации составил  $6,2 \pm 2,65$  суток. Срок формирования полной фасетки – в среднем  $12,6 \pm 2,61$  суток, полной эпителизации –  $16,0 \pm 2,61$  суток. В среднем с  $20,7 \pm 3,02$  суток начиналось формирование рубца. В результате репаративных процессов в 33,3% случаев сформировалось облаковидное помутнение, в 50% случаев – помутнение средней интенсивности и в 16,7% случаев – интенсивное помутнение.

Анализ процентного соотношения площади прокрашиваемого флюоресцеином дефекта к площади первично наносимого повреждения роговицы показал следующие результаты. Площадь прокрашиваемого дефекта на 3 сутки патологии у животных этой группы составила  $50,2 \pm 2,6\%$ . На 7 сутки площадь дефекта была максимальной, увеличившись на 63,7% относительно 3 суток, и составляла  $82,2 \pm 1,5\%$ . На 14 сутки площадь дефекта уменьшилась относительно 7 суток на 32,1% и составляла  $55,8 \pm 2,4\%$ , тогда как на 21 сутки дефект уменьшился относительно 7 суток на 89,8% и составлял  $8,4 \pm 0,9\%$  (таблицы 16 и 17, рисунок 23).

Инстилляцией ципрофлоксацина сопровождалась уменьшением площади дефекта роговицы на 7 сутки гнойной язвы на 14,9% ( $p < 0,05$ ), на 14 сутки – на 28,6% ( $p < 0,05$ ), на 21 сутки – на 54,8% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями животных контрольной группы (гнойная язва без лечения).

Таблица 16 – Клинические проявления гнойной язвы роговицы на фоне разного лечения

Группы/ критерии оценки клиники	Без лечения (контроль)	Ципрофлоксацин	0,5 мг/мл лактоферрин	1,5 мг/мл лактоферрин	2,5 мг/мл лактоферрин	5 мг/мл лактоферрин	0,5 мг/мл лактоферрин + ципрофлоксацин	0,5 мг/мл лактоферрин + ципрофлоксацин с отменой лактоферрина
<b>Характер развития патологического процесса</b>								
% перехода из стадии инфильтрации в стадию изъязвления	100	82,3*	63,3*	60*#	56,7*#	60*#	70*	66,7*#
% перехода из стадии инфильтрации в стадию эпителизации	0	16,7*	36,7*	40*#	42,3*#	40*#	30*	33,3 *#
Распространение инфильтрации за зону нанесённого дефекта (количество глаз), %	46,7	26,6	10*	10*	26,6	33,3	6,67*#	6,67*#
<b>Осложнения</b>								
Десцеметоцеле, кол-во глаз	9	5	6	4	2	2	3	4
Перфорация, кол-во глаз	5	1	1	1	0	0	0	0
<b>Репаративные процессы</b>								
Начало эпителизации, сутки	10,65±2,72	6,2±2,65*	6,05±2,58*	5,1±2,49*	4,75±1,86*	3,35±1,42*#	3,35±1,35*#	3,35±0,99*#
Полная фасетка, сутки	15,7±2,89	12,6±2,61	10,1±2,6	9,1±1,73*	6,1±2,08*#	7,1±2,34*#	4,6±1,33*#	4,7±1,49*#
Полная эпителизация, сутки	19,4±3,29	16±2,91	11,9±2,58*	10,8±2,18*#	14,9±3,14	16,5±3,27	7,8±2,12*#	7,8±1,58*#
Гиперплазия эпителия (%)	0	0	0	16,7	44,4	83,3	0	0
Начало формирование рубца (сутки)	20,3±2,63	20,7±3,02	16,3±3,19	16,3±2,34	11,9±2,71*#	6,3±2,19*#	16,2±2,76	16,3±1,66
<b>Исходы репарации</b>								
Отсутствие помутнения	0	0	0	0	0	0	0	33,3
Облаковидное помутнение	16,7	33,3	0	0	0	0	16,7	33,3
Помутнение средней интенсивности (возможна визуализация структур передней камеры)	50,0	50	33,3	33,3	16,7	16,7	16,7	33,3
Интенсивное помутнение (отсутствие визуализации структур передней камеры)	33,3	16,7	66,7	66,7	82,3	82,3	66,6	0

\* -  $p < 0,05$  – достоверные различия с показателями контрольных животных (язва без лечения)

# -  $p < 0,05$  – достоверные различия с показателями животных, получающих ципрофлоксацин

Таблица 17 – Влияние лактоферрина, ципрофлоксацина и их комбинации на площадь дефекта эпителия в разные сроки гнойной язвы роговицы (M±SD)

Группы Эксперимента	% отношение площади прокрашиваемого дефекта к площади наносимого повреждения роговицы			
	3 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки
Гнойная язва (контроль)	51,9±1,6	96,6±2,1%	78,2±2,1%	18,6±0,9%
Ципрофлоксацин	50,2±2,6	82,2±1,5#	55,8±2,4#	8,4±0,8#
Лактоферрин 0,5 мг/мл	56,8±3,1	83,3±2,2#	22,9±1,4#%	18,5±1,1%
Лактоферрин 1,5 мг/мл	39,0±1,2#%	73,8±2,1#%	19,4±0,3#%	10,8±1,1#
Лактоферрин 2,5 мг/мл	33,6±3,4#%	73,7±2,2#%	16,7±1,7#%	15,4±3,2#%
Лактоферрин 5 мг/мл	21,0±1,5#%	40,7±1,4#%	13,1±1,2#%	8,2±0,7#
Ципрофлоксацин и лактоферрин 0,5 мг/мл	47,1±2,3	31,4±1,4#%	12,9±1,6#%	5,8±0,9#
Ципрофлоксацин и лактоферрин 0,5 мг/мл в течение 14 дней	44,8±1,8	30,9±1,4#%	9,6±1,2#%	1,4±0,3#%

% -  $p < 0,05$  – достоверные различия с показателями животных, получавшими ципрофлоксацин

# -  $p < 0,05$  – достоверные различия с показателями контрольных животных

На фоне лечения лактоферрином (0,5 мг/мл) стадия инфильтрации в 36,7% случаев, перешла в стадию эпителизации, в 63,3% случаев язвенный дефект сформировался. В стадии изъязвления на 6 глазах сформировалось десцеметоцеле, закончившееся в 1 случае перфорацией роговицы. В 10% случаев в фазах инфильтрации и изъязвления воспалительные изменения в виде инфильтрации, отёка стромы роговицы, эпителиопатии распространялись за зону нанесения первично наносимого дефекта. Средний срок начала эпителизации составил  $6,05 \pm 2,58$  суток. Срок формирования полной фасетки равнялся  $10,1 \pm 2,6$  суткам, полной эпителизации –  $11,9 \pm 2,58$  суткам. В среднем с  $16,3 \pm 3,19$  суток начиналось формирование рубца. В результате репаративных процессов помутнения роговицы относились к средней степени (33,3%) и интенсивным (66,7%) (таблицы 16, 17, рисунок 23).

Анализ процентного соотношения площади прокрашиваемого флюоресцеином дефекта к площади первично наносимого повреждения роговицы показал следующие результаты. Площадь прокрашиваемого дефекта на 3 сутки патологии у животных этой группы составила  $56,8 \pm 3,1\%$ . На 7 сутки площадь дефекта была максимальной, увеличившись на 46,6% относительно 3 суток и составляла  $83,3 \pm 2,2\%$  ( $p < 0,05$ ).

На 14 сутки площадь дефекта уменьшилась относительно 7 суток на 72,5% и составляла  $22,9 \pm 1,4\%$  ( $p < 0,05$ ), тогда как на 21 сутки дефект уменьшился относительно 7 суток на 77,8% и составлял  $18,5 \pm 1,1\%$ .

Применение лактоферрина (концентрация 0,5 мг/мл) сопровождалось уменьшением площади дефекта роговицы на 7 сутки гнойной язвы на 13,8% ( $p < 0,05$ ), на 14 сутки – на 70,7% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями животных контрольной группы (гнойная язва без лечения).

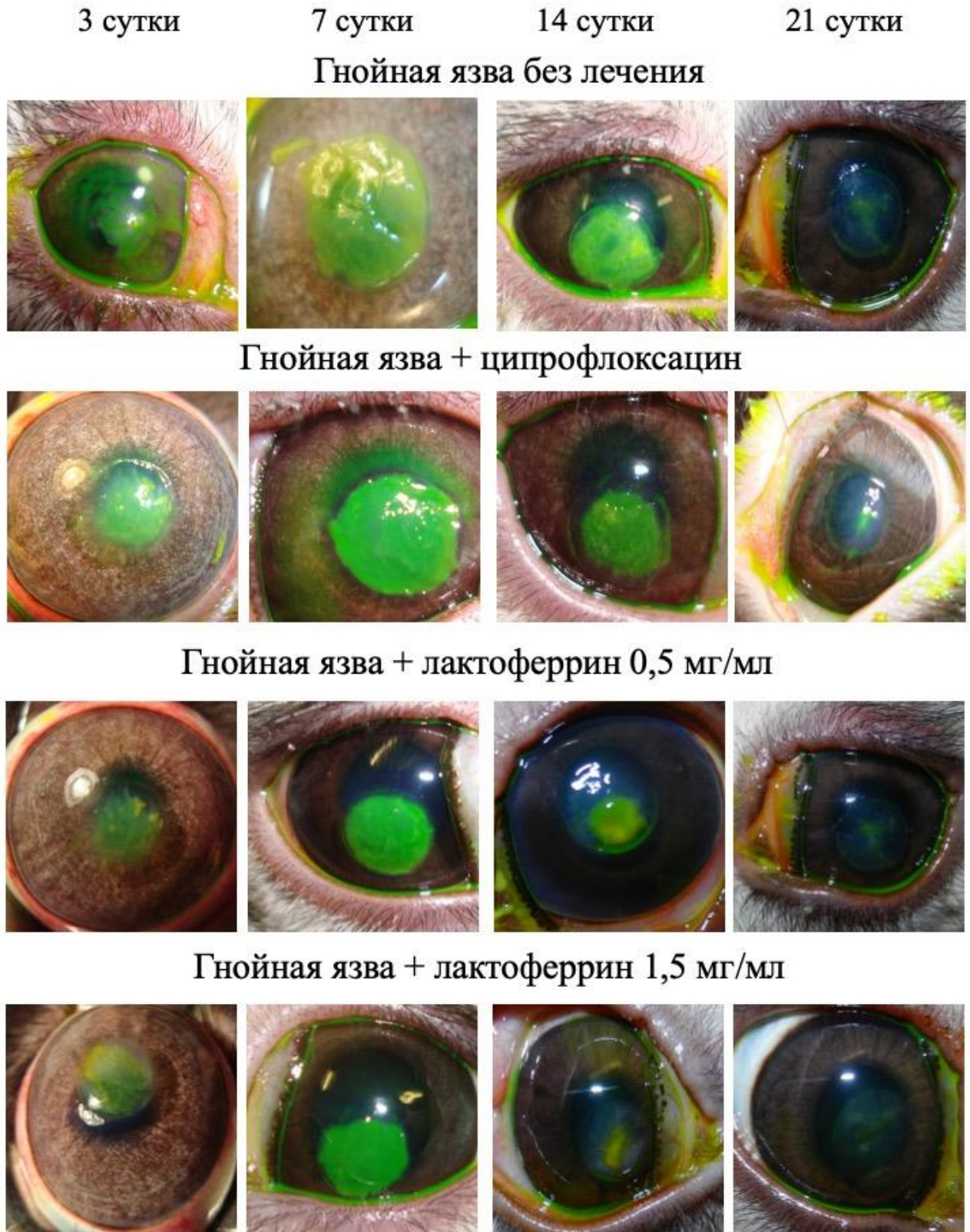


Рисунок 23 – Влияние тестируемых веществ на площадь дефекта эпителия, прокрашиваемого флюоресцеином, в разные сроки формирования гнойной язвы роговицы.

На 14 сутки гнойной язвы площадь дефекта роговицы у животных, получавших лактоферрин (концентрация 0,5 мг/мл), была ниже площади дефекта у животных, получавших ципрофлоксацин на 58,9% ( $p < 0,05$ ), а на 21 день была ее больше на 120,2% ( $p < 0,05$ ).

На фоне лечения лактоферрином (1,5 мг/мл) стадия инфильтрации в 60% случаев перешла в стадию эпителизации, в 40% случаев язвенный дефект сформировался. В стадии изъязвления на 4 глазах сформировалось десцеметоцеле, закончившееся в 1 случае перфорацией роговицы. В 10% случаев в фазах инфильтрации и изъязвления воспалительные изменения в виде инфильтрации, отёка стромы роговицы, эпителиопатии распространялись за зону первично дефекта. Средний срок начала эпителизации составил  $5,1 \pm 2,49$  суток. Срок формирования полной фасетки равнялся в среднем  $9,1 \pm 1,73$  суток, полной эпителизации –  $10,8 \pm 2,58$  суток. Характерно, что при применении лактоферрина в концентрации 1,5 мг/мл наблюдалась гиперплазия эпителия в 16,7% случаев, обнаруживаемая по формированию «шагреновой» поверхности дна язвы со слабым прокрашиванием флюоресцеином. В среднем с  $16,3 \pm 2,34$  суток начиналось формирование рубца. В результате репаративных процессов помутнения роговицы относились к средней степени (33,3%) и интенсивным (66,7%) (таблицы 16, 17, рисунок 23).

Анализ процентного соотношения площади прокрашиваемого флюоресцеином дефекта к площади первично наносимого повреждения роговицы показал следующие результаты. Площадь прокрашиваемого дефекта на 3 сутки патологии у животных этой группы составила  $39,0 \pm 1,2\%$ . На 7 сутки площадь дефекта была максимальной, увеличившись на 89,2% относительно 3 суток, и составляла  $73,8 \pm 2,2\%$  ( $p < 0,05$ ). На 14 сутки площадь дефекта уменьшилась относительно 7 суток на 73,7% и составляла  $19,4 \pm 1,4\%$  ( $p < 0,05$ ), тогда как на 21 сутки дефект уменьшился относительно 7 суток на 85,4% и составлял  $10,8 \pm 1,1\%$  ( $p < 0,05$ ).

Использование лактоферрина (концентрация 1,5 мг/мл) сопровождалось уменьшением площади дефекта роговицы на 3 сутки гнойной язвы на 24,9% ( $p < 0,05$ ), на 7 сутки – на 23,6% ( $p < 0,05$ ), на 14 сутки – на 75,2% ( $p < 0,05$ ), на 21 сутки – на 41,9% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями животных контрольной группы (гнойная язва без лечения).

Применение лактоферрина снижало площадь дефекта роговицы по сравнению с животными, получавшими ципрофлоксацин, на 3 сутки – на 22,3% ( $p < 0,05$ ), на 7 сутки – на 10,2% ( $p < 0,05$ ), на 14 сутки – на 65,2% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

На фоне лечения лактоферрином в концентрации 2,5 мг/мл стадия инфильтрации в 56,7% случаев перешла в стадию эпителизации, в 42,3% случаев язвенный дефект сформировался. В стадии изъязвления на 2 глазах сформировалось десцеметоцеле, не закончившееся ни в одном случае перфорацией роговицы. В 26,6% случаев в фазах инфильтрации и изъязвления воспалительные изменения в виде инфильтрации, отёка стромы роговицы, эпителиопатии распространялись за зону первичного дефекта. Согласно проведённому статистическому анализу, в этой группе средний срок начала эпителизации составил  $4,75 \pm 1,86$  суток, срок формирования полной фасетки –  $6,1 \pm 2,08$  суток, полной эпителизации –  $14,9 \pm 3,14$  суток. При применении лактоферрина в концентрации 2,5 мг/мл наблюдалась гиперплазия эпителия в 44,4% случаев. В среднем с  $11,9 \pm 2,71$  суток начиналось формирование рубца. В результате репаративных процессов в 16,7% сформировались помутнения роговицы средней степени, а в 82,3% – интенсивные (таблицы 16, 17, рисунок 24).

Анализ процентного соотношения площади прокрашиваемого флюоресцеином дефекта к площади первично наносимого повреждения роговицы показал следующие результаты. Площадь прокрашиваемого дефекта на 3 сутки патологии у животных этой группы составила  $33,6 \pm 3,4\%$ .



3 сутки

7 сутки

14 сутки

21 сутки

Гнойная язва + лактоферрин 2,5 мг/мл



Гнойная язва + лактоферрин 5 мг/мл



Гнойная язва + ципрофлоксацин + лактоферрин 0,5 мг/мл

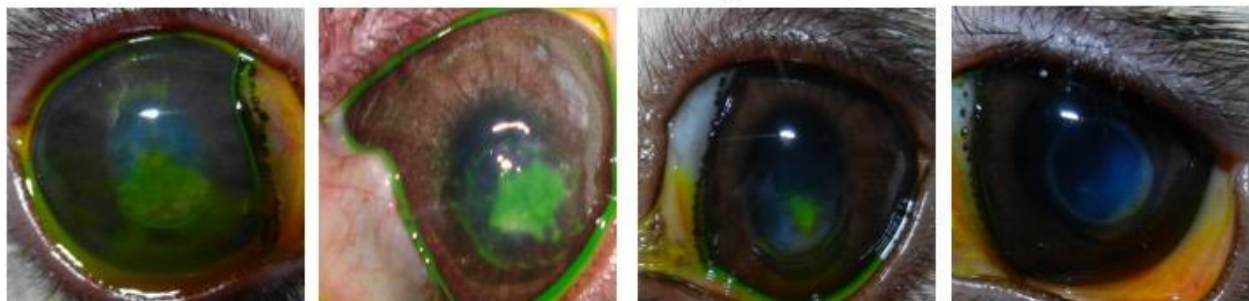
Гнойная язва + ципрофлоксацин + лактоферрин 0,5 мг/мл  
в течение 14 суток

Рисунок 24 – Влияние тестируемых веществ на площадь дефекта эпителия, прокрашиваемого флюоресцеином, в разные сроки формирования гнойной язвы роговицы.

На 7 сутки площадь дефекта была максимальной, увеличившись на 119,3% относительно 3 суток и составляла  $73,7 \pm 2,2\%$ . На 14 сутки площадь дефекта уменьшилась относительно 7 суток на 77,3% и составляла  $16,7 \pm 1,7\%$ , тогда как на 21 сутки дефект уменьшился относительно 7 суток на 77,7% и составлял  $15,4 \pm 3,2\%$ .

Лактоферрин (концентрация 2,5 мг/мл) уменьшал площадь дефекта роговицы на 3 сутки гнойной язвы на 35,3% ( $p < 0,05$ ), на 7 суток – на 23,7% ( $p < 0,05$ ), на 14 суток – на 78,6% ( $p < 0,05$ ), на 21 сутки – 17,2% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями животных контрольной группы (гнойная язва без лечения).

Использование лактоферрина снижало площадь дефекта роговицы по сравнению с животными, получавшими ципрофлоксацин, на 3 суток – на 33,1% ( $p < 0,05$ ), на 7 суток – на 10,3% ( $p < 0,05$ ), на 14 суток – на 70,1% ( $p < 0,05$ ) соответственно, а на 21 сутки повышало ее на 83,3% ( $p < 0,05$ ).

На фоне лечения лактоферрином (в концентрации 5 мг/мл) стадия инфильтрации в 60% случаев перешла в стадию эпителизации, в 40,0% язвенный дефект сформировался. В стадии изъязвления на 2 глазах сформировалось десцеметоцеле, не закончившееся ни в одном случае перфорацией глаза. В 33,3% случаев в фазах инфильтрации и изъязвления воспалительные изменения в виде инфильтрации, отёка стромы роговицы, эпителиопатии распространялись за зону нанесения первичного дефекта. Согласно проведённому статистическому анализу, в этой группе средний срок начала эпителизации составил  $3,35 \pm 1,42$  суток, срок формирования полной фасетки –  $7,1 \pm 2,34$  суток, полной эпителизации –  $16,5 \pm 3,27$  суток. При применении лактоферрина в концентрации 5 мг/мл наблюдалась гиперплазия эпителия в 44,4% случаев. В среднем с 6,3 суток ( $\pm 2,19$ ) начиналось формирование рубца. В результате репаративных процессов помутнения роговицы относились к средней степени (16,7%) и интенсивным (82,3%) (таблица 16, 17, рисунок 24).

Анализ процентного соотношения площади прокрашиваемого флюоресцеином дефекта к площади первично наносимого повреждения роговицы показал следующие результаты. Площадь прокрашиваемого дефекта на 3 сутки патологии у животных этой группы составила  $21,0 \pm 1,5\%$ . На 7 сутки площадь дефекта была максимальной, увеличившись на  $93,8\%$  относительно 3 суток, и составляла  $40,7 \pm 1,4\%$ . На 14 сутки площадь дефекта уменьшилась относительно 7 суток на  $67,8\%$  и равнялась  $13,1 \pm 1,2\%$ , тогда как на 21 сутки дефект уменьшился относительно 7 суток на  $79,8\%$  и составлял  $8,2 \pm 0,7\%$ .

Использование лактоферрина (концентрация 5 мг/мл) сопровождалось уменьшением площади дефекта роговицы на 3 сутки гнойной язвы на  $59,5\%$  ( $p < 0,05$ ), на 7 сутки – на  $57,9\%$  ( $p < 0,05$ ), на 14 сутки – на  $83,2\%$  ( $p < 0,05$ ), на 21 сутки – на  $55,9\%$  ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями животных контрольной группы (гнойная язва без лечения).

Применение лактоферрина снижало площадь дефекта роговицы по сравнению с животными, получавшими ципрофлоксацин, на 3 сутки – на  $58,2\%$  ( $p < 0,05$ ), на 7 сутки – на  $50,5\%$ , ( $p < 0,05$ ), на 14 сутки – на  $76,5\%$  ( $p < 0,05$ ) соответственно.

На фоне лечения комбинацией лактоферрина в концентрации 0,5 мг/мл и ципрофлоксацина стадия инфильтрации в 70% случаев перешла в стадию эпителизации, в 30,0% случаев язвенный дефект сформировался. В стадии изъязвления на 3 глазах сформировалось десцеметоцеле, не закончившееся ни в одном случае перфорацией роговицы. В 6,67% случаев в фазах инфильтрации и изъязвления воспалительные изменения в виде инфильтрации, отёка стромы роговицы, эпителиопатии распространялись за зону первичного дефекта. Согласно проведённому статистическому анализу, в этой группе средний срок начала эпителизации составил  $3,35 \pm 1,35$  суток, срок формирования полной фасетки –  $4,6 \pm 1,33$  суток, полной эпителизации –  $7,8 \pm 2,12$  суток. При применении комбинации лактоферрина и ципрофлоксацина гиперплазии эпителия отмечено не было. В среднем с

16,2±2,76 суток начиналось формирование рубца. В результате репаративных процессов в 16,7% случаев сформировалось облаковидное помутнение, в 16,7% случаев – помутнение средней интенсивности и в 66,6% случаев – интенсивное помутнение (таблицы 16, 17, рисунок 24).

Анализ процентного соотношения площади прокрашиваемого флюоресцеином дефекта к площади первично наносимого повреждения роговицы показал следующие результаты. Площадь прокрашиваемого дефекта на 3 сутки патологии у животных этой группы составила 47,1±2,3%. При комбинированном лечении к 7 суткам площадь дефекта достоверно уменьшилась на 33,3% относительно 3 суток и составляла 31,4±1,4% ( $p<0,05$ ). На 14 сутки площадь дефекта уменьшилась относительно 3 суток на 72,6% и составляла 12,9±1,6% ( $p<0,05$ ), тогда как на 21 сутки дефект уменьшился относительно 3 суток на 87,7% и составлял 5,8±0,9% ( $p<0,05$ ).

Использование комбинации лактоферрина и ципрофлоксацина (концентрация 0,5 мг/мл) сопровождалось уменьшением площади дефекта роговицы на 7 сутки гнойной язвы – на 65,2% ( $p<0,05$ ), на 14 сутки – на 83,5% ( $p<0,05$ ), на 21 сутки – на 68,8% ( $p<0,05$ ) по сравнению с показателями животных контрольной группы (гнойная язва без лечения).

Применение комбинации лактоферрина и ципрофлоксацина снижало площадь дефекта роговицы по сравнению с животными, получавшими один ципрофлоксацин на 7 сутки – на 61,8% ( $p<0,05$ ), на 14 сутки – на 76,9% ( $p<0,05$ ) соответственно.

На фоне лечения комбинацией лактоферрина в концентрации 0,5 мг/мл и ципрофлоксацина с последующей отменой лактоферрина после полной эпителизации дна язвы, стадия инфильтрации в 66,7% случаев перешла в стадию эпителизации, в 33,3% случаев язвенный дефект сформировался. В стадии изъязвления на 4 глазах сформировалось десцеметоцеле, не закончившееся ни в одном случае перфорацией роговицы. В 6,67% случаев в фазах инфильтрации и изъязвления воспалительные изменения в виде инфильтрации, отёка стромы роговицы, эпителиопатии распространялись за

зону нанесения первичного дефекта. Средний срок начала эпителизации составил  $3,35 \pm 0,99$  суток, срок формирования полной фасетки –  $4,7 \pm 1,49$  суток, полной эпителизации –  $7,8 \pm 1,58$  суток. В этой группе гиперплазии эпителия отмечено не было. В среднем с  $16,2 \pm 2,76$  суток начиналось формирование рубца. В результате репаративных процессов в 33,3% случаев значимое помутнение роговицы отсутствовало, в 33,3% случаев сформировалось облаковидное помутнение, в 33,3% случаев – помутнение средней интенсивности. Ни в одном случае выраженного помутнения роговицы не было (таблицы 16, 17, рисунок 24).

Использование комбинации лактоферрина (концентрация 0,5 мг/мл) и ципрофлоксацина в течение 14 дней сопровождалось уменьшением площади дефекта роговицы на 7 сутки гнойной язвы – на 68,0% ( $p < 0,05$ ), на 14 сутки – на 87,7% ( $p < 0,05$ ), на 21 сутки – на 92,5% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями животных контрольной группы (гнойная язва без лечения).

Применение комбинации лактоферрина и ципрофлоксацина в течение 14 дней снижало площадь дефекта роговицы по сравнению с животными, получавшими один ципрофлоксацин на 7 сутки – на 62,4% ( $p < 0,05$ ), на 14 сутки – на 82,8% ( $p < 0,05$ ), на 21 сутки – на 83,3% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Таким образом, применение лактоферрина в концентрациях 0,5 мг/мл, 1,5 мг/мл, 2,5 мг/мл и 5 мг/мл для лечения экспериментальной гнойной язвы роговицы дозозависимо ускоряет заживление, предотвращает развитие осложнений (десцеметоцеле, перфорация), однако, в то же время усиливает помутнение роговицы в конце репарации. При использовании комбинации ципрофлоксацина и лактоферрина в концентрации 0,5 мг/мл ускоряется заживление роговицы по сравнению с изолированным применением фторхинолона, но наравне с этим усиливается и ее помутнение. Оптимальные результаты (ускорение заживление роговицы, предотвращение развития осложнений и при этом отсутствие интенсивного помутнения) дает комбинированная терапия ципрофлоксацином и лактоферрином в концентрации 0,5 мг/мл день при приеме последнего в течение 14 дней, то

есть до момента окончания формирования полноценного слоя эпителия на дне язвы.

При оценке гистологической картины роговицы при изучаемой патологии были получены следующие результаты.

На 1 сутки экспериментальной гнойной язвы наблюдалась следующая гистологическая картина. В зоне язвенного дефекта эпителий отсутствовал, в прилегающей зоне был истончен, с дегенеративными изменениями. Основное вещество роговицы (stroma) выглядело разволокненным за счет отека, определялась умеренно выраженная преимущественно нейтрофильно-клеточная воспалительная инфильтрация. Морфологическая картина соответствовала альтеративному и экссудативному воспалению (рисунок 25).

К 3 суткам наблюдались очаги эпителиальной пролиферации с количеством слоев эпителия от 1 до 4, выраженная дистрофия, большое количество групп дистрофичных эпителиальных клеток, вмурованных в собственное вещество. Основное вещество роговицы резко отечно. Помимо этого, наблюдалась выраженная воспалительная инфильтрация с преобладанием клеток лимфоцитарного ряда (в том числе, плазмоцитов) в области лимба. Сосуды радужки и реснитчатых отростков были полнокровны.

На 5 сутки патологии усиливалась эпителиальная пролиферация, количество слоев многослойного плоского эпителия варьировало от 3 до 15, так же, как и усиливалась лейкоцитарная инфильтрация. Встречались группы дистрофичных эпителиальных клеток, вмурованных в собственное вещество. Сохранялся отек стромы, разволокнение ее основного вещества.

7 сутки эксперимента характеризовались развитием пролиферативных изменений, формированием акантотических тяжей. Строма роговицы была разволокнена с умеренно выраженной нейтрофильной инфильтрацией в перифокальной зоне и более выраженной в оптической и лимбальной зонах. Количество слоев клеток многослойного плоского эпителия варьировало от 3

до 9-10, часть клеток находилась в состоянии дистрофии и дисплазии. Гистологическая картина соответствовала началу стадии пролиферации.

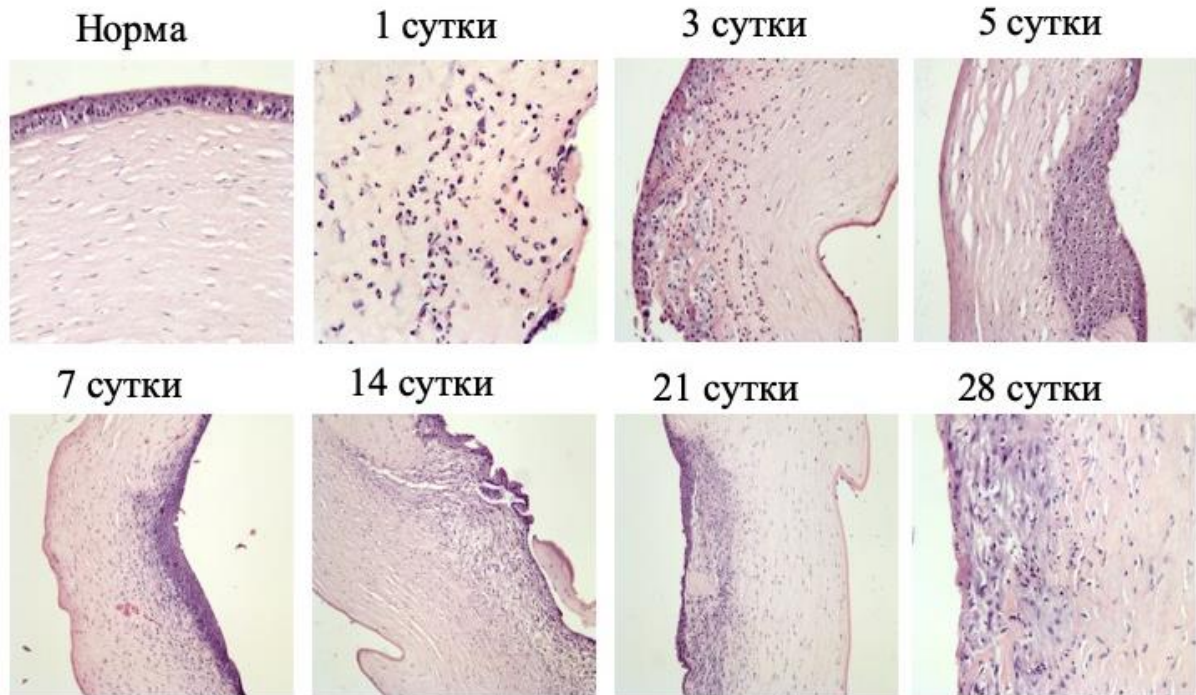


Рисунок 25 – Гистологическое строение роговицы при экспериментальной гнойной язве группы без лечения. Окраска гематоксилином и эозином (объектив  $\times 10$ )

На 14 сутки патологии происходило дальнейшее развитие репаративных процессов роговицы. Поверхностный эпителий роговицы включал в себя до 7 слоев, часть клеток находились в состоянии дистрофии и дисплазии. Воспалительная инфильтрация определялась на всем протяжении (более густая в области лимба и в поверхностных слоях роговицы). Основное вещество роговицы (строма) в зоне воспалительного очага было представлено рыхлой волокнистой неоформленной соединительной тканью, на остальном протяжении определялись зрелые сформированные волокна.

21 сутки язвы характеризовались разрастанием соединительной ткани, пролиферацией эпителия (количество слоев эпителия колебалось в области 5-7, ряд клеток находился в состоянии дисплазии и дистрофии). В строме отмечалась инфильтрация фибробластами и единичными лейкоцитами.

На 28 сутки эксперимента гистологическое строение роговицы характеризовалось явлениями фиброза и неоваскуляризации. На большом протяжении поверхность роговицы была эпителизирована, при этом в передней части имелись участки без эпителиальной выстилки и участки утолщения эпителия за счет пролиферации базальных клеток и появления многослойности. Основное вещество роговицы было представлено волокнистой соединительной тканью с явлениями набухания волокон в большей степени в поверхностных слоях.

На 1 сутки гнойной язвы при применении ципрофлоксацина наблюдалось отсутствие многослойного плоского неороговевающего эпителия в зоне язвенного дефекта, отек стромы, и ее инфильтрация полиморфноядерными лейкоцитами. Морфологическая картина соответствовала альтеративному и экссудативному воспалению (рисунок 26).

Третьи сутки характеризовались выраженной гранулоцитарной инфильтрацией поверхностного слоя собственного вещества роговицы, непосредственно подлежащего под поверхностным эпителием роговицы. На отдельных участках количество слоев многослойного плоского эпителия было увеличено до 9-10. Встречались также участки с уменьшенным количеством слоев эпителия до 1-2 слоев. Отмечался отек основного вещества роговицы. На 7-14 сутки отмечалась эпителизация роговицы с количеством слоев от 1 до 6, выраженность инфильтрации и отека стромы продолжала постепенно уменьшаться. 21-28 сутки язвы характеризовались увеличением объёма соединительной ткани, пролиферацией эпителия (количество слоев эпителия колебалось в области 3-4). В строме отмечалась инфильтрация единичными фибробластами и лейкоцитами (только на 21 сутки) (рисунок 26).

Морфологическая картина роговицы на 1 сутки патологии при применении лактоферрина в концентрации 0,5 мг/мл характеризовалась наличием участка отслаивания переднего эпителия, отеком и лейкоцитарной инфильтрацией собственного вещества роговицы. Морфологическая картина



имела признаки альтеративного и экссудативного воспаления (рисунок 27). На 3 сутки патологии по ходу роговицы на отдельных участках количество слоев многослойного плоского эпителия было увеличено до 9-10, на других участках снижено до 1-2. Отмечалась выраженная гранулоцитарная инфильтрация поверхностного слоя собственного вещества роговицы, непосредственно подлежащего под эпителием, отек стромы. На 5 сутки патологии в эпителии отмечались признаки гидропической дистрофии (с образованием в цитоплазме вакуолей), дисплазии. Также обращали на себя внимание группы эпителиальных клеток «вмуранных» в поверхностные слои собственного вещества роговицы. Количество слоев эпителия колебалось от 2 до 7. Сохранялись инфильтрация гранулоцитов, участки скопления гранулоцитов под эпителием, отек и разволокнение стромы. 7 сутки гнойной язвы роговицы характеризовались наличием эпителия толщиной 3-6 слоев, который в ряде участков отходил от боуменовой мембраны. В строме наблюдались единичные лейкоциты и фибробласты. Морфологическая картина соответствовала регенерации участка эпителия роговицы. На 14 сутки эксперимента по ходу роговицы передний эпителий был не нарушен и представлен преимущественно 4-5 слоями клеток, в подлежащем соединительнотканном собственном веществе роговицы обнаруживались участки разрыхления волокон и пролиферации клеток фибробластического ряда, расположение которых было весьма хаотично. На 21 сутки исследования на передней поверхности роговицы обнаруживался участок эпителия в виде крупного клеточного пролиферата, состоящий из хаотично расположенных эпителиальных клеток (более 8 слоев), который с одной стороны вдавался в собственное вещество роговицы, а с другой, наружной стороны, выбухал над эпителиальным слоем обычной толщины. В других участках роговицы обнаруживался эпителий с 2-6 слоями клеток. Морфологическая картина отражала эпителий роговицы с нарушенной (хаотичной) репаративной регенерацией (рисунок 27).

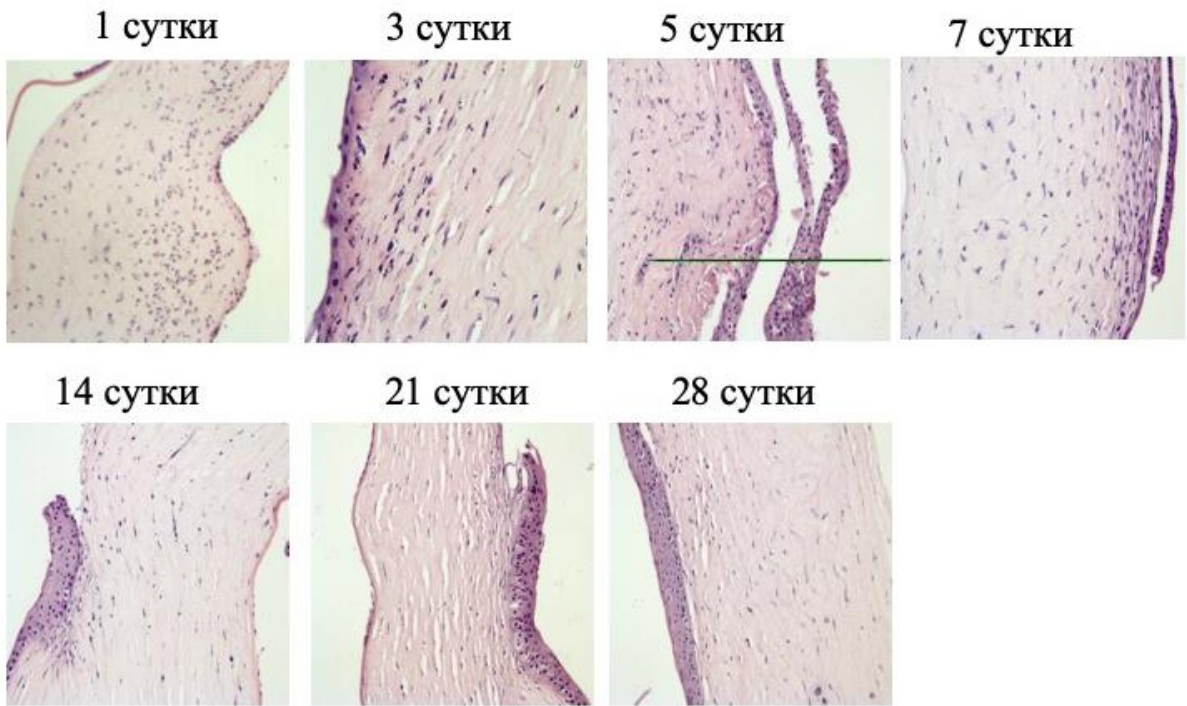


Рисунок 26 – Гистологическое строение роговицы при экспериментальной гнойной язве группы лечения ципрофлоксацином.

Окраска гематоксилином и эозином. (объектив  $\times 10$ )

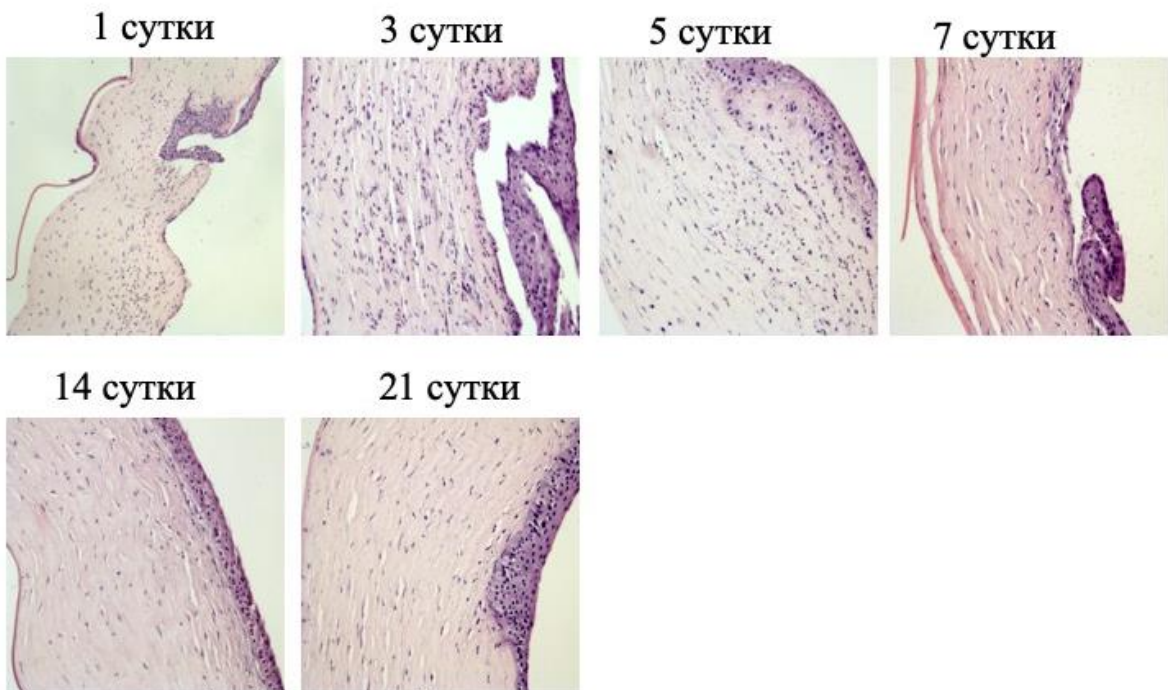


Рисунок 27 – Гистологическое строение роговицы при экспериментальной гнойной язве группы лечения лактоферрином в концентрации 0,5 мг/мл. Окраска гематоксилином и эозином. (объектив  $\times 10$ )

При гистологическом исследовании роговицы на 1 сутки применения лактоферрина в концентрации 1,5 мг/мл обнаруживались участки отрыва (отслаивания) переднего эпителия (многослойного плоского неороговевающего), фибрин и лейкоцитарный инфильтрат на поверхности собственного вещества роговицы, состоящего из коллагеновых волокон и фиброцитов между ними, отек, лейкоцитарная инфильтрация собственного вещества роговицы. В области перехода роговицы в склеру (лимб) отмечался отек, лейкоцитарный вал, детрит. Морфологическая картина имела признаки альтеративного и экссудативного воспаления. На 3 сутки патологии по ходу роговицы обнаруживались участки разной морфологической структуры. Наряду с участками некоторого утолщения эпителия роговицы до 6-8 слоев за счет увеличения числа слоев базальных клеток до 2-3-х слоев, несколько вдающихся в собственное вещество роговицы, обнаруживался участок отрыва поверхностных клеток эпителия, под которым в собственном веществе роговицы – отек, бесструктурные массы и лейкоцитарная инфильтрация. В собственном веществе области лимба наблюдалась выраженная лейкоцитарная реакция.

Морфологическая картина отражала сочетание ранних стадий воспаления (альтерации и экссудации) с более поздней продуктивной стадией воспаления – пролиферацией (регенерацией эпителия роговицы). На 5 сутки эксперимента по ходу роговицы среди участков нормального эпителия (3-5 слоев клеток) обнаруживались участки тонкого эпителия, состоящие из 1-го слоя базальных клеток и 1-го слоя поверхностных клеток. Вблизи лимба в собственном веществе конъюнктивы обнаруживалась лейкоцитарная инфильтрация. Морфологическая картина отражала торможение пролиферации эпителиальных клеток роговицы, а также признаки воспаления в конъюнктиве. 7 сутки гнойной язвы роговицы характеризовались наличием на достаточно большом протяжении утолщенного участка за счет увеличения слоев (до 6-8) как базальных клеток, так и других клеток, располагавшихся выше. В области лимба

воспалительная инфильтрация отсутствовала. На 14 сутки исследования по ходу роговицы обнаруживались участки эпителия в виде крупного клеточного пролиферата, состоящего из хаотично расположенных базальных, шиповатых и плоских эпителиальных клеток (более 15 слоев), которые с одной стороны вдавались в собственное вещество роговицы, а с другой, наружной стороны, выбухали над эпителиальным слоем обычной толщины. Морфологическая картина отражала эпителий роговицы с нарушенной (хаотичной) репаративной регенерацией.

Гистологическая картина роговицы на 1 сутки применения лактоферрина в концентрации 2,5 мг/мл на фоне язвы роговицы характеризовалась наличием участка отрыва (отслаивания) переднего многослойного эпителия роговицы, набуханием, отеком и лейкоцитарной инфильтрацией собственного вещества роговицы. В области лимба отмечалась незначительная лейкоцитарная инфильтрация. Морфологическая картина имела признаки альтеративного и экссудативного воспаления. На 3 сутки экспериментальной гнойной язвы роговицы обнаруживались участки разной морфологической структуры. Наряду с участками выраженного утолщения (более 8-10 слоев) эпителия роговицы за счет увеличения числа слоев базальных клеток до 4-5 слоев, сильно вдающихся в собственное вещество роговицы, обнаруживались участки деструкции и истончения эпителия роговицы. В собственном веществе роговицы – отек, диффузная неплотная лейкоцитарная инфильтрация. В собственном веществе лимба – выраженная плотная воспалительная лейкоцитарная инфильтрация. Морфологическая картина отражала сочетание ранних стадий воспаления (альтерации и экссудации) с продуктивной стадией воспаления – пролиферацией (регенерацией эпителия роговицы). На 5 сутки патологии выявлялись утолщенные участки эпителия роговицы за счет увеличения числа слоев (до 6-ти) как базальных, так и других эпителиальных клеток. Некоторые базальные клетки были с признаками вакуольной дистрофии. Воспалительные изменения не выражены. В области лимба наблюдалась

преимущественно макрофагальная инфильтрация. Морфологическая картина отражала очаги регенерации эпителия роговицы. На 7 сутки эксперимента по ходу роговицы передний эпителий был не нарушен и представлен преимущественно 4-5 (как обычно) слоями клеток, причем базальные клетки образовывали 1 слой. В подлежащем соединительно-тканном собственном веществе роговицы обнаруживались участки разрыхления волокон и пролиферации клеток фибробластического ряда, расположение которых было весьма хаотично. В области лимба воспалительная инфильтрация отсутствовала. Морфологическая картина регенерации эпителия роговицы соответствовала продуктивному воспалению. 14 сутки исследования характеризовались наличием крупного и удлинённого клеточного пролиферата, состоящего более чем из 10 слоев, хаотично расположенных преимущественно базальных эпителиальных клеток, часть которых имела признаки дифференцировки. Морфологическая картина регенерации эпителия роговицы.

На 1 сутки развития гнойной язвы роговицы при применении лактоферрина в концентрации 5 мг/мл по ходу роговицы обнаруживались участки отрыва и отслаивания многослойного плоского эпителия, состоящего из 3-4-5 слоев, ниже которых в собственном веществе роговицы отмечались набухание и разволокнение (отек) боуменовой мембраны и коллагеновых волокон, а также обнаруживалась неплотная лейкоцитарная инфильтрация. В собственном веществе в области лимба выраженная лейкоцитарная инфильтрация. В целом отмечалась морфологическая картина выраженных альтеративных и экссудативных воспалительных изменений. 3 сутки характеризовались наличием по ходу роговицы несколько утолщённого участка эпителия роговицы (до 5-6 слоев за счет увеличения числа слоев (до 2-х) базальных эпителиальных клеток), вдающегося в собственное вещество роговицы. Кроме того, рядом обнаруживался участок узкого эпителия роговицы, на поверхности которого локализовались сгустки слабо-эозинофильных бесструктурных масс. Морфологическая картина отражала

очаги регенерации эпителия роговицы и остаточные признаки экссудативного воспаления. На 5 сутки эксперимента по ходу роговицы обнаружены участки утолщения эпителия роговицы, состоящие из 7-8 и из 14 слоев эпителиальных клеток за счет увеличения числа как базальных, так и поверхностных клеток. В области лимба в собственном веществе отмечалась умеренная лейкоцитарная и макрофагальная инфильтрация. Морфологическая картина отражала очаги регенерации эпителия роговицы и признаки воспаления в области лимба. На 7 сутки исследования роговица на всем протяжении имела обычное строение, ее многослойный плоский эпителий имел 4-5 слоев клеток, базальные цилиндрические клетки составляли 1 слой, собственное вещество состояло из плотно расположенных коллагеновых волокон и редких фибробластов между ними. В области лимба воспалительная инфильтрация отсутствовала. Морфологических признаков повреждения или пролиферации эпителиальных клеток не обнаружено. На 14 сутки работы по ходу роговицы обнаруживались небольшие участки утолщения эпителия роговицы до 6-7 и 8-10 слоев эпителиальных клеток, за счет пролиферации базальных клеток (2-3 слоя). В области лимба воспалительная инфильтрация отсутствовала.

1 сутки патологии на фоне лечения комбинацией лактоферрина в концентрации 0,5 мг/мл и ципрофлоксацина характеризовались наличием участка отслаивания переднего многослойного эпителия роговицы, набуханием, отеком и лейкоцитарной инфильтрацией собственного вещества роговицы. Морфологическая картина имела признаки альтеративного и экссудативного воспаления. К 3 суткам наблюдались очаги эпителиальной пролиферации с количеством слоев эпителия от 3 до 15, признаки дистрофии, группы дистрофичных эпителиальных клеток, вмурованных в собственное вещество, субэпителиальная инфильтрация (преимущественно нейтрофильно-клеточная). На 5 сутки эксперимента по ходу роговицы встречались участки эпителия толщиной от 1 до 4 слоев клеток, инфильтрация стромы роговицы лейкоцитами. Морфологическая картина

отражала торможение пролиферации эпителиальных клеток роговицы. На 7-14 сутки исследования роговица на всем протяжении имела обычное строение, ее многослойный плоский эпителий имел 4-5 слоев клеток, собственное вещество состояло из плотно расположенных коллагеновых волокон и редких фибробластов между ними.

На 21 сутки наблюдалось утолщение эпителия роговицы до 7-10 слоев, часть клеток находилось в состоянии дистрофии и дисплазии. Увеличивалось количество стромы, преимущественно за счет увеличения соединительнотканых волокон. Отмечалось скопление фибробластов в субэпителиальной области (рисунок 28).

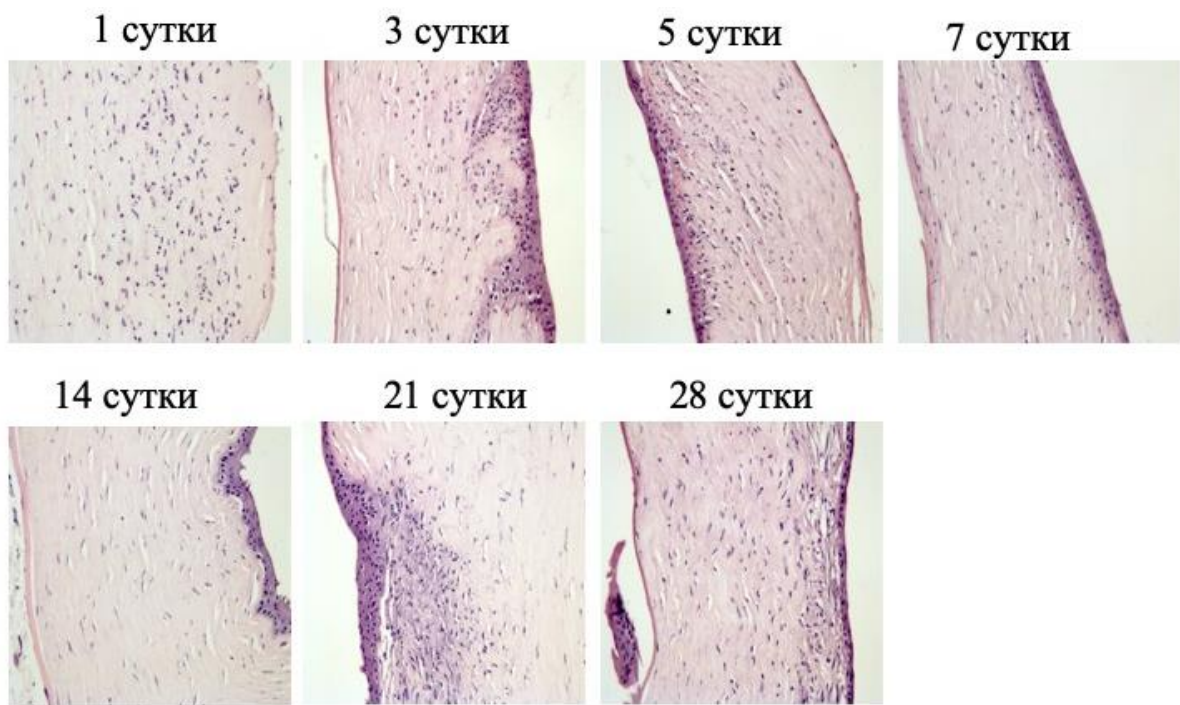


Рисунок 28 – Гистологическое строение роговицы при экспериментальной гнойной язве группы лечения комбинацией ципрофлоксацина и лактоферрина в концентрации 0,5 мг/мл. Окраска гематоксилином и эозином (объектив  $\times 10$ )

При лечении гнойной язвы роговицы комбинацией лактоферрина в концентрации 0,5 мг/мл и ципрофлоксацина, с последующей отменой лактоферрина после полной эпителизации были получены следующие результаты.

На 21-28 исследования роговица на всем протяжении имела обычное строение, ее многослойный плоский эпителий имел 4-6 слоев клеток, собственное вещество состояло из плотно расположенных коллагеновых волокон и редких фибробластов между ними (рисунок 29).

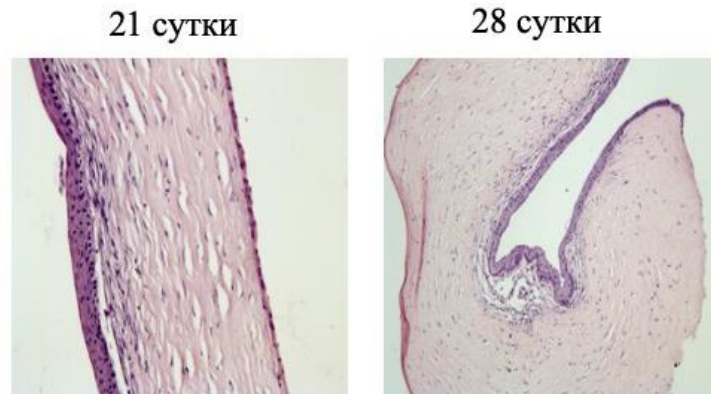


Рисунок 29 – Гистологическое строение роговицы при экспериментальной гнойной язве группы лечения комбинацией ципрофлоксацина и лактоферрина в концентрации 0,5 мг/мл в течение 14 суток. Окраска гематоксилином и эозином (объектив  $\times 10$ )

Таким образом, применение лактоферрина в концентрациях 0,5 мг/мл, 1,5 мг/мл, 2,5 мг/мл и 5 мг/мл для лечения экспериментальной гнойной язвы роговицы дозозависимо стимулирует регенерацию эпителия и образование соединительной ткани, при этом применение высоких доз 1,5 мг/мл, 2,5 мг/мл и 5 мг/мл сопровождается сочетанием морфологической картины ранних стадий воспаления (альтерации и экссудации) с более поздней продуктивной стадией – пролиферацией (регенерацией эпителия роговицы), что в конечном итоге приводит к задержке полной эпителизации дна дефекта. Применение лактоферрина во всех дозах после окончания фазы эпителизации приводит к образованию непрозрачной рубцовой ткани, интенсивность развития которой носит прямой дозозависимый характер.

Для комбинированного использования с ципрофлоксацином была выбрана концентрация лактоферрина 0,5 мг/мл (стимулирующая регенерацию эпителия, но не вызывающая его гиперплазию) и курс лечения 14 дней (до момента окончания формирования полноценного слоя эпителия



на дне язвы), что позволило ускорить регенерацию эпителия без чрезмерного разрастания соединительной ткани, как по сравнению с животными без лечения, так и по сравнению с кроликами, которым инстиллировали один ципрофлоксацин.

### **3.3. Биологические эффекты этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина при экспериментальном тромбозе сосудов сетчатки**

#### **3.3.1. Влияние этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина на выраженность окислительного стресса при экспериментальном тромбозе сосудов сетчатки**

Тромбоз сосудов сетчатки моделировали внутривенным введением фотосенсибилизатора бенгальского розового с последующим фокальным освещением белым светом височной сосудистой аркады в месте перегиба сосудов через край диска зрительного нерва [68].

Развитие экспериментального тромбоза сосудов сетчатки сопровождалось развитием окислительного стресса, что проявлялось следующими биохимическими изменениями (таблица 18). Концентрация МДА повышалась с первых суток патологии, достигала своего максимума на 3 сутки ишемии (на 41,1%,  $p < 0,05$  превышая показатели интактных животных), а затем постепенно снижалась и уже на 14 сутки достоверно от значений нормы не отличалась.

Уровень GSH снижался с 1 суток патологии и оставался пониженным вплоть до 14 дня эксперимента с минимальным значением также на 3 сутки патологии (на 17,6% ниже значений нормы,  $p < 0,05$ ).

Активность SOD снижалась через 6 ч после моделирования патологии на 25,3% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с интактными животными. Активность GPx уменьшалась через 6 часов на 8,1% ( $p < 0,05$ ), на 1 сутки – на 9,7% ( $p < 0,05$ ), на 3 сутки и 7 суток на 11,6% ( $p < 0,05$ ).

Активность GT снижалась через 6 ч после окклюзии на 27,9% ( $p < 0,05$ ), на 1 сутки – на 32,6% ( $p < 0,05$ ), на 3 сутки – на 23,3% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями интактных животных соответственно.

Таблица 18 – Выраженность окислительного стресса в сетчатке при экспериментальном тромбозе ее сосудов (медиана, верхний и нижний квантили)

Серии эксперимента	МДА, нмоль/мг белка	GSH, мкмоль/мг белка	SOD, ЕА/мг белка	Активность GPx, нмоль НАДФН/мин× мг белка	Активность GT, мкмоль ХДНБ/ мин× мг белка
Интактные кролики (норма)	10,45 (9,13; 11,25)	15,60 (14,53; 16,4)	3,75 (3,40; 4,05)	15,5 (15,2; 16,0)	0,43 (0,41; 0,46)
1 час	10,85 (10,35; 11,68)	15,75 (15,28; 16,73)	4,05 (3,43; 4,63)	16,15 (15,8; 16,3)	0,46 (0,39; 0,53)
3 часа	13,35 (12,43; 14,63)*	12,85 (12,05; 13,3)*	4,0 (3,8; 4,3)	14,5 (14,0; 14,8)	0,35 (0,32; 0,39)
6 часов	12,2 (11,48; 13,4)*	13,05 (12,13; 14,25)*	2,8 (2,5; 3,03)*	14,25 (13,8; 14,6)*	0,31 (0,26; 0,34)*
1 сутки	11,6 (11,05; 12,7)	13,55 (13,08; 14,65)*	3,1 (2,83; 3,35)	14,0 (13,2; 14,7)*	0,29 (0,21; 0,32)*
3 сутки	14,75 (14,09; 16,15)*	12,85 (11,13; 13,93)*	3,05 (2,78; 3,45)	13,7 (13,0; 14,5)*	0,33 (0,27; 0,36)*
7 сутки	13,45 (12,83; 15,08)*	13,2 (12,28; 14,45)*	4,1 (3,78; 4,53)	13,7 (13,0; 14,5)*	0,36 (0,25; 0,42)
14 сутки	11,8 (11,0; 12,25)	13,0 (12,2; 14,48)*	4,15 (3,90; 4,53)	14,65 (14,2; 15,3)	0,38 (0,35; 0,44)

\* -  $p < 0,05$  – достоверные различия по сравнению с показателями интактных животных

Таблица 19 – Выраженность окислительного стресса в сетчатке при введении пирацетама на фоне экспериментального тромбоза ее сосудов (медиана, верхний и нижний квартили)

Серии эксперимента	МДА, нмоль/мг белка	GSH, мкмоль/мг белка	SOD, ЕА/мг белка	Активность GPx, нмоль НАДФН/мин× мг белка	Активность GT, мкмоль ХДНБ/ мин× мг белка
Интактные кролики (норма)	10,45 (9,13; 11,25)	15,60 (14,53; 16,4)	3,75 (3,40; 4,05)	15,5 (15,2; 16,0)	0,43 (0,41; 0,46)
1 час	11,19 (10,5; 13,1)	15,5 (14,1; 16,2)	3,6 (3,4; 4,4)	15,2 (14,3; 16,7)	0,45 (0,39; 0,53)
3 часа	12,6 (11,5; 13,3)	12,8 (11,8; 14,1)	4,0 (3,3; 4,7)	15,2 (14,1; 15,9)	0,42 (0,36; 0,49)
6 часов	13,05 (11,8; 13,9)	11,9 (10,9; 14,5)*	3,6 (3,0; 3,9)	13,8 (12,5; 15,3)	0,31 (0,28; 0,49)
1 сутки	13,9 (11,9; 14,9)*	12,9 (10,9; 15,2)	3,5 (3,0; 3,7)	13,4 (12,9; 14,4)*	0,33 (0,28; 0,38)*
3 сутки	14,4 (13,4; 15,5)*%	12,8 (11,8; 13,9)*	3,3 (2,8; 3,7)	13,7 (12,3; 14,6)*	0,27 (0,21; 0,36)*%
7 сутки	12,9 (11,9; 13,9)	12,2 (11,0; 13,4)*	3,4 (3,1; 4,3)	14,1 (13,7; 14,7)*	0,3 (0,19; 0,35)*%
14 сутки	11,3 (10,4; 12,5)	14,0 (13,5; 16,0)	3,9 (3,3; 4,1)	15,1 (14,2; 15,6)	0,35 (0,31; 0,45)

\* -  $p < 0,05$  – достоверные различия по сравнению с показателями интактных животных

# -  $p < 0,05$  – достоверные различия с показателями контрольных животных

% -  $p < 0,05$  – достоверные различия с показателями животных, получавших ноопепт

На фоне введения парацетама (препарата сравнения) концентрация МДА повышалась на 1 и 3 сутки эксперимента на 33,0% и 37,8% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями интактных животных (таблица 19).

Уровень GSH снижался через 6 ч – на 23,7% ( $p < 0,05$ ), на 3 сутки – на 17,9% ( $p < 0,05$ ), на 7 сутки – на 21,8% ( $p < 0,05$ ).

Активность SOD статистически значимо не отличалась от значений интактных кроликов. В то же время на 1, 3 и 7 сутки экспериментальной патологии происходило снижение активности GPx и GT – на 13,5%, 11,6% и 9,0% ( $p < 0,05$ ) и на 23,3%, 37,2% и 30,2% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

При сравнении показателей свободнорадикального окисления в сетчатке после введения парацетама и после введения воды достоверных различий между изучаемыми показателями получено не было (таблица 19).

На фоне введения ноопепта концентрация МДА достоверно повышалась только на 1 сутки эксперимента на 22,5% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями интактных животных. Концентрация GSH снижалась через 3 ч и на 1 сутки – на 12,2% и 16,0% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Активность SOD снижалась на 1 сутки патологии на 20,0% ( $p < 0,05$ ), активность GPx – через 6 ч и на 1 сутки – на 16,5% и 10,6% ( $p < 0,05$ ) соответственно, а активность GT – только через 6 ч – на 20,9% ( $p < 0,05$ ) (таблица 20).

Таблица 20 – Выраженность окислительного стресса в сетчатке при введении ноопепта на фоне экспериментального тромбоза ее сосудов (медиана, верхний и нижний квартили)

Серии эксперимента	МДА, нмоль/мг белка	GSH, мкмоль/мг белка	SOD, ЕА/мг белка	Активность GPx, нмоль НАДФН/мин× мг белка	Активность GT, мкмоль ХДНБ/ мин× мг белка
Интактные кролики (норма)	10,45 (9,13; 11,25)	15,60 (14,53; 16,4)	3,75 (3,40; 4,05)	15,5 (15,2; 16,0)	0,43 (0,41; 0,46)
1 час	11,4 (10,25; 11,4)	15,15 (14,0; 16,2)	3,85 (3,53; 4,08)	16,15 (15,7; 16,4)	0,43 (0,39; 0,42)
3 часа	13,1 (9,88; 13,83)	13,7 (12,95; 14,03)*	3,7 (3,23; 4,250)	15,2 (14,7; 15,9)	0,37 (0,35; 0,42)
6 часов	11,85 (10,33; 12,23)	13,5 (12,73; 14,58)	3,6 (2,73; 3,98)	12,95 (12,5; 13,9)*	0,34 (0,29; 0,38)*
1 сутки	12,8 (12,0; 14,03)*	13,1 (12,3; 13,6)*	3,0 (2,88; 3,23)*	13,85 (13,5; 14,5)*	0,39 (0,33; 0,55)#
3 сутки	12,2 (10,63; 13,2)#	13,15 (11,6; 14,55)	3,6 (3,05; 4,13)	14,3 (13,3; 15,4)	0,41 (0,34; 0,46)
7 сутки	11,45 (10,93; 13,23)#	14,15 (13,23; 14,75)	3,55 (3,03; 3,90)	14,9 (13,6; 15,3)	0,48 (0,39; 0,57)
14 сутки	11,85 (10,7; 13,15)	14,3 (12,9; 16,45)	3,95 (3,8; 4,25)	15,25 (15,0; 15,32)	0,38 (0,35; 0,44)

\* -  $p < 0,05$  – достоверные различия по сравнению с показателями интактных животных

# -  $p < 0,05$  – достоверные различия с показателями контрольных животных

При сравнении показателей свободнорадикального статуса сетчатки ишемизированных животных, которым вводилась вода или ноопепт, были получены следующие результаты.

Концентрация МДА у животных, получавших ноопепт, была достоверно ниже показателей контрольных животных на 3 и 7 сутки на 17,3% и 14,9% ( $p < 0,05$ ) соответственно, а активность GT на 1 сутки патологии превышала их на 34,5% ( $p < 0,05$ ). Уровень GSH, активность SOD и GPx достоверно у контрольных животных и животных, получавших ноопепт, не различались (таблица 20).

При сравнении свободнорадикального статуса сетчатки при тромбозе ее сосудов на фоне введения ноопепта и введения пираретама были получены следующие результаты. На 3 сутки патологии концентрация МДА на фоне применения ноопепта была ниже значений группы пираретама на 15,3% ( $p < 0,05$ ). Активность GT при введении ноопепта была выше показателей кроликов, получавших пираретам, на 3 и 7 сутки на 34,1% и 37,5% ( $p < 0,05$ ) соответственно. В то же время уровень GSH, активность SOD, GPx, достоверно между данными группами не различались.

Таким образом, применение ноопепта при тромбозе сосудов сетчатки снижает выраженность окислительного стресса, что проявляется в снижении концентрации МДА и повышении активности GT.

### **3.3.2. Влияние этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина на концентрацию нейромедиаторов в сетчатке при экспериментальном тромбозе ее сосудов**

При оценке содержания аминокислот в сетчатке при экспериментальном тромбозе ее сосудов были получены следующие результаты (таблица 21).

Таблица 21 – Содержание аминокислот в сетчатке при экспериментальном тромбозе ее сосудов, мкмоль/г ткани  
(медиана, верхний и нижний квартили)

Серии эксперимента	Asp	Glu	Gly	Tau	GABA
Интактные кролики (норма)	0,30 (0,25; 1,26)	3,55 (3,44; 5,93)	1,92 (1,87; 2,75)	60,88 (56,0; 90,7)	1,18 (0,80; 1,48)
6 часов	0,21 (0,15; 0,38)	2,14 (1,72; 2,37)*	1,08 (0,85; 1,19)*	21,97 (16,05; 23,97)*	0,82 (0,55; 0,97)
12 часов	0,20 (0,11; 0,25)	2,41 (1,83; 2,84)*	1,57 (0,97; 2,07)	24,62 (17,45; 26,04)*	0,88 (0,75; 1,15)
1 сутки	17,05 (0,69; 17,74)	16,91 (4,09; 16,91)	16,67 (1,98; 15,53)	17,74 (16,26; 30,43)*	16,12 (2,21; 17,32)*
3 сутки	1,05 (0,83; 4,82)	5,00 (4,40; 25,14)	1,78 (1,64; 5,24)	49,17 (45,05; 108,69)	2,05 (1,76; 7,25)
5-7 сутки	3,88 (1,38; 6,44)*	36,15 (9,44; 44,15)*	6,91 (3,27; 8,85)*	123,64 (65,20; 142,94)	10,76 (3,15; 13,24)*
14 сутки	3,16 (0,64; 4,35)	30,65 (6,18; 33,17)**	4,15 (2,29; 7,51)	99,13 (61,0; 147,95)	5,85 (2,05; 11,55)*

\* -  $p < 0,05$  – достоверные различия по сравнению с показателями интактных животных

Таблица 22 – Содержание аминокислот в сетчатке при введении ноопепта на фоне экспериментального тромбоза ее сосудов, мкмоль/г ткани (медиана, верхний и нижний квартили)

Серии эксперимента	Asp	Glu	Gly	Tau	GABA
Интактные кролики (норма)	0,30 (0,25; 1,26)	3,55 (3,44; 5,93)	1,92 (1,87; 2,75)	60,88 (56,0; 90,7)	1,18 (0,80; 1,48)
6 часов	0,30 (0,12; 0,34)	3,74 (3,32; 4,82)#	2,46 (2,18; 2,78)#	27,33 (20,73; 28,49)*	1,32 (0,97; 1,71)#
12 часов	0,18 (0,13; 0,33)	3,55 (3,29; 4,29)#	3,06 (2,53; 3,55)#	22,97 (22,04; 26,67)*	1,34 (1,16; 1,81)#
1 сутки	0,22 (0,17; 0,34)#	3,86 (3,57; 4,63)#	2,58 (2,32; 2,82)	24,31 (21,08; 27,89)*	1,20 (0,89; 1,37)#
3 сутки	0,27 (0,19; 0,31)#	4,98 (4,47; 5,77)	2,94 (2,65; 3,16)	22,95 (21,23; 24,32)*#	1,35 (1,22; 1,60)#
5-7 сутки	0,49 (0,37; 0,62)#	4,78 (3,99; 5,06)#	2,52 (2,03; 2,64)#	21,15 (18,65; 24,60)*#	1,41 (1,19; 1,57)#
14 сутки	0,61 (0,48; 0,69)#	4,88 (3,94; 6,09)#	2,19 (1,81; 2,65)#	26,70 (22,06; 34,08)*#	1,71 (1,22; 2,27)#

\* -  $p < 0,05$  – достоверные различия по сравнению с показателями интактных животных

# -  $p < 0,05$  – достоверные различия по сравнению с показателями группы контроля патологии



В серии ишемизированных нелеченых кроликов через 6 и 12 часов после моделирования патологии отмечалось снижение уровня Glu на 39,7% и 32,1% ( $p < 0,05$ ) соответственно по сравнению с показателями интактных животных. В последующем (на 5–7 и 14 сутки) развивалось резкое (на 918,3% и 763,4%,  $p < 0,05$ ) нарастание концентрации глутамата в сетчатке.

Уровень Asp повышался только на 5-7 сутки на 282,2% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями интактных животных.

Концентрация Gly снижалась через 6 ч ишемии на 43,7% ( $p < 0,05$ ), нормализовывалась через 12 ч, 1 и 3 сутки, повышалась на 5-7 сутки на 259,9% ( $p < 0,05$ ) и вновь не отличалась от показателей интактных животных на 14 сутки.

Содержание Tau снижалось через 6 ч, 12 ч и 1 сутки ишемии на 63,9%, 59,6% и 70,9% ( $p < 0,05$ ) соответственно, а в остальные сроки эксперимента достоверно от значений нормы не отличалось.

Концентрация GABA повышалась на 1 сутки эксперимента на 1266,1% ( $p < 0,05$ ), на 5-7 сутки – на 811,9% ( $p < 0,05$ ) и на 14 сутки на – 395,8% ( $p < 0,05$ ).

У животных, которым вводился ноопепт, концентрации Glu, Asp, Gly и GABA в сетчатке нормализовались и статистически значимо не отличались от показателей интактных животных на протяжении всего эксперимента. В то же время содержание таурина снижалось на протяжении всего эксперимента (с 6 ч ишемии и до 14 сутки) с минимальным уровнем на 5-7 сутки (на 65,3% ниже значений интактных животных,  $p < 0,05$ ) (таблица 22).

При сравнении концентраций аминокислот в сетчатке после введения воды или ноопепта на фоне ишемии сетчатки были получены следующие результаты.

На 1, 3, 5-7 и 14-е сутки концентрация Asp в сетчатке животных, получавших ноопепт, была ниже показателей контрольных животных на 98,7%, 74,4%, 87,4% и 80,7% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Концентрация Glu у животных, которым вводили ноопепт, через 6 и 12 ч была выше значений кроликов, которым вводили вводу, на 74,8% ( $p < 0,05$ ) и 47,3% ( $p < 0,05$ ), а на 1, 5-7 и 14-е сутки была их ниже на 77,2%, 86,8% ( $p < 0,05$ ) и 84,1% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Уровень Gly в сетчатке на фоне введения ноопепта через 6 и 12 ч ишемии был выше значений контрольных кроликов на 127,8% и 94,9% ( $p < 0,05$ ) соответственно, а на 5-7 и 14-е сутки был их ниже на 63,5% и 47,2% ( $p < 0,05$ ).

На 3 сутки эксперимента содержание Tau в сетчатке животных при введении ноопепта было ниже значений контрольных кроликов на 53,3% ( $p < 0,05$ ), на 5-7 сутки – на 82,9% ( $p < 0,05$ ), на 14 сутки – 73,1% ( $p < 0,05$ ).

Концентрация GABA в сетчатке животных, получавших ноопепт, через 6 и 12 ч ишемии превышала показатели контроля на 60,9%, 52,8% ( $p < 0,05$ ) соответственно, а на 1, 3, 5-7 и 14-е сутки была их ниже на 92,6%, 34,1%, 86,9% и 70,8% ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, применение ноопепта при тромбозе сосудов сетчатки оказывает ретинопротекторное действие, что проявляется в нормализации концентрации Glu, Asp, Gly и GABA в сетчатке.

### **3.3.3. Влияние этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина на клиническую и патоморфологическую картину экспериментального тромбоза сосудов сетчатки**

Строение сетчатки кролика имеет сходные черты, но и различия со строением сетчатки человека. В обоих случаях чётко выделяются ретикулярный пигментный эпителий, слой фоторецепторов, наружный ядерный, наружный плексиформный, внутренний ядерный, внутренний плексиформный слои, количество ганглиозных клеток существенно меньше, чем у человека, тогда как аксоны ганглиозных клеток частично имеют миелиновую оболочку и чётко визуализируются при офтальмоскопии в виде белесоватых перьевидных образований с назальной и темпоральной сторон от диска зрительного нерва вплоть до экваториальной зоны. У кролика нет

макулы, относительно небольшое количество колбочек, иная степень восприятия цветов. Диск зрительного нерва имеет глубокую экскавацию, чёткие границы. Диск формируется путем консолидации двух пучков миелинизированных нервных волокон. Через края диска перегибаются две (темпоральная и назальная) ветви центральной артерии и центральной вены сетчатки, которые соответственно формируют две аркады, идущие по поверхности слоя миелинизированных нервных волокон. Гистологическое строение сетчатки здорового кролика представлено на рисунке 30: хорошо прослеживаются все слои сетчатой оболочки, особенно слой нервных утолщенных (миелинизированных) волокон. Ретинальные сосуды проходимы, содержат разрозненные форменные элементы крови.

Офтальмоскопически через 1 час после визуального подтверждения формирования модели (окклюзии темпоральной артериальной аркады с прекращением кровотока) наблюдали отсутствие кровотока дистальнее окклюзии в артериальном русле, побледнение сетчатки, единичные преретинальные микрогеморрагии проксимальнее окклюдированного участка, незначительную проминенцию пучка миелиновых волокон в зоне кровоснабжения поражённой артерии. Крупные вены извиты, калибр неравномерный, венулы штопорообразно извиты.

Изменения активно прогрессировали – к концу первых суток артериальное русло ниже окклюзии не визуализировалось, кровоизлияния несколько увеличились, приобретая форму небольших штрихов, появился секторальный отёк диска зрительного нерва, сетчатка приобрела молочный оттенок, проминенция пучка миелиновых волокон увеличилась, отмечался умеренный венозный стаз, картина изменений венозного русла оставалась визуально прежней. Гистологически наблюдался тромбоз ретинальных сосудов, кистовидные полости в слое нервных волокон, проминирование в слое нервных волокон. Чётко визуализировался отек в наружном плексиформном слое. Данная картина характерна для начальной ишемии в зоне ответственности ретинального кровотока (рисунок 31).

На 3 сутки изменения касались незначительно нарастающего отёка сетчатки, увеличилась проминенция слоя миелиновых волокон, у всех животных появились признаки частичной магистральной реканализации артериального русла в виде появления кровотока на пике пульсового давления ниже зоны окклюзии. Изменения венозного русла оставались прежними, в 2 глазах несколько увеличились кровоизлияния.

К 7 суткам признаки магистральной реканализации увеличились, крупные артерии ниже зоны окклюзии визуализировались в виде тонких сосудистых русел в 95% экспериментальных глаз, артерии 1-2 порядка и артериолы не определялись. Секторальный отёк диска зрительного нерва, сетчатки и слоя миелиновых волокон сохранялся. Преретинальные кровоизлияния – в фазе рассасывания разных степеней. Магистральные вены оставались полнокровными с признаками стаза в венах 1-2 порядков, извитыми, неравномерного диаметра. Часть капилляров находилась в спавшемся состоянии и была выключена из кровотока.

Тем не менее, наблюдались признаки частичного восстановления ретинального кровотока при сохранении небольшого межклеточного отека в слое ганглиозных клеток. Отмечалось отчетливое разделение утолщенными отростками Мюллеровских клеток слоя нервных волокон на отдельные сегменты. На этом фоне можно было отметить появление отдельных нервных волокон с гиперхромноокрашенными, имеющими нечеткие границы, миелиновыми оболочками, что, на наш взгляд, является результатом постепенно и неравномерно развивающейся демиелинизации нервных волокон в условиях гемодинамической гипоксии. На периферии отмечалась частичная атрофия главным образом внутренних слоев сетчатки, субретинальный отек с фрагментарной потерей подлежащего ретинального пигментного эпителия (рисунок 32).

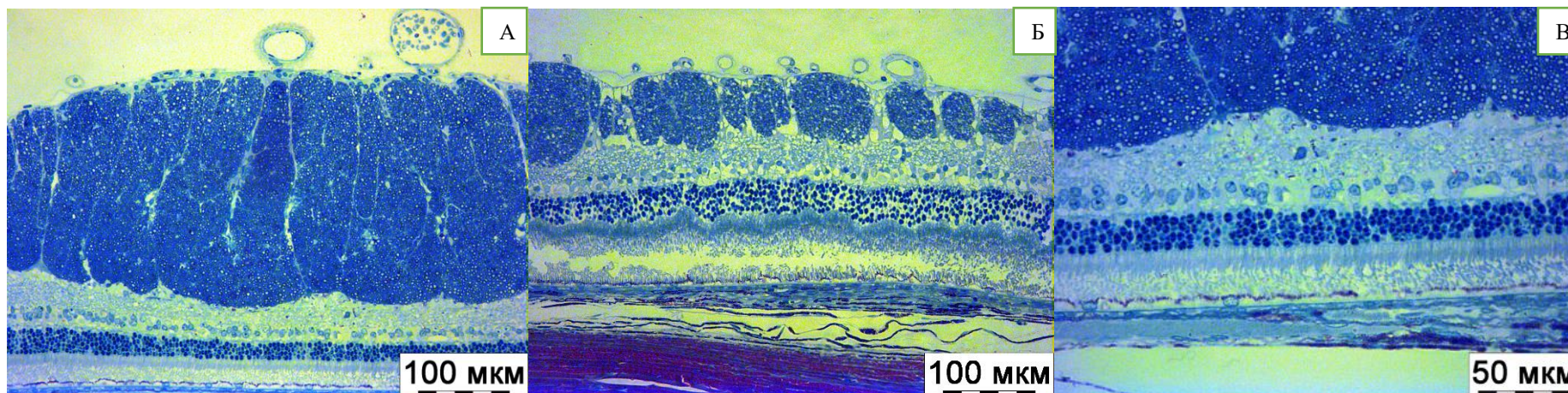


Рисунок 30 – Срез стенки глазного яблока здорового кролика в парацентральной области (А, В) и на периферии (Б).

Полутонкий срез. Полихромное окрашивание

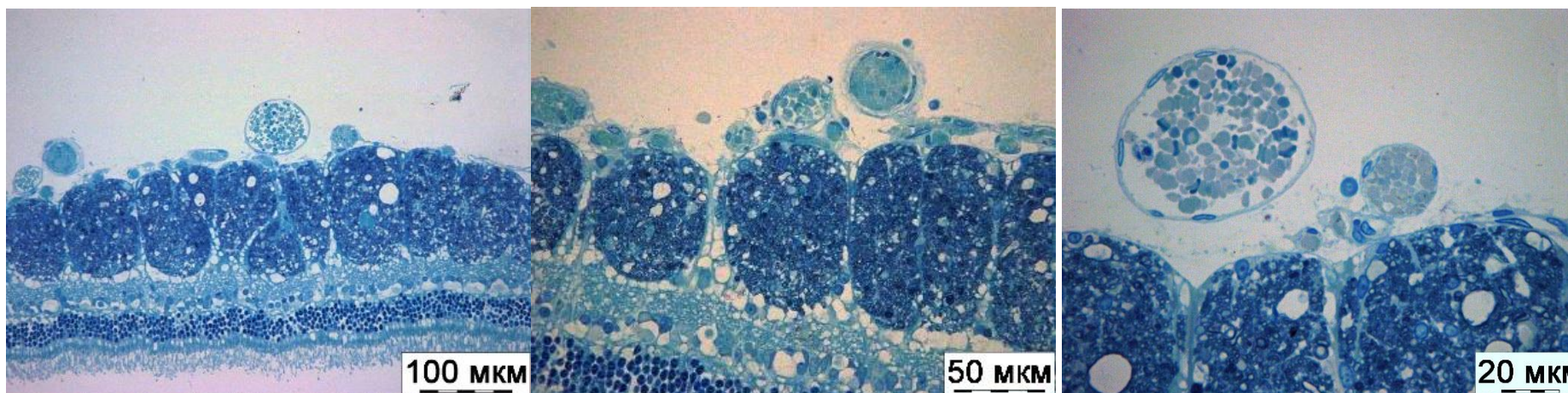


Рисунок 31 – Гистологическая картина сетчатки кролика на 1 сутки после моделирования тромбоза ретинальных сосудов группы без лечения. Полутонкий срез. Полихромное окрашивание

К 14 суткам признаки отёка диска зрительного нерва, сетчатки и слоя миелиновых волокон уменьшились, визуализировалось лишь секторальное побледнение диска зрительного нерва. Наблюдались признаки восстановления магистрального кровотока особенно со стороны назальных аркад. Однако артериолярные сосуды оставались сужеными и практически не визуализировались. Просвет магистральных вен был в сравнении с назальной аркадой незначительно шире, вены 1-2 порядков также имели более широкий просвет, визуализировались единичные венулы. В целом, четко прослеживалась тенденция к восстановлению проходимости сосудов и увеличению ретинальной перфузии. В этот срок обращало на себя внимание увеличение процессов демиелинизации (точечная гиперхромия) в слое нервных волокон, смазанность границ между ними. Наблюдался отек в обоих плексиформных слоях, в субретинальном пространстве и волнообразный контур ретинального пигментного эпителия (рисунок 33). Следует отметить, что к этому сроку рассасывались кровоизлияния во всех глазах.

К 28 суткам кроме секторального побледнения, других изменений со стороны диска зрительного нерва, который характеризовался чёткими границами, не отмечено. Проминенция слоя миелиновых волокон отсутствовала, их плотность была визуально меньше по сравнению с интактной зоной сетчатки. Просвет артерий и вен сохранялся без существенной динамики в сравнении с 14 сутками наблюдения. Постепенно становились проходимыми ретинальные сосуды мелкого калибра. Отмечено формирование ограниченного (до 2-3 диаметров диска зрительного нерва) хориоретинального очага с депигментированными участками. В ретинальном сосудистом русле менее выраженной была неравномерность диаметра и степень заполнения форменными элементами крови, хотя часть капиллярного русла оставалась редуцированной. Следствием перенесенной гипоксии сетчатки мы считаем разрастание глиальной ткани (отростков Мюллеровских клеток), разделяющей слой миелинизированных нервных волокон на сегменты.

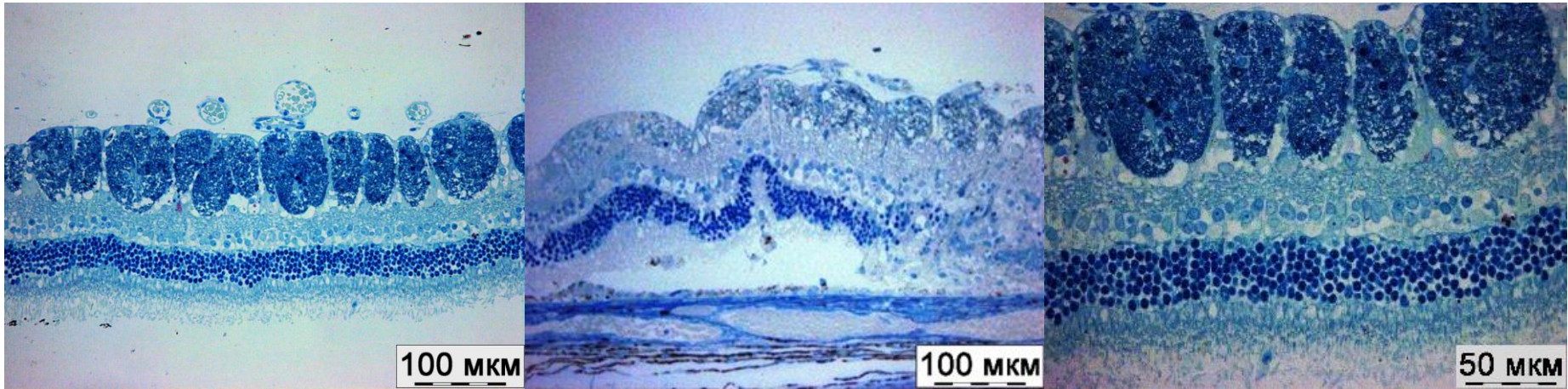


Рисунок 32 – Гистологическая картина сетчатки кролика на 7 сутки после моделирования тромбоза ретинальных сосудов группы без лечения. Полутонкий срез. Полихромное окрашивание

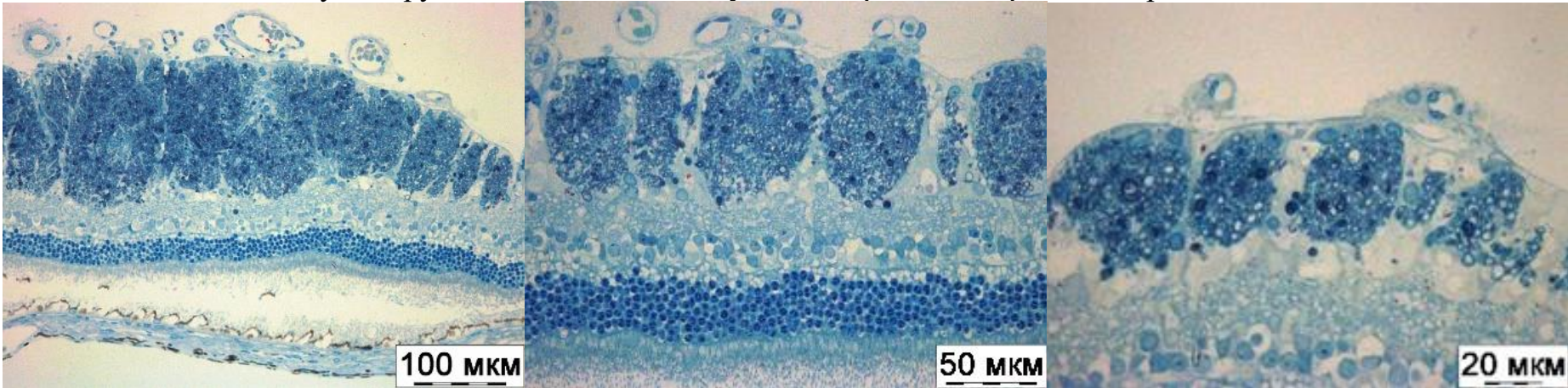


Рисунок 33 – Гистологическая картина сетчатки кролика на 14 сутки после моделирования тромбоза ретинальных сосудов группы без лечения. Полутонкий срез. Полихромное окрашивание

Наблюдалось увеличение нервных волокон с гиперхромными миелиновыми оболочками на фоне слабо окрашенных атрофирующихся волокон. В результате общая плотность нервных волокон в сравнении с предыдущим сроком наблюдения снижалась. Контурные нервных волокон становились нечеткими, размытыми, появлялись также микрокисты, нередко сливные, развивалась заместительная гипертрофия отростков Мюллеровских клеток, индуцирующей вертикальную сегментацию слоя нервных волокон. Отмечался отёк и слабое прокрашивание вторых и третьих нейронов, в меньшей степени – первых, получающих питание из хориокапиллярного слоя, что подтверждает модель окклюзии именных собственных сосудов сетчатки (рисунок 34).

К 84 суткам наблюдения развивалась секторальная атрофия диска зрительного нерва, уменьшалось количество миелиновых волокон в темпоральном пучке, сохранялась описанная разница сосудистого русла в интактной и патологической зонах сетчатки, наблюдался ограниченный участок (до 2-3 диаметров диска зрительного нерва) диспигментированной хориоидальной атрофии.

Артериальные ретинальные сосуды оставались суженными, в том числе за счет утолщения стенки (плазматическое пропитывание, перешедшее в гиалиноз). Помимо вертикальной сегментации слоя нервных волокон появлялась горизонтальная сегментация глиально-вазкулярной тканью, направленная на купирование ишемического состояния сетчатки на границе водораздела ретинального и хориокапиллярного кровотоков. Однако послойная структура наружных слоев сетчатки уже необратимо утрачена. На периферии сетчатки миелинизированные нервные волокна располагались в виде отдельных сегментов. Отсутствовали функционирующие ретинальные капилляры, что является наиболее вероятной причиной четко визуализируемой дегенерации оптической сетчатки и ее замещения пролиферирующей глиальной тканью (рисунок 35).



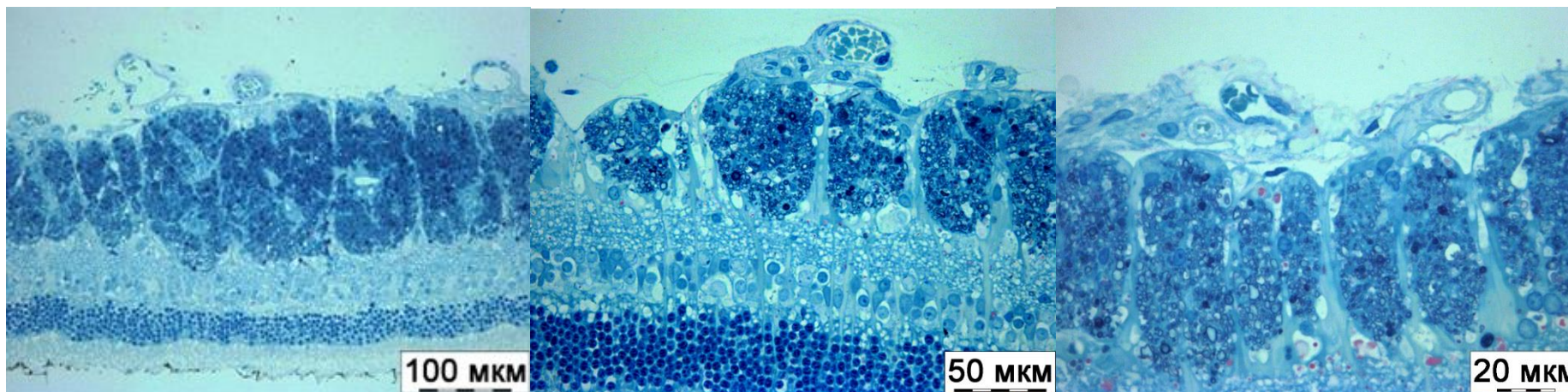


Рисунок 34 – Гистологическая картина сетчатки кролика на 28 сутки после моделирования тромбоза ретинальных сосудов группы без лечения. Полутонкий срез. Полихромное окрашивание

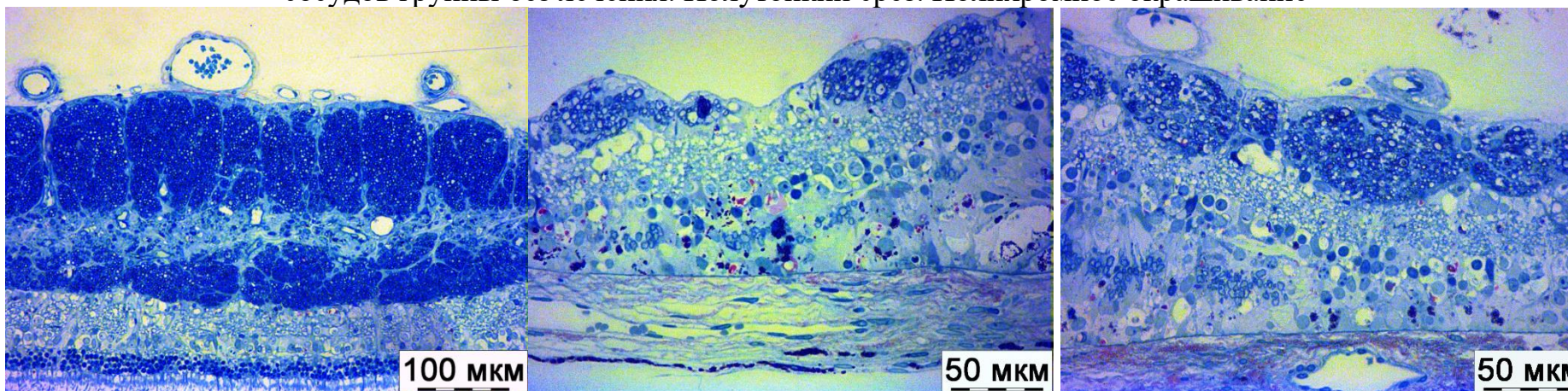


Рисунок 35 – Гистологическая картина сетчатки кролика на 84 сутки после моделирования тромбоза ретинальных сосудов группы без лечения. Полутонкий срез. Полихромное окрашивание

Офтальмоскопическая картина в 1 сутки на фоне лечения пирацетамом и ноопептом от группы контроля (без лечения) не отличалась.

К 3 суткам при сравнительной оценке на фоне применения пирацетама отмечалось активное рассасывание геморрагий у всех животных, сосудистое русло визуально было неотличимо от группы без лечения. На фоне применения ноопепта было отмечено появление кровотока в окклюдированных артериях в систолическую и диастолическую фазу в 25% экспериментальных глаз, вены визуально от группы контроля не отличались. Визуально достоверно отличить степень отёка заинтересованных структур глазного дна в сериях лечения и при его отсутствии не представлялось возможным на данный срок наблюдения.

На 7 сутки признаки магистральной реканализации на фоне лечения ноопептом были отмечены во всех экспериментальных зонах сетчатки, в 35% случаев визуализировались узкие артерии 1-2 порядка. Секторальный отёк диска зрительного нерва, сетчатки и слоя миелиновых волокон сохранялся, однако был заметно меньше, чем в серии без лечения. Преретинальные кровоизлияния – в фазе рассасывания разных степеней. На фоне применения пирацетама отмечалось полное рассасывание геморрагий у всех животных, сосудистое русло, изменения заинтересованных структур глазного дна визуально были похожи на таковые в серии без лечения. Гистологическая картина на фоне применения ноопепта представлена на рисунке 36. Наблюдалась небольшая констрикция артериол и дилатация венул, выявлялись отдельные непроходимые мелкие сосуды. Визуализировались отдельные кистовидные очаги (отек), появлялись гиперхромные точки в слое нервных волокон, что свидетельствует об ишемических изменениях. Отмечалась гипертрофия отростков Мюллеровских клеток. В сравнении с группой без лечения повреждения структур сетчатки выглядели менее выраженными и носили обратимый характер.

К 14 суткам во всех сериях лечения признаки отёка диска зрительного нерва, сетчатки, включая слой миелиновых нервных волокон, были заметно

меньше, чем в серии без лечения. Наблюдалось существенное восстановление кровотока по магистральным артериям, однако, в сравнении с назальной аркадой просвет оставался несколько уже. При применении исследуемых препаратов, в отличие от серии без лечения, артерии 1-2 порядка визуализировались в 72% (пирацетам) и 86% случаев (ноопепт). Просвет магистральных вен был в сравнении с назальной аркадой незначительно шире, вены 1-2 порядков также имели более широкий просвет, визуализировались единичные венулы.

В группе лечения ноопептом гистологическая картина представлена на рисунке 37. В основном ретинальные сосуды обычного диаметра, их просвет равномерно заполнен клетками крови, однако, в отдельных венах наблюдалось застойное полнокровие. Отека в слое нервных волокон не отмечалось, однако признаки ишемии сохранялись в виде появления «гиперхромных точек».

В целом, сохранялся послойный характер строения ретины. Микрокистовидный отек под слоем нервных волокон, небольшой внутриклеточный отек во внутреннем ядерном слое, в области наружных сегментов фоторецепторов. Наблюдался волнообразный контур ретинального пигментного эпителия. Микроскопическая картина позволяет определённо говорить о лучшем морфологическом состоянии структур сетчатки, хотя и с признаками постишемических изменений.

К 28 суткам и 84 суткам на фоне применения лекарственных препаратов в сравнении с серией контроля визуально отмечалось большая сохранность миелиновых волокон и меньшая площадь деколорации диска зрительного нерва. Микроскопически на 28 сутки на фоне применения ноопепта визуализировался гиалиноз стенок и некоторое сужение капилляров. Отмечалась вертикальная «сегментация» слоя нервных волокон гипертрофированными отростками Мюллеровских клеток. По сравнению с предыдущим сроком уменьшилась отечность в пределах всей толщи сетчатки (рисунок 38).

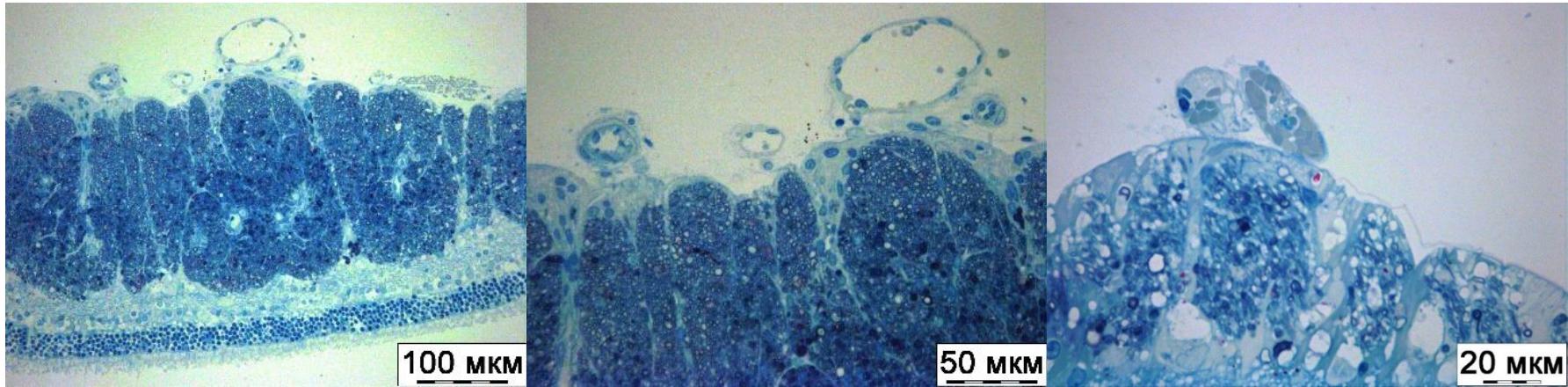


Рисунок 36 – Гистологическая картина сетчатки кролика на 7 сутки после моделирования тромбоза ретинальных сосудов группы лечения ноопептом. Полутонкий срез. Полихромное окрашивание

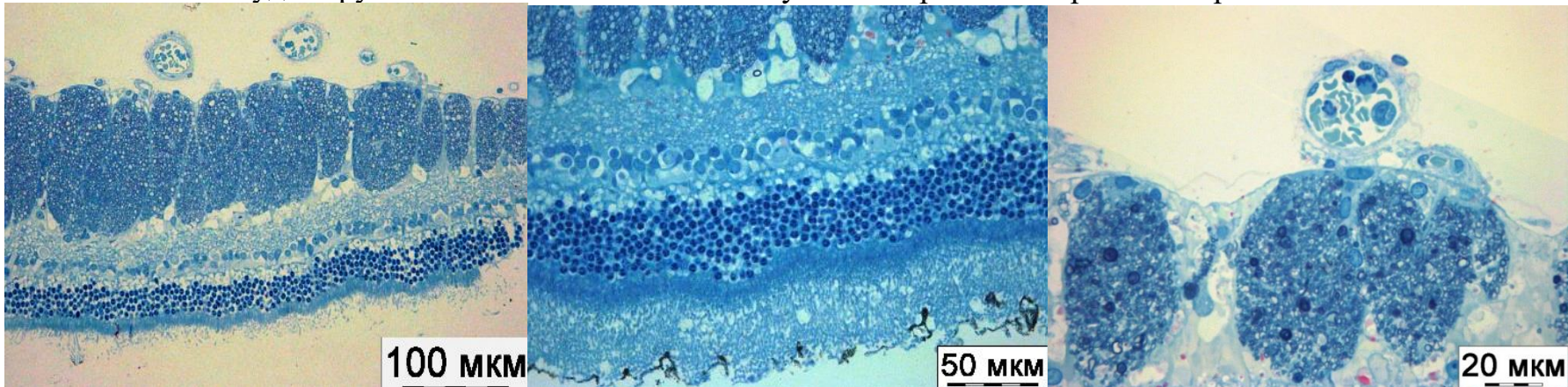


Рисунок 37 – Гистологическая картина сетчатки кролика на 14 сутки после моделирования тромбоза ретинальных сосудов группы лечения ноопептом. Полутонкий срез. Полихромное окрашивание

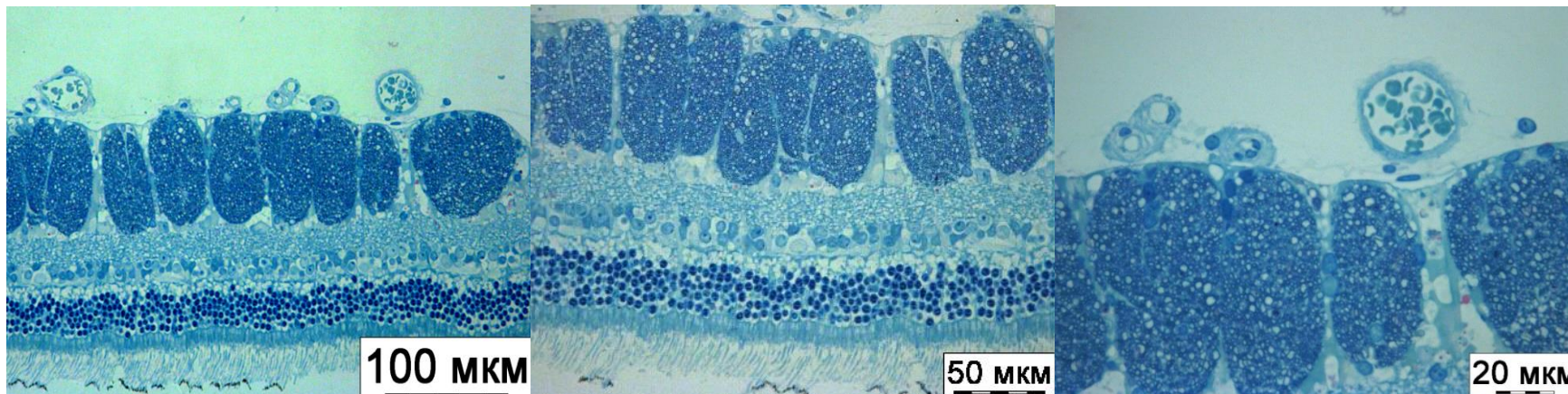


Рисунок 38 – Гистологическая картина сетчатки кролика на 28 сутки после моделирования тромбоза ретинальных сосудов группы лечения ноопептом. Полутонкий срез. Полихромное окрашивание

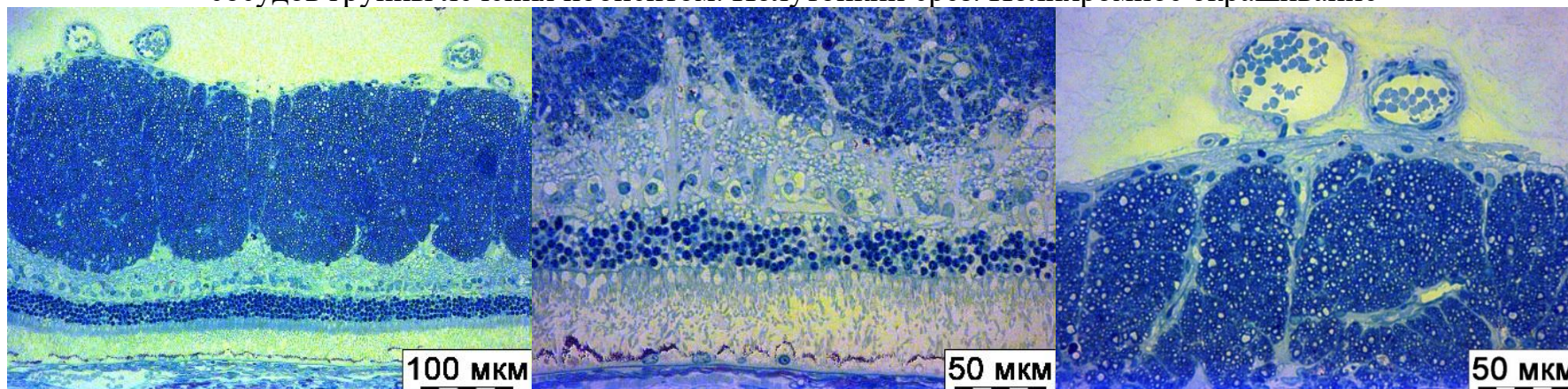


Рисунок 39 – Гистологическая картина сетчатки кролика на 84 сутки после моделирования тромбоза ретинальных сосудов группы лечения ноопептом. Полутонкий срез. Полихромное окрашивание

На 84 сутки гистологическая картина на фоне применения ноопепта представлена на рисунке 39. Сетчатая оболочка прилежит к сосудистой оболочке и по строению практически не отличается от контрольной. Отмечается частичная вертикальная сегментация нервных волокон за счет врастания глиальной ткани (отростки Мюллеровских клеток). Остальные слои без видимых изменений.

Таким образом, применение ноопепта при экспериментальном тромбозе сосудов сетчатки оказывает ретинопротекторное действие, которое проявляется в большей сохранности миелиновых волокон, уменьшении площади деколорации диска зрительного нерва, снижении его отека, ускорении восстановления кровотока по магистральным сосудам и сохранении послойного строения сетчатки.

### **3.3.4. Влияние этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина на электроретинограмму при экспериментальном тромбозе сосудов сетчатки**

При регистрации общей (максимальной) электроретинограммы при экспериментальном тромбозе сосудов сетчатки были получены следующие результаты. У животных всех серий не было получено достоверных изменений амплитуды  $a$  волны во все сроки эксперимента (рисунки 40-47).

У контрольных животных (моделирование патологии без лечения) амплитуда  $b$  волны на 1 сутки после моделирования тромбоза сосудов (рисунок 40) повышалась на 29,8% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями интактных животных (рисунок 41), а затем снижалась и на 3, 10, 28, 56 и 84 сутки была их ниже на 28,5%, 27,4%, 19,3%, 26,1% и 24,9% ( $p < 0,05$ ) соответственно (рисунки 42-47).

Лаг-фаза  $b$  волны у животных, получавших воду, повышалась на 3 сутки исследования на 18,4% ( $p < 0,05$ ), на 14 сутки – на 18,1% ( $p < 0,05$ ), а на 84 сутки – на 25,9% ( $p < 0,05$ ) по сравнению со значениями до моделирования патологии. Отношение амплитуды  $b$  волны к амплитуде  $a$  волны достоверно увеличивалось только на 1 сутки – на 33,3% ( $p < 0,05$ ) (таблица 23).

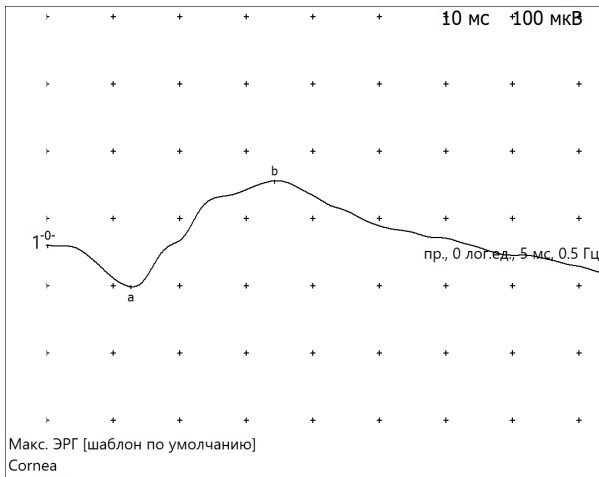


Рисунок 40 – Максимальная ЭРГ интактных кроликов

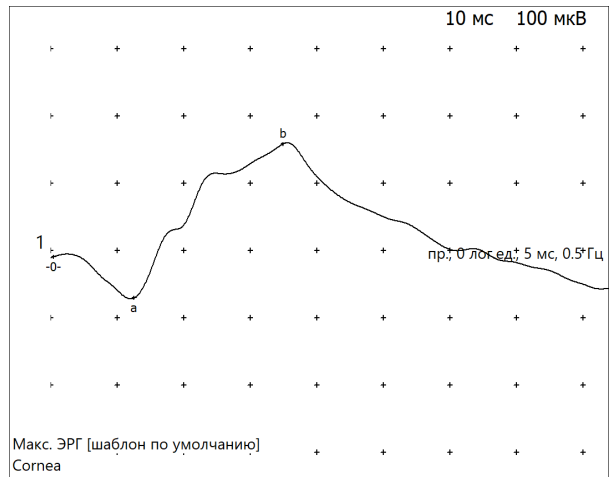


Рисунок 41 – Максимальная ЭРГ группы контроля патологии, 1 сутки

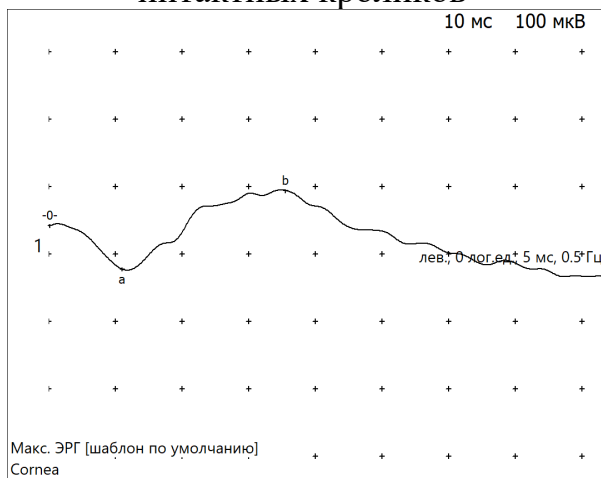


Рисунок 42 – Максимальная ЭРГ группы контроля патологии, 3 сутки

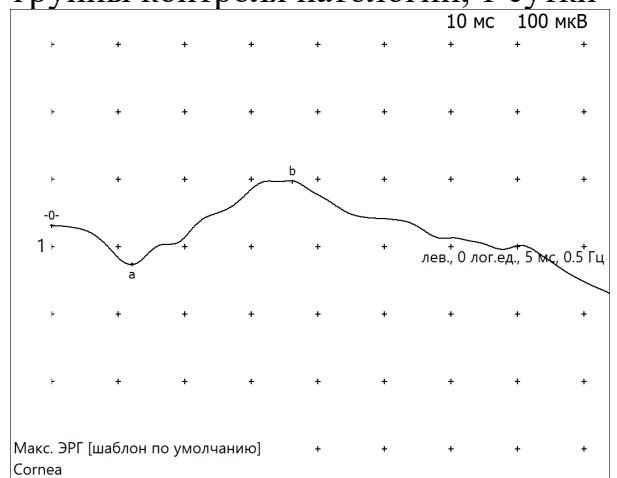


Рисунок 43 – Максимальная ЭРГ группы контроля патологии, 10 сутки

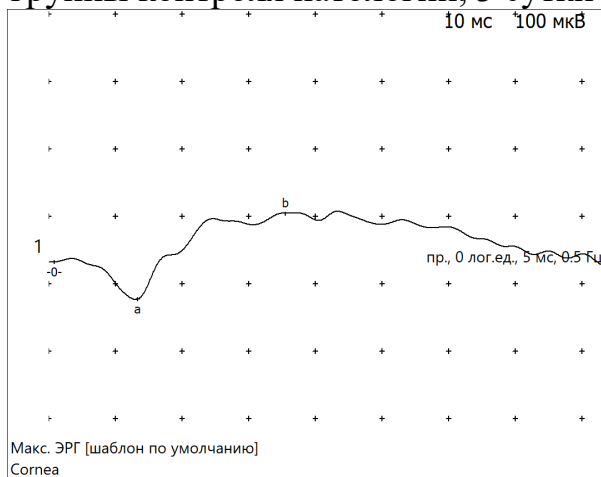


Рисунок 44 – Максимальная ЭРГ группы контроля патологии, 14 сутки

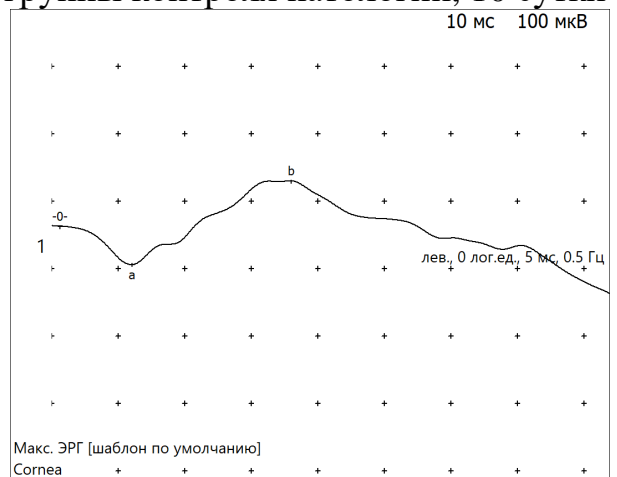


Рисунок 45 – Максимальная ЭРГ группы контроля патологии, 28 сутки

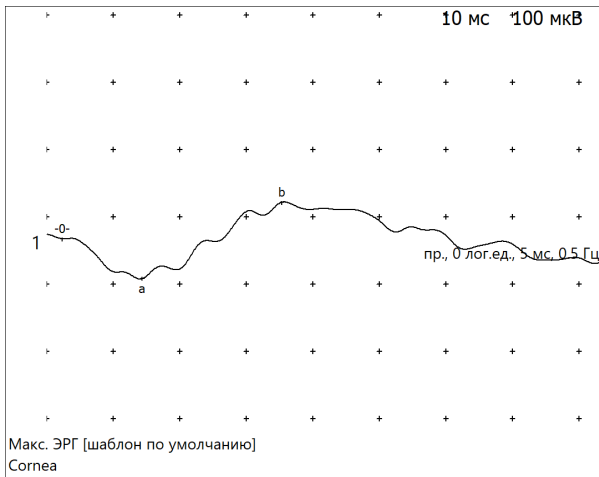


Рисунок 46 – Максимальная ЭРГ группы контроля патологии, 56 сутки

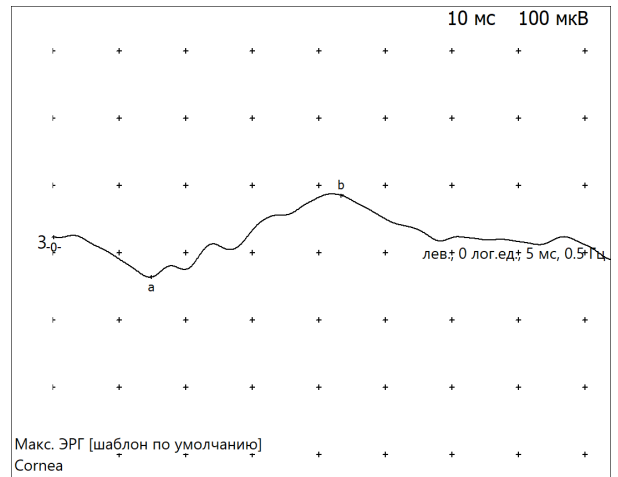


Рисунок 47 – Максимальная ЭРГ группы контроля патологии, 84 сутки

Таблица 23 – Показатели общей (максимальной) электроретинографии при экспериментальном тромбозе сосудов сетчатки ( $M \pm SD$ )

	Амплитуда волны <i>a</i> , мВ	Амплитуда волны <i>b</i> , мВ	Лаг-фаза <i>b</i> волны, мс	Отношение амплитуды волны <i>b</i> к <i>a</i>
норма (n=40)	64,1±8,2	154,5±16,5	33,1±3,9	2,4±0,4
1 час (n=8)	61,3±17,5	143,0±15,6	32,9±4,7	2,5±0,6
1 сутки (n=8)	61,9±5,4	200,6±18,9*	29,5±2,7	3,2±0,3*
3 сутки (n=8)	60,4±9,8	110,5±15,5*	39,2±2,0*	1,9±0,3
7 сутки (n=9)	64,1±22,1	160,8±28,5	38,5±4,8	3,1±1,4
10 сутки (n=8)	61,7±6,9	112,2±13,8*	35,1±3,4	1,8±0,2
14 сутки (n=8)	65,7±17,4	128,9±21,7	39,1±4,1*	2,1±0,6
28 сутки (n=8)	63,2±12,4	124,7±13,6*	36,5±3,7	2,1±0,6
56 сутки (n=8)	61,5±4,7	114,2±10,7*	36,5±3,5	1,9±0,2
84 сутки (n=8)	65,7±7,0	116,0±6,7*	41,7±4,1*	1,8±0,3

\* -  $p < 0,05$  – достоверные различия с показателями интактных животных (норма)



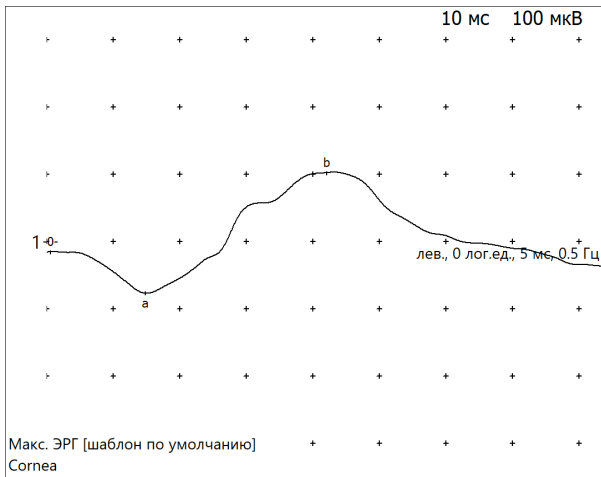


Рисунок 48 – Максимальная ЭРГ группы лечения пирацетамом, 1 сутки

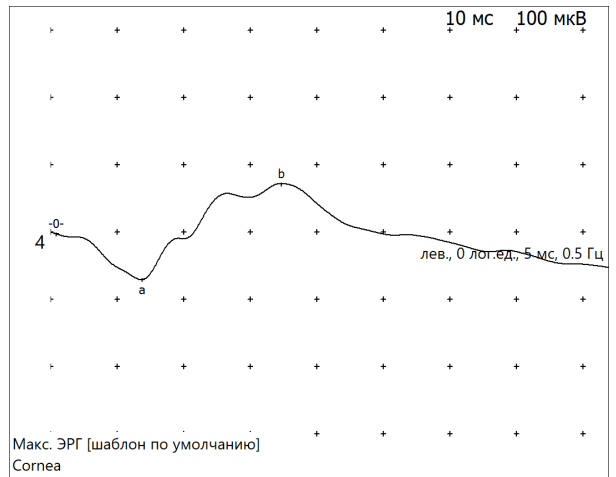


Рисунок 49 – Максимальная ЭРГ группы лечения пирацетамом, 3 сутки

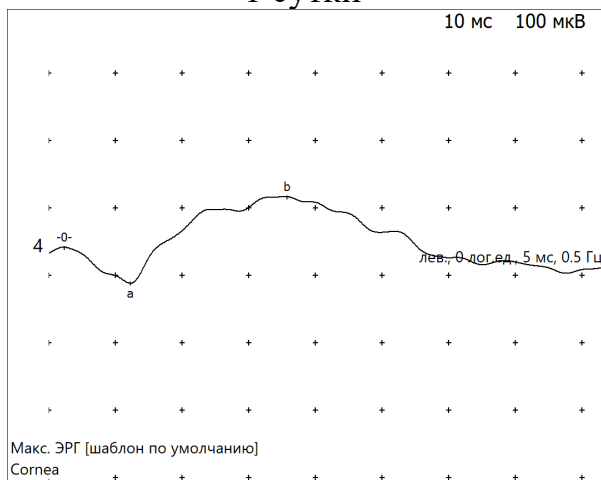


Рисунок 50 – Максимальная ЭРГ группы лечения пирацетамом, 10 сутки

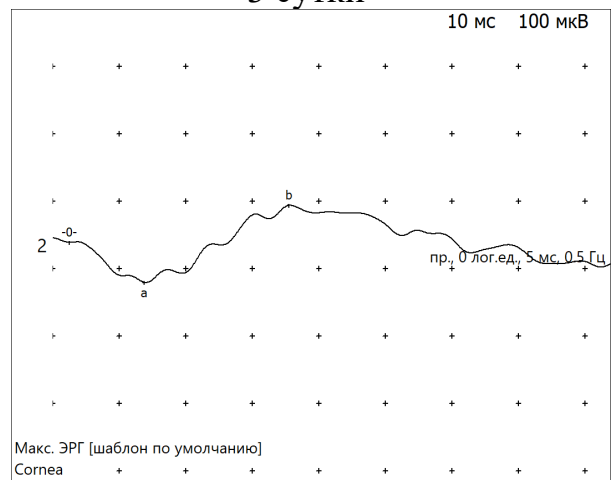


Рисунок 51 – Максимальная ЭРГ группы лечения пирацетамом, 28 сутки

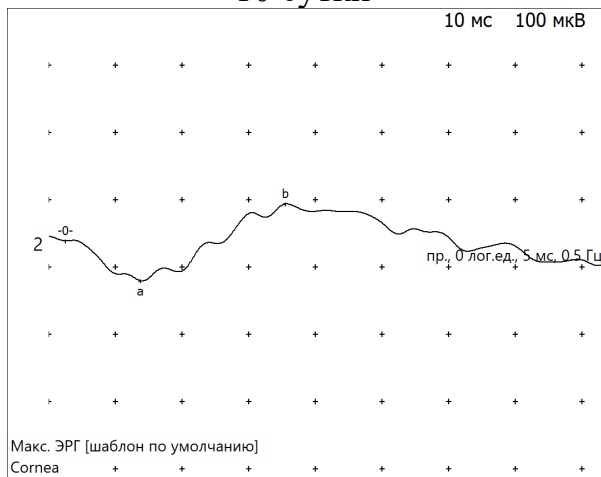


Рисунок 52 – Максимальная ЭРГ группы лечения пирацетамом, 56 сутки

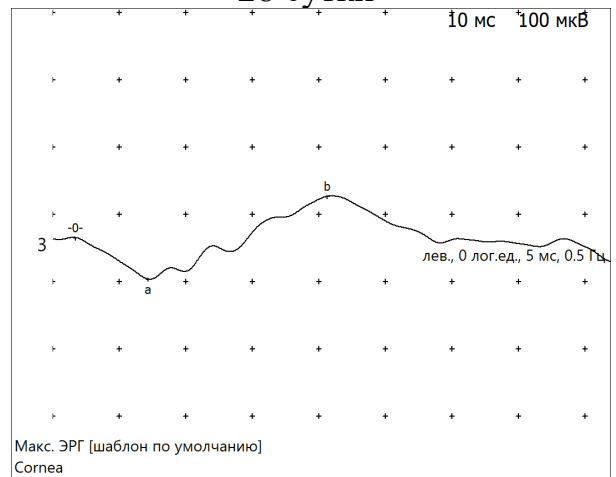


Рисунок 53 – Максимальная ЭРГ группы лечения пирацетамом, 84 сутки

При применении пирацетама с целью коррекции электрофизиологических нарушений в сетчатке отмечалось повышение амплитуды *b* волны на 1 сутки патологии по сравнению с показателями интактных животных на 19,0% ( $p<0,05$ ) (рисунок 48) и ее снижение на 28, 56 и 84 сутки – на 26,3%, 28,3% и 24,9% ( $p<0,05$ ) соответственно (рисунки 48-53).

Лаг-фаза *b* волны увеличивалась на 3 сутки – на 18,1% ( $p<0,05$ ), на 7 сутки – на 19,0% ( $p<0,05$ ), на 84 сутки – на 19,6% ( $p<0,05$ ), а отношение амплитуды *b* волны к амплитуде *a* волны повышалось на 1 сутки – на 33,3% ( $p<0,05$ ) и снижалось на 28 и 56 сутки – на 25,0% и 20,8% ( $p<0,05$ ).

Таблица 24 – Показатели общей (максимальной) электроретинографии при экспериментальном тромбозе сосудов сетчатки на фоне лечения пирацетамом ( $M \pm SD$ )

	Амплитуда волны <i>a</i> , мВ	Амплитуда волны <i>b</i> , мВ	Лаг-фаза <i>b</i> волны, мс	Отношение амплитуды волны <i>b</i> к <i>a</i>
1 час (n=8)	59,1±14,4	143,3±13,7	37,3±4,6#	2,5±0,5
1 сутки (n=15)	59,0±6,9	183,9±16,6*	34,1±2,6#	3,2±0,5*
3 сутки (n=15)	66,3±17,6	140,8±17,5#	39,1±5,3*	2,3±0,8
7 сутки (n=13)	62,2±11,6	162,1±22,0	39,4±4,9*	2,7±0,5
10 сутки (n=8)	57,5±5,2	133,9±14,9#	36,1±3,9	2,3±0,3#
14 сутки (n=8)	62,7±5,9	144,1±14,6	37,2±3,6	2,3±0,2
28 сутки (n=8)	64,9±6,1	113,9±13,2*	37,8±3,1	1,8±0,1*
56 сутки (n=8)	56,1±6,1	110,7±7,7*	35,9±3,6	1,9±0,1*
84 сутки (n=8)	62,7±5,2	115,9±9,2*	39,6±4,6*	1,9±0,2

\* -  $p<0,05$  – достоверные различия с показателями интактных животных (норма)

# -  $p<0,05$  – достоверные различия с показателями контрольных животных

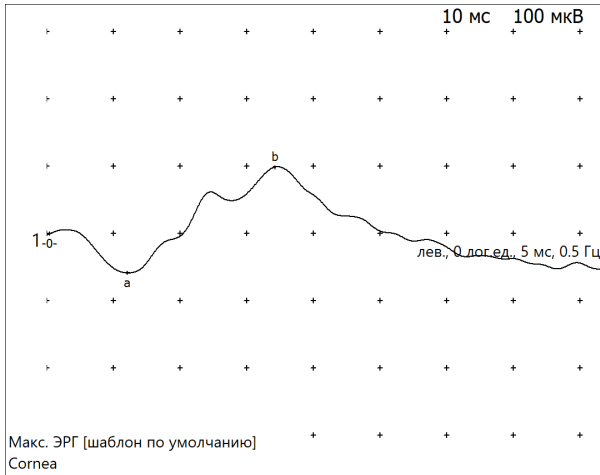


Рисунок 54 – Максимальная ЭРГ группы лечения ноопептом, 1 сутки

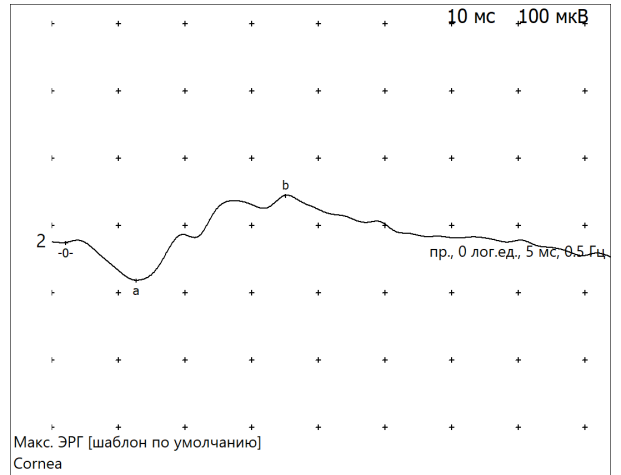


Рисунок 55 – Максимальная ЭРГ группы лечения ноопептом, 3 сутки

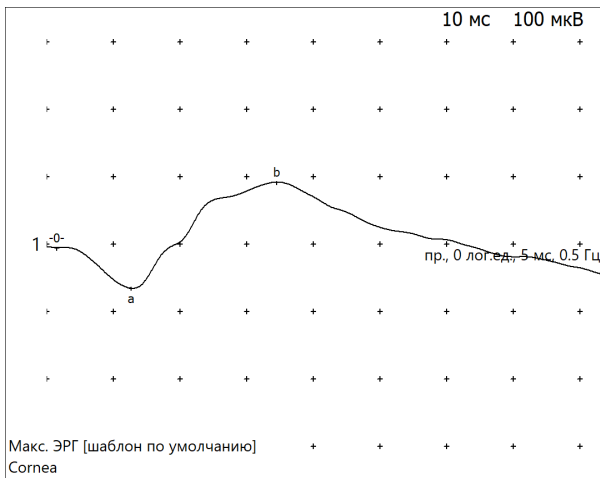


Рисунок 56 – Максимальная ЭРГ группы лечения ноопептом, 10 сутки

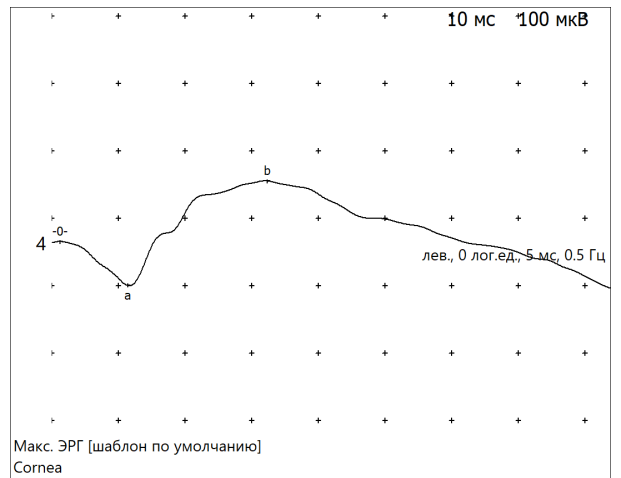


Рисунок 57 – Максимальная ЭРГ группы лечения ноопептом, 28 сутки

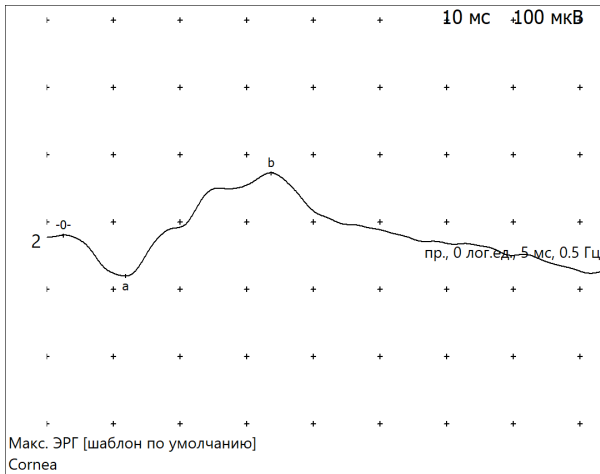


Рисунок 58 – Максимальная ЭРГ группы лечения ноопептом, 56 сутки

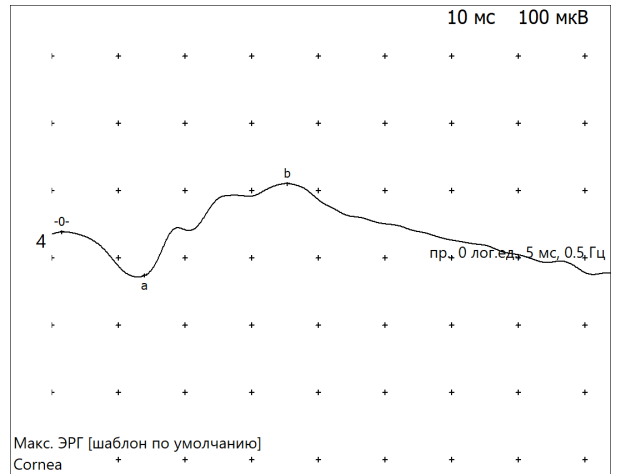


Рисунок 59 – Максимальная ЭРГ группы лечения ноопептом, 84 сутки

В то же время амплитуда  $b$  волны увеличивалась на 3 сутки на 27,4% (рисунок 49), на 10 сутки – на 19,3% ( $p < 0,05$ ) (рисунок 50), лаг-фаза  $b$  волны повышалась через 1 час – на 13,4% ( $p < 0,05$ ), на 1 сутки – 15,6% ( $p < 0,05$ ), а отношение амплитуды  $b$  волны к амплитуде  $a$  волны возрастала на 10 сутки на 27,8% ( $p < 0,08$ ) по сравнению с показателями контрольных животных (таблица 24).

Таблица 25 – Показатели общей (максимальной) электроретинографии при экспериментальном тромбозе сосудов сетчатки на фоне лечения ноопептом ( $M \pm SD$ )

	Амплитуда волны $a$ , мВ	Амплитуда волны $b$ , мВ	Лаг-фаза $b$ волны, мс	Отношение амплитуды волны $b$ к $a$
1 час ( $n=8$ )	62,7 $\pm$ 10,4	141,3 $\pm$ 13,2	31,9 $\pm$ 1,7	2,3 $\pm$ 0,4
1 сутки ( $n=8$ )	60,7 $\pm$ 8,9	151,6 $\pm$ 18,8#%	35,6 $\pm$ 2,3#	2,5 $\pm$ 0,3#%
3 сутки ( $n=8$ )	56,9 $\pm$ 10,2	134,5 $\pm$ 11,3*#	32,0 $\pm$ 2,4#%	2,4 $\pm$ 0,5
7 сутки ( $n=8$ )	55,2 $\pm$ 12,7	148,5 $\pm$ 17,6	33,6 $\pm$ 2,9#%	2,8 $\pm$ 0,6
10 сутки ( $n=8$ )	61,5 $\pm$ 18,7	139,2 $\pm$ 15,8#	32,8 $\pm$ 1,9	2,4 $\pm$ 0,5#
14 сутки ( $n=8$ )	60,6 $\pm$ 6,6	142,6 $\pm$ 14,5	39,4 $\pm$ 3,9*	2,4 $\pm$ 0,5
28 сутки ( $n=8$ )	64,9 $\pm$ 6,1	144,6 $\pm$ 9,5#%	35,5 $\pm$ 3,7	2,2 $\pm$ 0,3
56 сутки ( $n=8$ )	63,5 $\pm$ 5,6	138,8 $\pm$ 14,8#%	34,8 $\pm$ 5,1	2,2 $\pm$ 0,2#%
84 сутки ( $n=8$ )	62,7 $\pm$ 5,2	134,4 $\pm$ 11,0*#%	33,0 $\pm$ 1,8#%	2,1 $\pm$ 0,1#%

\* -  $p < 0,05$  – достоверные различия с показателями интактных животных (норма)

# -  $p < 0,05$  – достоверные различия с показателями контрольных животных

% -  $p < 0,05$  – достоверные различия с показателями животных, получавших пирацетам

Введение ноопепта при экспериментальном тромбозе сосудов сетчатки приводило к следующим изменениям электроретинограммы.

Амплитуда  $b$  волны уменьшалась на 3 сутки (рисунок 55) и 84 сутки

(рисунок 59) после моделирования тромбоза сосудов сетчатки на 12,9% и 13,0% ( $p < 0,05$ ) соответственно по сравнению с показателями интактных кроликов. Лаг-фаза  $b$  волны увеличивалась на 14 сутки на 19,0% ( $p < 0,05$ ), а отношение амплитуды  $b$  волны к амплитуде  $a$  волны статистически значимо не изменялось.

По сравнению с показателями контрольных животных отмечалось снижение амплитуда  $b$  волны на 1 сутки на 24,4% ( $p < 0,05$ ) (рисунок 54) и ее увеличение на 3 сутки на 21,7% ( $p < 0,05$ ) (рисунок 55), на 10 сутки – на 24,1% ( $p < 0,05$ ) (рисунок 56), на 28 сутки – на 15,9% ( $p < 0,05$ ) (рисунок 57), на 56 сутки – на 21,5% ( $p < 0,05$ ) (рисунок 58), на 84 сутки – на 15,9% ( $p < 0,05$ ) (рисунок 59).

Лаг-фаза  $b$  волны на 1 сутки исследования превышала показатели контрольных животных на 20,7% ( $p < 0,05$ ), а на 3 сутки, 7 сутки и 84 сутки была их ниже на 18,4% ( $p < 0,05$ ), 12,7% ( $p < 0,05$ ) и 20,9% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Отношение амплитуды  $b$  волны к амплитуде  $a$  волны было ниже значений контроля на 1 сутки – на 21,9% ( $p < 0,05$ ), на 10 сутки, 56 сутки и на 84 сутки выше их на 33,3% ( $p < 0,05$ ), 15,8% ( $p < 0,05$ ) и 16,7% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

При сравнении показателей электроретинограммы при моделировании тромбоза сосудов сетчатки и лечении пираретамом и ноопептом были получены следующие результаты.

Амплитуда  $b$  волны при введении ноопепта была ниже значений животных, получавших пираретам, на 1 сутки на 17,6% ( $p < 0,05$ ) (рисунок 48 и рисунок 54) и выше их на 28, 56 и 84 сутки – на 26,9%, 25,4% и 15,9% соответственно ( $p < 0,05$ ) (рисунок 51 и рисунок 57, рисунок 52 и рисунок 58, рисунок 53 и рисунок 59 соответственно).

Лаг-фаза  $b$  волны при введении ноопепта была ниже, чем на фоне пираретама на 3 сутки на 18,2% ( $p < 0,05$ ), на 7 сутки – на 14,7% ( $p < 0,05$ ), на 84 сутки – 16,7% ( $p < 0,05$ ).

Отношение амплитуды  $b$  волны к амплитуде  $a$  волны при использовании ноопепта было ниже показателей кроликов, которым вводили пирарцетам на 1 сутки эксперимента на 21,9% ( $p < 0,05$ ) и выше их на 56 и 84 сутки – на 15,8% и 10,5% ( $p < 0,05$ ) соответственно (таблица 25).

Таким образом, показано, что ноопепт при экспериментальном тромбозе сосудов сетчатки улучшает ее электрическую активность, и по данному действию превосходит препарат сравнения – пирарцетам.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рамках настоящего исследования изучалась эффективность применения антиоксидантов при развитии типичных патологических процессов – дегенеративно-дистрофического, воспалительного и дисциркуляторного – на моделях заболеваний глаза – катаракты, гнойной язвы роговицы, острой окклюзии сосудов сетчатки.

При этом в ходе работы был применен оригинальный подход выбора используемых для лечения веществ, который заключался в назначении антиоксидантов в зависимости от механизма их действия, наличия у них дополнительной фармакологической активности, а также от особенностей патогенеза патологии.

Например, в патогенезе катаракты важную роль играет свободнорадикальное окисление белка-кристаллина и липидов клеточных мембран [169]. При этом, первостепенную роль в антиоксидантной системе защиты играет глутатион и глутатион-зависимые антиоксидантные ферменты [196, 258]. Поэтому, в фармакотерапии данной патологии целесообразно использовать липофильный антиоксидант, влияющий преимущественно на глутатионовое звено системы защиты от перекисного окисления.

Учитывая данные обстоятельства, в качестве антиоксиданта был выбран 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол (ионол). Это соединение обладает высокой антиоксидантной и антирадикальной активностью в системах *in vitro* и *in vivo*. В опытах *in vitro* ионол задерживал помутнение хрусталика в присутствии промежуточного продукта перекисного окисления липидов – 4-гидроксиноненаля, а также индуцировал глутатион-S-трансферазу в эпителиоцитах хрусталика. Добавление в рацион питания крыс ионола повышало уровень глутатиона в их хрусталике [18, 79, 80, 105].

При бактериальном кератите в роговице можно выделить две основные группы источников свободных радикалов – экзогенные и эндогенные. Из экзогенных генераторов свободных радикалов, как и в здоровой роговице, основную роль играет ультрафиолетовое излучение солнечного света [246]. К

эндогенным источникам свободных радикалов относятся макрофаги крови, инфильтрирующие ткань роговицы при воспалении [133], а также моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, эндотелиальные, гладкомышечные и другие клетки, продуцирующие свободные радикалы для защиты от патогенных микроорганизмов [96].

То есть, активация свободнорадикального окисления при данной патологии играет не только негативную роль, но и направлена на борьбу с микроорганизмами, поэтому применение антиоксидантов оправдано только при чрезмерной активации процессов пероксидации, приводящей к развитию осложнений, например, пенетрации в фазу альтерации.

Кроме того, желательно, чтобы применяемый препарат также обладал антибактериальной активностью. На основании данного подхода, в качестве антиоксиданта для терапии гнойной язвы роговицы был выбран лактоферрин,

Лактоферрин представляет собой высококонсервативную мономерную одиночную полипептидную цепь массой 80 кДа, содержащуюся в большинстве экзокринных секретов млекопитающих, таких, как молоко, слюна и слезы, бронхиальный и кишечный секреты.

Благодаря секвестрации железа лактоферрин контролирует физиологический баланс производства активных форм кислорода и скорость их элиминации, что естественным образом предотвращает прямое повреждение клеток свободными радикалами. Также он способен повышать активность ключевых антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы) [181, 207]. При этом лактоферрин также играет важную роль в защите макроорганизмов от микробных инфекций [195, 238].

Антимикробная активность лактоферрина хорошо изучена и состоит из двух механизмов. Лактоферрин оказывает бактериостатическое действие в отношении грамположительных бактерий за счет связывания  $Fe^{3+}$ , необходимого для роста микроорганизмов [184]. В отношении



грамотрицательных бактерий он оказывает бактерицидное действие, за счет взаимодействия с липидом А поверхностного бактериального полисахарида (LPS) [88, 89, 174].

Сетчатка очень уязвима для окислительного повреждения, возникающего при ее ишемии и ишемии-реперфузии. При этом, при ишемии сетчатки, помимо основных источников образования свободных радикалов, возникающих при снижении парциального напряжения кислорода, важную роль, как и в других нейронах, играет глутаматная эксайтотоксичность [241]. Поэтому, в терапии данной патологии целесообразно использовать антиоксиданты, блокирующие также негативные эффекты глутамата, например, оригинальный отечественный нейропротектор – этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина (ноопепт).

В исследованиях *in vitro* и *in vivo* показано, что ноопепт обладает как прямой, так и косвенной антиоксидантной активностью [67, 77, 160].

Кроме того, данный лекарственный препарат, обладает выраженными ноотропными и нейропротективными свойствами. В ряде исследований показано, что ноопепт подавляет развитие глутаматной эксайтотоксичности, проявляет холино-позитивные свойства, усиливает экспрессию NGF (фактора роста нервов) и BDNF (нейротрофического фактора мозга), стабилизирует транскрипционный фактор NIF-1 [27, 49, 56, 62].

Для решения поставленных задач работа была разбита на несколько этапов.

Катаракта – дегенеративно-дистрофическое заболевание глаза, сопровождающееся помутнением ткани хрусталика, то есть, потерей его основных функций – светопроведения и светопреломления [42, 51, 85]. Это заболевание может быть вызвано различными факторами (физические, химические воздействия, системные метаболические нарушения и др.), однако, первое место по частоте встречаемости занимает возрастная катаракта.

По данным литературы более 80% населения старше 70 лет имеет возрастную катаракту. Имеются убедительные литературные данные, подтверждающие существенную роль оксидативного стресса в развитии возрастной катаракты [90, 278], поэтому на первом этапе исследования была получена экспериментальная модель катаракты путём эндовитреальной индукции образования активных форм кислорода. Была использована методика по К.С. Вhуан et al. в собственной модификации – катарактогенез индуцировали введением в стекловидное тело раствора диквата дибромида [110].

Показано, что введение данного вещества вызывает увеличение концентрации супероксидного и гидроксильного радикалов в хрусталике, сетчатке, стекловидном теле и камерной влаге в несколько раз и сопровождается формированием корковой катаракты [110].

В нашем исследовании получены аналогичные результаты: введение диквата дибромида сопровождалось развитием окислительного стресса в хрусталике кроликов, повышением уровня МДА, снижением концентрации GSH, уменьшением активности антиоксидантных ферментов GPx и GT.

Данные биохимические изменения приводили к следующим клиническим проявлениям. К 7 суткам эксперимента в хрусталике появлялись мелкие субкапсулярные и кортикальные вакуоли, что, видимо, связано, с нарушением проницаемости мембран для ионов воды в результате процессов свободнорадикального окисления липидов. Снижение уровня GSH сопровождалось формированием внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей, что, в свою очередь, приводило к потере нативности белковых молекул, их агрегации и формированию белковых агрегатов в хрусталике.

Увеличение активности ПОЛ к 14 суткам сопровождалось нарастанием степени разрушения мембран и дисфункцией транспортной ионной помпы, что и могло стать причиной увеличения количества мелких вакуолей в коре хрусталика, появления симптомов диссоциации (разволокнения) и зияния швов коры хрусталика. Размеры и количество белковых агрегатов оставались

на прежнем уровне. Отсутствие значительных изменений прозрачности хрусталика к этому сроку можно объяснить удовлетворительными показателями антиоксидантной системы, то есть «контролируемостью» окислительного стресса.

К 28 суткам в хрусталике было зафиксировано слияние вакуолей, увеличение площади зон диссоциации коры и степени зияния швов коры, формирование водяных щелей, что свидетельствует о набухании ткани хрусталика и значительном нарушении межволоконных контактов. Помутнение содержимого водяных щелей характеризует накопление тканевого детрита, что является следствием нарастающего разрушения ткани хрусталика [86]. Прямым указанием на увеличение степени разрушения ткани хрусталика можно считать появление участков деструкции волокон в местах выраженной диссоциации коры. Деструктивные изменения можно объяснить высокой активностью ПОЛ на фоне истощения антиоксидантной системы, так как чрезмерная неконтролируемая активация этого процесса приводит к разрушению белков, мембран и гибели клетки. Набухание ткани хрусталика также может быть связано с возможными конформационными изменениями  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы [151, 225].

С 28 до 42 суток исследования в подавляющем большинстве случаев имело место значительное разрушение волокон и структуры коры хрусталика, содержимое водяных щелей помутнело, зоны разрушения волокон коры хрусталика заняли всю площадь диссоциации. Эти морфологические изменения можно объяснить высокой активностью ПОЛ, следствием чего стало разрушение значительного количества мембран клеток и волокон хрусталика. Отсутствие изменений степени набухания хрусталика, возможно, связано с достижением определённого ионного и водного баланса между изучаемой тканью и окружающей жидкостью при анатомически сохранной капсуле хрусталика.

К 56 суткам в абсолютном большинстве случаев нарастала дезорганизация и разрушение волокон кортекса хрусталика, белковые

агрегаты существенно увеличились, число вакуолей уменьшилось, а их размеры увеличились за счёт слияния соседних, на месте водяных щелей сформировались участки помутнения коры. Эти изменения произошли на фоне уменьшения активности ПОЛ. То есть, снижение активности ПОЛ на этом этапе не сопровождается прекращением развития катаракты, что указывает на доминирование в этот период развития патологического процесса других патофизиологических механизмов.

На втором этапе нами была проведена оценка влияния ионола на течение экспериментальной катаракты. Поскольку нежелательные эффекты ионола (гепатотоксичность, проканцерогенное действие) связывают с образованием его метаболитов при микросомальном окислении [172, 212], в исследовании использовалось его местное применение в виде инстилляций в конъюнктивальную полость. При этом, поскольку на данный момент отсутствует готовая лекарственная форма для применения в офтальмологической практике, первоначально осуществлялся подбор эффективной и безопасной дозы ионола при данном способе применения.

Для этого в конъюнктивальную полость глаз интактных кроликов закапывали ионол в концентрациях 22%, 10%, 2,2% и 0,22% три раза в сутки в течение 30 суток. Месячный курс инстилляций растворов ионола высоких концентраций (22% и 10%) индуцировал ПОЛ в ткани хрусталика, что проявлялось повышением концентрации МДА и снижением уровня GSH. Согласно данным литературы, прооксидантное действие ионола в высоких концентрациях может быть связано с его способностью разобщать окисление и фосфорилирование в дыхательной цепи митохондрий [91], а также с его способностью к самоокислению с генерацией свободных радикалов [220].

В то же время применение 2,2% и 0,22% растворов вызывало достоверное увеличение содержания GSH и активности GT в ткани хрусталика, что свидетельствует о повышении емкости антиоксидантной системы хрусталика.

Таким образом, показано, что эффективными и безопасными для хрусталика являются инстилляции 0,22 и 2,2% растворов ионола. Поэтому для дальнейших экспериментов использовались именно эти концентрации.

В качестве стандартной терапии катаракты использовали инстиллянии в конъюнктивальную полость раствора «Офтан Катахрома» и 10% масляного раствора  $\alpha$ -токоферола ацетата. Терапия «Офтан Катахромом» до 28 суток не вызывала существенного изменения процесса формирования катарактальных изменений хрусталика, а также выраженности окислительного стресса в сравнении с контрольной серией.

С 28 по 56 сут эксперимента в 28-33% случаев наблюдалась стабилизация процесса катарактогенеза. «Офтан Катахром» – комбинированный препарат, состоящий из аденозина, никотинамида и цитохрома С [25, 33]. При этом аденозин, являющийся предшественником АТФ, участвует в метаболических процессах, никотинамид стимулирует синтез никотинамиддинуклеотида, кофактора дегидрогеназ, а цитохром С участвует в окислительно-восстановительных процессах и является антиоксидантом.

Отсутствие выраженного эффекта при применении «Офтан Катахрома» при дикват дибромид индуцированной катаракте, скорее всего, связано с особенностями данной экспериментальной модели. В частности, в основе развития катаракты под действием диквата дибромид лежит активация процессов свободнорадикального окисления в хрусталике. Аденозин и никотинамид, входящие в состав «Офтан Катахрома» не являются прямыми антиоксидантами, а цитохром С, являясь белковой молекулой, видимо, не достигает хрусталика при инстиллянии в конъюнктивальную полость в необходимом для проявления антиоксидантного действия количестве.

Применение второго препарата сравнения – 10% масляного раствора  $\alpha$ -токоферола ацетата также не оказало существенного эффекта ни на клиническую картину развивающейся катаракты, ни на

свободнорадикальный статус хрусталика. Полученные результаты, скорее всего, связаны с тем, что  $\alpha$ -токоферола ацетат является неактивным веществом. Для его активации необходима реакция гидролиза с образованием свободного  $\alpha$ -токоферола [120]. Видимо, при местном применении в виде инстилляций в конъюнктивальную полость не происходит образование  $\alpha$ -токоферола, а, следовательно, отсутствует терапевтический эффект.

Применение 0,22% раствора ионола для лечения экспериментальной катаракты оказывало выраженный терапевтический эффект. На протяжении всего эксперимента улучшался свободнорадикальный статус хрусталика. Концентрация МДА была ниже значений контрольных животных, а уровень GSH и активность GPx и GT – были их выше. При этом активность антиоксидантных ферментов нормализовывалась и достоверно не отличалась от показателей интактных животных, содержание МДА было их выше, а уровень GSH – ниже.

Значительный антиоксидантный эффект ионола можно объяснить прямой антирадикальной и антиоксидантной активностью 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола, а также способностью ингибировать окислительную модификацию белков (что, видимо, в некоторой степени предотвратило образование дополнительных радикалообразующих центров в матриксе хрусталика).

Кроме того, этот эффект может быть обусловлен высокой активностью исследуемых глутатион-зависимых антиоксидантных ферментов на фоне достаточно высокой концентрации GSH. Сохранение активности антиоксидантных глутатион-зависимых ферментов в ткани хрусталика практически на уровне интактной ткани на протяжении всего опыта можно объяснить значительным снижением активности ПОЛ и, как следствие, окислительного инактивирования этих ферментов, а также индуцирующим влиянием ионола на GT [41]. Однако, увеличения активности этого фермента выше нормального уровня зафиксировано не было, что, вероятно, связано с

повышенной активностью ПОЛ и определённым ингибированием этого фермента за счёт окисления и взаимодействия с продуктами распада фосфолипидов мембран.

Выраженный антиоксидантный эффект 0,22% раствора ионола сопровождался улучшением клинической картины катаракты. Достигнутое снижение активности ПОЛ и улучшение состояния АОС, вероятно, предотвратили в части случаев необратимые изменения молекул и структур изучаемой ткани, а в других – вызвали стабилизацию патологического процесса. Это, вероятно, позволило ткани самопроизвольно запустить определённые репаративные процессы, что привело к частичному восстановлению прозрачности хрусталика.

Уменьшение степени деструктивных процессов в изучаемой ткани можно связать со снижением активности ПОЛ и, как следствие, окислительного разрушения мембран. Отсутствие признаков значительного набухания хрусталика в ходе опыта, вероятно, связано с уменьшением окислительного разрушения мембран и нормальным функционированием ионной помпы (уменьшение окисления этого фермента), а снижение степени белковой агрегации – со значительным замедлением истощения GSH.

Аналогичные положительные изменения, но выраженные в большей степени, были получены и при применении 2,2% раствора ионола.

На фоне лечения уровень GSH, активность GPx в хрусталике нормализовались и достоверно от значений интактных животных не отличались, а активность GT даже их превышала.

При сравнении свободнорадикального статуса хрусталика после введения растворов ионола разных концентраций показано, что при применении ионола в концентрации 0,22% содержание МДА в хрусталике было выше показателей животных, которым вводили 2,2% раствор на 28 и 42 сутки эксперимента, содержание GSH, напротив, при использовании 0,22% раствора ионола было ниже значений кроликов получавших 2,2% раствор на 42 и 56 сутки.

Активность GPx во все сроки эксперимента достоверно между сравниваемыми сериями не различалась, а активность GT была выше у животных, получавших 2,2% раствор на 14, 28, 42 и 56 сутки. Полученные результаты свидетельствуют о дозозависимом эффекте ионола.

Выявленное выраженное антиоксидантное действие 2,2% раствора ионола сопровождалось положительным клиническим эффектом: значительным изменением динамики процесса – стабилизацией и, во многих случаях, регрессом помутнений хрусталика, а также существенным снижением выраженности катарактальных изменений хрусталика.

Так как ионол – прямой антиоксидант, его терапевтический эффект можно объяснить ингибированием процессов свободнорадикального окисления. В частности, изменение динамики патологического процесса в сторону стабилизации, а затем – регресса, так же как и отсутствие грубых деструктивных явлений в кортексе хрусталика, свидетельствует о предотвращении ионолом глубокой окислительной деструкции биополимеров и ультраструктур волокон хрусталика. Значительное уменьшение набухания изучаемой ткани, видимо, связано со снижением активности ПОЛ, что позволило сохранить структурную и функциональную целостность мембран и транспортной ионной системы.

**Таким образом, на основе полученных данных можно сделать вывод, что применение 0,22% и 2,2% растворов ионола в виде интилляций в конъюнктивальную полость по две капли три раза в день является патогенетически оправданным и эффективным способом лечения катаракты, причем, 2,2% раствор превосходит по антиоксидантной активности 0,22%.**

Гнойная язва роговицы – тяжёлое септическое воспалительное заболевание светопроводящего и светопреломляющего отдела наружной оболочки глаза [107]. В ряде случаев неэффективность терапии может приводить к развитию эндоокулярных септических процессов, что заканчивается функциональной и/или анатомической потерей глаза. Тяжёлое



глубокое поражение ткани роговицы приводит в ряде случаев к формированию рубцов с разной степенью утраты её прозрачности и/или преломляющих свойств, что приводит к полной или частичной утрате предметного зрения. Это определяет высокую степень значимости разработки эффективных методов терапии, учитывающих патогенетические механизмы повреждения ткани роговицы. Поэтому, на следующем этапе работы была смоделирована гнойная язва роговицы и изучено влияние лактоферрина на течение данной экспериментальной патологии.

Гнойную язву роговицы моделировали по методике Н.А. Адамовой (1990) [2]. В качестве инфицирующего агента использовалась чистая культура золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus* (АТСС 25923). Выбор возбудителя был обусловлен этиологией гнойной язвы роговицы в реальной клинической практике. По данным литературы в 16,4% случаев бактериальный кератит вызывает *Staphylococcus aureus* [263], а при травме роговицы его удельный вес как возбудителя увеличивается до 42,7% [81].

У всех животных контрольной группы (язва роговицы без лечения) патология сформировалась в течение 12-24 часов после внесения культуры. С 1 по 3 сутки опыта во всех сериях данной группы клиническая картина соответствовала стадии инфильтрации, с 3 по 7 сутки – изъязвления, с 7 по 21 сутки – эпителизации, с 21 по 28 сутки – формирования рубца.

Из стадии инфильтрации в стадию изъязвления перешли все глаза. В 46,7% случаев в фазах инфильтрации и изъязвления воспалительные изменения в виде инфильтрации, отёка стромы роговицы, эпителиопатии распространялись за зону нанесения первичного дефекта. В стадии изъязвления на 9 глазах сформировалось десцеметоцеле, закончившееся в 5 случаях перфорацией роговицы.

Гистологическая картина на первые сутки экспериментальной гнойной язвы соответствовала альтеративному и экссудативному воспалению. В зоне язвенного дефекта эпителий отсутствовал, в прилегающей зоне был истончён, с дегенеративными изменениями. В основном веществе роговицы,

определялась умеренно выраженная преимущественно нейтрофильно-клеточная воспалительная инфильтрация.

Согласно данным литературы, первоначально, независимо от причины повреждения, большинство кератоцитов (в том числе, и вокруг образовавшегося дефекта роговицы) погибает вследствие апоптоза, что может быть ответным механизмом на повреждение, предотвращающим распространение инфекции через эпителий в глубжележащие слои роговицы [277]. Хемокины, образующиеся при повреждении эпителия роговицы, подобно фактору, активирующему хемотаксис моноцитов, и колониестимулирующему фактору гранулоцитов, привлекают моноциты, гранулоциты, Т-лимфоциты и другие воспалительные клетки из лимбальной сосудистой сети [178]. Данные клетки начинают активно синтезировать цитокины, протеолитические ферменты, а также свободные радикалы (супероксидный анион-радикал) и их предшественники (хлорноватистую кислоту), направленные на нейтрализацию патогенного возбудителя [40, 96]:



Это приводит либо к регрессу заболевания и эпителизации роговицы, либо к некрозу и вовлечению в патологический процесс окружающих тканей при высокой патогенности микроорганизма или слабой резистентности макроорганизма [178].

Наряду с процессами альтерации и экссудации, сразу после повреждения, в роговице развиваются пролиферативные изменения. Экспериментальные исследования показали, что эпителиальные клетки начинают мигрировать к краю раны через несколько часов после повреждения [126].

К 3-7 суткам эпителиальная пролиферация, как и лейкоцитарная инфильтрация усиливались. Проллиферация эпителия приводила к увеличению слоев многослойного плоского эпителия в области язвенного дефекта. Накопление лейкоцитов, продуцирующих протеолитические

ферменты и свободные радикалы, в ряде случаев сопровождалось расплавлением окружающих тканей, увеличением изъязвления как в ширину, так и в глубину, и приводило к формированию десцеметоцеле и перфорации роговицы. К 7 суткам площадь язвенного дефекта достигала максимальной площади.

В данные сроки патологии (3-7 сутки) наблюдалась интенсификация процессов перекисного окисления липидов, что проявлялось повышением уровня конечного продукта пероксидации – МДА, снижением концентрации GSH, активности антиоксидантных ферментов SOD, GPx и GT. Снижению активности антиоксидантных ферментов предшествовало повышение активности GT – на вторые сутки и GPx – на третьи, что, скорее всего, является проявлением компенсаторной реакции, направленной на ускорение утилизации продуктов пероксидации. При дальнейшем нарастании окислительного стресса усиливалось повреждение клеток, накапливались конечные продукты пероксидации, что и проявлялось снижением активности антиоксидантных ферментов.

Данные биохимические изменения оксидантно-антиоксидантной системы играют важную роль в патогенезе гнойной язвы. Так, показано, что активные формы кислорода вызывают непосредственное повреждение стромальных гликозаминогликанов с последующим нарушением их свойств [117]. После атаки стромальных гликозаминогликанов активными формами кислорода они становятся менее устойчивыми к протеолизу тканевыми ферментами и фагоцитирующими клетками. В норме тройная спиральная структура коллагена, основного структурного вещества роговицы, резистентна к деградации большинством протеаз. Активные формы кислорода вызывают окислительную деструкцию коллагеновых фибрилл типа 1, что является первым этапом разрушения коллагена. На втором этапе происходит энзиматический протеолиз этих окисленно-модифицированных молекул [201], что приводит, в конечном итоге, к разрушению роговицы и язвообразованию [197].

На протяжении первых 6 суток эксперимента у животных контрольной группы с язвенного дефекта высевались колонии золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus*.

В дальнейшем происходило развитие репаративных процессов. Выраженность лейкоцитарной инфильтрации уменьшалась, в то время как пролиферация эпителиальных клеток и фибробластов усиливались. Одновременно снижалась выраженность окислительного стресса.

21 сутки язвы характеризовались разрастанием соединительной ткани, пролиферацией эпителия. В строме отмечалась инфильтрация фибробластами и единичными лейкоцитами. Площадь язвенного дефекта значительно сокращалась (до  $18,6 \pm 0,9\%$  от площади первоначального дефекта).

На 28 сутки эксперимента гистологическое строение роговицы характеризовалось явлениями фиброза и неоваскуляризации роговицы. Показатели свободнорадикального статуса роговицы достигали исходных значений.

Стандартная терапия гнойной язвы проводилась с использованием фторхинолона 2 поколения – ципрофлоксацина. Ципрофлоксацин – противомикробное средство широкого спектра действия, которое подавляет бактериальную ДНК-гиразу (топоизомеразы II и IV). Данные изменения приводят к нарушению синтеза ДНК, роста и деления бактерий, вызывают выраженные морфологические изменения и быструю гибель бактериальной клетки [74].

В настоящем исследовании терапия ципрофлоксацином в некоторых случаях перевела стадию инфильтрации в стадию эпителизации, уменьшила перифокальные воспалительные изменения в роговице, достоверно ускорила начало эпителизации, уменьшила количество интенсивных помутнений роговицы и, в некоторых случаях, привела к облаковидному помутнению роговицы, не влияя на количество помутнений средней интенсивности в исходе заболевания. Кроме того, практически в 2 раза уменьшилось

количество критических истончений роговицы (десцеметоцеле) и в 5 раз уменьшилось количество перфораций роговицы.

На 1 сутки гнойной язвы гистологическая картина роговицы животных, получавших ципрофлоксацин, существенно не отличалась от контрольной группы. Однако, с данного срока происходила интенсификация свободнорадикальных реакций, что проявлялось повышением концентрации МДА и снижением активности SOD. Данные изменения, скорее всего, связаны с бактерицидным действием используемого химиотерапевтического препарата, что приводило к интенсификации процессов липопероксидации.

На 3 сутки лечения ципрофлоксацином гистологическая картина роговицы соответствовала альтеративному и экссудативному воспалению, с выраженной эпителиальной пролиферацией.

На 5 сутки выраженность лейкоцитарной инфильтрации была значительно ниже, чем у животных контрольной группы. При биохимическом исследовании отмечалась дальнейшая интенсификация свободнорадикальных реакция (концентрация МДА оставался повышенной, уровень GSH и активность антиоксидантных ферментов снижались).

Начиная с 1 суток, инстилляцией ципрофлоксацина проявлялись снижением количества колоний золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus*, высеиваемых с язвенного дефекта, по сравнению с показателями животных контрольной группы, а с 6 суток они и вовсе не высеивались, что является доказательством его антибактериальной активности.

На 7-14 сутки отмечалась эпителизация роговицы, выраженность инфильтрации и отека стромы продолжала постепенно уменьшаться. На 14 сутки происходило значительное уменьшение площади язвенного дефекта (она равнялась  $55,8 \pm 2,4\%$  против  $78,2 \pm 2,1\%$  в контрольной группе без лечения).

С 14 суток также отмечалась нормализация свободнорадикального статуса роговицы животных.

21-28 сутки язвы характеризовались увеличением объёма соединительной ткани, пролиферацией эпителия, полным восстановлением целостности поверхности роговицы.

Сравнительный анализ применения в качестве монотерапии разных доз лактоферрина показал следующие результаты.

Инстилляцией лактоферрина в концентрации 0,5 мг/мл привели к достоверному относительно группы без лечения увеличению процента перехода стадии инфильтрации в стадию эпителизации, уменьшению процента изъязвлений, доли критического истончения роговицы и перфораций, и были сопоставимы с лечением ципрофлоксацином.

Использование лактоферрина 0,5 мг/мл привело к значимому снижению перифокальной воспалительной реакции. По критериям начала эпителизации и полной эпителизации данная группа достоверно превосходила группу без лечения и по всем характеристикам репаративных процессов серию лечения ципрофлоксацином.

Гистологическая картина роговицы на 1 сутки патологии существенно не отличалась от группы контрольных животных и животных, получавших ципрофлоксацин.

На 3 сутки патологии морфологическая картина отражала сочетание ранних стадий воспаления (альтерации и экссудации) с началом более поздней продуктивной стадии воспаления – пролиферации (регенерации эпителия роговицы).

5-7 сутки патологии соответствовали картине регенерации участка эпителия роговицы. В строме роговицы отмечалась инфильтрация лейкоцитами и фибробластами. Применение лактоферрина оказывало выраженный антиоксидантный эффект. Концентрация МДА повышалась только на 3 и 5 сутки эксперимента, уровень GSH снижался с 1 суток патологии и нормализовался к 7 суткам, активность SOD снижалась только на 5 сутки патологии, а GT – на 3 и 5 сутки. Однако, активность GPx снижалась с 1 суток гнойной язвы роговицы, достигала минимального

значения на 5 сутки и оставалась сниженной до 14 суток эксперимента. На протяжении первых 6 суток эксперимента у животных, получавших лактоферрин в концентрации 0,5 мг/мл, с язвенного дефекта высевались колонии золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus*, однако, стоит отметить, что на 4-6 сутки это были единичные колонии.

На 14-21 сутки эксперимента продолжалась регенерация эпителия роговицы. В строме отмечались участки разрыхления волокон и пролиферации клеток фибробластического ряда. На 14 сутки площадь язвенного дефекта у животных данной группы была значительно меньше показателей контрольных животных ( $22,9 \pm 1,4\%$  против  $78,2 \pm 2,1\%$ ).

На 21 день морфологическая картина представляла собой участок эпителия роговицы с нарушенной (хаотичной) репаративной регенерацией. Однако, исходы репаративных процессов по прозрачности роговицы были значимо хуже, чем при терапии ципрофлоксацином и без лечения.

Применение лактоферрина в концентрации 1,5 мг/мл достоверно снизило долю изъязвлений и перифокальной воспалительной реакции и было сопоставимо по этим критериям с применением лактоферрина в концентрации 0,5 мг/мл, но уменьшило количество десцеметоцеле. По критериям начала эпителизации, фасетки и полной эпителизации эта группа была сопоставима с группой лактоферрина 0,5 мг/мл и достоверно превосходила группы без лечения и лечения ципрофлоксацином. Эту группу отличало появление гиперплазии эпителия в фазе эпителизации в небольшом проценте случаев. Исходы были сопоставимы с группой лактоферрина 0,5 мг/мл.

Морфологическое строение роговицы при введении лактоферрина в концентрации 1,5 мг/мл было сходным с гистологической картиной роговицы при введении лактоферрина в концентрации 0,5 мг/мл на протяжении всего эксперимента. Однако, обращало на себя внимание раннее начало и выраженное течение процессов пролиферации и эпителизации. На 12 сутки усиленная пролиферация эпителия сохранялась.

Лактоферрин в концентрации 1,5 мг/мл оказывал выраженное антибактериальное действие. Уже на третьи сутки гнойной язвы на фоне инстиляции тестируемого вещества при посеве материала с поверхности роговицы колонии золотистого *Staphylococcus aureus* не высеивались.

Применение лактоферрина (концентрация 1,5 мг/мл) также проявляло выраженный антиоксидантный эффект. Уровень МДА достоверно повышался только на 3 сутки эксперимента, концентрация GSH также снижалась только на 3 сутки, активность SOD и GT повышались на 7 сутки, а GPx – на 3 сутки по сравнению с показателями интактных животных.

Применение лактоферрина в концентрации 2,5 мг/мл достоверно уменьшило долю изъязвлений (в 2 раза относительно группы без лечения и в 1,5 раза относительно группы лечения ципрофлоксацином), но было сопоставимо с группой лечения ципрофлоксацином по выраженности перифокальной воспалительной реакции и, что важно, эта реакция была выражена в большем проценте случаев, чем при применении лактоферрина в концентрациях 0,5 мг/мл и 1,5 мг/мл.

Лактоферрин в концентрации 2,5 мг/мл в 2 раза уменьшил количество десцеметоцеле по сравнению с лактоферрином в концентрации 1,5 мг/мл и практически в 4 раза по сравнению с группой без лечения. По скорости начала репаративных процессов лактоферрин 2,5 мг/мл превосходил все предыдущие группы лечения, но, окончательная полная эпителизация наступала достоверно позже, чем при применении лактоферрина 0,5 и 1,5 мг/мл и достоверно не отличалась как от группы без лечения, так и от группы с лечением ципрофлоксацином. Причём, гиперплазия эпителия наблюдалась практически в половине случаев. Также характерно, что формирование фиброцеллюлярной ткани начиналось до момента полной эпителизации дна язвы. В исходе по количеству интенсивных помутнений этот вид лечения превосходил все предыдущие.

В гистологической картине течения гнойной язвы на фоне применения лактоферрина обращали на себя внимание раннее начало и выраженное



течение эпителиальной пролиферации. При этом воспалительные изменения были выражены в меньшей степени и к 5 суткам практически полностью проходили. К 12 суткам эпителиальная пролиферация сохранялась и характеризовалась наличием крупного и удлинённого клеточного пролиферата, состоящего более чем из 10 слоев.

Лактоферрин в концентрации 2,5 мг/мл обладал выраженным антибактериальным действием. Уже с первых суток с поверхности роговицы высевались лишь единичные колонии золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus*, а с третьего дня колонии не вырастали.

При использовании лактоферрина (концентрация 2,5 мг/мл) концентрация МДА и содержание GSH превышали показатели интактных животных на 21 сутки эксперимента, активности GPx и GT достоверно от них не отличались. Активность SOD достоверно снижалась на 1 сутки эксперимента и повышалась на 7 сутки. Полученные результаты могут быть связаны с активной регенерацией эпителия на поздних сроках исследования. Показано, что при активной пролиферации клеток повышается продукция свободных радикалов [125].

Применение лактоферрина в концентрации 5 мг/мл во многом было аналогично лактоферрину в концентрации 2,5 мг/мл, но превосходило последний по количеству глаз с перифокальным воспалением. Эпителизация начиналась раньше в среднем на 1,5 суток, однако, заканчивалась на 1,5 суток позже, причем, гиперплазия эпителия наблюдалась более чем в 80% случаев.

Использование лактоферрина (концентрация 5 мг/мл) сопровождалось уменьшением площади дефекта роговицы на 7 – 14 сутки как в сравнении с показателями животных контрольной группы (гнойная язва без лечения), так и в сравнении с животными, получавшими ципрофлоксацин.

Исходы и гистологическая картина роговицы были аналогичны показателям животных, получавших лактоферрин в концентрации 2,5 мг/мл.

Лактоферрин в концентрации 5 мг/мл оказывал выраженное антибактериальное действие. Уже на третьи сутки гнойной язвы на фоне инстиляции тестируемого препарата при посеве материала с поверхности роговицы колонии золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus* не высеивались.

При применении лактоферрина в концентрации 5 мг/мл исследуемые показатели оксидантной-антиоксидантной системы на протяжении всего эксперимента достоверно от значений интактных животных не отличались. Лишь концентрация МДА, GSH, активность GT превышали их на 21 сутки эксперимента, что также, скорее всего, свидетельствует об активной пролиферации эпителиальных клеток.

**Таким образом, в данном исследовании установлено, что при экспериментальной стафилококковой гнойной язве роговицы лактоферрин в разных концентрациях оказывает выраженное антибактериальное, репаративное и антиоксидантное действие.**

Согласно данным литературы, лактоферрин является одним из основных белков слезной жидкости и содержится в ней в концентрациях выше, чем 2 мг/мл [179]. Основной функцией лактоферрина является защита поверхности глаза от вторжения микроорганизмов за счет его выраженных антибактериальных свойств [104].

Принято считать, что в низких концентрациях лактоферрин оказывает бактериостатическое действие за счет связывания железа, и лишения, таким образом, бактериальной микрофлоры необходимого для ее роста и жизнедеятельности микроэлемента [142].

В высоких концентрациях лактоферрин оказывает бактерицидное действие, которое реализуется за счет его связывания с бактериальной мембраной. В 1988 году было показано [137], что лактоферрин повреждает внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий посредством связывания с липидом А липополисахарида. Положительно заряженный N-конец белка препятствует взаимодействию липополисахарида с катионами  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$

бактериальной мембраны, вызывая высвобождение липида А, с последующим повреждением мембраны и гибелью бактерии [136]. Взаимодействие лактоферрина с липополисахаридом, кроме того, усиливает действие такого природного антибактериального агента, как лизоцим [157].

Действие лактоферрина в высоких концентрациях против грамположительных бактерий основано на связывании положительно заряженного белка с анионными молекулами бактериальной поверхности, такими как липотейхоевая кислота. В результате отрицательный заряд клеточной стенки уменьшается, способствуя взаимодействию лизоцима с пептидогликаном и расщеплению последнего [8].

Помимо лизоцима описано синергетическое действие лактоферрина с различными антибиотиками [137], а также с бактериофагами [253].

Кроме того, лактоферрин может препятствовать прикреплению некоторых бактерий к клетке хозяина. Механизм этого действия точно не установлен, но предполагают, что углеводный фрагмент лактоферрина связывает бактериальные компоненты, отвечающие за прикрепление, подавляя их взаимодействие с рецепторами клетки [157].

Исследования показывают, что за бактерицидные свойства лактоферрина ответственна катионная область в N-концевом участке молекулы (пептид, получивший название лактоферрицин) [108, 152]. Пептиды, содержащие эту катионную область лактоферрина человека (остатки аминокислот 18-40), проявляют более сильный бактерицидный эффект.

Из данных литературы известно, что лактоферрин принимает активное участие в процессе ранозаживления, способствуя физиологическому протеканию воспаления, грануляции и эпителизации [148]. Y. Takayama et al. показали в системе *in vitro*, что лактоферрин способствует фибробласт-опосредованному уплотнению коллагена посредством стимулирующего влияния на фибробласты. Лактоферрин индуцирует пролиферативную активность фибробластов и консолидацию коллагена [247]. Вероятно, это

действие лактоферрина обусловило отмеченное в настоящем исследовании активное развитие рубцовой ткани в области язвенного дефекта.

Выявленное уменьшение выраженности местного окислительного стресса при применении лактоферрина при гнойной язве роговицы у кроликов, по сравнению с показателями животных без лечения, может быть связано как с антибактериальной активностью изучаемого вещества, так и с его антиоксидантными свойствами.

Принято считать, что прямая антиоксидантная активность лактоферрина обусловлена его способностью связывать железо, блокируя, таким образом, развитие реакций Фентона и Хабер-Вайса [8].

Так, в опытах *in vitro* на липосомах из мозга крупного рогатого скота показано, что лактоферрин подавляет железоиндуцированное аскорбатзависимое перекисное окисление липидов. При этом насыщение лактоферрина железом нивелирует его антиоксидантную активность [168].

Кроме того, в ксантин-ксантинооксидазной модельной системе *in vitro* показано, что лактоферрин ингибирует образование гидроксильных радикалов [183].

Однако, позже было выявлено, что лактоферрин может подавлять ПОЛ (образование гидропероксидов, гексенала и флюоресценции), связывая железо участками молекулы, отличными от активных центров. Неспецифическим связыванием металла может быть объяснено антиоксидантное действие лактоферрина при молярном соотношении железо: белок выше, чем 2:1 [188].

Кроме того, исследования последних лет показали, что антиоксидантное действие лактоферрина заключается также в активации ферментов антиоксидантной системы [128].

Непрямая антиоксидантная активность лактоферрина может реализоваться за счет стимуляции гликолиза, приводя к повышенному образованию АТФ, что необходимо для поддержания ионного градиента, мембранного потенциала и морфологии эритроцитов [249].

Лактоферрин может участвовать в окислительно-восстановительных реакциях в клеточной мембране, которые приводят к активации  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмена [185], так лактоферрин может участвовать в поддержании оптимального ионного градиента и пролиферации клеток.

Лактоферрин стимулирует митоген-активированную протеинкиназу (МАРК) в клеточной линии лимфобластов человека [189] и нейтрофилах [164]. Эти эффекты, вероятно, опосредованы взаимодействием лактоферринового рецептора и лактоферрина [249].

Разнонаправленные изменения свободнорадикального статуса роговицы при инстилляции лактоферрина в концентрациях 1,5 мг/мл, 2,5 мг/мл и 5 мг/мл могут быть объяснены следующим образом.

При введении лактоферрина в концентрации 1,5 мг/мл происходило снижение выраженности окислительного стресса, что проявлялось повышением концентрации МДА и снижением GSH по сравнению с показателями интактных животных лишь на 3 сутки и существенным улучшением данных показателей с 5 по 14 сутки по сравнению с показателями контроля. Активности антиоксидантных ферментов не только не снижались по сравнению с показателями интактных животных, но даже увеличивались (активность SOD повышалась на 7 сутки, GPx – на 3 сутки, GT – на 7 сутки). Данные результаты, скорее всего, характеризуют проявление индукции антиоксидантных ферментов вследствие активизации свободнорадикального окисления. Повышение емкости антиоксидантной системы вследствие этого подавляет свободнорадикальные реакции, что и снижает выраженность окислительного стресса (не происходит дальнейшего повышения уровня МДА, снижения концентрации GSH и активности антиоксидантных ферментов).

При введении лактоферрина в концентрации 2,5 мг/мл изучаемые показатели оксидантной-антиоксидантной систем достоверно не изменялись по сравнению с показателями интактных животных, лишь активность SOD достоверно снижалась на 1 сутки эксперимента и повышалась на 7 сутки, а

концентрация МДА и GSH превышали показатели интактных животных на 21 сутки эксперимента. При этом выраженность окислительного стресса существенно снижалась по сравнению с показателями контрольных животных. Данные изменения свидетельствуют о том, что средняя концентрация лактоферрина существенно подавляла образование свободных радикалов и развитие окислительного стресса, при этом, индукции активности SOD хватало для предотвращения развития окислительного стресса (активность других ферментов достоверно не изменялась по сравнению с показателями интактных животных).

При применении лактоферрина в концентрации 5 мг/мл изучаемые биохимические показатели достоверно не изменялись по сравнению со значениями интактных животных: не происходила ни индукция, ни ингибирование. Лишь содержание МДА и GSH и активность GT превышали их на 21 сутки эксперимента. При этом данные показатели были значительно лучше показателей контрольных животных. Видимо, высокая концентрация лактоферрина настолько выражено подавляла свободнорадикальные реакции, что активизация собственной антиоксидантной системы не происходила.

Повышение концентрации МДА и GSH (при введении лактоферрина в концентрациях 2,5 мг/мл и 5 мг/мл) и активности GT (при введении лактоферрина в концентрации 5 мг/мл) может быть связано с активной регенерацией эпителия на поздних сроках исследования.

Учитывая полученные результаты о наличии в одном глазу сочетания морфологической картины ранних стадий воспаления (альтерации и экссудации) с более поздней продуктивной стадией воспаления – пролиферацией (регенерацией эпителия роговицы), задержке полной эпителизации дна дефекта и избыточном образовании непрозрачной рубцовой ткани, при применении лактоферрина в концентрациях 1,5, 2,5 и 5 мг/мл мы предложили адекватную концентрацию лактоферрина – 0,5 мг/мл

для комбинированного применения с антибактериальным препаратом ципрофлоксацином.

Применение данной комбинации привело к доминированию перехода стадии инфильтрации в стадию эпителизации дефекта, существенному уменьшению доли глаз с выраженной перифокальной воспалительной реакцией, сокращению сроков начала эпителизации (на 7 дней относительно группы без лечения, на 3 дня относительно группы лечения ципрофлоксацином и лактоферрином 0,5 мг/мл), образования фасетки (на 11 дней относительно группы без лечения, на 8 дней – относительно группы лечения ципрофлоксацином и 5 дней – относительно группы лактоферрин 0,5 мг/мл) и полной эпителизации (на 11 дней относительно группы без лечения, на 8 дней – относительно группы лечения ципрофлоксацином и 4 дня – относительно группы лактоферрин 0,5 мг/мл). Начало формирования рубца было сопоставимо с группой лечения лактоферрином 0,5 мг/мл и наступало раньше, чем при применении ципрофлоксацина. Интенсивность помутнений в исходе была сопоставима с группой лечения лактоферрином 0,5 мг/мл по количеству интенсивных помутнений и превосходила по этому критерию группы без лечения и лечение ципрофлоксацином.

Использование комбинации лактоферрина и ципрофлоксацина (концентрация 0,5 мг/мл) сопровождалось уменьшением площади дефекта роговицы на 7 сутки – 14 сутки как по сравнению с показателями животных контрольной группы (гнойная язва без лечения), так и по сравнению с животными, получавшими ципрофлоксацин.

Гистологически на 1-3 сутки патологии отмечалась картина альтеративного и экссудативного воспаления, на 3-5 сутки – регенерация эпителия. На 7-14 сутки исследования роговица на всем протяжении имела обычное строение, а на 21 сутки наблюдалось утолщение эпителия роговицы, увеличивалось количество стромы, преимущественно за счет увеличения соединительнотканых волокон.

При проведении бактериологического исследования уже на третьи сутки гнойной язвы на фоне инстилляций тестируемых веществ при посеве материала с поверхности роговицы колонии золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus* не высевались.

На фоне применения лактоферрина в составе комплексной терапии экспериментальной гнойной язвы в сравнении с показателями интактных животных, не подвергающихся моделированию гнойной язвы, отмечались следующие изменения. Уровень МДА повышался на 2 и 3 сутки гнойной язвы, концентрация GSH повышалась на 28 сутки исследования, активность SOD уменьшалась на 5 и 7 сутки гнойной язвы, активность GPx снижалась только на 7 сутки гнойной язвы. Активность GT увеличивалась на 3 сутки патологии, оставалась повышенной на 5 сутки, и снижалась на 7 сутки по сравнению с показателями интактных животных и нормализовывалась к 14 суткам.

Исходя из полученных биохимических, морфологических и клинических результатов лечения, мы сделали вывод об эффективности использования комбинации и потенцировании клинического эффекта составных компонентов лечения.

Однако, 2/3 глаз имели в исходе интенсивное помутнение роговицы, что нельзя расценивать как хороший результат лечения. Учитывая известный факт стимуляции репаративных процессов лактоферрином, мы сочли целесообразным применить комбинацию до момента окончания формирования полноценного слоя эпителия на дне язвы, то есть до начала формирования рубца.

Результаты такой схемы применения ципрофлоксацина и лактоферрина 0,5 мг/мл не изменили характера течения патологического процесса, количеств тяжёлых осложнений фазы изъязвления, но привели к тому, что в 1/3 случаев значимого помутнения не сформировалось, в 1/3 случаев сформировалось облаковидное помутнение и только в 1/3 случаев сформировалось помутнение средней интенсивности.



Гистологически на 21-28 сутки исследования роговица на всем протяжении имела обычное строение, ее многослойный плоский эпителий имел 4-6 слоев клеток, собственное вещество состояло из плотно расположенных коллагеновых волокон и редких фибробластов между ними.

**Таким образом, установлено, что наилучший эффект при гнойной язве роговицы в составе комплексной терапии с ципрофлоксацином дает лактоферрин в концентрации 0,5 мг/мл, инстилляций по 2 капли 4 раза в день при использовании в течение 14 дней – до момента окончания формирования полноценного слоя эпителия на дне язвы, то есть до начала формирования рубца.**

Острые нарушения кровообращения в сосудах сетчатки (центральная артерия и вена сетчатки) – тяжёлые дисциркуляторные заболевания глаза, характеризующиеся неблагоприятным функциональным прогнозом вплоть до полной утраты предметного зрения. В литературе показана взаимосвязь данной патологии с системной патологией сосудов (атеросклероз, гипертоническая болезнь, дисциркуляторные заболевания головного мозга и др.). Учитывая неуклонный рост заболеваемости сердечно-сосудистой патологией, актуальность поиска оптимальных способов лечения острой сосудистой патологии органа зрения увеличивается [75, 76].

Поэтому, на заключительном этапе исследования, оценивалось влияние оригинального отечественного нейропротектора ноопепта на состояние сетчатки при экспериментальном эндовазальном тромбозе ее сосудов.

Тромбоз сосудов сетчатки моделировали внутривенным введением фотосенсибилизатора бенгальского розового с последующим транспупиллярным облучением белым светом височной сосудистой аркады.

В основе данной модели лежит способность фотосенсибилизатора бенгальского розового под воздействием света  $\lambda=560$  нм генерировать активные формы кислорода, что приводит к повреждению сосудистой стенки и тромбированию сосудов. Преимуществами данной модели являются селективность, направленность воздействия, малая травматичность. При этом

избирательно поражаются клетки эндотелия сосудов, и происходит минимальное воздействие на окружающие ткани [1998].

Офтальмоскопически через 1 час после визуального подтверждения формирования модели (окклюзии темпоральной артериальной аркады с прекращением кровотока) наблюдали отсутствие кровотока дистальнее окклюзии в артериальном русле, побледнение сетчатки, единичные преретинальные микрогеморрагии проксимальнее окклюдированного участка, незначительную проминенцию пучка миелиновых волокон в зоне кровоснабжения поражённой артерии.

Изменения активно прогрессировали – к концу первых суток артериальное русло ниже окклюзии не визуализировалось, кровоизлияния несколько увеличились, приобретая форму небольших штрихов, появился секторальный отёк диска зрительного нерва, проминенция пучка миелиновых волокон увеличилась, отмечался умеренный венозный стаз. Гистологически наблюдался тромбоз ретинальных сосудов, кистовидные полости в слое нервных волокон. Четко визуализировался отек в наружном плексиформном слое. Данная картина характерна для начальной гипоксии в зоне ответственности ретинального кровотока.

При этом, в сетчатке происходила активация процессов свободнорадикального окисления, о чем свидетельствует увеличение концентрации МДА – конечного продукта пероксидации, снижение уровня GSH, уменьшение активности антиоксидантных ферментов – SOD, GPx, GT.

Считается, что при значительном и достаточно быстром образовании свободных радикалов происходит подавление нормальных клеточных антиоксидантных защитных механизмов, вызывающее окислительный стресс и различные типы повреждения тканей [101], что и было показано нами в сетчатке при моделировании тромбоза ее сосудов.

Одновременно с этими изменениями происходило нарушение аминокислотного состава сетчатки – снижался уровень глутамата, глицина и таурина.

Глутамат – главный возбуждающий нейротрансмиттер в сетчатке. Он высвобождается фоторецепторами, биполярными и ганглиозными клетками [241]. Если уровень глутамата остается повышенным достаточно долго, это может привести возбужденные нейроны к гибели за счёт эксайтотоксичности.

В настоящее время принято считать, что этот процесс играет ведущую роль в патогенезе ишемического повреждения сетчатки. Избыточное накопление глутамата активирует ионотропные NMDA- и AMPA-подтипы рецепторов, вызывая массивный приток ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму постсинаптического нейрона.

Кальций, в свою очередь, запускает ряд процессов: активацию функционирования дыхательной цепи митохондрий с увеличением утечки супероксидного анион-радикала и гидроксильного радикала; активацию НАДФН<sub>2</sub>-оксидазы, в результате чего повышается содержание супероксидного анион-радикала; активацию NO-синтазы, что приводит к накоплению NO; активацию гемоксигеназы, которая переводит  $\text{Fe}^{3+}$  в  $\text{Fe}^{2+}$ .

Все перечисленные процессы интенсифицируют ПОЛ, в ответ происходит активация антиоксидантной системы защиты клетки. При гипоксии наблюдается ее истощение, что приводит к развитию окислительного стресса и к гибели нервных клеток путем апоптоза или некроза в зависимости от степени их повреждения [16].

Таурин – серосодержащая аминокислота, детектируемая преимущественно в амакринных клетках. Его содержание в сетчатке существенно превосходит уровень в мозговой ткани. Считается, что таурин в сетчатке выполняет следующие функции: защита фоторецепторов на внешних сегментах палочек, подверженных воздействию света и химических веществ; регуляция транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  внутрь клетки; регулирование сигнальной трансдукции за счет ингибирующего действия таурина на фосфорилирование белков [84].

ГАМК и глицин являются основными тормозными медиаторами сетчатки. Наличие ГАМК выявлено в популяции горизонтальных, биполярных, амакринных и интерплексиформных клеток. Более половины всей популяции амакринных клеток содержат глицин [44].

Тормозные медиаторы, такие как ГАМК и глицин, способны подавлять действие глутамата на нейроны, поскольку они вызывают гиперполяризацию и противодействуют деполяризации, вызванной глутаматом [240], то есть, играют защитную роль.

В физиологическом состоянии уровни нейромедиаторов во внеклеточном пространстве поддерживаются на стационарно низком уровне, так как нейроны и глия эффективно удаляют нейромедиаторы из синаптической щели после их высвобождения.

Выявленное в нашем исследовании снижение уровня аминокислот в сетчатке, скорее всего, связано с их выделением в межклеточное пространство и снижением их уровня в изучаемой ткани [155].

На общей (максимальной) ретинограмме отмечалось увеличение амплитуды  $b$  волны и отношения амплитуды  $b$  волны к амплитуде  $a$  волны. Большинство исследователей связывают происхождение  $b$  волны с активностью биполяров и клеток Мюллера, не исключают вклад ганглиозных клеток сетчатки [82, 83]. Повышение амплитуды  $b$  волны в первые сутки экспериментального тромбоза сосудов сетчатки может являться проявлением гипервозбуждения данных нейронов, на фоне снижения кровотока в сосудах сетчатки. Данные изменения согласуются с динамикой содержания аминокислот в сетчатке.

Амплитуда  $a$  волны не изменялась, так как она отражает функционирование фоторецепторов, питающихся от хороидеи.

К 3 суткам тромбоза сосудов сетчатки выраженность окислительного стресса нарастала и достигала своего максимума: в еще большей степени увеличивалась концентрация МДА, снижался уровень GSH, уменьшалась активность GPx и GT. В то же время аминокислотный состав сетчатки

нормализовывался и достоверно от показателей интактных животных не отличался.

На ретинограмме происходило снижение амплитуды *b* волны и увеличение ее лаг-фазы, что свидетельствует об уменьшении функциональной активности нейронов во внутренних слоях сетчатки. При этом, *a* волна не изменялась [82].

Биохимические изменения сопровождались следующими морфологическими нарушениями. Постепенно нарастал отёк сетчатки, увеличилась проминенция слоя миелиновых волокон, у всех животных появились признаки частичной магистральной реканализации артериального русла в виде появления кровотока на пике пульсового давления ниже зоны окклюзии, в 2 глазах несколько увеличились кровоизлияния.

К 7 суткам признаки магистральной реканализации увеличились, крупные артерии ниже зоны окклюзии визуализировались в виде тонких сосудистых русел в 95% экспериментальных глаз. Секторальный отёк диска зрительного нерва, сетчатки и слоя миелиновых волокон сохранялся. Преретинальные кровоизлияния находились в фазе рассасывания разных степеней. Магистральные вены оставались полнокровными с признаками стаза в венах 1-2 порядков.

Отмечалось отчетливое разделение утолщенными отростками Мюллеровских клеток слоя нервных волокон на отдельные сегменты. На этом фоне можно было отметить появление отдельных нервных волокон с гиперхромно окрашенными, имеющими нечеткие границы миелиновыми оболочками, что, на наш взгляд, является результатом постепенно и неравномерно развивающейся демиелинизации нервных волокон в условиях гемодинамической гипоксии. На периферии отмечалась частичная атрофия, главным образом, внутренних слоев сетчатки, субретиальный отек с фрагментарной потерей подлежащего ретинального пигментного эпителия.

К 7 суткам начинал восстанавливаться свободнорадикальный статус сетчатки: нормализовывался уровень МДА, активности SOD и GT.

Сниженными оставались только уровень GSH и активность GPx. В то же время в сетчатке наблюдалось значительное увеличение концентрации возбуждающих и тормозных аминокислот: аспартата, глутамата, глицина и ГАМК.

Аспартат, аналогично глутамату, является возбуждающим нейромедиатором и функционирует главным образом в синапсах фоторецепторов [44].

Накопление аминокислот в сетчатке, выявленное в нашем исследовании, вероятно, обусловлено их повышенным образованием и нарушением обратного захвата [228] и может провоцировать развитие глутаматной эксайтотоксичности и усугублять деструктивные процессы в сетчатке.

К 14 суткам признаки отёка диска зрительного нерва, сетчатки и слоя миелиновых волокон уменьшились, визуализировалось лишь секторальное побледнение диска зрительного нерва. Наблюдались признаки восстановления магистрального кровотока особенно со стороны назальных аркад. Однако, артериолярные сосуды оставались сужеными и практически не визуализировались. Просвет магистральных вен был в сравнении с назальной аркадой незначительно шире, вены 1-2 порядков также имели более широкий просвет. В этот срок обращало на себя внимание увеличение процессов демиелинизации (точечная гиперхромия) в слое нервных волокон, смазанность границ между ними. Наблюдался отек в обоих плексиформных слоях, в субретинальном пространстве и волнообразный контур ретинального пигментного эпителия. Следует отметить, что к этому сроку рассасывались кровоизлияния во всех глазах.

На 14 сутки практически восстанавливался свободнорадикальный статус сетчатки, концентрация МДА, активность SOD, GT, GPx достоверно от показателей нормы не отличались, оставался сниженным только уровень GSH.

Концентрация аминокислот (аспартата, глицина, таурина) также нормализовывалась, оставалось повышенным только содержание глутамата и ГАМК.

К 28 суткам кроме секторального побледнения других изменений со стороны диска зрительного нерва не отмечено. Проминенция слоя миелиновых волокон отсутствовала, их плотность была визуальна меньше по сравнению с интактной зоной сетчатки. Просвет артерий и вен сохранялся без существенной динамики в сравнении с 14 сутками наблюдения.

Отмечено формирование ограниченного (до 2-3 диаметров диска зрительного нерва) хориоретинального очага с депигментированными участками. В ретинальном сосудистом русле менее выраженной была неравномерность диаметра и степень заполнения форменными элементами крови, хотя часть капиллярного русла оставалась редуцированной.

Следствием перенесенной гипоксии сетчатки мы считаем разрастание глиальной ткани (отростков Мюллеровских клеток), разделяющей слой миелинизированных нервных волокон на сегменты. Наблюдалось увеличение нервных волокон с гиперхромными миелиновыми оболочками на фоне слабо окрашенных атрофирующихся волокон. В результате общая плотность нервных волокон в сравнении с предыдущим сроком наблюдения снижалась. Контуры нервных волокон становились нечеткими, размытыми, появлялись также микрокисты, нередко сливные, развивалась заместительная гипертрофия отростков Мюллеровских клеток, индуцирующих вертикальную сегментацию слоя нервных волокон. Отмечался отёк и слабое прокрашивание вторых и третьих нейронов, в меньшей степени – первых, получающих питание из хориокапиллярного слоя, что подтверждает модель окклюзии именно собственных сосудов сетчатки.

На электроретинограмме отмечалось снижение амплитуды *b* волны и увеличение ее лаг-фазы по сравнению с показателями нормы. В то же время амплитуда *a* волны не изменялась.

К 84 суткам наблюдения развивалась секторальная атрофия диска зрительного нерва, уменьшалось количество миелиновых волокон в темпоральном пучке, сохранялась описанная разница сосудистого русла в интактной и патологической зонах сетчатки, наблюдался ограниченный участок (до 2-3 диаметров диска зрительного нерва) диспигментированной хориоидальной атрофии.

Артериальные ретинальные сосуды оставались суженными, в том числе, за счет утолщения стенки (плазматическое пропитывание, перешедшее в гиалиноз). Помимо вертикальной сегментации слоя нервных волокон появлялась горизонтальная сегментация глиально-васкулярной тканью, направленная ингибировать ишемическое состояние сетчатки на границе водораздела ретинального и хориокапиллярного кровотоков. Однако, послойная структура наружных слоев сетчатки была уже необратимо утрачена. На периферии сетчатки миелинизированные нервные волокна располагаются в виде отдельных сегментов. Отсутствовали функционирующие ретинальные капилляры, что является наиболее вероятной причиной четко визуализируемой дегенерации оптической сетчатки и ее замещения пролиферирующей глиальной тканью.

На общей (максимальной) ретинограмме сохранялось снижение амплитуды  $b$  волны и увеличение ее лаг-фазы, что свидетельствует о том, что к 84 сут не происходило восстановления функциональной активности нейронов во внутренних слоях сетчатки [82].

При использовании классического ноотропа – пирацетама для лечения экспериментального тромбоза сосудов сетчатки были получены следующие результаты. Применение пирацетама оказывало ретинопротекторное действие, которое проявлялось снижением отека диска зрительного нерва и миелиновых волокон, улучшением гемодинамики, сохранением послойного строения сетчатки. Функциональное состояние нейронов сетчатки, оцененное с помощью электроретинографии, на 3-10 сутки патологии улучшалось, что проявлялось в нормализации амплитуды  $b$  волны.



При этом пирацетам не оказывал значимого антиоксидантного действия, оцениваемые параметры выраженности окислительного стресса (концентрация МДА, уровень GSH, активность SOD, GPx, GT) статистически значимо от показателей контрольных (без лечения) животных не отличались.

Скорее всего, полученные результаты связаны с механизмом действия пирацетама. Пирацетам – циклическое производное ГАМК, оказывающее мембранотропное действие, повышающее активность аденилаткиназы, усиливающее утилизацию глюкозы клетками, повышающее плотность холинорецепторов, активирующее AMPA глутаматные рецепторы [1, 65].

Аналогичные результаты, но выраженные в большей степени, были получены при применении ноопепта для лечения экспериментального тромбоза сосудов сетчатки.

Ноопепт оказывал ретинопротекторное действие, которое проявлялось в большей сохранности миелиновых волокон, уменьшении площади деколорации диска зрительного нерва, снижении его отека, ускорении восстановления кровотока по магистральным сосудам и сохранении послойного строения сетчатки.

Применение ноопепта при тромбозе сосудов сетчатки вызывало нормализацию содержания аминокислот в сетчатке на протяжении всего эксперимента. Показатели, полученные при исследовании сетчатки ишемизированных кроликов, леченных ноопептом, достоверно не отличались от показателей интактных животных. Это свидетельствует о том, что данный нейропротективный препарат восстанавливает нарушенный ишемией баланс нейромедиаторов в сетчатке, а также препятствует развитию глутаматной эксайтоксичности. Полученные результаты согласуются с данными, полученными ранее *in vitro* о замедлении под влиянием ноопепта высвобождения глутамата кортикальными нейронами [11].

Ноопепт улучшал электрическую активность нейронов сетчатки, что проявлялось снижением амплитуды  $b$  волны и отношения амплитуды  $b$

волны к амплитуде  $a$  волны на ретинограмме на 1 сутки и их увеличением на 3, 10, 28, 56 и 84-е сутки по сравнению с контрольными животными.

Данные изменения свидетельствуют о том, что на 1 сутки ноопепт предупреждал гипервозбуждение нейронов, а на 3-84-е сутки предотвращал снижение их активности. Особенно стоит отметить эффект ноопепта на 84 сутки, что является косвенным подтверждением способности ноопепта уменьшать выраженность атрофии сетчатки при экспериментальном тромбозе на данном сроке эксперимента [82].

При этом, по способности улучшать функциональное состояние нейронов ноопепт превосходил пирацетам, что выражалось в снижении амплитуда  $b$  и отношения амплитуды  $b$  волны к амплитуде  $a$  волны при введении ноопепта на 1 сутки и их повышении на 28, 56 и 84 сутки.

При сравнении показателей свободнорадикального статуса сетчатки контрольных животных и кроликов, которым вводился ноопепт, показано, что концентрация МДА у животных, получавших ноопепт, была достоверно ниже показателей контрольных животных на 3 и 7 сутки соответственно, а активность GT на 1 сутки патологии их превышала, что свидетельствует о том, что ноопепт способен подавлять развитие окислительного стресса в сетчатке при экспериментальном тромбозе ее сосудов.

Ноопепт (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина) разработан на основе оригинальной гипотезы пептидного дизайна, согласно которой с использованием соответствующих аминокислот воспроизводятся структуры, близкие к известным психотропным средствам [61].

Непептидным прообразом ноопепта был ноотропный препарат пирацетам. Молекулярные механизмы действия ноопепта в настоящее время активно изучаются. Показано, что ноопепт (10 мкМ) увеличивает ДНК-связывающую активность HIF-1, транскрипционного фактора, запускающего адаптивные процессы в ответ на гипоксическое воздействие, не влияя на активность других транскрипционных факторов (CREB, NFAT, NF-κB, p53, STAT1, GAS, VDR и HSF1). В условиях стабилизации HIF-1, вызванной

индуктором гипоксии  $\text{CoCl}_2$ , ноопепт вызывает дополнительное повышение ДНК-связывающей активности HIF-1 [216] (Вахитова Ю.В. и др., 2016). Данное действие ноопепта может лежать в основе его многочисленных фармакологических эффектов, в том числе описанного выше биологического эффекта ноопепта на модели тромбоза сосудов сетчатки.

**Таким образом, в результате настоящего исследования установлено, что при экспериментальном тромбозе сосудов сетчатки ноопепт, при внутривенном введении сразу после моделирования патологии в дозе 0,5 мг/кг массы, а затем при введении три раза в день per os в дозе 10 мг/кг массы оказывает ретинопротекторное действие, улучшает функциональное состояние нейронов, нормализует концентрацию глутамата, ГАМК, глицина и аспартата и снижает выраженность окислительного стресса в сетчатке.**

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе на трёх экспериментальных моделях патологий глаза, представляющих основные виды типичных патологических процессов (дегенеративно-дистрофический, воспалительный и дисциркуляторный), биохимическими методами в совокупности с клиническими, морфологическими, микробиологическими и электрофизиологическими методами изучена роль в патогенезе исследуемых заболеваний в модельных системах *in vivo* окислительного стресса и доказана терапевтическая эффективность предложенных методов лечения антиоксидантами, как с изолированной антиоксидантной активностью, так и с комплексным механизмом действия.

## ВЫВОДЫ

1. Подбор эффективной антиоксидантной дозы 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола для ткани хрусталика в системе *in vivo* показал, что инстилляцией в конъюнктивальную полость глаз кроликов растворов в концентрациях 2,2% и 0,22% по две капли три раза в день в течение 30 суток улучшает антиоксидантный потенциал ткани хрусталика, что характеризуется увеличением уровня GSH и повышением активности GT. В тоже время применение растворов 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола в концентрациях 22% и 10% сопровождается инверсией антиоксидантного эффекта в прооксидантный, который проявляется повышением концентрации МДА, снижением уровня GSH.

2. Однократное введение в стекловидное тело глаза кролика раствора диквата дибромида в дозе 600 нмоль приводит к патологической активации свободнорадикального окисления в ткани хрусталика, проявляющейся повышением уровня МДА, снижением концентрации GSH, уменьшением активности антиоксидантных ферментов GT и GPx и формированию типичной клинической и патоморфологической картины прогрессирующей корковой катаракты.

3. Инстилляцией в конъюнктивальную полость глаз кроликов 2,2% и 0,22% растворов 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола по две капли три раза в день в течение 56 суток при экспериментальной катаракте оказывает выраженное антиоксидантное и значимое терапевтическое действие, существенно превосходящее эффекты от использования препаратов сравнения – «Офтан Катахрома» и  $\alpha$ -токоферола ацетата. При этом по антиоксидантной активности 2,2% раствор 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола превосходит 0,22% раствор.

4. Моделирование экспериментальной гнойной язвы роговицы с использованием культуры золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) вызывает патологическую активацию свободнорадикального окисления в ткани роговицы, что сопровождается повышением концентрации

МДА, снижением уровня GSH, снижением активности антиоксидантных ферментов SOD, GPx и GT.

5. Лактоферрин в концентрациях раствора 0,5 мг/мл, 1,5 мг/мл, 2,5 мг/мл и 5 мг/мл в виде инстилляций в конъюнктивальную полость по две капли четыре раза в день в течение 28 суток при экспериментальной стафилококковой гнойной язве роговицы оказывает дозозависимое антиоксидантное действие, антимикробную активность, ускоряет заживление дефекта и предотвращает развитие осложнений (десцеметоцеле, перфорация).

6. Гистологическая картина изменений тканей роговицы при экспериментальной стафилококковой гнойной язве на фоне применения лактоферрина демонстрирует усиление регенерации эпителия и образования соединительной ткани, при этом применение высоких доз 1,5 мг/мл, 2,5 мг/мл и 5 мг/мл сопровождается сочетанием морфологической картины ранних стадий воспаления (альтерации и экссудации) с более поздней продуктивной стадией – пролиферацией (регенерацией эпителия роговицы), что в конечном итоге приводит к задержке полной эпителизации дна дефекта. Применение лактоферрина во всех дозах после окончания фазы эпителизации приводит к образованию непрозрачной рубцовой ткани, интенсивность развития которой носит прямой дозозависимый характер.

7. Лактоферрин в концентрации 0,5 мг/мл в составе комплексной терапии с ципрофлоксацином оказывает наилучший терапевтический эффект при гнойной язве роговицы при использовании курса введения по 2 капли 4 раза в день в течение 14 дней – до момента окончания формирования полноценного слоя эпителия на дне язвы, то есть до начала формирования рубца. Лактоферрин, применяемый в указанной дозе и разработанном нами курсе применения, проявляет свои положительные свойства не усиливая образование соединительной ткани и помутнения роговицы.

8. Интравенозное введение бенгальского розового и фокальное освещение сосудов сетчатки белым светом приводит к развитию типичной

клинической картины острой окклюзии (тромбоза) магистральных ретинальных сосудов с нарушением микроструктуры и электрофизиологической активности сетчатки, при этом было получено воспроизведение основных звеньев патогенеза: патологической активация свободнорадикального окисления, метаболической дисфункция нейронов сетчатки и накопления глутамата.

9. При экспериментальной острой окклюзии (тромбозе) магистральных ретинальных сосудов этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина при внутривенном введении сразу после моделирования патологии в дозе 0,5 мг/кг массы, а затем при введении три раза в день per os в дозе 10 мг/кг массы снижает выраженность окислительного стресса, улучшает функциональное состояние нейронов, нормализует концентрацию глутамата, аспартата, ГАМК, глицина; уменьшает патологические морфологические изменения в сетчатке.

10. Полученные результаты применения разработанного комплексного подхода изучения функционального и структурного статуса изучаемых тканей с применением биохимических методов оценки активности свободнорадикального окисления, состояния антиоксидантной защиты, аминокислотного статуса, морфологического, микробиологического и физиологических методов исследования позволили обосновать дифференцированное применение с терапевтической целью веществ с антиоксидантной активностью в зависимости от типа офтальмологической патологии (дегенеративно-дистрофическая, воспалительная, дисциркуляторная).

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Использованные экспериментальные модели (дикват дибромид индуцированная катаракта, стафилококковая гнойная язва роговицы, фотоиндуцированный бенгальским розовым тромбоз сосудов сетчатки) могут быть рекомендованы для изучения патогенеза соответствующих заболеваний, а также для поиска новых подходов для их фармакотерапии.

2. Полученные экспериментальные данные позволяют рекомендовать проведение клинических исследований по оценке эффективности применения раствора антиоксиданта 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола в концентрации 2,2% в виде инстилляций по две капли три раза в день с целью замедления прогрессирования катаракты.

3. Полученные результаты позволяют рекомендовать проведение клинических исследований по оценке эффективности применения лактоферрина в концентрации 0,5 мг/мл в виде инстилляций по 2 капли 4 раза в день в составе комплексной терапии с ципрофлоксацином для лечения гнойной язвы роговицы. Причем длительность применения лактоферрина составляет 14 дней, то есть до момента окончания формирования полноценного слоя эпителия на дне язвы, то есть до начала формирования рубца.

4. Полученные результаты позволяют рекомендовать проведение клинических исследований по оценке эффективности применения препарата этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина при острой окклюзии магистральных сосудов сетчатки.



## ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Для подтверждения клинической значимости полученных экспериментальных данных об эффективности 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола, лактоферрина и этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина при офтальмологической патологии необходимо выполнение клинических исследований.

2. Учитывая выявленный выраженный прямой антиоксидантный эффект 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола при его местном применении (инстилляции в конъюнктивальную полость) целесообразно дальнейшее исследование данного антиоксиданта при офтальмологической патологии, сопровождающейся развитием окислительного стресса, например, при возрастной макулярной дегенерации.

3. На основании выявленной способности лактоферрина стимулировать регенерацию эпителия роговицы, а также оказывать выраженное антиоксидантное и антибактериальное действие целесообразно его дальнейшее изучение при других типах патологии роговицы, например, при термическом и химическом ожоге.

4. Выявленная способность N-фенилацетил-L-пролилглицина оказывать ретинопротекторное действие при ишемии сетчатки позволяет рекомендовать дальнейшее изучение препарата при заболеваниях, сопровождающихся гипоксией сетчатой оболочки глаза, например, при глаукоме.

**ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ****АО** – антиоксиданты**АТФ** – аденозинтрифосфат**АФК** – активные формы кислорода**ВОЗ** -Всемирная организация здравоохранения**ГАМК** -  $\gamma$ -аминомасляная кислота**ГПТБ** – гидроперекись трет-бутила**ДНК** – дезоксирибонуклеиновая кислота**МДА** – малоновый диальдегид**НАДН<sub>2</sub>** – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный**НАДФН<sub>2</sub>** – нкотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный**ПОЛ** – перекисное окисление липидов**СА1** – поле радиального слоя гиппокампа**СР** – свободные радикалы**СРО** – свободнорадикальное окисление**ТБК** – тиобарбитуровая кислота**УФ** – ультрафиолетовый диапазон светового излучения**ФАДН<sub>2</sub>** – флавинадениндинуклеотид восстановленный**AREs** – antioxidant response elements, элементы антиоксидантного ответа, электрофильный элемент ответа**Asp** – аспартат**BDNF** – нейротрофический фактора мозга**Cat** – каталаза**CREB, NFAT, NF- $\kappa$ B, p53, STAT1, GAS, VDR, HSF1**– транскрипционные факторы**GABA** –  $\gamma$ -аминомасляная кислота**Glu** – глутамат**Gly** – глицин**GPx** – глутатионпероксидаза**GT** – глутаион-S-трансфераза

**H<sub>2</sub>O** – вода

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – перекись водорода

**HEK293, SH-SY5Y** – клеточные линии

**HIF-1** – гипоксией индуцированный фактор

**HOCl** – хлорноватистая кислота

**IL-1, IL-6, IL-8, IL-12** – интерлейкины 1, 6, 8, 12 соответственно

**Ki-67** – маркер пролиферации

**NGF** – нейротрофиновый фактор роста нервов

**NO<sup>•</sup>** – оксид азота

**Nrf2** – Nuclear factor erythroid 2-related factor 2,

транскрипционный фактор

**<sup>•</sup>OH** – гидроксильный радикал

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>** – синглетный кислород

**O<sub>2</sub>** – кислород

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** – супероксидный анион-радикал

**ONOO<sup>•</sup>** – пероксинитрит

**ROO<sup>•</sup>** – пероксильные радикалы

**SOD** – супероксиддисмутаза

**Tau** – таурин

**TNF-α** – фактор некроза опухолей α

**UVA** – ультрафиолетовое излучение спектра «А» (315–400 нм)

**UVB** – ультрафиолетовое излучение спектра «В» (280–315 нм)

**UVC** – ультрафиолетовое излучение спектра «С» (100–280 нм)

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абдулина, О.В. Пирацетам: от механизма действия к лечению когнитивных расстройств / О.В. Абдулина. – Текст (визуальный) : непосредственный // РМЖ. – 2010. – Т. 18, № 26. – С. 1596-1600.
2. Адамова, Н.А. Эффективность лечения язвенных поражений роговицы фобронектином / Н.А. Адамова, Т.У. Горгиладзе, А.В. Артемов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Рус. офтальмол. журн. – 1990. – №1. – С. 245-248.
3. Активная защита при окислительном стрессе. Антиоксидант-респонсивный элемент. Обзор. / В.В. Ляхович, В.А. Вавилин, Н.К. Зенков, Е.Б. Меньщикова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биохимия. – 2006. – Т. 71. – №9. – С. 1183-1198.
4. Антиоксиданты: классификация, фармакотерапевтические свойства, использование в практической медицине / С.А. Шахмарданова, О.Н. Гулевская, В.В. Селецкая, А.В. Зеленская, Я.А. Хананашвили, Д.А. Нефедов, П.А. Галенко-Ярошевский. – Текст (визуальный) : непосредственный // Журнал фундаментальной медицины и биологии. – 2016. – №3. – С. 4-15.
5. Бабижаев, М.А. Свободно радикальное окисление липидов и тиоловых групп при катарактогенезе / М.А. Бабижаев, А.И. Деев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биофизика. – 1986. – Т.31, вып. 1.– С.109 – 114.
6. Байбурина, Г.А. Роль путей клеточной сигнализации в развитии последствий окислительного стресса / Г.А. Байбурина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Медицинский вестник Башкортостана. – 2016. – Т. 11, №2 (62) . – С. 82-91.
7. Бактериальные поражения роговицы: особенности клинического течения и исходы / Е.А. Дроздова, Н.М. Марачева, О.В. Пухова, Е.И. Тимошевская. – Текст (визуальный) : непосредственный. // Медицинский вестник Башкортостана. – 2017. – Т.12, №2(68). – С. 29-32

8. Борзенкова, Н.В. Лактоферрин: физико-химические свойства, биологические функции, системы доставки, лекарственные препараты и биологически активные добавки (обзор) / Н.В. Борзенкова, Н.Г. Балабушевич, Н.И. Ларионова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биофарм. журн. – 2010. – Т.2, №3. – С. 3-19.

9. Брудастов, Ю.А. Активность каталазы и супероксиддисмутазы *staphylococcus aureus* при их персистировании в макроорганизме / Ю.А. Брудастов, Т.С. Сборец, Д.Г. Дерябин. – Текст (визуальный) : непосредственный // Журн. микробиологии. – 2001. – № 2. – С. 13–16.

10. Вартанян, Л.С. Влияние ионола на метаболизм супероксидных радикалов в печени мышей / Л.С. Вартанян, С.М. Гуревич. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вопр. мед. химии. – 1999. – №4. – С. 314-320.

11. Влияние дипептидного нейропротекторного препарата ноопепт на высвобождение глутамата срезами коры головного мозга крыс / К.С. Ус, П.М. Клодт, В.С. Кудрин [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Нейрохимия. – 2006. – Т.23, №2. – С.122-127.

12. Влияние ноопепта на динамику  $[Ca^{2+}]_i$  в нейронах культивируемых срезов гиппокампа крысы / С.Н. Колбаев, О.П. Александрова, И.Н. Шаронова, В.Г. Скребицкий. – Текст (визуальный) : непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т.164, №9. – С. 309-313.

13. Гаврилова, В.Б. Анализ методов определения продуктов ПОЛ / В.Б. Гаврилова, А.Р. Гаврилова, Л.М. Мазул. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вопр. мед. химии. – 1987. – №1. – С. 118-120.

14. Гланц, С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. / С. Гланц. – М.: Практика, 1998. – 459 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

15. Голиков, А.П. Влияние дибунола и изоптина на содержание креатинкиназы и миоглобина в сыворотке крови собак при постишемической

коронарной реперфузии / А.П. Голиков, О.А. Авилова, В.Ю. Полумисков. – Текст (визуальный) : непосредственный // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1987. – Т. 104, № 10. – С. 413-416.

16. Давыдова, О.Н. Глутаматные рецепторы в клетках нервной и иммунной систем / О.Н. Давыдова, А.А. Болдырев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Анналы клинич. и эксперим. неврологии. – 2007. – Т.1, №4. – С.28- 34.

17. Дадали, В.А. Исследование корригирующего действия клотримазола и  $\beta$ -ионола при воздействии тиофенола / В.А. Дадали, Н.Э. Голованова, Р.Н. Павлова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2000. – Т.130, №11. – С. 555-557.

18. Дегтярёв, И.А. Распределение в организме, метаболизм и биологическое действие II. Биологическое действие ионола: (обзор) / И.А. Дегтярёв, Г.Е. Зайков. – Текст (визуальный) : непосредственный // Хим. – фармац. журн. – 1985. – № 10 – С. 1160 - 1169.

19. Доклиническое изучение токсичности ноопепта / Л.П. Коваленко, Н.М. Смольникова, С.В. Алексеева [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2002. – Т.65, №1. – С. 62-64.

20. Зайцев, В.Г. Связь между химическим строением и мишенью действия как основа классификации антиоксидантов прямого действия / В.Г. Зайцев, О.В. Островский, В.И. Закревский. – Текст (визуальный) : непосредственный // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2003. – Т.66, №4. – С. 66-70.

21. Зарубина, И.В. Молекулярная фармакология антигипоксантов / И.В. Зарубина, П.Д. Шабанов. – СПб.: ООО «Изд-во Н-Л», 2004. – 368 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

22. Зарудий, Ф.С. 2,6-Ди-третбутил-4-метилфенол (дибунол, ионол, тонарол) классический антиоксидант / Ф.С. Зарудий. – Текст (визуальный) : непосредственный // Хим.- фармац. журн. – 2001. – Т. 35, №3. – С. 42-48.

23. Захарова, М.А. Консервативное лечение катаракты: миф или реальность / М.А. Захарова. – Текст (визуальный) : непосредственный // РМЖ. Клиническая офтальмология. – 2017. – № 4. – С. 231–234.

24. Изменения морфофункционального состояния печени крыс при острой интоксикации тетрахлорметаном и их коррекция антигипоксантами, антиоксидантом и актопротекторами / Т.К. Дубовая, А.В. Быков, А.Ю. Цибулевский [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Эксперим. и клинич. фармакология. – 1996. – Т.59,№4. – С. 51-54.

25. Инструкция по медицинскому применению препарата Офтан Катахром. – Текст (визуальный) : электронный. – URL: <http://grls.rosminzdrav.ru/>

26. Иомдина, Е.Н. Биомеханика глаза: теоретические аспекты и клинические приложения / Е.Н. Иомдина, С.М. Бауэр, К.Е. Котляр. – Москва: Реал Тайм, 2015. – 208 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

27. К механизму действия ноопепта: снижение активности стресс-индуцируемых протеинкиназ и активация экспрессии нейротрофинов / Р.У. Островская, Ю.В. Вахитова, М.Х. Салимгареева [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Нейрофармакология. – 2010. – Т.73, №12. – С.2–5.

28. Каспарова, Е.А. Гнойные язвы роговицы: этиология, патогенез, классификация / Е.А. Каспарова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник офтальмологии. – 2015. – №5. – С. 87-97.

29. Катаракта : учеб.-метод. пособие для врачей-интернов по специальности «Офтальмология» / Н. Г. Завгородняя, Л. Э. Саржевская, Е. М. Ивахненко [и др.]. – Запорожье, 2017. – 77 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

30. Катаракта и глаукома: как и когда оперировать? / А.С. Басинский, И.Р. Газизова, А.В. Куроедов, С.Ю. Петров. – Текст (визуальный) : непосредственный // Национальный журнал глаукома. – 2019. – 18, № 3. – С. 75-80.

31. Колбаев, С.Н. Исследование влияния ноопепта протон обусловленный вход кальция в клетках-зернах мозжечка крыс / С.Н. Колбаев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Асимметрия. – 2019. – Т. 13, №4. – С. 22-29.
32. Колесникова, Л.И. Свободнорадикальное окисление: взгляд патофизиолога / Л.И. Колесникова, М.А. Даренская, С.И. Колесников. – Текст (визуальный) : непосредственный // Бюллетень Сибирской медицины. – 2017. – Т. 16, № 4. – С. 16–29.
33. Королева, И.А. Возрастная катаракта: профилактика и лечение / И.А. Королева, Е.А. Егоров. – Текст (визуальный) : непосредственный // РМЖ. Клиническая офтальмология. – 2018. – № 4. – С.194–198.
34. Костюк, В.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.В. Ковалева. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вопр. мед. химии. – 1990. – Т.36, №2. – С. 88-91.
35. Курбанов, А.И. Антиоксидантные ферменты микроорганизмов как потенциальные факторы патогенности / А.И. Курбанов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Междунар. мед. журн. – 2009. – №1. – С.136-139.
36. Курбанов, А.И. Роль каталазы и супероксиддисмутазы микроорганизмов при их фагоцитозе макрофагальными клетками / А.И. Курбанов, З.О. Караев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биомед. – 2005. – № 3. – С. 44–45.
37. Ланкин, В.З. Важная роль свободнорадикальных процессов в этиологии и патогенезе атеросклероза и сахарного диабета / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе. – Текст (визуальный) : непосредственный // Кардиология. – 2016. – Т.56, №12. – С. 97-105.
38. Ланкин, В.З. Ингибирование перекисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментативными системами



(супероксиддисмутаза, глутатион-пероксидаза, глутатион-редуктаза) при экспериментальном злокачественном росте / В.З. Ланкин, С.М. Гуревич. – Текст (визуальный) : непосредственный // Докл. АН СССР. – 1976. – Т.226,№3. – С. 705 - 708.

39. Ланкин, В.З. Итоги изучения патофизиологических последствий нарушения регуляции свободнорадикальных процессов: тупик или новый импульс? / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе. – Текст (визуальный) : непосредственный // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2016. – Т. 1, №3(109) (часть 2). – С. 160-167.

40. Ланкин, В.З. Свободнорадикальные процессы в норме и при заболеваниях сердечно-сосудистой системы / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Ю.Н. Беленков. – Москва: РКНПК МЗ РФ, 2001. – 78 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

41. Ланкин, В.З. Ферментативное перекисное окисление липидов / В.З. Ланкин. – Текст (визуальный) : непосредственный // Укр. биохим. журн. – 1984. – Т.56, №3. – С. 317-331.

42. Мальцев, Э.В. Хрусталик / Э.В. Мальцев. – Москва: Медицина, 1988. – 192 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

43. Мартусевич, А.К. Антиоксидантная терапия: современное состояние, возможности и перспективы / А.К. Мартусевич, К.А. Карузин, А.С. Самойлов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биорадикалы и антиоксиданты. – 2018. – Т.5, №1. – С. 5-23.

44. Матвеева, Н.Ю. Нейрохимическая специализация нейронов сетчатки / Н.Ю. Матвеева. – Текст (визуальный) : непосредственный // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2012. – №2. – С.66-70.

45. Меньщикова, Е.Б. Современные подходы при анализе окислительного стресса, или как измерить неизмеримое / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков. – Текст (визуальный) : непосредственный // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2016. – Т. 1, №3 (109) (часть 2). – С. 174-180.

46. Метаболический статус витаминов-антиоксидантов и субстратов НАД-зависимых дегидрогеназных систем у больных возрастной катарактой / И.П. Метелицына [и др.] . – Текст (визуальный) : непосредственный // Журн. АМН Украины. – 1996. – № 2(4). – С. 696-703.

47. Модуляция ноопептом и пирацетамом никотиновых рецепторов нейронов виноградной улитки / М.А. Разумовская, Г.Б.Мурзина, Р.У. Островская [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Журн. высш. нервн. деят. – 2018. – Т.68, №4. – С. 537-548. doi: 10.1134/S0044467718040135.

48. Молекулярные механизмы окислительного стресса / О.А. Гребенчиков, Т.С. Забелина, Ж.С. Филипповская [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник интенсивной терапии. – 2016. – №3. – С. 13-21.

49. Молекулярный механизм действия Ноопепта – замещенного Pro-Glu-дипептида / Ю.В. Вахитова, С.В. Садовников, С.С. Борисевич [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Acta naturae. – 2016. – Т.8, №1(28). – С.90–98.

50. Моргунов, А.А. Влияние антиоксиданта ионола в составе липосом на функцию изолированного и ишемизированного сердца / А.А.Моргунов, В.Г.Булгаков, М.В. Биленко. – Текст (визуальный) : непосредственный // Эксперим. и клинич. фармакология. – 1992. –Т.55,№2. – С. 17-20.

51. Муранов, К.О. Молекулярная физиология и патология хрусталика глаза / К.О. Муранов, М.А. Островский. – М.: Торус пресс, 2013. –304 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

52. Мурзина, Г.Б. Модуляция ноопептом вызванного ацети7лхолином входящего тока в нейронах виноградной улитки / Г.Б. Мурзина, А.С. Пивоваров. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биофизика. – 2019. – Т. 64, №3. – С. 507-514.

53. Нарушения сенсорики. Молекулярные механизмы нейродегенерации клеток сетчатки при ишемии / Г.Р. Каламкаргов, А.Е. Бугрова, Т.С. Константинова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма: в 2-х томах / под ред. акад. РАН М.В. Угрюмова. – М.: Научный мир, 2014. – Том 2. – С. 459-483.

54. Нейропептид циклопролилглицин увеличивает содержание мозгового нейротрофического фактора в нейрональных клетках / Т.А. Гудашева, К.Н. Колясникова, Т.А. Антипова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Доклады академии наук. – 2016. – Т.469, №4. – С.1-4.

55. Нейропротективный дипептид ноопепт предотвращает повреждения ДНК на модели предиабета у мышей / Р.У. Островская, С.С. Ягубова, А.К. Жанатаев [и др.] . – Текст (визуальный) : непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т.168, №8. – С. 185-190.

56. Ноопепт стимулирует экспрессию NGF и BDNF в гиппокампе крысы / Р.У. Островская, Т.А. Гудашева, А.П. Цаплина [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2008. – Т. 146, № 9. – С. 309–312.

57. Ноопепт, обладая нейропротективными свойствами, не стимулирует пролиферацию клеток / Л.Ф. Зайнуллина, Т.В. Иванова, Р.У. Островская [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – Т.166, №10. – С. 457-460.

58. Окислительный и карбонильный стресс как фактор модификации белков и деструкции днк при сахарном диабете / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Г.Г. Коновалова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Терапевтический архив. – 2018. – Т. 90, №10. – С. 46-90.

59. Окислительный стресс и его роль в патогенезе / М.Я. Ходос, Я.Е. Казаков, М.Б. Видревич, Х.З. Брайнина. – Текст (визуальный) :

непосредственный // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2017. – Т. 14, № 4. – С. 381-398.

60. Оклюзии вен сетчатки: методические рекомендации / Ю.С. Астахов, С.Н. Тульцева, М.В. Гацу [и др.]. – СПб.: Эко-Вектор, 2017. – 82 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

61. Оригинальный ноотропный и нейропротективный препарат ноопепт / Р.У. Островская, Т.А. Гудашева, Т.А. Воронина, С.Б. Середенин. – Текст (визуальный) : непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2002. – Т.65, №5. – С.66–72.

62. Островская, Р.У. Эволюция проблемы нейропротекции / Р.У. Островская. – Текст (визуальный) : непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2003. – Т.66, №2. – С.32–37.

63. Пат. 2165769 Рос. Федерация, МПК 7 А61 К38/40, 35/20, А 61 Р 43/00. Антибактериальный, антиоксидантный, иммуномодулирующий и антиканцерогенный препарат и способ его применения / В.И. Чиссов, Р.И. Якубовская, А.В. Бойко, Е.Р. Немцова, Т.В. Сергеева, Н.А. Осипова; Р.И. Якубовская. - №200011842; заявл. 13.07.2000

64. Пептидные аналоги пирацетама как лиганды предполагаемых ноотропных рецепторов / Т.А. Гудашева, Р.У. Островская, С.С. Трофимов [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Хим.-фарм. журн. — 1985. – № 11. – С. 1322-1324.

65. Пирацетам и бетагистин: возможные механизмы эндотелиопротекции / А.С. Солгалова, В.О. Солдатов, М.А. Першина, Т.Г. Покровская. – Текст (визуальный) : непосредственный // Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье". – 2018. – № 2. – С. 61-69.

66. Приходько, В.Ю. Новый ноотропный препарат ноопепт в клинической практике / В.Ю. Приходько. – Текст (визуальный) : непосредственный // Украинский вестник психоневрологии. – 2009. – Т.17, №2(59). – С.104–109.

67. Процессы перекисного окисления липидов в коре больших полушарий головного мозга и плазме крови молодых крыс с высоким уровнем тревожности при эмоциональном стрессе: защитный эффект ноотропного дипептида ГВС-III / А.М. Менджерицкий, А.В. Лысенко, С.В. Демьяненко [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Нейрохимия. – 2003. – Т. 20, №4. – С. 281-286.

68. Разина, А.В. Оптимизация метода общей анестезии на кроликах / А.В. Разина, А.И. Фролова, М.А. Сергеев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Акт. вопр. ветеринарии и биологии. – 2010. – №1. – С.32–35.

69. Ракитский, В.Н. Нейропротекторное действие ноопепта на модели фокального ишемического повреждения спинного мозга / В.Н. Ракитский, С.С. Пашин. – Текст (визуальный) : непосредственный // Токсикологический вестник. – 2016. – №2(137). – С. 37-40

70. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – Москва: Медиа Сфера, 2002. – 312 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

71. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

72. Рябиченко, Е.В. Роль активных форм кислорода, генерируемых фагоцитами, в патогенезе заболеваний / Е.В. Рябиченко, В.М. Бондаренко, В.В. Рябиченко. – Текст (визуальный) : непосредственный // Журн. микробиол. – 2000. – № 4. – С. 65–71.

73. Стальная, И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью 2-тиобарбитуровой кислоты / И.Д. Стальная. – Текст (визуальный) : непосредственный // Современные методы в биохимии. – Москва: Б.и., 1977. – С.66-68.

74. Страчунский, Л.С. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Л.С. Страчунский, Ю.Б. Белоусов, С.Н. Козлов. – М.: Боргес, 2002. – 384 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

75. Тарасова, Л.Н. Глазной ишемический синдром / Л.Н. Тарасова, Т.Н. Киселева, А.А. Фокин. – М.: Медицина, 2003. – 176 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

76. Тульцева, С.Н. Окклюзии вен сетчатки (этиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение) / С.Н. Тульцева, Ю.С. Астахов. – СПб.: Изд-во Н-Л», 2010. – 112 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

77. Федорова, Т.Н. Оценка антиоксидантного действия ноотропного дипептида ноопепт на модели  $Fe^{2+}$  - индуцированной хемилюминесценции липопротеинов сыворотки крови человека *in vitro* / Т.Н. Фёдорова, К.С. Ус, Р.У. Островская. – Текст (визуальный) : непосредственный // Нейрохимия. – 2007. – Т. 24, №1. – С. 69-73.

78. Фёдорова, Т.Н. Перекисное окисление липидов при экспериментальной ишемии мозга / Т.Н. Фёдорова, А.А. Болдырев, И.В. Ганнушкина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биохимия. – 1999. – Т.64, вып. 1. – С. 94-98.

79. Фенольные биоантиоксиданты / Н.К. Зенков, Н.В. Кандалинцева, В.З. Ланкин [и др.]. – Новосибирск: СО РАМН, 2003. – 328 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

80. Хавинсон, В.Х. Свободнорадикальное окисление и старение / В.Х. Хавинсон, В.Н. Анисимов. – Санкт-Петербург: Наука, 2003. – 223с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

81. Шаимова, В.А. Бактериальный кератит. Клинико-иммунологические особенности течения, прогноза, лечения разных форм заболевания : 14.00.36; 14.00.08: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / В.А. Шаимова. – Челябинск, 2007. – 42 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

82. Шамшинова, А.М. Функциональные методы исследования в офтальмологии / А.М. Шамшинова, В.В. Волков. – Москва: ОАО Издательство «Медицина», 2004 г. – 432 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.
83. Шамшинова, А.М. Электроретинография в офтальмологии / А.М. Шамшинова. – Москва: Медика, 2009 – 304 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.
84. Шейбак, Л.Н. Биосинтез и обмен таурина / Л.Н. Шейбак, В.М. Шейбак. – Текст (визуальный) : непосредственный // Журнал ГГМУ. – 2005. – №1. – С.9-12.
85. Шмелева, В.В. Катаркта / В.В. Шмелева. – М.: Медицина, 1981. – 224 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.
86. Шульпина, Н.Б. Биомикроскопия глаза / Н.Б. Шульпина.– М.: Медицина, 1974. – 264 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.
87. 20-hydroxyeicosatetraenoic acid alters endothelial cell barrier integrity independent of oxidative stress and cell death / V. Mavangira, J. Brown, J.C. Gandy, L.M. Sordillo. – Text : visual // Prostaglandins Other Lipid Mediat. – 2020. – Feb 4. – P. 106425. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2020.106425.
88. A lactotransferrin single nucleotide polymorphism demonstrates biological activity that can reduce susceptibility to caries / D.H. Fine, G.A. Toruner, K. Velliyagounder [et al.]. – Text : visual // Infect Immun. – 2013. – Vol. 81. – P. 1596–605. doi: 10.1128/IAI.01063-12.
89. A novel single-nucleotide polymorphism in the lactoferrin gene is associated with susceptibility to diarrhea in North American travelers to Mexico / J.A. Mohamed, H.L. DuPont, Z.D. Jiang [et al.] – Text : visual // Clin Infect Dis. – 2007. – Vol. 44. – P. 945–52. Doi: 10.1086/512199.
90. A novel tool reflecting the role of oxidative stress in the cataracts: thiol/disulfide homeostasis / A. Elbay, O.F. Ozer, M. Altinisik [et al.]. – Text : visual // Scand J Clin Lab Invest. – 2017. – Vol. 77, № 3. – P. 223-227. doi: 10.1080/00365513.2017.1292539.

91. A reappraisal of the proposed metabolic and antioxidant actions of butylated hydroxytoluene(BHT) in the liver / L.D.S. Castro, L. Bracht, J.F. Comar [et al.] . – Text : visual // J Biochem Mol Toxicol. – 2017. – Vol. 31, № 8. doi: 10.1002/jbt.21924.

92. A study of effects of peptide fragments of bovine and human lactoferrins on activities of three key HIV-1 enzymes / J.H. Wong, Z. Liu, K.W.K. Law [et al.] . – Text : visual // Peptides. – 2014. – Vol. 62. – P. 183–188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2014.07.006>.

93. Aerobic glycolysis is essential for normal rod function and controls secondary cone death in retinitis pigmentosa / L. Petit, S. Ma, J. Cipi [et al.] . – Text : visual // Cell Rep. – 2018. – Vol. 23. – P. 2629-2642. Doi: 10.1016/j.celrep.2018.04.111.

94. Ahmad, A. Biomarkers of inflammation and oxidative stress in ophthalmic disorders / A. Ahmad, H. Ahsan. – Text : visual // J. Immunoassay Immunochem. – 2020. – Feb 11. – P. 1-15. doi: 10.1080/15321819.2020.1726774.

95. Albertini, R. Monitoring of low density lipoprotein oxidation by low-level chemiluminescence / R. Albertini. – Text : visual // Abuja Free Radical Res. – 1998. – Vol.29. – P. 75-83.

96. Amanso, A.M. Differential roles of NADPH oxidases in vascular physiology and pathophysiology / A.M. Amanso, K.K. Griendling. – Text : visual // Front. Biosc. – 2012. – Vol. 1, № 4. – P. 1044-1064.

97. An involvement of oxidative stress in endoplasmic reticulum stress and its associated diseases / B. Bhandary, A. Marahatta, H.R. Kim, H.J. Chae. – Text : visual // Int J Mol Sci. – 2012. – Vol. 14. – P. 434–456.

98. Anticataractogenic effect of betaine in chick embryo hydrocortisone-induced cataract model / R. Duman, T. Ertekin, R. Duman [et al.]. – Text : visual // Indian J Med Res. – 2019. – Vol. 150, № 4. – P. 407-411. doi: 10.4103/ijmr.IJMR\_50\_18.



99. Antioxidant defenses in eukaryotic cells Free radicals: from basic science to medicine / eds.: E. Niki, G. Poli, E. Albano, M.U. Dianzani. – Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag, 1993. – P. 365-373. – Text : visual.
100. Antioxidant effects of piperine in in-vivo chick embryo cataract model induced by steroids / A. Vurmaz, R. Duman, M.C. Sabaner [et al.] . – Text : visual // *Cutan Ocul Toxicol.* – 2019. – Vol. 38, № 2. – P. 182-189. doi: 10.1080/15569527.2019.1570521.
101. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state / S.Y. Gilgun, Z. Rosenbaum, E. Melamed, D. Offen. – Text : visual // *Pharmacol. Rev.* – 2002. – Vol. 54. – P. 271–284.
102. Antioxidant therapy in the treatment of experimental acute corneal inflammation / J.L. Alio, M.J. Ayala, M.E. Mulet [et al.]. – Text : visual // *Ophthalmic. Res.* – 1995. – Vol. 27, № 3. – P.136-143.
103. Antioxidant therapy: current status and future prospects / O. Firuzi [et al.]. – Text : visual // *Curr. Med. Chem.* – 2011. – Vol. 18. – P. 3871–3888.
104. Arnold, R.R. A bactericidal effect for human lactoferrin / R.R. Arnold, M.F. Cole, J.R. McGhee. – Text : visual // *Science.* – 1977. – Vol. 197. – P. 263-265.
105. Attenuation of 4-hydroxynonenal-induced cataractogenesis in rat lens by butylated hydroxytoluene / S.K. Srivastata, S. Awasthi, L. Wang [et al.]. – Text : visual // *Curr. Eye Res.* – 1996. – Vol.15. – P. 749-754.
106. Babihayev, M.A. Lipid peroxide and reactive oxygen species generating systems of the crystalline lens / M.A. Babihayev, E.B. Costa. – Text : visual // *Biochim Biophys Acta.* – 1994. – Vol. 1225. – P. 326–37.
107. Bacterial profile of ocular infections: a systematic review / M. Teweldemedhin, H. Gebreyesus, A.H. Atsbaha [et al.]. – Text : visual // *BMC Ophthalmol.* – 2017. – Vol. 17, № 1. – P. 212. doi: 10.1186/s12886-017-0612-2.
108. Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFcin, LFampin and LFchimera on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* / H.

Flores-Villasenor, A. Canizalez-Román, M. Reyes-Lopez [et al.]. – Text : visual // *Biometals*. – 2010. – Vol. 23, № 3. – P. 569-578.

109. Baynes, R.D. Lactoferrin and the inflammatory response / R.D. Baynes, W.R. Bezwoda. – Text : visual // *Adv Exp Med Biol*. – 1994. – Vol. 357. – P. 133–41. Doi 10.1007/978-1-4615-2548-6\_13.

110. Bhuyan, K.C. Free radical enhancer xenobiotic is an inducer of cataract in rabbit / K.C. Bhuyan, D.C. Bhuyan, S.M. Podos. – Text : visual // *Free Radic. Res. Commun*. – 1991. – Pt.2. – P.12 - 13.

111. Biomarkers of oxidative damage in human disease / I. Dalle-Donne, R. Rossi, R. Colombo [et al.] . – Text : visual // *Clin Chem*. – 2006. – Vol. 52. – P. 601–623.

112. Black, H.S. Pro-oxidant and anti-oxidant mechanism(s) of BHT and  $\beta$ -carotene in photocarcinogenesis / H.S. Black. – Text : visual // *Frontiers Biosci*. – 2002. – Vol. 7. – P. 1044-1055.

113. Block, F. Effects of antioxidants on ischemic retinal dysfunction / F. Block, M. Schwarz. – Text : visual // *Exp. Eye Res*. – 1997. – Vol. 64. – P. 559–564.

114. Block, K. Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes / K. Block, Y. Gorin, H.E. Abboud. – Text : visual // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2009. – Vol. 106. – P. 14385–14390.

115. Bonne, C. Free radicals in retinal ischemia / C. Bonne, A. Muller, M. Villain. – Text : visual // *Gen. Pharmacol*. – 1998. – Vol. 30. – P. 275–280.

116. Cabrera, M.P. Antioxidants and the Integrity of Ocular Tissues / M.P. Cabrera, R.H. Chihuailaf. – Text : electronic // *Veter. Med. Inter*. – 2011. – URL: <http://ukpmc.ac.uk/articles/PMC3140028/>

117. Carubelli, R. Role of active oxygen species in corneal ulceration. Effect of hydrogen peroxide generated in situ / R. Carubelli, R.E. Nordquist, J.J. Rowsey. – Text : visual // *Cornea*. – 1990. – Vol. 9, № 2. – P. 161-169.

118. Cell death pattern in lens epithelium of cataract patients / Ø. Osnes-Ringen, K.H. Berg, M.C. Moe [et al.]. – Text : visual // *Acta Ophthalmol.* – 2016. – Vol. 94, № 5. – P. 514-20. doi: 10.1111/aos.13009.
119. Chandra, P. Antioxidant compounds from microbial sources: a review / P. Chandra, R. Kumar Sharma, D. Singh Arora. – Text : visual // *Food Research International.* – 2020. – Vol. 129. – P. 108849. doi: 10.1016/j.foodres.2019.108849.
120. Complexity of vitamin E metabolism / L. Schmolz, M. Birringer, S. Lorkowski, M. Wallert. – Text : visual // *World J Biol Chem.* – 2016. – Vol. 7, № 1. – P. 14-43. doi: 10.4331/wjbc.v7.i1.14.
121. Concentrations of adenosine and its metabolites in the rat retina/choroid during reperfusion after ischemia / S. Roth, S.S. Park, C.W. Sikorski [et al.]. – Text : visual // *Curr. Eye Res.* – 1997. – Vol. 16. – P. 875–885.
122. Connexin hemichannels mediate glutathione transport and protect lens fiber cells from oxidative stress / W. Shi, M.A. Riquelme, S. Gu, J.X. Jiang. – Text : visual // *J Cell Sci.* – 2018. – Vol. 131, № 6. – P. pii: jcs212506. doi: 10.1242/jcs.212506.
123. Cornish, K.M. Quercetin metabolism in the lens: role in inhibition of hydrogen peroxide induced cataract / K.M. Cornish, G. Williamson, J. Sanderson. – Text : visual // *Free Radic Biol Med.* – 2002. – Vol. 33. – P. 63–70.
124. Detection of aldehyde dehydrogenase activity in human corneal extracts / T.D. Gondhowiardjo, N.J. van Haeringen, R. Hoekzema [et al.]. – Text : visual // *Curr. Eye Res.* – 1991. – Vol. 10. – P. 1001–1007.
125. Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function / W. Droge. – Text : visual // *Physiol. Rev.* – 2002. – Vol. 82, № 1. – P. 47-95.
126. Dua, H.S. Corneal epithelial wound healing / H.S. Dua, J.A.P. Gomes, A. Singh. – Text : visual // *Br. J. Ophthalmol.* – 1994. – Vol. 78. – P. 401-408.
127. Effect of dietary antioxidants on the susceptibility to hepatic microsomal lipid peroxidation in the rat / K. Yamamoto, N. Fukuda, S. Shiroyi [et al.]. – Text : visual // *Ann. Nutr. Metab.* – 1995. – Vol. 39. – P. 99-106.

128. Effect of dietary bovine lactoferrin on performance and antioxidant status of piglets / Y.Z. Wang, C.L. Xu, Z.H. An [et al.]. – Text : visual // *An. Feed Sci. Technol.* – 2008. – Vol. 140. – P. 326-336.

129. Effect of Tempol, a Membrane-Permeable Free Radical Scavenger, on In Vitro Model of Eye Inflammation on Rabbit Corneal Cells / R. Crupi, D. Impellizzeri, E. Gugliandolo [et al.]. – Text : visual // *J Ocul Pharmacol Ther.* – 2019. – Vol. 35, № 10. – P. 571-577. doi: 10.1089/jop.2019.0016.

130. Effect of topical antioxidant therapy on experimental infectious keratitis / J.L. Alio, A. Artola, A. Serra [et al.]. – Text : visual // *Cornea.* – 1995. – Vol. 14, № 2. – P. 175-179.

131. Effect of UVB radiation on corneal aldehyde dehydrogenase / L. Uma H. Jayaram, Y. Sharma, D. Balasubramanian. – Text : visual // *Curr. Eye Res.* – 1996. – Vol. 15, № 6. – P. 685-690.

132. Effects of melatonin, vitamin E and octreotide on lipid peroxidation during ischemia–reperfusion in the guinea pig retina / S. Celebi, N. Dilsiz, T. Yilmaz, A.S. Kukner. – Text : visual // *Eur. J. Ophthalmol.* – 2002. – Vol. 12. – P. 77–83.

133. Effects of topical vitamin E on corneal superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and polymorphonuclear leucocyte infiltration after photorefractive keratectomy / A. Bilgihan, K. Bilgihan, O. Yis [et al.]. – Text : visual // *Act. Ophthalmol. Scand.* – 2003. – Vol. 81, № 2. – P. 177-180.

134. Electrochemical detection of human brain transmitter amino acids by high-performance liquid chromatography of stable o-phthalaldehyde-sulphite derivatives / S.J. Pearson, C. Czudek, K. Mercer [et al.] – Text : visual // *J. Neuronal. Transm.,* - 1991. – Vol.86. – P. 151–157.

135. Elevation of serum oxidative stress in patients with retina vein occlusions / K.H. Chen, E.L. Hsiang, M.Y. Hsu [et al.]. – Text : visual // *Acta Ophthalmol.* – 2019. – Vol. 97, № 2. – P. e290-e295. doi: 10.1111/aos.13892.

136. Ellison, R. The effects of lactoferrin on Gram-negative bacteria / R. Ellison. – Text : visual // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1994. Vol. 357. P. 71–90.

137. Ellison, R.T. 3<sup>rd</sup> Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin / R.T. Ellison 3<sup>rd</sup>, T.J. Giehl, F.M. LaForce. – Text : visual // *Infect. Immun.* – 1988. – Vol. 56. – P. 2774-2781.
138. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman. – Text : visual // *Archives of biochemistry and biophysics.* – 1959. – Vol. 82, №1. – P.70-77.
139. Ero1-PDI interactions, the response to redox flux and the implications for disulfide bond formation in the mammalian endoplasmic reticulum / A.M. Benham, M. van Lith, R. Sitia, I. Braakman. – Text : visual // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* – 2013. – Vol. 368. – P. 20110403.
140. Erythrocyte oxidative stress is associated with cell deformability in patients with retinal vein occlusion / M. Becatti, R. Marcucci, A.M. Gori [et al.]. – Text : visual // *J Thromb Haemost.* – 2016. – Vol. 14, № 11. – P. 2287-2297. doi: 10.1111/jth.13482.
141. Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage / D.E. Pellegrini Giampietro, G. Cherici, M. Alesiani [et al.]. – Text : visual // *J. Neurosci.* – 1990. – Vol.10. – P. 1035–1041.
142. Farnaud, S. Lactoferrin--a multifunctional protein with antimicrobial properties / S. Farnaud, R.W. Evans. – Text : visual // *Mol. Immunol.* – 2003. – Vol. 40, № 7. – P. 395-405.
143. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors / P. Wu [et al.]. – Text : visual // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2015. – Vol. 36. – P. 422–439.
144. Flora, S.J.S. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure / S.J.S. Flora. – Text : visual // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2009. – Vol. 2, №4. – P. 191–206.
145. Fortmann, Seth D. Molecular mechanisms of retinal ischemia / Seth D. Fortmann, Maria B. Grant. – Text : visual // *Current Opinion in Physiology.* – 2019. – Vol. 7. – P. 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2018.12.008>.

146. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol [et al.]. – Text : visual // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 39. – P. 44–84.
147. Free radicals in rabbit retina under ocular hyperpressure and functional consequences / A. Muller, S. Pietri, M. Villain [et al.]. – Text : visual // *Exp. Eye Res.* – 1997. – Vol. 64. – P. 637–643.
148. Gallium-desferrioxamine protects the cat retina against injury after ischemia and reperfusion / E. Banin, E. Berenshtein, N. Kitrossky [et al.]. – Text : visual // *Free Radical Biol. Med.* – 2000. – Vol. 28. – P. 315–323.
149. Gao, Y. Human age-related cataracts: epigenetic suppression of the nuclear factor erythroid 2-related factor 2-mediated antioxidant system / Y. Gao, Y. Yan, T. Huang. – Text : visual // *Mol. Med. Rep.* – 2015. – Vol. 11. – P. 1442–1447. doi: 10.3892/mmr.2014.2849.
150. Gehlbach, P. Enhancement of retinal recovery by conjugated deferoxamine after ischemia–reperfusion / P. Gehlbach, R.L. Purple. – Text : visual // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1994. – Vol. 35. – P. 669–676.
151. Giblin, F.J. Glutathione and lens epithelial function / F.J. Giblin, B. Chakrapani, V.N. Reddy. – Text : visual // *Invest. Ophthalmol.* – 1976. – Vol. 15, №5. – P. 381 – 393.
152. Gifford, J.L. Lactoferricin: a lactoferrin – a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties / J.L. Gifford, H.N. Hunter, H.J. Vogel. – Text : visual // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2005. – Vol. 62, № 22. – P. 2588-2598.
153. Gjoerloff, K. Standardized full-field electroretinography in rabbits / K. Gjoerloff, S. Andreasson, B. Ehinger. – Text : visual // *Documenta Ophthalmologica.* – 2004. – Vol. 109. – P. 163–168.
154. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990-2020: a systematic review and meta-analysis / S.R. Flaxman, R.R. Bourne, S. Resnikoff [et al.]. – Text : visual // *Lancet Glob Health.* – 2017. – Vol. 5, № 12. – P. e1221-e1234. doi:10.1016/S2214-109X(17)30393-5.

155. Glutamate release in experimental ischaemia of the retina: an approach using microdialysis / P. Louzada-Junior, J.J. Dias, W.F. Santos [et al.]. – Text : visual // *J. Neurochem.* – 1992. – Vol.59. – P. 358–363.
156. Glycolytic reliance promotes anabolism in photoreceptors / Yashodhan Chinchore, Tedi Begaj, David Wu [et al.]. – Text : visual // *eLife.* – 2017. – Vol. 6. – P. 1-22. 10.7554/eLife.25946.
157. Gonzalez-Chavez, S.A. Lactoferrin: structure, function and applications / S.A. Gonzalez-Chavez, S. Arevalo-Gallegos, Q. Rascon-Cruz. – Text : visual // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2009. – Vol. 33, № 4. – P. 301-308.
158. Guest, P.C. A Rat Eye Lens Model of Cataract Formation / P.C. Guest. – Text : visual // *Methods Mol Biol.* – 2019. – Vol.1916:311-318. doi: 10.1007/978-1-4939-8994-2\_30.
159. Guo, Z.G. Oxidized low-density lipoproteins induce apoptosis in aortic and endocardial endothelial cells / Z.G. Guo. – Text : visual // *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* – 1997. – Vol. 18. – P. 525-528.
160. GVS-111 prevents oxidative damage and apoptosis in normal and Down's syndrome human cortical neurons / A. Pelsman, C. Hoyo-Vadilo, T. Gudasheva [et al.]. – Text : visual // *Int. J. Devel. Neurosci.* – 2003. – Vol. 803. – P.1-8.
161. Halliwell, B. Free radicals in biology and medicine / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. – 5 edn. – Oxford: Clarendon Press, Oxford University Press, 2015. – 905 p. – Text : visual.
162. Harrison, R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now? / R. Harrison. – Text : visual // *Free Radic Biol Med.* – 2002. – Vol. 33. – P. 774–797.
163. Human lens phospholipid changes with age and cataract / L. Huang, V. Grami, Y. Marrero [et al.]. – Text : visual // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2005. – Vol. 46. – P. 1682–9.
164. Human neutrophil lactoferrin trans-activates matrix metalloproteinase 1 gene through stress-activated MAPK-signaling modules / S.M. Oh, D.H. Hahm,

I.H. Kim, S.Y. Choi. – Text : visual // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – P. 42575-42579.

165. Hypochlorite induces lipid peroxidation in blood lipoproteins and phospholipid liposomes / O.M. Panasenko, S.A. Evgina, E.S. Driomina [et al.]. – Text : visual // Free Radical Biol. Med. – 1995. – Vol.19. – P. 133-140.

166. Immunoregulatory role of 15-lipoxygenase in the pathogenesis of bacterial keratitis / T.W. Carion, M. Greenwood, A.S. Ebrahim [et al.]. – Text : visual // FASEB J. – 2018. – Vol. 32, № 9. – P. 5026-5038. doi: 10.1096/fj.201701502R.

167. Inhibition of Corneal Inflammation by an Acylated Superoxide Dismutase Derivative / E. Ando, Y. Ando, M. Inoue [et al.]. – Text : visual // Inves. Ophthal. Visual. Sc. – 1990. – Vol. 31, № 10. – P. 1963–1967.

168. Inhibition of lipid peroxidation by the iron-binding protein lactoferrin / J.M.C. Gutteridge, S.K. Paterson, A.W. Segal, B. Halliwell. – Text : visual // Biochem. J. – 1981. – Vol. 199. – P. 259-261.

169. Inhibition of NLRP3 Protects Human Lens Epithelial Cells against Oxidative Stress-Induced Apoptosis by NF- $\kappa$ B Signaling / Y. Zou, B. Cui, P. Liang [et al.] – Text : visual // Ophthalmic. Res. – 2020. – Vol. 65, №2. – P. 174-181. doi: 10.1159/000504303.

170. Involvement of oxygen free radicals in experimental retinal ischemia and the selective vulnerability of retinal damage / H. Kuriyama, M. Waki, M. Nakagawa, M. Tsuda. – Text : visual // Ophthalmic Res. – 2001. – Vol. 33. – P. 196–202.

171. Ischemia and reperfusion-induced histologic changes in the rat retina. Demonstration of a free radical-mediated mechanism / M.E. Szabo, M.T. Droy Lefaix, M. Doly [et al.]. – Text : visual // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 1991. – Vol. 32. – P. 1471–1478.

172. Iverson, F. Phenolic antioxidants: Health protection branch studies on butylated hydroxyanisole / F. Iverson. – Text : visual // Cancer Lett. – 1995. – Vol. 93. – P. 49-54.



173. Jarrett, S.G. Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration / S.G. Jarrett, M.E. Boulton. – Text : visual // *Mol. Aspects Med.* – 2012. – Vol. 33. – P. 399–417. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.03.009>.
174. Jenssen, H. Antimicrobial properties of lactoferrin / H. Jenssen, R. Hancock. – Text : visual // *Biochimie.* – 2009. – Vol. 91. – P. 19–29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2008.05.015>.
175. Jezek, P. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism / P. Jezek, L. Hlavatá. – Text : visual // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2005. – Vol. 37. – P. 2478–2503.
176. Kang, K.A. Oxidative Stress, Nrf2, and Epigenetic Modification Contribute to Anticancer Drug Resistance / K.A. Kang, J.W. Hyun – Text : visual // *Toxicol. Res.* – 2017. – Vol.33, No1. – P. 1–5.
177. Keen, J.N. Glutathione transferases catalysis of nucleophilic reactions of glutathione / J.N. Keen, W.B. Iakoby. – Text : visual // *Biological chemistry.* – 1978. – Vol.253, №16. – P. 5854 - 5858.
178. Khurana, A.K. *Ophthalmology* / A.K. Khurana. – 4 th ed. – New delhi: New age international, 2007. – 355 p. – Text : visual.
179. Kijlstra, A. Lactoferrin levels in normal human tears / A. Kijlstra, S.H.M. Jeurissen, K.M. Koning. – Text : visual // *Br. J. Ophthalmol.* – 1983. – Vol. 67. – P. 199-202.
180. Krause, K.H. Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases / K.H. Krause. – Text : visual // *Jpn. J. Infect. Dis.* – 2004. – Vol. 57. – P. S28–S29.
181. Kruzel Marian, L. Lactoferrin in a Context of Inflammation-Induced Pathology / M.L. Kruzel, M. Zimecki, J.K. Actor . – Text : visual // *Front Immunol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 1438.
182. Kruzel, M.L. Lactoferrin and immunologic dissonance: clinical implications / M.L. Kruzel, M. Zimecki. – Text : visual // *Arch. Immunol. Ther. Exp.* – 2002. – Vol. 50. – P. 399–410.

183. Kuizenga, A. Inhibition of hydroxyl radical formation by human tears / A. Kuizenga, N.J. van Haeringen, A. Kijlstra. – Text : visual // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 1987. – Vol. 28. – P. 305-313.
184. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview / I.A. García-Montoya, T.S. Cendón, S. Arévalo-Gallegos, Q. Rascón-Cruz. – Text : visual // Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. – 2012. – Vol. 1820. – P. 226–236. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.06.018>.
185. Lactoferrin activates plasma membrane oxidase and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity / I.L. Sun, F.L. Crane, D.J. Morré [et al.]. – Text : visual // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1991. – Vol. 176. – P. 498-504.
186. Lactoferrin decreases LPS-induced mitochondrial dysfunction in cultured cells and in animal endotoxemia model / M.L. Kruzel, J.K. Actor, Z. Radak [et al.]. – Text : visual // Innate Immun. – 2010. – Vol. 16. – P. 67–79. Doi: 10.1177/1753425909105317.
187. Lactoferrin for prevention of common viral infections / H. Wakabayashi, H. Oda, K. Yamauchi, F. Abe. – Text : visual // J. Infect. Chemother. – 2014. – Vol. 20. – P. 666–671. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiac.2014.08.003>.
188. Lactoferrin in infant formulas: effect on oxidation / M.T. Satué-Gracia, E.N. Frankel, N. Rangavajhyala, J.B. German. – Text : visual // J. Agric. Food Chem. – 2000. – Vol. 48, № 10. – P. 4984-4990.
189. Lactoferrin stimulates the mitogen activated protein kinase in the human lymphoblastic T Jurkat cell line / I. Duthille, M. Masson, G. Spik, J. Mazurier. – Text : visual // Advances in Lactoferrin Research / eds.: G. Spik [et al.]. – New York: Plenum Press, 1998. – P. 257-260.
190. Lactoferrin Structure and Functions / D. Legrand, A. Pierce, E. Ellass [et al.]. – Text : visual // Adv Exp Med Biol. – 2008. – Vol. 606. – P. 163-94. doi: 10.1007/978-0-387-74087-4\_6.
191. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process / S. Baveye, E. Ellass, J. Mazurier [et al.]. – Text :

visual // Clin. Chem. Lab. Med. – 1999. – Vol. 37. – P. 281–6.10.1515/CCLM.1999.049.

192. Lecithin-bound superoxide dismutase in the prevention of neutrophil-induced damage of corneal tissue / K. Matsumoto, S. Shimmura, E. Goto [et al.]. – Text : visual // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 1998. – Vol. 39, № 1. – P. 30-35.

193. Lipid peroxidation and peroxynitrite in retinal ischemia–reperfusion injury / H. Shibuki, N. Katai, J. Yodoi [et al.]. – Text : visual // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2000. – Vol.41. – P. 3607–3614.

194. Long, A.C. Apoptotic and necrotic mechanisms of stress-induced human lens epithelial cell death / A.C. Long, C.M. Colitz, J.A. Bomser. – Text : visual // Exp. Biol. Med (Maywood). – 2004. – Vol. 229. – P. 1072–80.

195. Lonnerdal, B. Lactoferrin: molecular structure and biological function / B. Lonnerdal, S. Iyer. – Text : visual // Annu Rev. Nutr. – 1995. – Vol. 15. – P. 93–110.10.1146/annurev.nu. 15.070195. 000521.

196. Lou, M.F. Thiol regulation in the lens / M.F. Lou. – Text : visual // J Ocul Pharmacol Ther. – 2000. – Vol.16. – P. 137–48.

197. Ma, J.J. Mechanisms of corneal ulceration / J.J. Ma, C.H. Dohlman. – Text : visual // Ophthalmol. Clin. North. Am. – 2002. – Vol. 15, № 1. – P. 27-33.

198. Management of infective corneal ulcers in a high-income developing country / T. Al Mahmoud, M. Elhanan, M.H. Elshamsy [et al.] . – Text : visual // Medicine (Baltimore). 2019. – Vol. 98 (51). – P. e18243. doi: 10.1097/MD.000000 0000 018243.

199. Medicinal prospects of antioxidants: A review / K. Neha, M.R. Haider, A. Pathak, M.S. Yar. – Text : visual // Eur J Med Chem. – 2019. – Vol. 178. – P. 687-704. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.06.010.

200. Miller, A.C. Very early changes in pulmonary protein kinase C-alpha and calpain II contents following injection of butylated hydroxytoluene (BHT) into mice / A.C. Miller. – Text : visual // Toxicology. – 1995. – Vol. 97. – P. 141-149.

201. Mukhopadhyay, C.K. Free metal ion-independent oxidative damage of collagen. Protection by ascorbic acid / C.K. Mukhopadhyay, I.B. Chatterjee. – Text : visual // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269, № 48. – P. 30200-30205.
202. Multifunctional capacity and therapeutic potential of lactoferrin / Luis Moreno-Expósitoa, Rebeca Illescas-Montesb, Lucía Melguizo-Rodrígueza [et al.]. – Text : visual // *Life Sciences.* – 2018. – Vol. 195. – P. 61–64.
203. Nauseef, W.M. Biological roles for the NOX family NADPH oxidases / W.M. Nauseef. – Text : visual // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283. – P. 16961–16965.
204. Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress / P.K. Mukherjee, V.L. Marcheselli, C.N. Serhan, N.G. Bazan. – Text : visual // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* – 2004. – Vol. 101. – P. 8491–8496. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402531101>.
205. Niu, X.L. Oxidized low-density lipoproteins induce apoptosis in macrophages / X.L. Niu, X.W. Zhang, Z. Guo. – Text : visual // *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* – 1996. – Vol.17. – P. 467-470.
206. Norren, D.V. Spectral transmission of the human ocular media / D.V. Norren, J.J. Vos. – Text : visual // *Vision Res.* – 1974. – Vol. 14. – P.1237–1244.
207. Novel recombinant human lactoferrin: differential activation of oxidative stress related gene expression / M.L. Kruzel, J.K. Actor, M. Zimecki [et al.]. – Text : visual // *J. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 168. – P. 666–75. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.09.011.
208. Nrf2 protects human lens epithelial cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative and ER stress: The ATF4 may be involved / T.J. Ma, D.H. Lan, S.Z. He [et al.]. – Text : visual // *Exp Eye Res.* – 2018. – Vol. 169. – P. 28-37. doi: 10.1016/j.exer.2018.01.018.
209. O'Callaghan, R.J. The Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Eye Infections / R.J. O'Callaghan. – Text : visual // *Pathogens.* – 2018. – Vol. 7, № 1. – P. pii: E9. doi: 10.3390/pathogens7010009.

210. Oxidation-induced changes in human lens epithelial cells. 1. Phospholipids / L. Huang, R. Estrada, M.C. Yappert [et al.] . – Text : visual // *Free Radic Biol Med.* – 2006. – Vol. 41. – P. 1425–32.
211. Oxidative damage of Chinese hamster fibroblasts induced by t-butyl hydroperoxide and by X-rays / M. Bryszewska, A. Piasecka, L.B. Zavodnik [et al.]. – Text : visual // *Biochim Biophys Acta.* – 2003. – Vol. 1621. – P. 285–291.
212. Oxidative metabolism of butylated hydroxytoluene by hepatic and pulmonary microsomes from rats and mice / J.A. Thompson, A.M. Malkinson, M.D. Wand [et al.]. – Text : visual // *Drug Metab. Dispos.* – 1987. – Vol.15. – P. 833-840.
213. Oxidized low density lipoprotein stimulates collagen production in cultured arterial smooth muscle cells / S. Jimi, K. Saku, N. Uesugi [et al.]. – Text : visual // *Atherosclerosis.* – 1995. – Vol. 116. – P. 15-26.
214. Paglia, D.E. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase / D.E. Paglia, W.N. Valentine. – Text : visual // *The Journal of laboratory and clinical medicine.* – 1967. – Vol.70. – P. 158 - 169.
215. Pappa, A. Corneal and stomach expression of aldehyde dehydrogenases: from fish to mammals / A. Pappa, N.A. Sophos, V. Vasiliou. – Text : visual // *Chem. Biol. Interact.* – 2001. – Vol. 130–132. – P. 181–191.
216. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH / R.C. Kukreja, H.A. Kontos, M.L. Hess, E.F. Ellis. – Text : visual // *Circ Res.* – 1986. – Vol. 59. – P. 612–619.
217. Poetsch, A.R. The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis / A.R. Poetsch. – Text : visual // *Comput Struct Biotechnol J.* – 2020. – Vol. 18. – P. 207-219. doi: 10.1016/j.csbj.2019.12.013.
218. Prevalence and risk factors for lens opacities in Nigeria: results of the national blindness and low vision survey / A.M. Mahdi, M. Rabiou, C. Gilbert [et al.] . – Text : visual // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2014. – Vol. 55. – P. 2642–2651. doi: 10.1167/iops.12-10303.

219. Prevalence, causes of blindness, visual impairment and cataract surgical services in Sindhudurg district on the western coastal strip of India / S. Patil, P. Gogate, S. Vora [et al.]. – Text : visual // *Indian J. Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 62. – P. 240–245. doi: 10.4103/0301-4738.

220. Prooxidant actions of bisphenol A (BPA) phenoxyl radicals: implications to BPA-related oxidative stress and toxicity / S. Babu, S. Uppu, M.O. Claville, R.M. Uppu. – Text : visual // *Toxicol. Mech. Methods.* – 2013. – Vol. 23, № 4. – P. 273-80.

221. Protective Effects of Lanosterol Synthase Up-Regulation in UV-B-Induced Oxidative Stress / H. Hua, T. Yang, L. Huang [et al.]. – Text : visual // *Front Pharmacol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 947. doi: 10.3389/fphar.2019.00947.

222. Protective role of intramuscularly administered vitamin E on the levels of lipid peroxidation and the activities of antioxidant enzymes in the lens of rats made cataractous with gamma-irradiation / I. Karslioglu, M.V. Ertekin, I. Kocer [et al.]. – Text : visual // *Eur J Ophthalmol.* – 2004. – Vol. 14. – P. 478–85.

223. Qian, Y. The role of oxygen free radical in experimental keratitis / Y. Qian, J. Wu. – Text : visual // *Zhonghua. Yan. Ke. Za. Zhi.* – 1998. – Vol. 34, № 2. – P. 149-151.

224. Quantificatin of oxygen consumption in retina ex vivo demonstrates limited reserve capacity of photoreceptor mitochondria / K. Kooragayala, N. Gotoh, T. Cogliati [et al.]. – Text : visual // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2015. – Vol. 56. – P. 8428. 10.1167/iovs.15-17901.

225. Reddy, V.N. Metabolism and function of glutathione in the lens / V.N. Reddy. – Text : visual // *Human Cataract Formation.* – London: Pitman, 1984. – Vol.106. – P. 65 – 83.

226. Redox homeostasis, oxidative stress and mitophagy / C. Garza-Lombó, A. Pappa, M.I. Panayiotidis, R. Franco. – Text : visual // *Mitochondrion.* – 2020. – Vol. 51. – P. 105-117. doi: 10.1016/j.mito.2020.01.002.

227. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling / Y.S. Bae, H. Oh, S.G. Rhee, Y.D. Yoo. – Text : visual // *Mol Cells*. – 2011. – Vol. 32. – P.491–509.
228. Retinal glutamate in diabetes and effect of antioxidants / R.A. Kowluru, R.L. Engerman, G.L. Case, T.S. Kern. – Text : visual // *Neurochem. Internat.* – 2001. – Vol. 38, № 5. – P.385-390.
229. Retinal ischemia – reperfusion injury attenuated by blocking of adhesion molecules of vascular endothelium / A. Tsujikawa, Y. Ogura, N. Hiroshiba [et al.]. – Text : visual // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1999. – Vol. 40. – P. 1183–1190.
230. Retinal lipid and glucose metabolism dictates angiogenesis through the lipid sensor Ffar1 / J.S. Joyal, Y. Sun, M.L. Gantner [et al.]. – Text : visual // *Nat Med.* – 2016. – Vol. 22. – P. 439-445. Doi: 10.1038/nm.4059.
231. Retinal Vascular Signs and Cerebrovascular Diseases / T.H. Rim, A.W.J. Teo, H.H.S. Yang [et al.] . – Text : visual // *J. Neuroophthalmol.* – 2020. – Vol. 40, № 1. – P. 44-59. doi: 10.1097/WNO.0000000000000888.
232. Retinal vein occlusions, from basics to the latest treatment / M. Ho, D.T. Liu, D.S. Lam, J.B. Jonas. – Text : visual // *Retina*. – 2016. – Vol. 36, № 3. – P. 432-48. doi: 10.1097/IAE.0000000000000843.
233. Ringvold, A. Distribution of ascorbate in the anterior bovine eye / A. Ringvold, E. Anderssen, I. Kjonniksen. – Text : visual // *Invest. Ophthal. Vis. Sc.* – 2000. – Vol. 41, № 1. – P. 20–23.
234. Role of aldehyde dehydrogenase isozymes in the defense of rat lens and human lens epithelial cells against oxidative stress / S. Choudhary, T. Xiao, S. Srivastava [et al.] . – Text : visual // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2005. – Vol. 46. – P. 259–67.
235. Role of neutrophils in radical production during ischemia and reperfusion of the rat brain: effect of neutrophil depletion on extracellular ascorbyl radical formation / Y. Matsuo, T. Kihara, M. Ikeda [et al.] . – Text : visual // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 1995. – Vol.15. – P. 941–947.

236. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease / M. Fransen, M. Nordgren, B. Wang, O. Apanasets. – Text : visual // *Biochim Biophys Acta*. – 2012. – Vol.1822. – P. 1363–1373.

237. Saccà, S.C. The dysfunction of the trabecular meshwork during glaucoma course / S.C. Saccà, A. Pulliero, A. Izzotti. – Text : visual // *J. Cell Physiol*. – 2015. – Vol. 230. – P. 510–525.

238. Sanchez, L. Biological role of lactoferrin / L. Sanchez, M. Calvo, J.H. Brock. – Text : visual // *Arch. Dis. Child*. – 1992. – Vol. 67. – P. 657–661. doi: 10.1136/adc.67.5.657

239. Serum Oxidative Stress Markers in Patients with Senile Cataract and Healthy Controls / J. Shahinfar, Z. Keshavarzi, M. Ahmadi [et al.]. – Text : visual // *J. Coll. Physicians Surg. Pak*. – 2018. – Vol. 28, № 6. – P. 448-451. doi: 10.29271/jcpsp.2018.06.448.

240. Schwartz-Bloom, R.D.  $\gamma$ -aminobutyric acid neurotransmission and cerebral ischemia / R.D. Schwartz-Bloom, R. Sah. – Text : visual // *J. Neurochem*. – 2001. – Vol.77. – P.353–371.

241. Sharma, R.K. *Adler's Physiology of the Eye: Clinical Application*, Kaufman, P.L. and Alm, A. / R.K. Sharma, B. Ehinger. - eds., St. Louis: Mosby, 2003. – P. 319–347. – Text : visual.

242. Simonić, A. The influence of piracetam on the motor activity of rabbits with contusioned spinal cord / A. Simonić, D. Atanacković, B. Batistić. – Text : visual // *Scand. J. Rehabil. Med. Suppl*. – 1988. – Vol. 17. – P. 125-30.

243. Singh, A. Resveratrol delay the cataract formation against naphthalene-induced experimental cataract in the albino rats / A. Singh, S.H. Bodakhe. – Text : visual // *J Biochem Mol Toxicol*. – 2020. – Vol. 34, № 1. – P. e22420. doi: 10.1002/jbt.22420.

244. Slaga, T.J. Inhibition of skin tumor initiation, promotion, and progression by antioxidants and related compounds / T.J. Slaga. – Text : visual // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. – 1995. – Vol.35. – P. 51-57.



245. Spector, A. Oxidative stress-induced cataract: Mechanism of action / A. Spector. – Text : visual // FASEB J. – 1995. – Vol. 9. – P. 1173–1182.
246. Superoxide dismutase isoenzymes in the normal and diseased human cornea / A. Behndig, K. Karlsson, B.O. Johansson [et al.]. – Text : visual // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2001. – Vol. 42, № 10. – P. 2293-2296.
247. Takayama, Y. Lactoferrin promotes collagen gel contractile activity of fibroblasts mediated by lipoprotein receptors / Y. Takayama, T. Takezawa. – Text : visual // Biochem. Cell Biol. – 2006. – Vol. 84, № 3. – P. 268-274.
248. Takayama, Y. Roles of lactoferrin on skin wound healing. / Y. Takayama, R. Aoki. – Text : visual // Biochem Cell Biol. – 2012. – Vol. 90, № 3. – P. 497-503.
249. Taleva, M.B. · Lactoferrin as Antioxidant and Regulator of Glycolysis in Human Erythrocytes / M.B. Talevaa, L. Manevab. – Text : visual // Z. Naturforsch. – 2003. – Vol. 58. – P. 256-262.
250. Tangvarasittichai, O. Oxidative Stress, Ocular Disease and Diabetes Retinopathy / O. Tangvarasittichai, S. Tangvarasittichai. – Text : visual // Curr Pharm Des. – 2018. – Vol. 24, № 40. – P. 4726-4741. doi: 10.2174/1381612825666190115121531.
251. t-Butylated hydroxytoluene enhances in-tracellular levels of glutathione and related enzymes of rat lens in vitro organ culture / H. Ahmad, R. Sharma, A. Mansour [et al.]. – Text : visual // Exp. Eye Res. – 1992. – Vol. 54. – P. 41-48.
252. The antioxidants in the process of ocular pathology / A. Fernández-Araque, A.A. Giaquinta, C. Laudo Pardo, A. Rojo Aragüés. – Text : visual // Nutr Hosp. – 2017. – Vol. 34, № 2. – P. 469-478. doi: 10.20960/nh.420.
253. The concerted action of lactoferrin and bacteriophages in the clearance of bacteria in sublethally infected mice / M. Zinecki, J. Artym, M. Kocieba [et al.]. – Text : visual // Postery Hig. Med. Dosw. – 2008. – Vol. 62. – P. 42-46.

254. The expressions of klotho family genes in human ocular tissues and in anterior lens capsules of age-related cataract / Y. Zhang, L. Wang, Z. Wu [et al.]. – Text : visual // *Curr. Eye Res.* – 2017. – Vol. 42. – P. 871–875. doi: 10.1080/02713683.2016.1259421.

255. The physiological role of reactive oxygen species (ROS) in lens and corneal epithelial cells / M. Lou [et al.]. – Text : visual // *Act. Ophthalm.* – 2011. – Vol.89, Is. 248. – P. 21-22.

256. The role of corneal crystallins in the cellular defense mechanisms against oxidative stress / N. Lassen, W.J. Black, T. Estey, V. Vasiliou. – Text : visual // *Semin. Cell Evelop. Biol.* – 2008. – Vol. 19, Is. 2. – P. 100–112.

257. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration / S. Beatty, H.-H. Koh, M. Phil [et al.]. – Text : visual // *Surv. Ophthalmol.* – 2000. – Vol. 45. – P. 115–134. [https://doi.org/10.1016/S0039-6257\(00\)00140-5](https://doi.org/10.1016/S0039-6257(00)00140-5).

258. The Structure and Stability of the Disulfide-Linked  $\gamma$ S-Crystallin Dimer Provide Insight into Oxidation Products Associated with Lens Cataract Formation / D.C. Thorn, A.B. Grosas, P.D. Mabbitt [et al.]. – Text : visual // *J. Mol. Biol.* – 2019. – Vol. 431, № 3. – P. 483-497. doi: 10.1016/j.jmb.2018.12.005.

259. Three-dimensional structure of lactoferrin in various functional states / E.N. Baker, B.F. Anderson, H.M. Baker [et al.]. – Text : visual // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1994. – Vol. 357. – P. 1–12. [10.1007/978-1-4615-2548-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2548-6_1).

260. Trends in oxidative aging theories / F.L. Muller, M.S. Lustgarten, Y. Jang [et al.]. – Text : visual // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – Vol. 43. – P. 477–503.

261. Tsai, C.F. Protective Effects of Rosmarinic Acid against Selenite-Induced Cataract and Oxidative Damage in Rats / C.F. Tsai, J.Y. Wu, Y.W. Hsu. – Text : visual // *Int. J. Med. Sci.* – 2019. – Vol. 16, № 5. – P. 729-740. doi: 10.7150/ijms.32222.

262. Turrens, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species / J.F. Turrens. – Text : visual // *J. Physiol.* – 2003. – Vol. 552. – P. 335–344.
263. Types of organisms and in-vitro susceptibility of bacterial isolates from patients with microbial keratitis: A trend analysis of 8 years / S. Das, R. Samantaray, A. Mallick [et al.]. – Text : visual // *Indian J. Ophthalmol.* – 2019. – Vol. 67, № 1. – P. 49-53. doi: 10.4103/ijoo.IJO\_500\_18.
264. Ultraviolet radiation oxidative stress affects eye health / I.V. Ivanov, T. Mappes, P. Schaupp [et al.] . – Text : visual // *J Biophotonics.* – 2018. – Vol. 11, № 7. – P. e201700377. doi: 10.1002/jbio.201700377.
265. Upritchard, J.E. Oxidation of heparin-treated low density lipoprotein by peroxidases / J.E. Upritchard, W.H. Sutherland. – Text : visual // *Atherosclerosis.* – 1999. – Vol.146. – P. 211-219.
266. UV rays, the prooxidant/antioxidant imbalance in the cornea and oxidative eye damage / S. Čejková, S. Ātōpek, J. Crkovska [et al.]. – Text : visual // *Physiol. Res.* – 2004. – Vol. 53, № 1. – P. 1–10.
267. UV-B induced fibrillization of crystallin protein mixtures / S. Cetinel, V. Semenchenko, J.Y. Cho [et al.]. – Text : visual // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12, № 5. – P. e0177991. doi: 10.1371/journal.pone.0177991.
268. Van Heyningen, R. Fluorescent derivatives of 3-hydroxy-L-kynurenine in the lens of man, the baboon and the grey squirrel / R. Van Heyningen. – Text : visual // *Biochem J.* – 1971. – Vol.123. – P. 30P–1P.
269. Vernon, M.W. Piracetam / M.W. Vernon, E.M. Sorkin. – Text : visual // *Drugs & Aging.* – 1991. – Vol. 1, Issue 1. – P. 17–35.
270. Watson, B.D. Animal models of photochemically induced brain ischemia and stroke / B.D. Watson. – Text : visual // *Pathophysiology, Diagnosis and Management. Cerebrovascular Diseases* / eds.: M.D. Ginsberg, J. Bogousslavsky. – Blackwell Science, 1998. – Vol. 1. – P. 52–73.
271. Weidinger, A. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: Oxidative stress versus signal transduction / A. Weidinger, A.V. Kozlov. – Text : visual // *Biomolecules.* – 2015. – Vol. 5. – P. 472–484.

272. Williams, D.L. Oxidation, antioxidants and cataract formation: a literature review / D.L. Williams. – Text : visual // *Vet. Ophthalmol.* – 2006. – Vol. 9. – P. 292–298.

273. Williams, D.L. Prevalence of feline cataract: results of a cross-sectional study of 2000 normal animals, 50 cats with diabetes and one hundred cats following dehydrational crises / D.L. Williams, M.F. Heath. – Text : visual // *Vet Ophthalmol.* – 2006. – Vol. 9. – P. 341–349.

274. Wu, L. Vincamine prevents lipopolysaccharide induced inflammation and oxidative stress via thioredoxin reductase activation in human corneal epithelial cells / L. Wu, M. Ye, J. Zhang. – Text : visual // *Am. J. Transl. Res.* – 2018. – Vol. 10, № 7. – P. 2195–2204.

275. Yno1p/Aim14p, a NADPH-oxidase ortholog, controls extramitochondrial reactive oxygen species generation, apoptosis, and actin cable formation in yeast / M. Rinnerthaler, S. Büttner, P. Laun [et al.]. – Text : visual // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. – Vol.109. – P. 8658–8663.

276. Zhang, H. Increased catalase levels and hypoxanthine-enhanced nitro-blue tetrazolium staining in rat retina after ischemia followed by recirculation / H. Zhang, C.D. Agardh, E. Agardh. – Text : visual // *Curr. Eye Res.* – 1995. – Vol. 14. – P. 47–54.

277. Zhao, J. M. Role of tears in keratocyte loss after epithelial removal in mouse cornea / J. Zhao, T. Nagasaki, D.M. Maurice. – Text : visual // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2001. – Vol. 42. – P. 1743-1749.

278. Zhao, W.J. Increasing susceptibility to oxidative stress by cataract-causing crystallin mutations / W.J. Zhao, Y.B. Yan. – Text : visual // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – Vol. 108. – P. 665-673. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.013.

**БЛАГОДАРНОСТИ**

Автор выражает глубокую благодарность:

Научным консультантам за всестороннюю теоретическую, методическую и практическую помощь в выполнении диссертационного исследования – заведующему лабораторией патологии мозга Московского НИИ психиатрии Минздрава России доктору медицинских наук, профессору **Узбекову Марату Галиевичу**; заведующему кафедрой глазных болезней института усовершенствования врачей ФГУ НМХЦ им. Н.И. Пирогова, старшему специалисту клиники офтальмологии ФГУ НМХЦ им. Н.И. Пирогова доктору медицинских наук, профессору, академику РАЕН **Шишкину Михаилу Михайловичу**

Руководителю отделения модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии МНИОИ им. П.А. Герцена - филиала ФГБУ "НМИРЦ" Минздрава России доктору биологических наук, профессору **Якубовской Раисе Ивановне**, ученому секретарю Диссертационного совета Д 208.047.02 на базе ФГБУ "НМИЦ радиологии" Минздрава России доктору биологических наук **Немцовой Елене Романовне** за разработку препарата на основе Лактоферрина, теоретическую, методическую и практическую поддержку проведенных исследований в рамках диссертационной работы.

Научному руководителю Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский» институт фармакологии имени В.В. Закусова, академику РАН **Сергею Борисовичу Середенину**, руководителю Отдела химии лекарственных средств, члену-корреспонденту РАН **Татьяне Александровне Гудашевой**, главному научному сотруднику лаборатории психофармакологии, профессору **Рите Ушеровне Островской**, заведующему лабораторией нейрохимической фармакологии **Владимиру Сергеевичу Кудрину** за помощь в выполнении исследований по оценке влияния ноопепта на аминокислотный состав сетчатки при экспериментальном тромбозе ее сосудов.

Заведующей кафедрой фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, доктору медицинских наук, профессору **Якушевой Елене Николаевне**, сотрудникам кафедры: профессору, доктору медицинских наук **Узбековой Динаре Галиевне**, доктору медицинских наук, доценту **Щулькину Алексею Владимировичу** за помощь и поддержку на всех этапах выполнения диссертационной работы.