На правах рукописи

ТИХОНОВИЧ МАРИНА ВАЛЕРЬЕВНА

ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ НЕСТЕРОИДНОЙ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ РАЗВИТИЯ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ ВИТРЕОРЕТИНОПАТИИ

14.01.07 – глазные болезни

14.03.03 – патологическая физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва 2016 г

Работа была выполнена на базе факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» и ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России

Научные руководители:

Иойлева Елена Эдуардовна, доктор медицинских наук, ученый секретарь ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России;

Гаврилова Светлана Анатольевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Официальные оппоненты:

Иошин Игорь Эдуардович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий офтальмологическим отделением в ФГБУ «Клиническая больница»;

Темнов Андрей Александрович, доктор медицинских наук, заведующий научной лабораторией клеточных и физико-химических медицинских технологий ГБУ здравоохранения города Москвы «НИИ скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы».

Ведущая организация:

ГБОУ ВПО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России

Защита состоится «5» декабря 2016 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д.208.014.01 при ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России по адресу: 127486, г. Москва, Бескудниковский б-р, д. 59А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России.

Автореферат разослан «____» _____2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук **И.А. Мушкова**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Пролиферативная витреоретинопатия (ПВР) – это тяжелая патология глаза, которая характеризуется избыточным воспалением, формированием соединительнотканных мембран и приводит к слепоте. Она является одной из основных причин рецидива регматогенной отслойки сетчатки, которая встречается в 6,1-17,9 случаев на 100 тысяч населения (Mitry D., 2010). ПВР в послеоперационном периоде развивается в 16% случаев (Bonnet M., 1995; Kon C.H., 2000).

В настоящее время самым эффективным способом лечения ПВР считают хирургический (Silicone Study Group 1992; de Silva DJ, 2008). Даже после тщательного удаления мембран с поверхности сетчатки, частота рецидивов ПВР в первые три месяца после операции составляет в среднем 45% (Нероев ВВ, 2012; Шишкин ММ, 2012; Bonnet M, 1995; Kon C.H, 2000). Заболевание диагностируют на поздних стадиях, когда мембраны сформированы и обширны. Поэтому в дополнение к уже существующим хирургическим методам назрела необходимость разработки терапевтических подходов для профилактики ПВР.

В основе процесса развития заболевания лежит воспалительная реакция, характеризующаяся наличием альтерации, экссудации и пролиферации. В момент нарушения целостности сетчатки одним из первых активируется каскад арахидоновой кислоты. Из арахидоновой кислоты циклооксигеназы (ЦОГ-1 и ЦОГ-2) синтезируют провоспалительные простагландины, которые организуют процесс воспаления в поврежденной области. Провоспалительная ЦОГ-2 экспрессируется и клетками поврежденной сетчатки, и клетками идиопатических мембран (Maloney S., 2009), и образующимися на глазном дне при сахарном диабете мембранами (Kase S., 2010). Далее происходит увеличение проницаемости сосудов и выход провоспалительных клеток крови в преретинальное пространство. Клетки начинают синтезировать цитокины и факторы роста, что с одной стороны приводит к еще большему увеличению

проницаемости сосудов, а с другой – стимулирует пролиферацию клеток ПЭС, глиальных и иммунных клеток на поверхности сетчатки и стекловидного тела (Sen H., 1988; Lagua H., 1975; Vinores S., 1990; Charteris D., 2002; Oberstein S., 2011; Johnsen E., 2012). Клетки синтезируют матрикс, а через 2 недели от начала развития ПВР у них появляется сократительная активность. Это момент формирования фиксированных складок отслоенной сетчатки с выраженным ее укорочением (Glaser B., 1987; Walshe R., 1992).

Для уменьшения воспаления в клинике применяют стероидные препараты, которые блокируют действие фосфолипазы A_2 и подавляют весь каскад метаболизма арахидоновой кислоты (Tano Y., 1980; Acar N., 2010; Chen W., 2011), включая образование липоксинов. Липоксин A_4 подавляет воспаление и способствует его разрешению (Gronert K., 2010). Стероидные препараты имеют ряд побочных эффектов: повышение ВГД и ВЧД, развитие задней субкапсулярной катаракты, повышение уровня глюкозы в крови, снижение местного иммунитета (Майский В., 2006). К данной группе препаратов относится триамцинолона ацетонид, широко используемый в офтальмологии.

Действие НПВС при интравитреальном введении не изучено. НПВС блокируют работу ЦОГ, синтез липоксина A_4 сохраняется. Для исследования нами выбран лорноксикам – НПВС с выраженным обезболивающим, противовоспалительным и антиагрегантным действием. Препарат не оказывает токсического действия на сетчатку (Diakonis VF, 2013). В качестве положительного действия рассматриваем его способность уменьшать пролиферацию фибробластов и глиальных клеток (Гаврилова СА, 2008; Тихонович МВ, 2012). НПВС не имеют побочных эффектов стероидных препаратов.

Можно предположить, что данные свойства лорноксикама будут эффективны для профилактики развития ПВР.

Цель исследования

Изучить роль провоспалительных факторов в динамике развития пролиферативной витреоретинопатии и обосновать применение нестероидного противовоспалительного препарата (лорноксикама) для профилактики развития данного заболевания.

Задачи исследования

1. Доказать наличие провоспалительных, ростовых и нейротрофических факторов в эпиретинальных мембранах человека на поздних стадиях ПВР.
2. Создать диспазную модель пролиферативной витреоретинопатии у крыс и разработать критерии оценки состояния глаза крыс в эксперименте.
3. Обосновать преимущества применения нестероидной противовоспалительной терапии при ПВР по разработанным критериям в сравнении со стероидной терапией.
4. Изучить динамику изменений экспрессии циклооксигеназ в сетчатке и хориоидее на разных сроках развития пролиферативной витреоретинопатии в диспазной модели у крыс.
5. Провести сравнительный анализ изменений экспрессии циклооксигеназ в сетчатке и хориоидее в ответ на введение стероидного и нестероидного противовоспалительных препаратов при пролиферативной витреоретинопатии.

Научная новизна исследования

1. Впервые доказано, что в развивающихся при ПВР эпиретинальных мембранах на поздних стадиях заболевания экспрессируются циклооксигеназы первого и второго типов, нейротрофины BDNF и NGF и эндотелиальный фактор роста сосудов, что способствует поддержанию воспаления в глазу и росту мембран. Наблюдается прямая корреляционная зависимость между экспрессией ЦОГ-1, VEGF и BDNF.

2. Впервые создана модель пролиферативной витреоретинопатии у крыс на основе интравитреального введения диспазы и разработаны критерии оценки состояния глаза и изменений сетчатки в данной модели, основанные на офтальмоскопических и морфологических данных.

3. Впервые исследовано действие нестероидного противовоспалительного препарата (лорноксикам) на состояние глаза и изменения морфологических показателей сетчатки и хориоидеи при развитии ПВР в диспазной модели у крыс.

4. Впервые сравнили влияние нестероидного противовоспалительного препарата (лорноксикам) и стероидного противовоспалительного препарата (триамцинолона ацетонид) на состояние животных и их глаз, морфологические изменения сетчатки и хориоидеи, выраженность и частоту образования пролиферативных мембран.

5. Впервые изучили изменения экспрессии циклооксигеназ в сетчатке и хориоидее на разных стадиях развития заболевания в диспазной модели ПВР у крыс и проанализировали действие нестероидного противовоспалительного препарата (лорноксикам) и стероидного противовоспалительного препарата (триамцинолона ацетонид) на неё.

Практическая значимость

1. Выявлено, что в эпиретинальных мембранах при ПВР синтезируются провоспалительные факторы, на синтез и экспрессию которых можно влиять терапевтически.

2. Разработана схема терапевтического лечения ПВР, которая эффективнее применяемых в настоящее время в офтальмологии терапевтических методов профилактики пролиферативной витреоретинопатии.

3. Учитывая доказанный минимальный риск осложнений, возможность повторного введения, высокую эффективность профилактики ПВР, внедрение нестероидной противовоспалительной терапии в офтальмологическую практику позволит уменьшить количество рецидивов

отслойки сетчатки после хирургического лечения и снизить частоту встречаемости и тяжесть послеоперационных осложнений.

4. Нестероидный противовоспалительный препарат (лорноксикам) доступен для широкого внедрения в офтальмологическую практику.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Доказано, что на ранних стадиях развития пролиферативной витреоретинопатии происходит увеличение экспрессии провоспалительных циклооксигеназ в сетчатке и хориоидее, это сопровождается запуском целого каскада морфологических изменений. В образующихся на поздних стадиях данного заболевания мембранах также синтезируются провоспалительные циклооксигеназы, эндотелиальный фактор роста сосудов и нейротрофины, что поддерживает высокий уровень воспаления в глазу и способствует дальнейшему росту мембран.

2. Обосновано применение нестероидной противовоспалительной терапии для профилактики развития пролиферативной витреоретинопатии на основании полученных в ходе исследования данных, отражающих преимущества использования НПВС в сравнении со стероидной терапией. Лорноксикам, блокируя действие циклооксигеназ и нормализуя их экспрессию в сетчатке и хориоидее, препятствует развитию эндофтальмита, предупреждает ремоделирование сетчатки на всех сроках ПВР, значительно снижает частоту образования мембран и выраженность в них фиброзных процессов.

Внедрение в практику

Разработанная диспазная модель ПВР и критерии оценки состояния глаза при данной патологии у крыс внедрены и эффективно используются в практике на кафедре физиологии и общей патологии ФФМ МГУ. Их используют в научных целях для изучения фундаментальных вопросов воспаления и для разработки терапевтических подходов в лечении, также анализ получаемых результатов исследования включен в обучающий план кафедры физиологии и общей патологии ФФМ МГУ.

Апробация диссертации

Основные положения диссертации доложены на VI всероссийской с международным участием школе-конференции по физиологии кровообращения (Москва, 2016), на 14ом международном конгрессе «EURETINA» (Лондон, 2014), на XI и XII международных научно-практических конференциях «Современные технологии лечения витреоретинальной патологии» (Москва, 2014 и 2013), на международной конференции «ISOCB Ocular Cell Biology Conference» (Оксфорд, 2013), и на международном молодежном научном форуме «Ломоносов - 2012» (Москва, 2012).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ, из них - 4 в центральных рецензируемых журналах из списка ВАК РФ, 2 иностранные публикации. Получено два патента РФ на изобретение № 2558991 приоритет от 31.01.2014 и № 2458656 приоритет от 17.06.2011.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, трех глав собственных исследований, включающих описание материалов и методов, результатов, заключения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 173 страницах компьютерного текста, содержит 22 таблицы, 25 рисунков. Список литературы включает 265 источников, из них 6 отечественных и 259 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Работа состоит из клинической и экспериментальной частей.

1. В клиническую часть вошли 11 пациентов (11 образцов): 6 мужчин и 5 женщин в возрасте от 31-ого до 74-х лет (60,2±11,2 года) с РОС и наличием выраженной ПВР (на стадии от B до D3). У двух пациентов в анамнезе первичная отслойка сетчатки, у девяти – рецидив отслойки сетчатки. У всех пациентов локализация разрывов сетчатки периферическая. Длительность

заболевания у пациентов варьировала от 4-х до 36-ти месяцев (13,2±8,8 месяцев). Пациенты с другой глазной патологией из исследования были исключены. Всем пациентам проводили стандартные офтальмологические обследования до и после операции. В полученных при хирургическом вмешательстве эпиретинальных мембранах ПЦР-анализом определяли мРНК циклооксигеназ (ЦОГ-1 и ЦОГ-2), эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF), мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и фактора роста нервов (NGF).

2. Экспериментальная часть исследования выполнена на трехстах половозрелых самцах беспородных крыс (300 глаз), массой 354±110 гр. В ходе эксперимента оценивали общее состояние животных: массу, внешний вид, активность; проводили общий осмотр глаза и его придатков; выполняли непрямую офтальмоскопию с видеорегистрацией глазного дна и стекловидного тела.

Разработка диспазной модели пролиферативной витреоретинопатии у крыс

Для разработки модели ПВР использовали протеолитический фермент, расщепляющий белки внеклеточного матрикса, диспазу. Раствор фермента в трех дозах 0,015U/мкл, 0,035U/мкл, 0,075U/мкл вводили интравитриально в объеме 2 мкл, контрольным животным вводили 0,9% NaCl эквивалентно, дополнительно исследовали интактный контроль. Эксперимент выполнен на 70 крысах. Энуклеацию проводили на 1-ой, 6-ой и 8-ой неделях эксперимента. Полученные срезы глаз окрашивали гематоксилин-эозином и азаном по методу Гейденгайна (на соединительную ткань).

Оценка состояния сетчатки и хориоидеи осуществляли по разработанным оригинальным критериям: толщина отдельных слоев сетчатки и общая толщина сетчатки, толщина хориоидеи, продолжительность волнообразных изменений ядерных слоев сетчатки и её отслойки, наличие кист и розеток в сетчатке, выраженность деструкции фоторецепторов, наличие суб- и/или эпиретинальных кровоизлияний и суб- и/или эпиретинальных мембран (рис. 1).

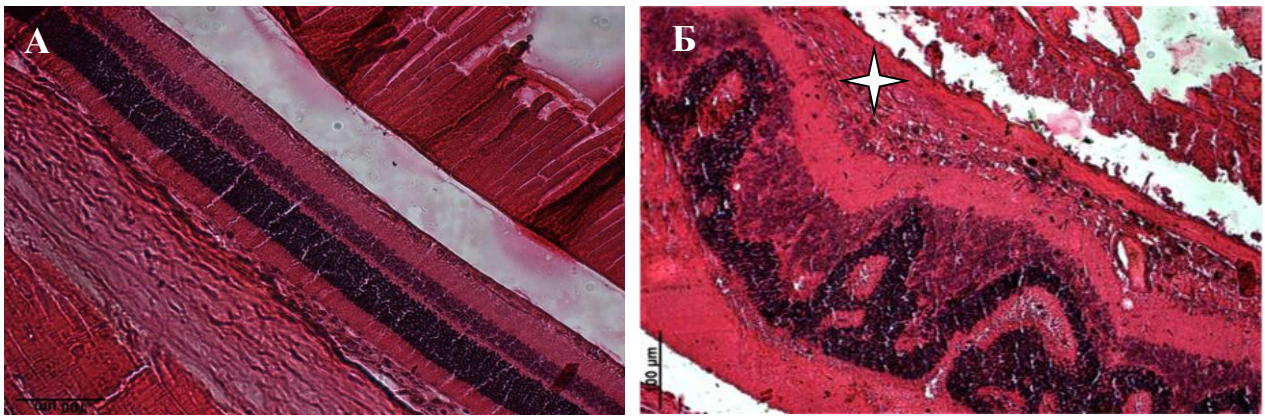

Рис. 1 Морфология сетчатки крысы. А – сетчатка в норме. Б – сетчатка при ПВР, вызванной введением диспазы. Звездочкой обозначена мембрана

Высокие дозы фермента на поздних сроках эксперимента вызывали сильные деструктивные изменения сетчатки, когда не представлялось возможным выделить в ней конкретные слои. Скорость их появлений зависела от дозы фермента: максимальная доза вызывала деструкцию на 6-ой неделе эксперимента, а средняя доза - на 8-ой неделе. Минимальная доза диспазы не вызывала столь выраженных изменений сетчатки. Интравитреальное введение 2 мкл диспазы в дозе 0,015 U/мкл приводило к формированию в 100% случаев выраженных фиброзных мембран на 42 сутки эксперимента. Именно эта доза была выбрана для моделирования заболевания.

Исследование действий противовоспалительных препаратов на динамику развития ПВР у крыс

Протокол экспериментов. Для исследования эффективности противовоспалительной терапии при моделировании ПВР крысам через 20 мин после интравитреальной инъекции 0,015U/мкл диспазы вводили лорноксикам в дозе 8 мг/мл или триамцинолона ацетонид (ТА) в дозе 40 мг/мл. На вторые и третьи сутки лорноксикам вводили внутрибрюшинно в дозе 230 мкг/кг, ТА – внутримышечно в дозе 571 мкг/кг, контрольные крысы получали 0,9% NaCl эквивалентно, дополнительный контроль - интактные крысы. Энуклеацию проводили на 1-ый, 3-ий, 7-ой и 42-ой день эксперимента. Всего выполнили 130 экспериментов. *Экспериментальные группы животных:* **Физ р-р** - животные,

получавшие 0,9% NaCl; **Лорн** – животные, получавшие лорноксикам; **Триам** – животные, получавшие триамцинолона ацетонид; **Дисп** - животные, получавшие внутриглазную инъекцию 2 мкл диспазы; **Дисп+Лорн** – животные с диспазной витреоретинопатией, получавшие лорноксикам; **Дисп+Триам** - животные с диспазной витреоретинопатией, получавшие ТА; **ИК –** интактные животные в качестве контроля.

Схема и дозы вводимых препаратов выбраны исходя из рекомендованных для людей. *Гистологические методы оценки состояния сетчатки глаз.* Полученные срезы глаз окрашивали гематоксилин-эозином. Фотографирование срезов и обсчет проводили с использованием программы «AxioVision».

Исследование экспрессии циклооксигеназ в сетчатке и хориоидее в диспазной модели ПВР у крыс, и влияния противовоспалительных препаратов на этот процесс

Во всех группах изучали динамику продукции циклооксигеназ 1 и 2 типов, эксперимент выполнен на 100 животных. Протокол эксперимента описан выше. На депарафинизированные срезы наносили первичные антитела к ЦОГ-1 или ЦОГ-2 (кролик против крысы) фирмы Abcam и вторичные (козел против кролика), меченные пероксидазой. Активность собственных пероксидаз подавляли H_2O_2. В качестве отрицательного контроля использовали окрашенные вторичными антителами срезы сетчатки интактных крыс. Подсчет концентрации циклооксигеназ в слоях сетчатки и в хориоидее осуществляли в программе «ImagePro».

Статистическую обработку результатов проводили в программах Microsoft Excel 2011, Statistica 10.0, IBM SPSS Statistics 22. Использовали метод χ-квадрат или точный критерий Фишера; дисперсионный анализ смешанной линейной модели; непараметрический U-критерий Манна-Уитни; метод ранговой корреляции по Спирмену. Различия считали значимыми при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты анализа экспрессии ростовых, трофических и провоспалительных факторов в эпиретинальных мембранах

В 11-ти образцах эпиретинальных мембран пациентов с тяжелыми формами течения как рецидивирующей, так и первичной ПВР методом ПЦР выявлена экспрессия мРНК ЦОГ-1 и ЦОГ-2, VEGF и BDNF. мРНК NGF обнаружили только в трех образцах. Экспрессия провоспалительных факторов не зависела от пола, возраста пациентов, частоты рецидивирования заболевания и исхода лечения.

Впервые было выявлено, что чем больше в мембране экспрессировалось ЦОГ-1, тем больше в ней обнаруживали VEGF (Spearman R=0,71; $p<0,05$) и BDNF (Spearman R=0,74; $p<0,01$). Уровни продукции мРНК VEGF и BDNF также положительно связаны между собой (Spearman R=0,61; $p<0,05$). Ранее считалось, что зрелые мембраны имеют низкий уровень воспаления.

Таким образом, было показано, что на поздних стадиях ПВР в мембранах синтезируются провоспалительные факторы и факторы, обеспечивающие сохранность и пролиферацию клеток - VEGF и BDNF, что поддерживает высокий уровень воспаления и ростовых процессов в больном глазу.

Эти результаты позволили выработать рабочую гипотезу о том, что подавление синтеза простагландинов в ранний срок развития заболевания снизит уровень воспаления и уменьшит процессы фиброзирования и роста мембран.

Результаты действия противовоспалительных препаратов на динамику развития ПВР у крыс

Введение диспазы сопровождалось развитием катаракты у четверти животных 25% ($p<0,01$) и гемофтальма более, чем у половины животных в группе ($p<0,001$).

Лорноксикам на ранних сроках развития ПВР не влиял на частоту образования катаракты и гемофтальма. При использовании ТА для профилактики ПВР наблюдали тенденцию к увеличению частоты развития катаракты и гемофтальма на 18% ($p=0,11$) и на 15% ($p=0,13$) соответственно по сравнению с группой, получившей диспазу. В этой группе эндофтальмиты сопровождали развитие ПВР у четверти животных ($p<0,05$ по сравнению с группой Дис).

Оба противовоспалительных препарата сдвигали момент образования волнистых изменений в сетчатке с первых на третьи сутки эксперимента. Лорноксикам сдерживал увеличение частоты встречаемости «розеток» в сетчатке при развитии ПВР ($p<0,05$). Препарат на 34% ($p<0,05$) уменьшил частоту поражения фоторецепторов, при этом состояние пораженных фоторецепторов в группе Дисп+Лорн было в 2 раза лучше ($p<0,05$), чем в группе Дисп, и выраженность их изменений была сопоставима с таковой у животных, получавших физ. р-р. Триамцинолона ацетонид не обладал данными действиями.

Диспаза в месте непосредственного контакта с сетчаткой приводила к нарушению целостности ретинальных и/или хориоидальных сосудов, что сопровождалось кровоизлиянием. Нарушение гематоофтальмического барьера стимулировало развития мембран, которые образовывались эпи- и/или субретинально. ТА не повлиял на частоту развития мембран. Использование лорноксикама на 43% ($p<0,05$) снизило частоту развития мембран. В тех случаях, когда при применении лорноксикама мембраны образовывались, на 42 сутки эксперимента они всегда были меньше по размеру и почти не содержали выраженных фиброзных тяжей. Морфологически это многоклеточные структуры, похожие на молодые мембраны на 7 сутки у животных без лечения (рис. 2). Вероятно, хирургическое удаление данного типа мембран будет менее травматично для сетчатки.

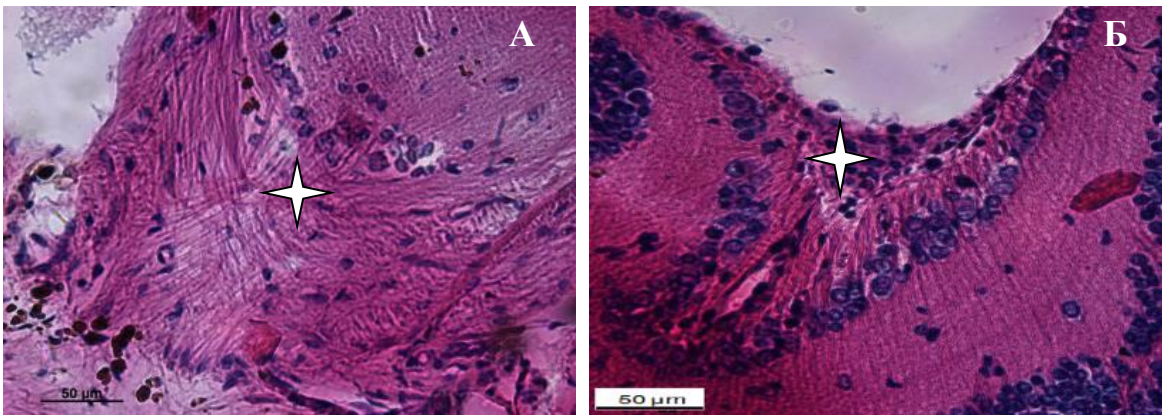

Рис. 2. Мембраны при ПВР на 42 сутки эксперимента. А – группа Дисп. Б – группа Дисп+Лорн. Звездочкой обозначены мембраны

Большое внимание было уделено изучению состояния сетчатки и хориоидеи. Было выявлено, что интавитреальная инъекция физиологического раствора сопровождается утолщением сетчатки на 54 мкм ($p<0,001$), вызванным отеком всех её слоев, кроме ганглионарного. На 42 сутки отек спадает, и толщина сетчатки становится сопоставима с интактной. То есть нарушение целостности глазного яблока запускает слабую реакцию воспаления. При этом толщина хориоидеи не изменялась на протяжении всего эксперимента. Введение диспазы ухудшило состояние сетчатки и хориоидеи. Изменения появились с первых суток и нарастали с увеличением длительности эксперимента. На 1-ые сутки происходило увеличение ВЯС и НПС на 33% ($p<0,05$) и на 50% ($p<0,01$) соответственно, что было вызвано отеком ганглионарного слоя сетчатки. На 3-и сутки общая толщина сетчатки уменьшалась на 21% ($p<0,05$) по сравнению с группой ИК, в основном за счет уменьшения толщины НЯС, ВПС в 1,4 раза ($p<0,05$) и нейроганглионарного слоя в 1,5 раза ($p<0,01$) вследствие гибели фоторецепторов и ганглионарных клеток сетчатки. На 7-ые сутки после внутриглазной инъекции диспазы происходило значительное увеличение толщины всех слоев, кроме СПК и НГС, при этом общая толщина сетчатки увеличилась в 2 раза ($p<0,05$) по сравнению с ИК. Толщина хориоидеи увеличивалась в 3 раза ($p<0,01$). Однако в отличие от группы Физ р-ра, при использовании диспазы не происходило уменьшения

толщины сетчатки к 42 суткам эксперимента. Толщина хориоидального слоя была больше на 68% ($p<0,01$), а толщина сетчатки – на 59% ($p<0,05$) по сравнению с группой ИК, что связано с процессами глиоза и фиброза в сетчатке.

Использование ТА в диспазной модели ПВР у крыс уменьшало выраженность изменений слоёв сетчатки по сравнению с группой, получавшей только диспазу. Препарат сдерживал появление изменений толщины слоев сетчатки на 1-ые сутки. На 3-и сутки наблюдали уменьшение слоя хориоидеи и НГС сетчатки на 37% ($p<0,01$) и 29% ($p<0,05$) соответственно. К 7-ым суткам наблюдали общее утолщение сетчатки в 1,6 раза ($p<0,01$). В данном случае оно происходило из-за расширения СПК в 1,9 раза ($p<0,01$), НЯС в 1,5 раза ($p<0,05$) и ВЯС в 1,6 раза ($p<0,05$). Хориоидея также увеличивалась в размерах в 4 раза ($p<0,001$). К концу эксперимента в группе Дисп+Триам осталось только три крысы, у которых можно было анализировать сетчатку, у остальных животных наблюдался эндофтальмит. К 42 суткам НГС уменьшается по сравнению с ИК на 24% ($p<0,05$).

Лорноксикам нивелировал действие диспазы, и толщины сетчатки и хориоидеи не менялись на протяжении всего эксперимента.

Таким образом, применение лорноксикама на ранних стадиях ПВР препятствовало развитию эндофтальмита, предупредило ремоделирование сетчатки и хориоидеи на ранних и поздних стадиях заболевания, на 43% снизило частоту образования мембран и значительно уменьшило их фиброзирование. Использование ТА способствовало увеличению частоты развития катаракты, гемофтальма, в 8 раз увеличило количество случаев эндофтальмита, не предупредило отёк сетчатки, развившийся на седьмые сутки эксперимента, ухудшило состояние хориоидеи и НГС.

Результаты действия противовоспалительных препаратов на экспрессию циклооксигеназ в диспазной модели пролиферативной витреоретинопатии у крыс

На 1-ые сутки после введения диспазы обнаружили ЦОГ-1 в ЭС, в НПС и во внутренних сегментах фоторецепторов, где в норме данный фермент отсутствует. ТА усилил действие диспазы на экспрессию ЦОГ-1 в ЭС, НЯС и ВЯС, и в НГС на 7%, 6%, 29% и 9% соответственно ($p<0,05$). В группе Дисп+Триам возросла экспрессия ЦОГ-1 в слоях, где в норме её нет: в хориоидее на 45% ($p<0,05$), во внутренних сегментах фоторецепторов на 38% ($p<0,05$) и в НПС на 16% ($p<0,05$) соответственно по сравнению с животными из группы ИК. Использование лорноксикама привело к возвращению экспрессии ЦОГ-1 к норме не только по распределению в слоях сетчатки, но и по концентрации в них.

ЦОГ-2 также стала определяться во всех слоях сетчатки и в хориоидее после введения диспазы. При этом в НГС произошло увеличение экспрессии ЦОГ-2 по сравнению с группой ИК на 32% ($p<0,05$). Использование НПВС в дополнение к инъекции диспазы вернуло количество ЦОГ-2 во внутренних сегментах фоторецепторов к норме. Лорноксикам снизил экспрессию ЦОГ-2 в НГС на 9% по сравнению с группой, не получавшей лечения. ТА не повлиял на экспрессию данной изоформы фермента в НГС по сравнению с группой Дисп.

На 3-и сутки эксперимента экспрессия ЦОГ-1 во всех группах соответствовала норме. ЦОГ-2 по-прежнему присутствовала во всех слоях сетчатки и в хориоидее в группе Дисп. Лорноксикам сдвинул момент увеличения экспрессии ЦОГ-2 в НГС с первых на третьи сутки и нормализовал содержание фермента в ЭС.

На 7-ые сутки эксперимента в группе, получавшей диспазу, экспрессия ЦОГ-1 была снижена на 28% ($p<0,05$) в ВЯС по сравнению с группой ИК. Противовоспалительные препараты оказали протективный эффект на уровне данного слоя. В группе Дисп+Триам была увеличена продукция ЦОГ-1 в

хориоидее в 1,5 раза ($p<0,05$), в ЭС в 2 раза ($p<0,01$), в слое внутренних сегментов фоторецепторов в 1,4 раза ($p<0,05$) и в НГС в 1,3 раз ($p<0,05$) по сравнению с базовым уровнем. Данные изменения могли быть вызваны ишемией сетчатки. При использовании лорноксикама для профилактики ПВР данных изменений в экспрессии ЦОГ-1 не наблюдали.

Экспрессия ЦОГ-2 на 7-ые сутки после введения диспазы снижалась также в НЯС и ВЯС на 34% ($p<0,01$) и 31% ($p<0,05$) по сравнению с группой ИК соответственно, что, вероятно, было вызвано гибелью клеток в данных слоях. Противовоспалительные препараты на этот эффект диспазы не повлияли.

На шестой неделе эксперимента экспрессия ЦОГ-1 была снижена во внутреннем ядерном слое на 30% ($p<0,05$) у всех групп животных, получавших диспазу. Картина экспрессии ЦОГ-2 мало отличалась от той, что была получена на седьмые сутки эксперимента.

Во всех мембранах, развившихся вследствие ПВР, аналогично мембранам у людей обнаружили экспрессию циклооксигеназ первого и второго типов.

Таким образом, введение диспазы с первых суток эксперимента изменяло экспрессию циклооксигеназ первого и второго типов в сетчатке и хориоидее. Противовоспалительные препараты оказали в основном эффект на экспрессию ЦОГ-1. При этом лорноксикам с первых суток нормализовал профиль экспрессии фермента, в то время как ТА, наоборот, увеличивал концентрацию ЦОГ-1 в сетчатке и хориоидее с первых по седьмые сутки эксперимента, что способствовало поддержанию высокого уровня воспаления в глазу и развитию пролиферативной витреоретинопатии.

Выводы

1. Методом ПЦР-анализа было доказано, что на поздних стадиях ПВР в эпиретинальных мембранах человека экспрессируются провоспалительные циклооксигеназы (ЦОГ-1 и ЦОГ-2), эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF), нейротрофический фактор роста (BDNF) и фактор роста нервов (NGF). Выявлена положительная корреляционная зависимость между экспрессией ЦОГ-1, VEGF и BDNF.

2. Созданная модель пролиферативной витреоретинопатии у крыс позволяет изучить течение заболевания с момента его инициации до поздних стадий. Интравитреальное введение 2 мкл раствора диспазы в дозе 0,015U/мкл запускает воспалительный процесс и на 42 сутки стабильно приводит к развитию выраженных фиброзированных мембран. Разработаны критерии оценки состояния глаз крыс, полностью характеризующие ПВР на ранних и поздних стадиях развития.

3. В эксперименте in vivo доказано, что блокирование ЦОГ-1 и ЦОГ-2 с помощью лорноксикама в острую стадию ПВР оказывает выраженный противовоспалительный эффект, что препятствует развитию эндофтальмита, предупреждает ремоделирование сетчатки на всех сроках развития ПВР, на 43% снижает частоту образования мембран и выраженность в них фиброзных процессов. Ингибирование фосфолипазы A_2 с помощью триамцинолона ацетонида приводит к увеличению частоты развития эндофтальмита и не сопровождается уменьшением проявлений признаков ПВР ни в острый, ни в хронический период заболевания.

4. Методом иммуногистохимического окрашивания определено, что экспрессия ЦОГ-1 и ЦОГ-2 при моделировании ПВР имеет сложную динамику. В первые сутки концентрация обоих ферментов возрастает во всех слоя сетчатки. На третий день экспрессия ЦОГ-1 нормализуется; концентрация ЦОГ-2 уменьшается во всех слоях, за исключением эпителиального, где её содержание остается в 1,3 раза выше нормы. С седьмых суток эксперимента

экспрессия ЦОГ-1 и ЦОГ-2 уменьшается в ядерных слоях сетчатки более чем на 30%.

5. При введении нестероидного противовоспалительного препарата лорноксикама в условиях эксперимента in vivo сохраняется профиль экспрессии ЦОГ-1, соответствующий здоровому контролю, тогда как стероидный препарат триамцинолона ацетонид усиливает экспрессию ЦОГ-1 в слоях сетчатки, содержащих ядра клеток, и в хориоидее на ранних сроках развития ПВР.

6. Доказано, что подавление циклооксигеназного звена воспалительной реакции является перспективной стратегией терапевтической профилактики развития пролиферативной витреоретинопатии.

Практические рекомендации

1. Рекомендуется включение интравитреального введения в конце выполнения операции и системного применения в последующие два дня после операции нестероидного противовоспалительного препарата лорноксикама в схему терапевтической профилактики пролиферативной витреоретинопатии у людей, перенесших хирургическое лечение регматогенной отслойкой сетчатки и отслойки сетчатки, осложненной ПВР.

2. Рекомендуется исключить интравитреальное использование триамцинолона ацетонида при наличии острого воспаления в глазу.

3. Рекомендуется включить результаты исследования о роли циклооксигеназ в функционировании сетчатки глаза и регуляции ими ростовых процессов в условиях изменяющейся синтетической активности в учебный курс офтальмологии, физиологии и фармакологии для студентов медиков и биологов.

4. Рекомендуется использовать созданную модель пролиферативной витреоретинопатии у крыс как корректную модель для изучения

функционирования сетчатки и хориоидеи в условиях здоровья и при изменяющейся синтетической активности клеток сетчатки.

5. Рекомендуется применять разработанную модель для оценки влияния лекарств на пролиферативные процессы в сетчатке, для разработки новых терапевтических стратегий пролиферативных заболеваний с последующей перспективой их использования в клинике.

Список сокращений

ВПС – внутренний плексиформный слой
ВЯС – внутренний ядерный слой
мРНК – матричная РНК
НГС – нейроганглионарный слой
НПВС – нестероидное противовоспалительное средство
НПС – наружный плексиформный слой
НЯС – наружный ядерный слой
ПВР – пролиферативная витреоретинопатия
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПЭС – пигментный эпителий сетчатки
ЦОГ – циклооксигеназа
ТА – триамцинолона ацетонид
ЭС – эпителиальный слой
BDNF - нейротрофический фактор мозга
NGF - фактор роста нервов
VEGF - эндотелиальный фактор роста сосудов

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Тихонович М., Иойлева Е., Гаврилова С. Роль воспаления в развитии пролиферативной витреоретинопатии // **Клиническая медицина**. — 2015. — Т. 93, № 7. — С. 14–20.

2. Ердяков А., Тихонович М., Ржавина Е., Гаврилова С. Характеристики сетчатки при развитии пролиферативной витреоретинопатии у крыс после внутриглазной инъекции конканавалина А и диспазы // **Российский**

физиологический журнал им. И.М.Сеченова. — 2015. — Т. 101, № 5. — С. 572–585.

3. Тихонович М., Лыскин П., Иойлева Е. и др. Экспрессия ростовых, трофических и провоспалительных факторов в эпиретинальных мембранах пациентов с тяжелой формой пролиферативной витреоретинопатии // **Офтальмохирургия** — 2015. — № 4. — С. 36–42.

4. Тихонович М., Иойлева Е. Роль эндотелиального фактора роста сосудов в физиологии сетчатки // **Вестник Оренбургского государственного университета**. — 2015. — № 12(187). — С. 244–249.

5. Тихонович. М.В., Ердяков А.К., Ржавина Е.М. «Влияние лорноксикама на общее состояние глаза и образование эпиретинальных мембран в модели воспаления у крыс» // VI Всероссийская научная конференция молодых ученых с участием иностранных специалистов «Актуальные проблемы офтальмологии» сборник научных работ 2011. – М., - С. 239-240

6. Тихонович М., Ердяков А., Ржавина Е. Влияние лорноксикама на состояние глаза и образование эпиретинальных мембран в модели воспаления // Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье: XIV Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей (с международным участием). — Издательство СПбГУ СПб., 2011. — С. 269–270.

7. Тихонович М., Ердяков А., Ржавина Е. Влияние лорноксикама на общее состояние глаза и образование эпиретинальных мембран в модели воспаления у крыс//Материалы 6-й Всероссийской научной конференции молодых ученых "Актуальные проблемы офтальмологии". — М., 2011. – С. 239.

8. Тихонович М. Неселективный блокатор циклооксигеназ в лечении патологий центрального отдела сетчатки с отечно-транссудативным

компонентом // Материалы Международного молодежного научного форума Ломоносов-2012. — МАКС Пресс, 2012.

9. Тихонович М., Лыскин П. Неселективный блокатор циклооксигеназ в лечении патологий хориоретинального интерфейса центрального отдела сетчатки с отечно-транссудативным компонентом // V Всероссийский с международным участием семинар-круглый стол "Макула" 2012. — Ростов-на-Дону, 2012. — С. 523–524.

10. Тихонович М., Ржавина Е., Ердяков А. Влияние неселективного блокатора циклооксигеназ на развитие эпиретинального фиброза в моделях необратимой ишемии глаза и диспазовызванной пролиферативной витреоретинопатии // Механизмы функционирования висцеральных систем. VIII Всероссийская конф. с междунар. участием. — СПб., 2012. – С.238.

11. Тихонович М., Ржавина Е., Ердяков А. Влияние неселективного блокатора циклооксигеназ на общее состояние глаза и сетчатки в моделях воспаления//Современные технологии лечения витреоретинальной патологии. — М., 2013. – С. 191-192.

12. Ердяков А., Ржавина Е., Тихонович М. Влияние лорноксикама на общее состояние глаза и сетчатки в различных моделях воспаления // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины: Материалы V Междунар. науч.-практ. конф., г. Ростов-на-Дону, 3–5 октября 2013 г. — Издательство ЮФУ г. Ростов-на-Дону, 2013. — С. 344–345.

13. Tikhonovich M., Rzhavina E., Erdyakov A., Gavrilova S. Influence of nonselective cyclooxygenase inhibitor on the overall state of the eye in inflammatory models. // ARVO/ISOCB Ocular Cell Biology Conference. — Oxford, United Kingdom, 2013. — P. 89–89.

14. Tikhonovich M., Gavrilova S. A rat model of proliferative vitreoretinopathy induced by dispase // 14th EURETINA — London, United Kingdom, 2014

15. Тихонович М., Иойлева Е., Гаврилова С. Разработка диспазной модели пролиферативной витреоретинопатии крыс // "Современные технологии в офтальмологии": "Современные технологии лечения витреоретинальной патологии". — 2014. — № 1. — С. 104–105.

16. Тихонович М., Гаврилова С. Лорноксикам предупреждает развитие пролиферативной витреоретинопатии // Физиология кровообращения: VI Всероссийская с международным участием школа-конференция. — МАКС Пресс Москва, 2016. — С. 157–158.

Патенты РФ

1. Тихонович. М.В., Лыскин П.В. Способ лечения оперированного незакрывшегося макулярного отверстия. Патент РФ на изобретение №2458656 от 20.08.2012 г.

2. Тихонович М.В., Гаврилова С.А. Способ моделирования пролиферативной витреоретинопатии у крыс. Патент РФ на изобретение №2558991 от 10.08.2015 г.

Биографические данные

Тихонович Марина Валерьевна, 1986 года рождения, в 2009 году с отличием окончила факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова по специальности «Лечебное дело».

С 2009 по 2011 год проходила обучение в клинической ординатуре по специальности «офтальмология» на базе ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. С 2011 по 2012 год обучалась в очной аспирантуре на базе ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. С 2013 по 2016 год обучалась в очной аспирантуре на базе кафедры физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Автором опубликовано 23 печатных работы, 16 из которых по теме диссертации, получено два патента РФ на изобретение.

За время обучения в аспирантуре автор принял участие в исполнении работ по четырем грантам, в одном из которых являлся руководителем проекта.

Также за время прохождения аспирантуры Тихонович М.В. получила четыре награды, одна из которых – стипендия Правительства РФ.