

УДК 617.721-002:616-003.283/284+577.17.05

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ИНСТИЛЛЯЦИЙ МЕЛАТОНИНА НА ХАРАКТЕР ТЕЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО УВЕИТА И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В СЛЕЗНОЙ И ВНУТРИГЛАЗНОЙ ЖИДКОСТЯХ

Н.Б. Чеснокова¹, О.В. Безнос^{1}, Н.А. Лозинская², Г.А. Бейшенова¹, Т.В. Нестерова¹*

¹Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца, 105062, Москва, ул. Садовая-Черногрозская, 14/19; тел.: 8(495)608-42-55; эл. почта: olval2011@mail.ru

²МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

Исследовали влияние инстилляций 0,1% раствора мелатонина на течение увеита, вызванного интравитреальным введением нормальной лошадиной сыворотки кроликам, и биохимические показатели в слезе и внутриглазной жидкости: антиокислительную активность, содержание белка и α_2 -макроглобулина. Лечение мелатонином способствовало уменьшению выраженности клинических признаков воспаления. В слезе на фоне лечения антиокислительная активность была достоверно выше, а содержание α_2 -макроглобулина достоверно ниже, чем у нелеченных животных. Во внутриглазной жидкости, взятой на 10 сутки увеита, после лечения была достоверно повышена антиокислительная активность и также достоверно снижен уровень α_2 -макроглобулина и белка, что свидетельствует об уменьшении интенсивности воспаления, увеличении антиокислительного потенциала и уменьшении проницаемости гематофтальмического барьера.

Ключевые слова: увеит, слеза, водянистая влага, мелатонин.

DOI: 10.18097/PBMC20166202164

ВВЕДЕНИЕ

Увеит – воспалительное заболевание сосудистой оболочки глаза различного генеза, часто затрагивающее и другие структуры глаза, в том числе сетчатку, и приводящее к слабовидению и инвалидности по зрению, особенно в молодом трудоспособном возрасте. Пусковым фактором для развития увеита является сенсибилизация организма микробным или тканевым антигеном и последующая местная сенсибилизация тканей глаза с нарушением гематофтальмического барьера. Повторное попадание антигена в глаз приводит к иммунному конфликту в сосудистой оболочке глаза. Тропные к кровеносным сосудам циркулирующие иммунные комплексы фиксируются на сосудистой стенке, активируют нейтрофилы, которые выделяют активные формы кислорода, эластину- и коллагенолитические ферменты, увеличивая проницаемость сосудов с развитием острого деструктивного процесса [1]. Предрасполагающим фактором считают очень интенсивное кровоснабжение сосудистой оболочки глаза, большую концентрацию в ней тучных клеток, а также то, что она обладает способностью действовать как депо Т и В-лимфоцитов [2].

В настоящее время основным методом лечения увеитов является введение высоких доз кортикостероидов [3]. Однако эти препараты обладают рядом серьёзных побочных эффектов. Учитывая, что при хронических увеитах применять кортикостероиды приходится длительно, иногда в течение многих месяцев, здоровью пациентов, особенно детей, наносится ощутимый вред. Поэтому ведётся активный поиск лекарственных средств, которые могли бы позволить уменьшить дозировку кортикостероидов и сократить время их применения [3].

Известно, что одним из ключевых звеньев патогенеза увеита, как и большинства воспалительных заболеваний, является окислительный стресс [4]. Подавление окислительного стресса является эффективным способом уменьшения интенсивности воспаления, облегчения течения заболеваний и снижения вероятности развития осложнений. Активные формы кислорода не только сами повреждают клетки и вызывают истощение пула эндогенных антиоксидантов, но и активируют транскрипционные факторы NF κ B и активирующий белок-1 (которые, в свою очередь, усиливают экспрессию генов провоспалительных цитокинов), а также индуцибельную NO-синтазу, что приводит к усилению синтеза NO и образованию токсичного пероксинитрита [4]. Все эти и многие другие процессы приводят к замыканию нескольких порочных кругов и прогрессированию воспаления.

Исходя из вышеизложенного, можно определить возможные точки приложения для новых лекарственных препаратов: снижение продукции активных форм кислорода; стимуляция синтеза антиоксидантных ферментов; снижение продукции NO индуцибельной NO-синтазой; инактивация пероксинитрита и NO-радикалов; ингибирование активации транскрипционных факторов (NF κ B и активирующий белок-1); снижение интенсивности перекисного окисления липидов и белков; уменьшение синтеза провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли- α , интерлейкин-1 и др.).

Таким образом, необходим мультифункциональный препарат, сочетающий антиоксидантные свойства со способностью подавлять экспрессию генов провоспалительных факторов и нейтрализовать пероксинитрит. Все эти свойства есть у мелатонина [5]. Мелатонин является основным сквенджером

пероксинитрита и свободных радикалов как кислородного, так и азотного происхождения, в том числе OH^\bullet , NO_2^\bullet , карбонатного радикала $\text{CO}_3^{\bullet-}$. При этом у него есть особенность, выделяющая его из ряда других антиоксидантов – отсутствие прооксидантных свойств в любой концентрации [6]. Мелатонин способен усиливать экспрессию генов, кодирующих антиоксидантные ферменты: супероксиддисмутазу (СОД), каталазу, глутатионпероксидазу [7]. Он также является ингибитором циклооксигеназы-2 и индуцибельной NO-синтазы [8] и снижает интенсивность воспаления, блокируя факторы транскрипции, активирующие экспрессию генов провоспалительных цитокинов [9].

Антиоксидантными свойствами обладают и некоторые метаболиты мелатонина: циклический 3-гидроксимелатонин, N1-ацетил-N2-формил-5-метоксикинурамин, N1-ацетил-5-метоксикинурамин, и, возможно, другие. За счёт таких метаболитов антиоксидантная активность, проявляемая мелатонином *in vivo*, существенно выше чем *in vitro*. Имеются литературные данные о том, что мелатонин в исследованиях *in vivo* эффективнее подавляет окислительный стресс, чем витамин Е, β -каротин и витамин С [10].

Зарубежные исследователи уже использовали мелатонин для лечения увеитов в эксперименте, но во всех доступных нам работах мелатонин применялся системно – в виде внутривенных инъекций, перорально и т.д. [11]. Мы же предприняли попытку применить мелатонин местно, в виде глазных капель, так как этот способ, учитывая амфифильность мелатонина, должен обеспечить хорошую биодоступность и более быстрое достижение эффективной концентрации его в тканях глаза.

Целью работы явилось изучение возможности применения мелатонина в виде глазных капель для лечения острого увеита у кроликов.

МЕТОДИКА

Работа выполнена на 12 кроликах (24 глаза) породы шиншилла, самцах, массой 2 кг. У 8 кроликов на обоих глазах моделировали острый иммуногенный увеит по методике Baldwin [12], модифицированной в НИИ глазных болезней им. Гельмгольца [13]. Нормальную лошадиную сыворотку вводили дважды: первую дозу (5 мл) вводили подкожно, разрешающую (0,07 мл) – в стекловидное тело на 10 сутки после первой.

Для лечения использовали 0,1% раствор мелатонина (масса/объём). Мелатонин (“Sigma-Aldrich”, США) растворяли в небольшом количестве диметилсульфоксида и доводили объём до нужного 0,05 М фосфатным буфером pH 7,4. Две группы по 4 животных (по 8 глаз) получали инстилляцию: первая – раствора мелатонина, вторая – фосфатного буфера с диметилсульфоксидом в том же соотношении. Растворы закапывали 3 раза в день по 30 мкл в оба глаза в течение 8 дней, начиная со дня введения разрешающей дозы лошадиной сыворотки.

Клиническую картину течения увеита оценивали ежедневно путём биомикроскопии с помощью щелевой лампы. Выраженность отёка и гиперемии век и конъюнктивы, отёка радужки и роговицы, количество фибрина в передней камере глаза, наличие спаек между зрачковым краем радужки и передней капсулой хрусталика (задних синехий), помутнение хрусталика оценивали в условных баллах по принятой в лаборатории шкале.

У всех животных забирали слёзную жидкость с помощью фильтровальной бумаги до первого введения лошадиной сыворотки и далее на 1, 3, 7 сутки увеита. Кружки из фильтровальной бумаги диаметром 5 мм помещали за нижнее веко на 5 мин, затем компоненты слезы элюировали 0,05 М фосфатным буфером pH 7,4 в соотношении 50 мкл на 1 кружок, затем центрифугировали 10 мин при 3000 g и супернатант использовали для исследований. Элюат соответствовал слезе, разведённой в 10 раз.

В элюате определяли следующие показатели: концентрацию общего белка по Лоури [14]; антиокислительную активность (АОА) по параметрам кинетики хемилюминесценции в модельной системе гемоглобин- H_2O_2 -люминол [15]; уровень α_2 -макроглобулина (α_2 -МГ) по ингибированию активности трипсина в присутствии соевого ингибитора протеолиза [16], активность СОД по торможению автоокисления кверцетина [17]. Для определения условной нормы в те же дни забирали слезу у 4 здоровых животных (8 глаз). Значения показателей в слезе рассчитывали в % от условной нормы.

На 10 сутки увеита у всех животных, в том числе здоровых, забирали внутриглазную жидкость (ВЖ) из передней камеры глаза инсулиновым шприцем под местной анестезией Алкаином (0,5% проксиметакаин), центрифугировали 10 мин при 3000 g и в надосадочной жидкости определяли те же показатели, что и в слезе.

Величину оптической плотности образцов измеряли на микропланшетном фотометре Synergy MX (“Bio-Tek”, США). Кинетику хемилюминесценции регистрировали на хемилуминометре “Биотокс-7” (“НПО “Энергия””, Россия). Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистических пакетов программ Excel и Statistica. Достоверность различий между группами с уровнем значимости не менее 95% оценивали с помощью параметрического t-критерия Стьюдента. Для оценки различий между группами по клиническим признакам увеита был применен непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показало проведённое нами ранее гистологическое исследование [18], при данном способе моделирования увеита развивается панувеит, но из-за выраженного помутнения хрусталика биомикроскопия позволяла наблюдать изменения только в переднем отделе глаза.

После введения разрешающей дозы лошадиной сыворотки у животных наблюдалась типичная картина острого увеита: гиперемия и отёк конъюнктивы, отёк век, нарастающий отёк радужки и роговицы, выпадение хлопьев фибрина в передней камере глаза, исчезновение реакции зрачка на свет за счёт формирования задних синехий, помутнение хрусталика.

При лечении мелатонином наблюдалась выраженная тенденция к уменьшению отёка и гиперемии конъюнктивы, отёка роговицы и радужки. Количество фибрина в передней камере оказалось достоверно меньше ($p < 0,05$), чем у нелеченных животных (рис. 1). Это важный терапевтический эффект, поскольку меньшее количество фибрина снижает вероятность развития таких осложнений увеита, как образование прочных спаек между зрачковым краем радужки и передней капсулой хрусталика и вторичная глаукома.

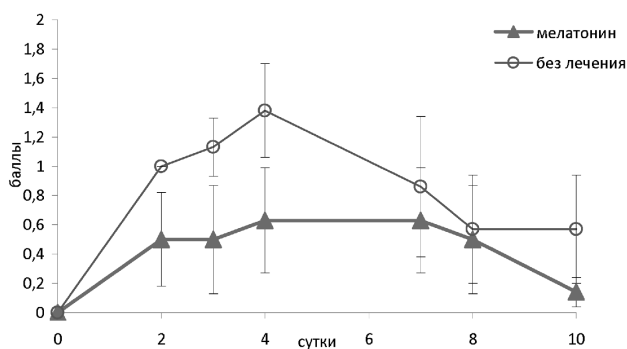


Рисунок 1. Количество фибрина в передней камере глаза кроликов при экспериментальном увеите.

Биохимическое исследование слёзной жидкости

У всех животных с увеитом наблюдалось снижение АОА слезы, свидетельствующее о выраженном окислительном стрессе. У нелеченных животных оно достигало 50% ($p < 0,01$), в то время как у леченных мелатонином – только 30% (рис. 2А). На 7 сутки АОА несколько повысилась, что соответствовало стиханию воспаления.

В слезе отмечалась тенденция к увеличению активности СОД в острый период увеита. У нелеченных животных активность СОД увеличилась на 15%, а на 7 сутки оказалась ниже нормы ($p < 0,02$). Лечение мелатонином привело к её повышению в течение всего периода наблюдения. Максимальное повышение наблюдалось на 1 сутки и составило 30% по сравнению с нормой. Возможно, повышение активности СОД в слезе животных, получавших инстилляции мелатонина, обусловлено стимуляцией мелатонином экспрессии гена, кодирующего СОД [5, 7].

У нелеченных животных на 1 сутки увеита содержание α_2 -МГ в слезе увеличилось в 4 раза по сравнению с нормой ($p < 0,05$) (рис. 2Б), а у леченных мелатонином только в 2 раза ($p < 0,05$ по сравнению с нелеченными), что свидетельствует о противовоспалительном действии мелатонина.

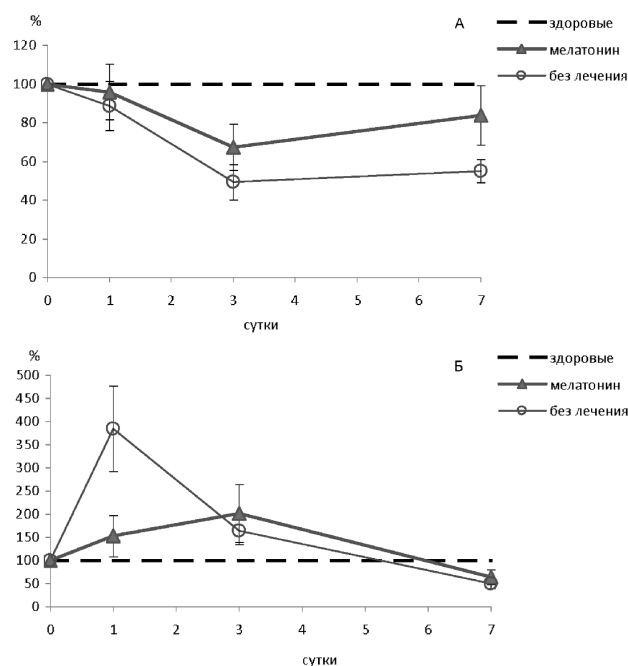


Рисунок 2. Биохимические показатели в слезе кроликов при экспериментальном увеите в % от уровня здоровых животных: А - антиокислительная активность; Б - содержание α_2 -макроглобулина.

Содержание α_2 -МГ в слезе и водянистой влаге изменяется в процессе развития воспаления, поскольку этот белок является, во-первых, ингибитором сериновых протеаз, которые в большом количестве присутствуют в очаге воспаления, а во-вторых, переносчиком ряда факторов иммунной системы, в частности α и β интерферонов, факторов некроза опухолей- α и β , трансформирующего фактора роста- $\beta 1$, многих интерлейкинов, иммуноглобулинов класса G. Известно также, что α_2 -МГ способен стимулировать образование антител [20]. Это особенно важно при данной модели увеита, поскольку пусковым механизмом воспаления в данном случае является иммунный конфликт в сосудистой оболочке глаза, протекающий с образованием циркулирующих иммунных комплексов. Как показали исследования, проведенные нами на различных моделях заболеваний глаз, уровень α_2 -МГ в слезе и ВЖ может служить надёжным индикатором выраженности воспаления [19, 21, 22].

Биохимическое исследование ВЖ

Внутриглазная жидкость была взята на 10 сутки увеита, когда острый период миновал и внешние проявления воспаления заметно уменьшились. Тем не менее, у всех животных с увеитом в ней было более, чем в 10 раз увеличено содержание белка по сравнению со здоровыми кроликами ($p < 0,01$). Как видно из таблицы, у получавших лечение оно было в 1,3 раза меньше, чем у нелеченных ($p < 0,01$). Содержание белка в ВЖ отражает состояние гематоофтальмического барьера: при воспалении его проницаемость резко возрастает. Известно, что мелатонин обладает способностью стабилизировать

ПРИМЕНЕНИЕ МЕЛАТОНИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ УВЕИТЕ

Таблица. Биохимические показатели во внутриглазной жидкости кроликов на 10 сутки увеита без лечения и на фоне лечения мелатонином

группа	антиокислительная активность (мкМ тролокса)	общий белок (мг/мл)	α_2 -макроглобулин (нмоль/мин-мл)
здоровые (8 глаз)	888,25 ± 55,26	0,84 ± 0,04	3,31 ± 1,82
без лечения (8 глаз)	315,00 ± 70,10*	20,8 ± 0,81*	19,78 ± 3,56*
лечение мелатонином (8 глаз)	534,86 ± 19,05* **	12,61 ± 0,94* **	9,8 ± 1,65* **

Примечание: * - $p < 0,01$ по сравнению со здоровыми животными; ** - $p < 0,01$ по сравнению с животными, не получавшими лечения.

тканевые барьеры, в частности гематоэнцефалический, путём подавления синтеза коллагеназы, разрушающей белки межклеточных контактов [23]. Вероятно, и в данном эксперименте такой эффект имел место.

У всех животных с увеитом АОА ВЖ, как и АОА слезы, была сильно снижена по сравнению со здоровыми животными ($p < 0,01$), но у леченных мелатонином она составила 60% от нормы, что было достоверно выше ($p < 0,02$), чем у нелеченных (40% от нормы). Это подтверждает выраженное антиоксидантное действие мелатонина.

Активность СОД в ВЖ кроликов с увеитом была на 15% выше, чем у здоровых. Лечение мелатонином никак не сказалось на ее уровне. Поскольку в слезе животных, получавших мелатонин, активность СОД повышалась только на 1 сутки увеита и уже к 7 суткам снизилась почти до уровня нормы, можно предположить, что в ВЖ происходило то же самое. Мы и ранее наблюдали значительное увеличение активности СОД в слезе только в острый период воспаления [18].

Содержание α_2 -МГ в ВЖ у всех животных с увеитом было достоверно повышено по сравнению со здоровыми ($p < 0,01$), но у леченных мелатонином оно оказалось вдвое ниже, чем у нелеченных ($p < 0,01$), что свидетельствует о менее выраженном воспалении.

ВЫВОДЫ

Инстилляции 0,1% раствора мелатонина положительно влияют на течение экспериментального увеита. Лечение мелатонином способствует уменьшению выраженности клинических признаков воспаления. Результаты биохимического исследования слезы и водянистой влаги свидетельствуют об увеличении под влиянием лечения местного антиокислительного потенциала, уменьшении проницаемости гематоофтальмического барьера и снижении остроты воспаления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шатилова Р.И., Бархатова Л.А. (1995) Офтальмол. журнал, №1, 1-5.
2. Ермакова Н.А. (2003) Клин. офтальмол., 4(4), 141-143.
3. Катаргина Л.А., Хватова А.В. (2000) Эндогенные увеиты у детей и подростков, М., Медицина, 320 с.

4. Нероев В.В., Катаргина Л.А., Денисова Е.В., Старикова А.В., Любимова Н.В. (2012) Рос. офтальмол. журнал, 5(2), 39-44.
5. Yadav U.C.S., Kalarya N.M., Ramana K.V. (2011) Curr. Med. Chem., 18(6), 931-942.
6. Korkmaz A., Reiter R.J., Topal T., Manchester L.C., Oter S., Tan D-X. (2009) Mol. Med., 15(1-2), 43-50.
7. Tan D-X. (2002) Curr. Top Med. Chem., №2, 181-197.
8. Rodriguez C., Mayo J.C., Sainz R.M., Antolin I., Herrera F., Martin V., Reiter R.J. (2004) J. Pineal Res., 36, 1-9.
9. Deng W.G., Tang S.T., Tseng H.P., Wu K.K. (2006) Blood., 110(2), 518-524.
10. Li J.H., Yu J.P., Yu H.G., Xu X.M., Yu L.L., Liu J., Luo H.S. (2005) Mediators Inflamm., 4, 185-193.
11. Reiter R.J., Manchester L.C., Tan D-X. (2010) Curr. Neuropharmacol., 8(3), 194-210.
12. Crooke A., Huete-Toral F., Martínez-Águila A., Colligris B., Pintor J. (2012) Expert Opin. Drug Discov., 7(10), 989-1001.
13. Baldwin H.A., Borgmann R. (1970) Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 133, 1326-1330.
14. Нероев В.В., Давыдова Г.А., Перова Т.С. (2006) Бюлл. экспер. биол. и мед., 142(11), 598-600.
15. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. (1951) J. Bio Chem., 193, 265-275.
16. Гулидова О.В., Любичкий О.Б., Клебанов Г.И., Чеснокова Н.Б. (1999) Бюлл. экспер. биол. мед., 128(11), 571-574.
17. Чеснокова Н.Б., Кузнецова Т.П. (1995) Исследование суммарной активности трипсиноподобных протеиназ и антипротеолитической активности в слезной жидкости при воспалительных заболеваниях глаз для выбора рациональной терапии: Метод. рек. Минздравмедпром РФ, М., 10с.
18. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. (1990) Вопр. мед. хим., 36(2), 88-91.
19. Чеснокова Н.Б., Нероев В.В., Безнос О.В., Бейшенева Г.А., Никольская И.И., Кост О.А., Биневский П.В., Шехтер А.Б. (2014) Вестн. офтальмол., 130(5), 30-36.
20. Зорин Н.А., Зорина В.Н., Зорина Р.М., Левченко В.Г. (2004) Клин. лаб. диагн., 49(11), 18-22.
21. Чеснокова Н.Б., Кузнецова Т.П., Сосулина Н.Е. (1994) Вестн. офтальмол., 110(2), 20-22.
22. Чеснокова Н.Б., Макаров П.В., Безнос О.В. (2001) Вестн. офтальмол., 117(2), 38-41.
23. Qin W., Lu W., Li H., Yuan X., Li B., Xiu R. (2012) J. Endocrinol., 214(2), 145-153.

Поступила: 26. 05. 2015.
Принята к печати: 29. 12. 2015.

**EFFECT OF MELATONIN INSTILLATIONS ON THE CLINICAL COURSE OF EXPERIMENTAL
UVEITIS AND BIOCHEMICAL PROCESSES IN TEARS AND AQUEOUS HUMOR**

N.B. Chesnokova¹, O.V. Beznos¹, N.A. Lozinskaya², G.A. Beyshenova¹, T.V. Nesterova¹

¹Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases,
14/19 Sadovaya-Chernogryazskaya str., Moscow, 105062 Russia; tel.: 8(495)608-42-55; e-mail: olval2011@mail.ru

²Moscow State University, Chemistry faculty, 1(3) Leninskiye Gory, Moscow, 119991 Russia

Acute immunogenic uveitis was modeled in rabbits via the subcutaneous and intravitreal injections of normal horse serum. We studied the effect of instillations of 0.1% melatonin solution on the clinical course of uveitis and biochemical parameters of tear fluid and aqueous humor: antioxidant activity, protein concentration and α_2 -macroglobulin level. Melatonin instillations decreased clinical manifestations of uveitis. We found that the antioxidant activity in tears of the rabbits treated with melatonin was substantially higher and the α_2 -macroglobulin level lower than in untreated animals. Antioxidant activity in aqueous humor taken on day 10 of uveitis was also twice higher while protein and α_2 -macroglobulin levels were 1.5-2 times lower than in untreated animals. These data indicate that instillations of melatonin increase the local antioxidant activity and decrease the acuity of inflammation and permeability of hematoophthalmic barrier in uveitis.

Key words: uveitis, melatonin, aqueous humor, tears