

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Тюлина Вероника Валерьевна

**Окислительный стресс при синдроме сухого глаза, вызванный
нарушением мигательного рефлекса**

Специальность 1.5.5. Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва - 2026

Диссертация подготовлена в отделе сигнальных систем клетки Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель: **Сенин Иван Иванович** - доктор химических наук

Официальные оппоненты: **Медведева Наталия Александровна** – доктор биологических наук, профессор, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных, ведущий научный сотрудник.

Колосова Наталия Гориславовна – доктор биологических наук, профессор, Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», лаборатория молекулярных механизмов старения, заведующая лабораторией.

Бережнов Алексей Валерьевич – доктор биологических наук, Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Институт биофизики клетки РАН, лаборатория клеточных механизмов нейропатологий, ведущий научный сотрудник.

Защита диссертации состоится «12» октября 2026 г. в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.7 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12, биологический факультет МГУ, аудитория М1.

E-mail: belka.umarova.msu@gmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/4045>

Автореферат разослан « » сентября 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета МГУ.015.7

доктор биологических наук

Умарова Б.А.

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы

В XXI веке население все больше зависит от различных технологий в личной и профессиональной сферах, много времени проводит за цифровыми экранами такими как компьютеры, смартфоны и планшеты, что привело к росту распространенности офтальмологических заболеваний, которые могут затронуть до 90% людей по всему миру, что заставляет обратить внимание на эту проблему.

Последствия длительного использования устройств визуального отображения информации еще предстоит выяснить. Однако уже имеющиеся клинические данные однозначно указывают на связь целого ряда патофизиологических эффектов с продолжительностью использования цифровых устройств. Одним из ключевых признаков является изменение физиологии моргания, которое выражается в изменении динамики паттернов мигательного рефлекса, что приводит к развитию синдрома сухого глаза (ССГ). Все это может привести к изменению биохимического состава и гиперосмолярности слезной жидкости (СЖ) с последующим воспалением эпителия роговицы и конъюнктивы.

Имеющиеся данные в основном носят фрагментарный характер, и требуются дальнейшие исследования для выявления изменений биохимического состава и компонентов СЖ при развитии ССГ, вызванного нарушением мигательного рефлекса. Интересно, что уже первые клинические исследования показали, что у пользователей цифровых экранов глазная поверхность подвержена окислительному стрессу (ОС), который может вызывать повреждение роговицы. У пациентов с ССГ в СЖ обнаружено провоспалительное состояние, а также повышенные концентрации маркеров перекисного окисления липидов. Первичный ответ, вероятно, включает замкнутый круг между прооксидантными и провоспалительными механизмами, которые способствуют дисфункции глазной поверхности. Поэтому дальнейшее изучение механизмов и динамики развития окислительного повреждения структур глаза при ССГ, вызванного нарушением мигательного рефлекса, представляет большой интерес для фундаментальной науки и прикладного применения при разработке терапевтических подходов для профилактики и лечения последствий длительного использования электронных устройств визуального отображения.

Целью настоящей работы является изучение механизмов развития окислительного стресса и его патогенетической роли при синдроме сухого

глаза, связанного с нарушением мигательного рефлекса, а также поиск обоснованного подхода для его коррекции.

В соответствии с этой целью решались следующие задачи:

1. Разработать экспериментальную модель синдрома сухого глаза, вызванного нарушением мигательного рефлекса и изучить динамику изменения компонентов антиоксидантной защиты в слёзной жидкости при развитии этой патологии;
2. Провести качественный и количественный анализ перекисного окисления липидов и изменений сигнального липидома слёзной жидкости с целью определения путей, опосредующих ответ тканей поверхности глаза в условиях окислительного стресса;
3. Исследовать эффективность местного применения водорастворимых антиоксидантов на клинко-морфологические изменения роговицы, показатели антиоксидантной активности и продуктов перекисного окисления липидов слёзной жидкости;
4. Оценить влияние применения ингибитора липоксигеназы на накопление продуктов перекисного окисления липидов и изменение липидного состава слёзной жидкости;
5. Изучить клинические, морфологические и биохимические эффекты применения митохондриально-адресованного антиоксиданта с оценкой терапевтической эффективности при синдроме сухого глаза.

Научная новизна работы

В работе была разработана новая экспериментальная модель ССГ, вызванного нарушением физиологии моргания. Предложенный подход позволил создать условия, имитирующие нарушение паттернов мигательного рефлекса и развитие ССГ у людей во время использования цифровых экранов. Охарактеризованы клинко-морфологические повреждения роговицы, а также изменение окислительно-восстановительного баланса СЖ при нарушении мигательного рефлекса, что ранее не было продемонстрировано ни в одном исследовании. Показано снижение антиоксидантной активности (АОА) и концентрации низкомолекулярных антиоксидантов, а также накопление продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в СЖ.

Впервые разработан воспроизводимый метод количественного совместного определения полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и оксипинов в СЖ. Продemonстрирована ключевая роль липидных продуктов липоксигеназного пути метаболизма арахидоновой и линолевой кислот при развитии воспаления глазной поверхности при ССГ, вызванного нарушением мигательного рефлекса.

Впервые показано, что местное применение глазных капель, содержащих диметилсульфоксид (ДМСО) и ингибитор 5-липоксигеназы Зилеутон, оказывает положительное действие на клинико-морфологические изменения роговицы при ССГ. В основе молекулярных механизмов терапевтического действия этих препаратов лежит их способность подавлять накопление продуктов ПОЛ и продуктов метаболизма арахидоновой и линолевой кислот липоксигеназного пути, что приводит к подавлению ОС и снижению индекса воспаления глазной поверхности.

Впервые показана эффективность митохондриально-адресованной антиоксидантной терапии при ССГ, вызванном нарушением мигательного рефлекса. Митохондриально-адресованный антиоксидант SkQ1 подавляет нарушение окислительно-восстановительного баланса СЖ, снижает провоспалительный ответ на глазной поверхности и подавляет разрушение внеклеточного матрикса роговицы.

Теоретическая и практическая значимость работы

На основании клинических, гистологических и биохимических данных можно говорить о возможном использовании разработанной нами модели для фундаментальных исследований механизмов развития ССГ и поиска новых терапевтических подходов лечения этого заболевания. В частности, с использованием нашей модели мы подтвердили роль ОС и воспаления в развитии ССГ, вызванного нарушением мигательного рефлекса. Нами впервые было показано, что ДМСО и ингибитор 5-липоксигеназы могут оказать положительное действие на ССГ. Кроме того, с использованием митохондриально-адресованного антиоксиданта SkQ1 мы продемонстрировали потенциальную эффективность антиоксидантной терапии при ССГ. Таким образом были впервые предложены и успешно применены подходы для профилактики и лечения ССГ, вызванного нарушением физиологии моргания.

Методология исследования

Работа выполнена с использованием современных биохимических, физико-химических, гистологических, клинических методов. Для исследований *in vivo* использовали модель на лабораторных кроликах.

Положения, выносимые на защиту

1. В условиях нарушения мигательного рефлекса у кроликов происходит развитие клинико-морфологических изменений глазной поверхности, характерных для ССГ;
2. Нарушение мигательного рефлекса приводит к развитию в СЖ окислительного стресса и сопровождается снижением в ней содержания низкомолекулярных антиоксидантов и накоплением продуктов перекисного окисления липидов и провоспалительных оксилипинов;

3. Липоксигеназы играют ключевую роль в биосинтезе провоспалительных оксилипинов на глазной поверхности при ССГ;
4. Местное применение ДМСО подавляет перекисное окисление липидов в СЖ;
5. Терапия ингибитором липоксигеназы - Зилеутоном - подавляет накопление провоспалительных оксилипинов и приводит к выраженному снижению индекса воспаления в СЖ на фоне нарушения мигательного рефлекса;
6. Митохондриально-адресованный антиоксидант SkQ1 препятствует развитию окислительного стресса и накоплению провоспалительных медиаторов в СЖ, а также сохраняет барьерную функцию эпителия роговицы.

Степень достоверности данных

Все результаты были получены в трех и более независимых экспериментах. Для достижения межгрупповой статистической достоверности все экспериментальные группы включали шесть и более экспериментальных животных. Методы исследования и статистическая обработка данных соответствует современным стандартам.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 11 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.5. Физиология человека и животных.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на следующих научных мероприятиях: «Достижения и перспективы супрамолекулярной и биологической химии в биомедицине и сельском хозяйстве» (Москва, 4-8 декабря 2017); Sechenov International Biomedical Summit 2018 (Москва, 21-23 мая 2018); II Объединенный научный форум (Дагомыс, 1-6 октября 2019); «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны» (Санкт-Петербург, 19-20 ноября 2020); 6-ая Российская конференция по медицинской химии с международным участием (MedChem-Russia, Нижний Новгород, 1-4 июля 2024); Всероссийская конференция с международным участием (Биохимия человека, Москва, 17–19 октября 2024); Международная научная конференция, посвященная 120-летию со дня рождения академика А.Н. Белозерского и 90-летию со дня рождения академика В.П. Скулачёва (Москва, 20-22 февраля 2025); Третья Всероссийская школа-конференция по медицинской химии для молодых ученых с международным участием (Уфа, 23-27 июня 2025). По материалам работы опубликованы 8 тезисов докладов в сборниках российских и международных конференций. Диссертационная

работа апробирована на заседании отдела сигнальных систем клетки НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова.

Личный вклад автора

Основные результаты диссертационной работы получены автором самостоятельно в отделе сигнальных систем клетки НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова с 2016 по 2026 год. Личный вклад включает: анализ научной литературы по теме исследования, разработку дизайна экспериментов и их выполнение, осуществление моделирования ССГ на животных, клинические осмотры, получение образцов для гистологических и биохимических исследований, статистическую обработку, анализ результатов. Соискателем осуществлялась подготовка рукописей статей к публикации и представление результатов работы на научных конференциях. Непосредственное измерение концентрации оксилипинов методом tandem mass spectrometry (ВЭЖХ-МС/МС) проводились при участии к.ф.н. Горяинова С.В. Подготовка гистологических срезов роговицы проводилась при участии к.б.н. Ганчаровой О.С.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 120 страницах и содержит 25 рисунков и 5 таблиц. В текст работы вошли следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение результатов исследования, выводы, список сокращений и список литературы (232 источника).

II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение. Во введении обозначены актуальность исследования и степень разработанности научной темы, сформулированы цели и задачи, аргументирована научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, описаны методология и методы исследования, сформулированы положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы. В обзоре литературы представлены современные данные о патогенезе ССГ, причинах развития ОС на глазной поверхности, описаны антиоксиданты СЖ, маркеры и мишени ОС, липидные медиаторы СЖ. Кроме того, представлена информация о существующих моделях ССГ на животных.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на самцах кроликов породы «новозеландская белая» возрастом 4–6 мес. и массой 2,3–3,5 кг. Животных содержали в индивидуальных клетках при 12-часовом световом цикле, температуре 22–25 °С и влажности 45–60% со свободным доступом к корму и воде. Исследование одобрено комитетом по уходу и использованию животных НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ (протоколы № 1/2016, № 001-1/05/2023, № 007-2/03/2024).

Модель ССГ создавали в условиях общей анестезии при влажности воздуха 30% и блокировании мигательного рефлекса векорасширителями. Анестезию проводили внутримышечным введением смеси тилетамина/золезепама и ксилазина (1,4 и 2,1 мг/кг соответственно). Препараты и плацебо инстиллировали в конъюнктивальный мешок 3 раза в сутки за сутки до моделирования и в течение 7 суток после него.

Клиническую оценку выполняли с помощью офтальмоскопии по шкале Дрейза, площадь повреждения роговицы определяли флуоресцеиновым тестом. Энуклеацию глазного яблока кролика проводили посмертно, затем глазное яблоко фиксировали в 10% нейтральном формалине, окрашивали срезы гематоксилином и эозином. Степень повреждения роговицы дополнительно оценивали окрашиванием метиленовым синим с последующей спектрофотометрией экстракта при 660 нм.

Образцы СЖ отбирали с помощью тест-полосок Ширмера. В СЖ определяли осмолярность, антиоксидантную активность (хемилюминесцентная система гемоглобин–H₂O₂–люминол), электрохимически активные антиоксиданты (обращённо-фазовая ВЭЖХ с УФ- и амперометрической детекцией), активность супероксиддисмутазы (СОД), содержание малонового диальдегида (МДА), активность ММП-9 (желатиновая зимография), концентрации ММП-9 и ТИМП-1 (ИФА). Липидный состав СЖ (ПНЖК и оксипирины) анализировали методом ВЭЖХ–МС/МС в режиме мониторинга множественных реакций с количественной оценкой по дейтерированным внутренним стандартам.

Статистическую обработку проводили в SigmaPlot 11. Использовали t-критерий, дисперсионный анализ повторных измерений и однофакторный дисперсионный анализ с тестом Тьюки. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Выбор экспериментального дизайна модели синдрома сухого глаза, вызванного нарушением мигательного рефлекса

Модель ССГ у кроликов индуцировали подавлением мигательного рефлекса векорасширителями в условиях общей анестезии при влажности воздуха 30%

Для выбора длительности экспозиции сравнивали 1, 3 и 6 ч. По данным флуоресцеинового теста через 1 ч выявлялись единичные участки окрашивания роговицы (рис. 1б), с увеличением времени площадь повреждения возрастала (рис. 1в, г). Гистологическое исследование показало, что через 1 ч отмечалась десквамация поверхностных клеток эпителия (рис. 2б), через 3 ч — дегенерация эпителиоцитов (рис. 2в), через 6 ч — очаги полной утраты эпителия и обнажение стромы (рис. 2г). Для дальнейших опытов была выбрана 6-часовая индукция с оценкой регенерации и показателей СЖ через 24, 48, 72 и 168 ч (рис. 3).

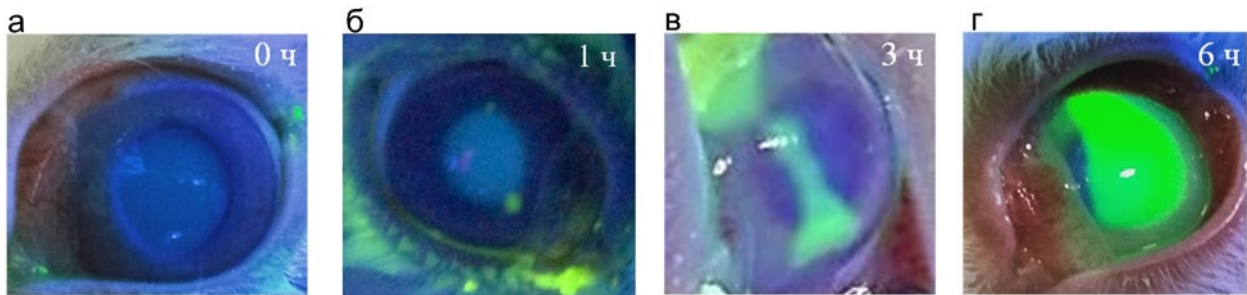


Рисунок 1 – Динамика повреждения роговицы по данным флуоресцеинового теста: а – до начала индукции экспериментальной модели ССГ, б – 1 час, в – 3 часа, г – 6 часов после начала моделирования ССГ

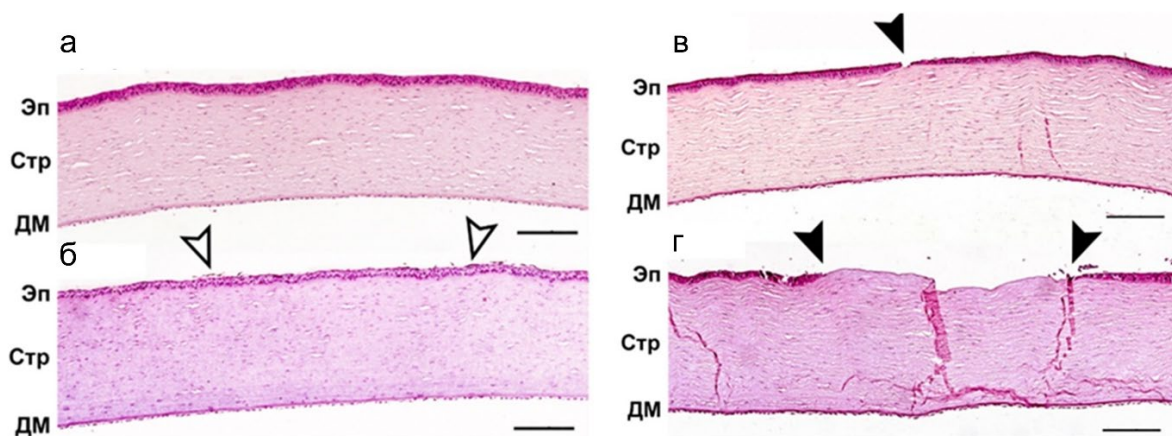


Рисунок 2 – Репрезентативные микроскопические изображения срезов роговицы, окрашенных гематоксилином и эозином: а - роговица в норме. б - через 1 час после начала экспозиции глазной поверхности (десквамация поверхностных эпителиальных клеток). в - через 3 часа (очаг дегенерации клеток эпителия) и г- через 6 часов (границы отсутствия эпителия роговицы и обнажение стромы). Сокращения: Эп – эпителий, Стр – строма, ДМ – десцеметова оболочка и эндотелий роговицы. Увеличение x100; масштабная линейка 200 мкм

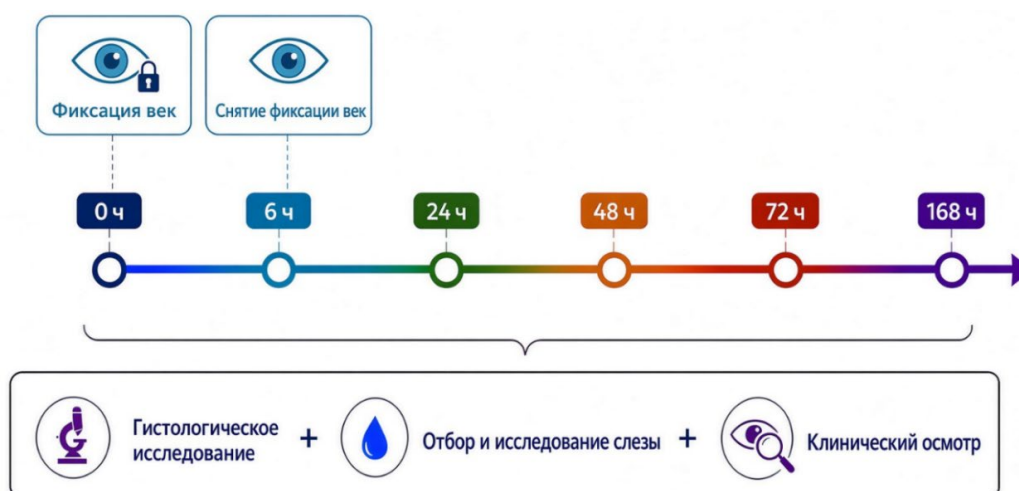


Рисунок 3 – Схема эксперимента

Повышение осмолярности СЖ и разрушение межклеточных контактов эпителия роговицы при ССГ

Нами было установлено, что через 6 часов после начала моделирования происходит увеличение уровня осмолярности СЖ ($338,5 \pm 5,1$ мОсм/л); значения в норме - $296,8 \pm 5,0$ мОсм/л. Одним из основных проявлений повреждения уже в первые часы моделирования является нарушение плотных межклеточных контактов, о чем свидетельствует повышение сорбции красителя метиленового синего. На основании этого наблюдения мы предположили, что при развитии патологического процесса происходит увеличение активности ферментов, разрушающих внеклеточный матрикс, возможно, матриксной металлопротеиназы-9 (ММП-9). Мы выявили, что в нашей модели происходит увеличение активности ММП-9 в СЖ по данным желатиновой зимографии (рис. 4а). Данные зимограммы были подтверждены ИФА. Мы выявили, что концентрация ММП-9 в СЖ также растет (рис. 4б). При этом было обнаружено многократное снижение концентрации тканевого ингибитора-1 (ТИМП-1), который является ключевым ингибитором исследуемой ММП-9 (рис. 4в). Как видно из графика, в норме количественное соотношение фермента и его ингибитора составляет 1, а уже через 2 часа эта стехиометрия достигает значения более 10 (рис. 4г).

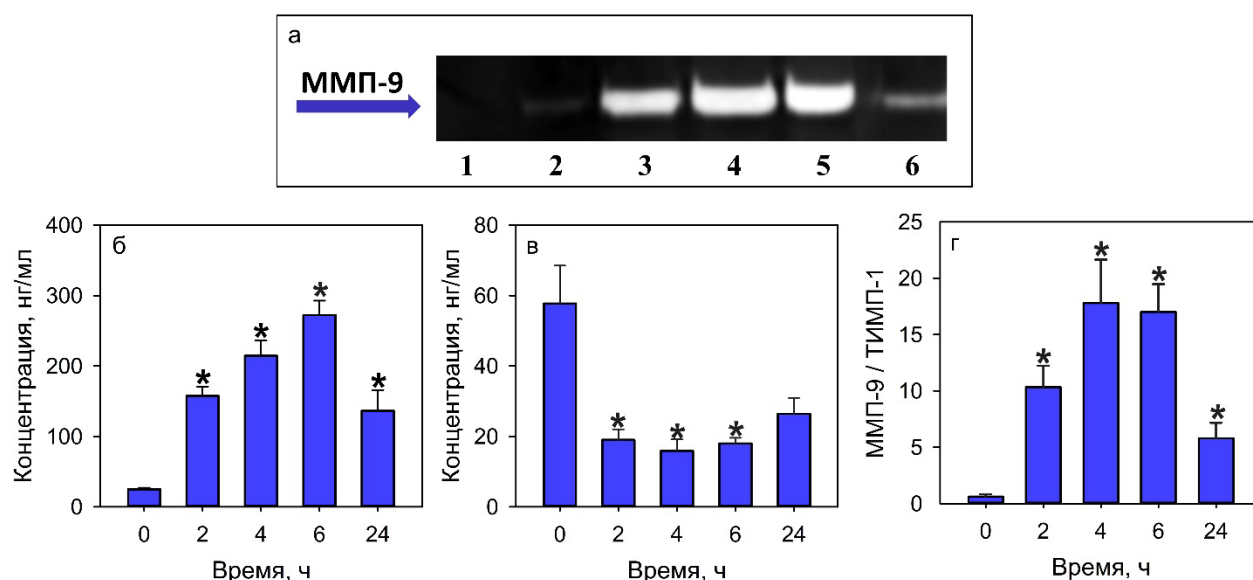


Рисунок 4 – Динамика содержания ММП-9 и ТИМП-1 в СЖ кроликов при развитии экспериментального ССГ: а- желатиновая зимограмма СЖ кроликов (1 – 0, 2 – 2, 3 – 4, 4 – 6, 5 – 8, 6 – 24 часа от начала моделирования); количественное содержание в СЖ: б – ММП-9, в – ТИМП-1; г – стехиометрия ММП-9 к ТИМП-1 в СЖ. Данные на графиках б-г представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$). Различия достоверны: * - между временными точками $p < 0,05$ (парный t-тест) по сравнению с животными без ССГ

Компоненты антиоксидантной защиты СЖ и маркеры перекисного окисления липидов. Липидомный анализ СЖ здоровых людей и кроликов

Защиту глазной поверхности от активных форм кислорода обеспечивают низкомолекулярные антиоксиданты и ферменты. Методом ВЭЖХ с электрохимической детекцией в СЖ здоровых кроликов выявлены аскорбиновая кислота, мочевая кислота, глутатион и цистеин. Более 60% АОА СЖ обусловлено аскорбиновой кислотой. Среди ферментов антиоксидантной защиты высокой активностью обладает супероксиддисмутаза. При моделировании ССГ содержание низкомолекулярных антиоксидантов снижалось в последовательности: цистеин и глутатион $\rightarrow$ аскорбиновая кислота и мочевая кислота (рис. 5а). В первые сутки достоверно уменьшались АОА (рис. 5б) и активность СОД (рис. 5в) при одновременном нарастании МДА — маркера ПОЛ (рис. 5г). Это свидетельствует о развитии окислительного стресса в использованной модели.

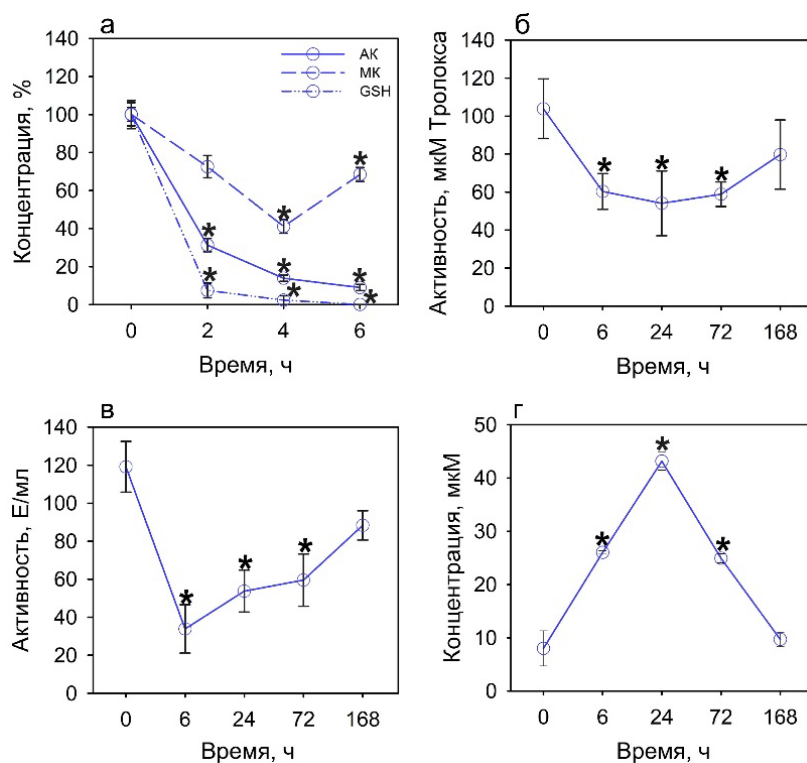


Рисунок 5 – Изменение окислительно – восстановительного баланса в СЖ при ССГ: а – изменение концентрации низкомолекулярных антиоксидантов в СЖ (МК – мочевая кислота, GSH – глутатион); б – определение АОА и в – определение активности СОД в СЖ после индукции ССГ; г – изменение уровня МДА в СЖ после индукции ССГ. Данные на графиках а-г представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$). Различия достоверны: * - между временными точками $p < 0,05$ (парный t-тест) по сравнению с животными без ССГ

Накопление продуктов ПОЛ указывает на возможную активацию метаболизма ПНЖК и оксипинонов. Нами разработан метод их количественного определения в СЖ с помощью ВЭЖХ–МС/МС и дейтерированных стандартов, что позволило впервые количественно детектировать более 20 соединений данного класса. Сравнительный анализ показал сходство липидного состава СЖ кролика и человека, что дополнительно подтверждает релевантность модели.

Изменение оксипинонового профиля при ССГ в СЖ кроликов

Разработанная методика позволила нам определить динамику изменения содержания ПНЖК и оксипинонов в СЖ при ССГ (рис. 6а). Наблюдаемые паттерны указывают на инициацию воспалительного процесса глазной поверхности, что, в частности отражается в соотношении арахидоновой и докозагексаеновой кислоты: преобладание арахидоновой кислоты достигает максимальных значений через 24 часа (рис. 6б). Важно отметить, что наиболее

выраженные изменения были выявлены для оксипинов, являющихся продуктами липоксигеназ.

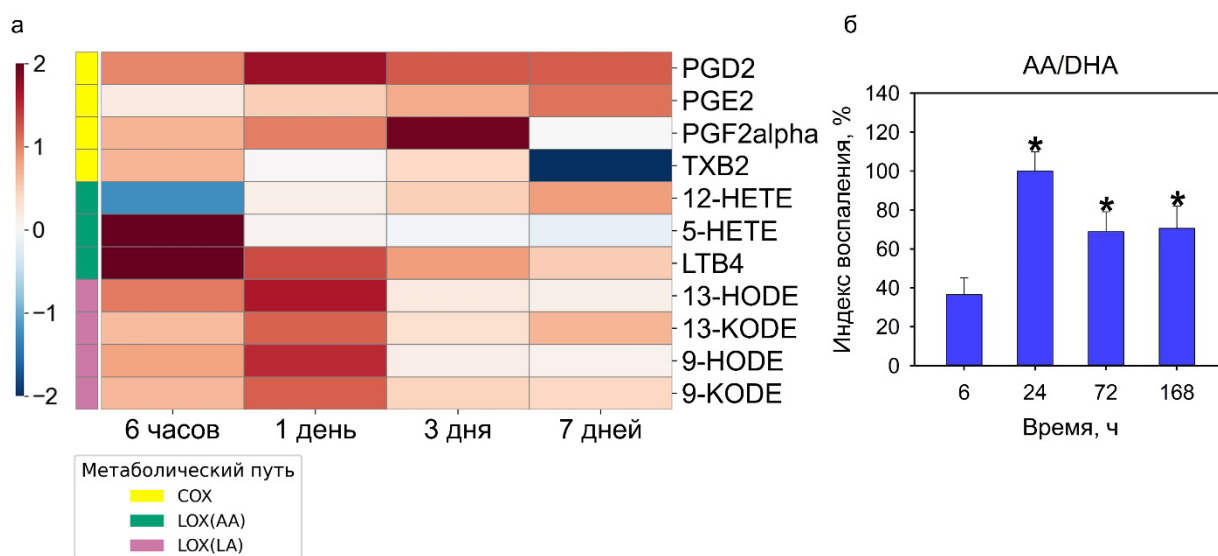


Рисунок 6 – Динамика профиля ПНЖК и оксипинов в СЖ животных после индукции ССГ: А -тепловая карта изменения содержания оксипинов; б – индекс воспаления (n=6). Различия достоверны: * - между временными точками $p < 0,05$ (дисперсионный анализ с повторными измерениями с тестом Тьюки) по сравнению с животными без ССГ

Таким образом, согласно результатам, мы можем предложить возможный патофизиологический механизм развития ССГ, вызванного нарушением мигательного рефлекса. А именно, блокирование мигательного рефлекса приводит к нарушению распределения и обновления слёзной пленки, увеличению испарения и уровня осмолярности СЖ, что запускает каскад событий: изменение редокс-статуса СЖ, окислительное повреждение липидного слоя, воспаление, а также повреждение клеток и межклеточных контактов поверхности роговицы. Поэтому для проведения дальнейших испытаний было предложено несколько вариантов экспериментальной терапии заболевания, которую проводили по следующей схеме. Сразу после индукции ССГ осуществляли инстилляцию растворов, выбранных соединений в конъюнктивальный мешок по схеме 3 раза в день в течение семи дней. В случае антиоксидантов дополнительно проводили премедикацию соответствующими растворами за сутки до моделирования заболевания.

Инстилляции и пероральное введение аскорбиновой кислоты не приводят к защите роговицы при ССГ

Нами не было обнаружено клинически значимых положительных эффектов при применении 10% раствора аскорбиновой кислоты перорально и в виде глазных капель на нашей модели. Эти наблюдения были подтверждены с помощью гистологического исследования. Через 24 часа после индукции ССГ не было достоверных различий между срезами без и при применении АК (рис. 7а-в). Поскольку в нашем опыте нам не удалось обнаружить терапевтических эффектов 10% раствора АК, дальнейшие эксперименты мы проводить не стали.

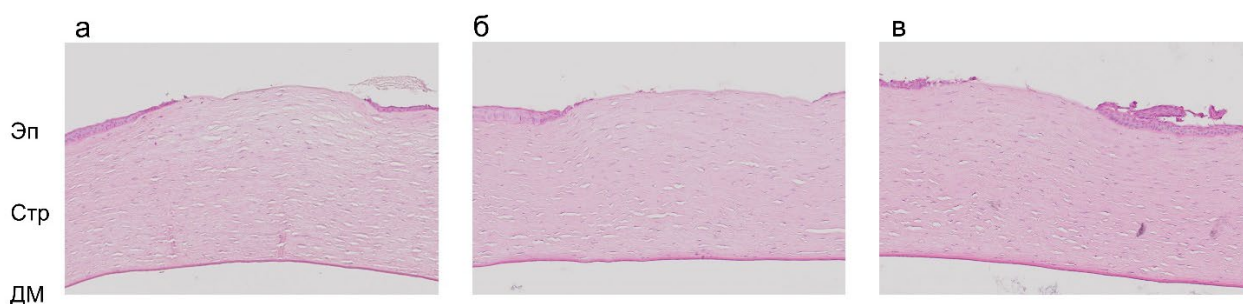


Рисунок 7 – Репрезентативные микроскопические изображения срезов роговицы, окрашенных гематоксилином и эозином через 24 ч после применения 10% раствора аскорбиновой кислоты при ССГ: а - ССГ, б - местное применение АК, в - пероральное применение АК. Сокращения: Эп – эпителий, Стр – строма, ДМ – десцеметова оболочка и эндотелий роговицы. Увеличение x200

Терапевтический эффект ДМСО при экспериментальном ССГ

В отличие от АК, инстилляции 50% ДМСО давали выраженный терапевтический эффект, заметный как на клиническом, так и на гистологическом уровнях. Интересно, что его введение не оказывало влияния на АОА СЖ (рис. 8а), однако приводило к снижению концентрации МДА (рис. 8б), что говорит об эффективном подавлении ПОЛ. Таким образом, можно сделать вывод о том, что при применении водорастворимых антиоксидантов нужно учитывать возможность их удержания на глазной поверхности.

Применение АК при ССГ, по нашим данным, не целесообразно, а использование ДМСО может быть перспективным направлением.

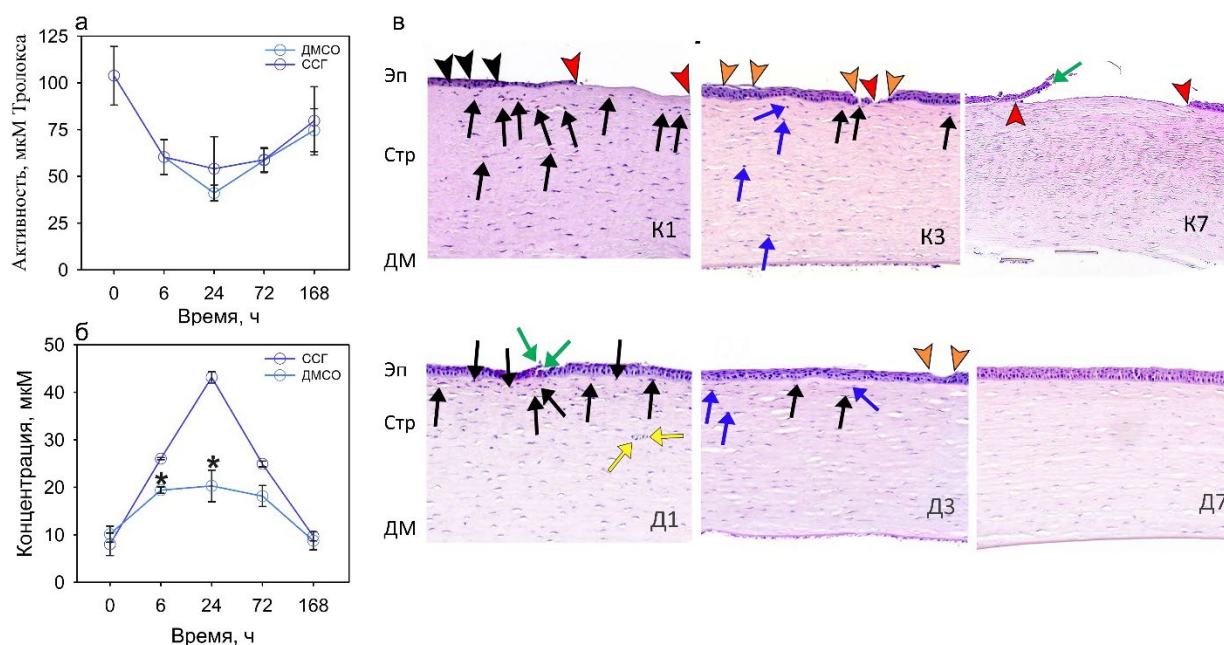


Рисунок 8 – Эффективность применения ДМСО при ССГ: динамика изменения в СЖ животных а – АОА, б – концентрации МДА. Данные на графиках а-б представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$). Различия достоверны: * - между временными точками $p < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ с тестом Тьюки) по сравнению с животными с ССГ без терапии; в - репрезентативные микроскопические изображения поперечных срезов роговицы, окрашенных гематоксилином и эозином: группа ССГ (К1, К3, К7), группа ДМСО (Д1, Д3, Д7) на 1,3 и 7 день после индукции. Красные стрелки - участки отсутствия эпителия роговицы, оранжевые – очаги разрушения эпителия роговицы, зеленые – участки реэпителизации, черные – гранулоцитарная инфильтрация в эпителии и строме роговицы, желтые – неоваскуляризация, синие – активация стромальных кератоцитов. Сокращения: Эп – эпителий, Стр – строма, ДМ – десцеметова оболочка и эндотелий роговицы. Увеличение x200

Зилеутон предотвращает накопление провоспалительных оксипинов в СЖ и ускоряет заживление глазной поверхности

Описанные свойства ДМСО давали синергические эффекты при его совместном применении с 0,05% ингибитором липоксигеназ Зилеутоном, где 50% раствор ДМСО также использовался в качестве вспомогательного компонента, повышающего растворимость. По данным гистологических исследований инстилляций этого препарата помимо выраженной заживляющей способности приводило к снижению количества нейтрофилов в роговице, что отражает противовоспалительное действие Зилеутона (рис. 9б). Эти наблюдения согласуются с результатами биохимического и липидного анализа СЖ: оба соединения не влияют на АОА (рис. 9в), однако снижают соотношение арахидоновой к докозагексаеновой кислоте (рис. 9г), что говорит

о подавлении воспалительного процесса. Более того, липидомный анализ показал, что ДМСО ингибирует образование продуктов COX, в то время как Зилеутон снижет уровень метаболитов LOX, в частности LTB₄, который отвечает за миграцию нейтрофилов в очаг поражения (рис. 9а).

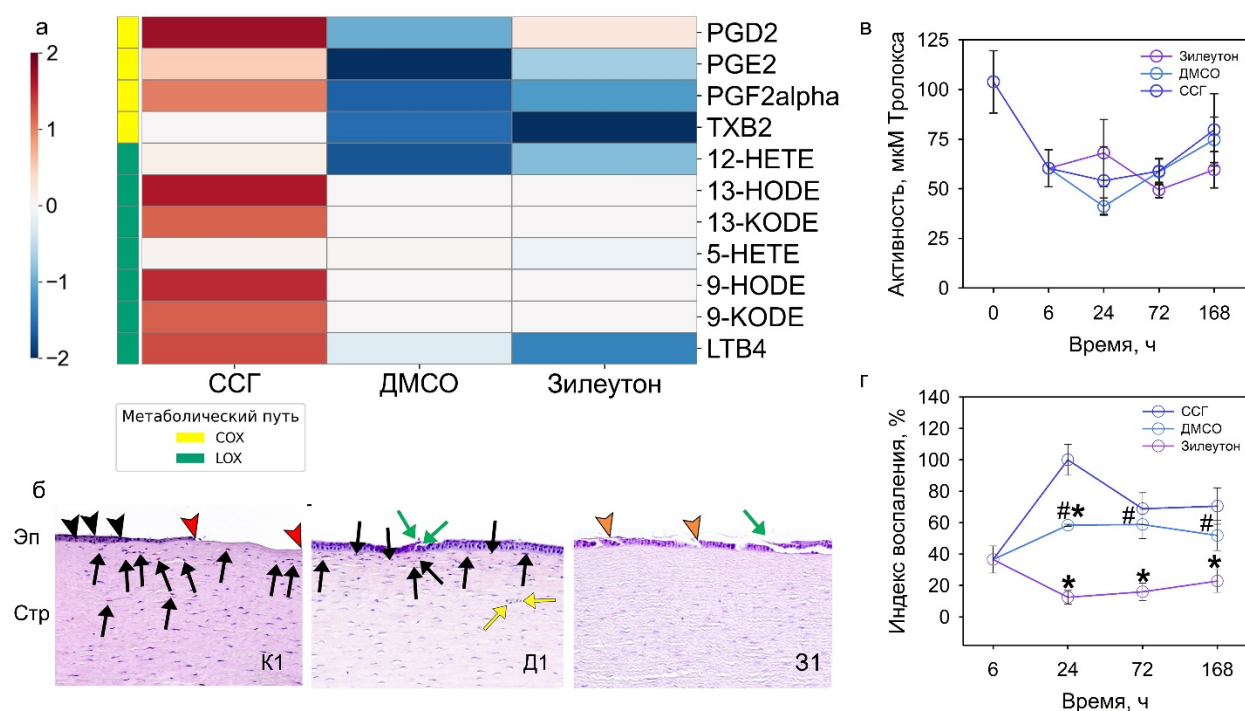


Рисунок 9 – Использование ингибитора липоксигеназы-Зилеутон при ССГ: А – тепловая карта СЖ животных через 24 часа после индукции ССГ по сравнению с интактными животными; б - Репрезентативные микроскопические изображения поперечных срезов роговицы, окрашенных гематоксилином и эозином. ССГ (К1), ДМСО (Д1), Зилеутон (31) через 24 часа после индукции модели. Красные стрелки - участки отсутствия эпителия, зеленые – участки реэпителизации, черные –инфильтрация в эпителии и строме роговицы. Сокращения: Эп – эпителий, Стр – строма. Увеличение x200; в – динамика изменения АОА в СЖ; г – индекс воспаления в СЖ. Данные на графиках в-г представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$). Различия достоверны: * - между временными точками $p < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ с тестом Тьюки) по сравнению с животными с ССГ без терапии, # - между временными точками $p < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ с тестом Тьюки) по сравнению с животными с Зилеутоном

Применение митохондриально-адресованного антиоксиданта SkQ1 при ССГ

Поскольку при ССГ развивается ОС нами был выбран митохондриально-адресованный антиоксидант SkQ1 для подавления активных форм кислорода в митохондриях. Для оценки эффективности глазных капель с SkQ1 мы использовали несколько концентраций: 0,25, 2,5 или 7,5 мкМ. Клинический осмотр проводили с помощью флуоресцеина через 6 часов и на 1-й, 3-й, 7-й дни после индукции модели; наименьшее окрашивание роговицы наблюдалось при

концентрации 7,5 мкМ SkQ1. Эти наблюдения согласуются с результатами гистологического исследования роговицы. На срезах роговицы видно, что у животных в группах SkQ1 не наблюдалось очагов полного разрушения эпителия (рис. 10г-е), тогда как у животных без терапии уже через 6 часов после индукции очаги присутствовали (рис. 10б-в). Незначительные изменения включали наличие единичных апоптотических клеток и, как следствие, уменьшение толщины эпителия роговицы (рис. 10г-д). Наименьшее уменьшение толщины эпителия наблюдалось после введения 7,5 мкМ SkQ1 (рис. 10е). Поэтому для дальнейших исследований мы выбрали концентрацию 7,5 мкМ SkQ1.

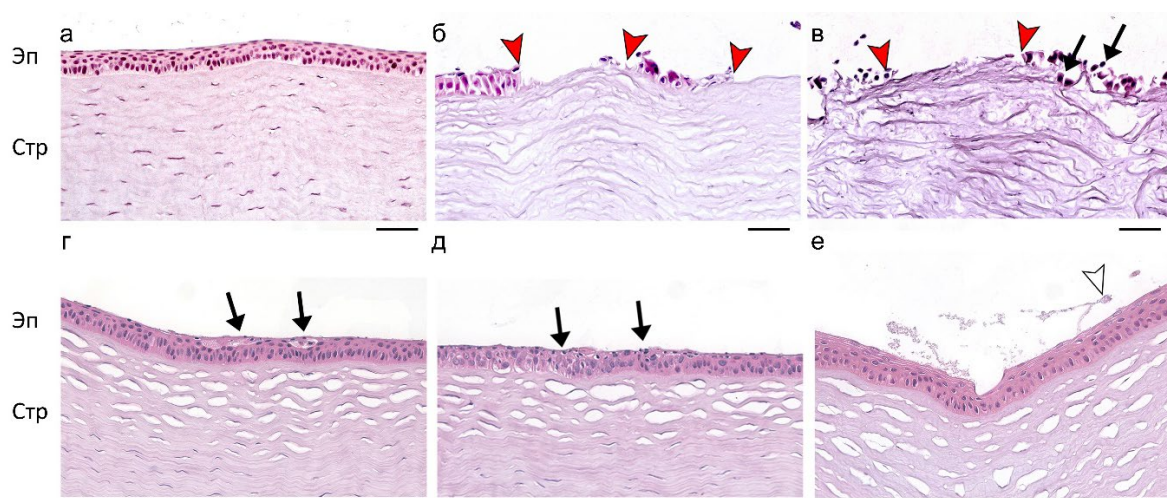


Рисунок 10 – Выбор концентрации SkQ1 для профилактики ССГ. Репрезентативные микроскопические изображения поперечных срезов роговицы, окрашенных гематоксилином и эозином: а – норма; б и в – ССГ; г – 0,25 мкМ SkQ1; д – 2,5 мкМ SkQ1, е – 7,5 мкМ SkQ1. Красные стрелки – участки отсутствия эпителия роговицы, черные стрелки – преднекротические и апоптотические изменения, белые стрелки – десквамация поверхностных клеток эпителия. Сокращения: Эп – эпителий, Стр – строма роговицы. Увеличение: $\times 400$; масштабная линейка 50 мкм

В основе эффекта SkQ1 лежит его выраженное антиоксидантное действие, которое отражается в повышении АОА (рис. 11а) и активности СОД (рис. 11б) в СЖ, а также в многократном снижении уровня МДА (рис. 11в). Примечательно, что при применении SkQ1 сохраняются плотные межклеточные контакты в эпителии роговицы (рис. 12а), что может указывать на его действие в отношении матриксных протеиназ. SkQ1 действительно подавляет активность и замедляет накопление ММП-9 в СЖ, одновременно предотвращая снижение уровня ТИМП-1. Таким образом, инстилляции SkQ1

приводят к стабилизации баланса ММП-9/ТИМП-1, что может быть дополнительным механизмом его защитного действия в отношении роговицы.

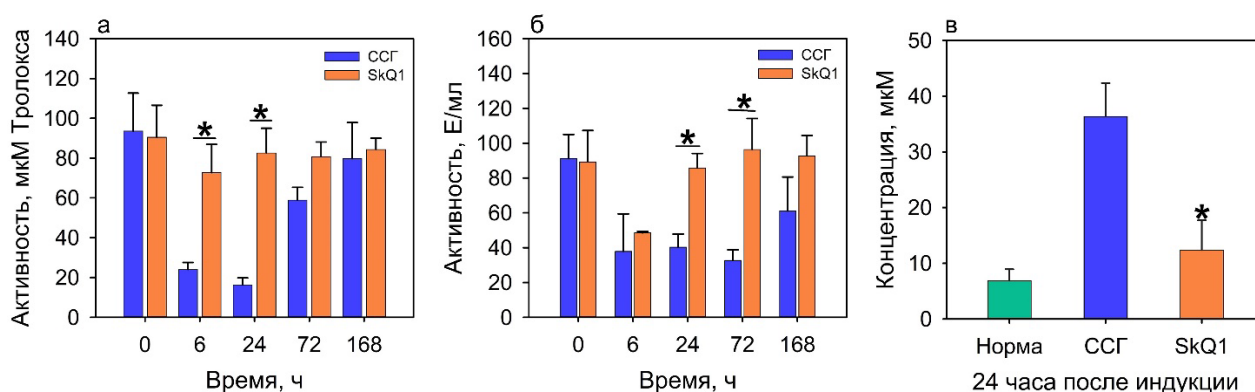


Рисунок 11 – SkQ1 подавляет нарушение окислительно – восстановительного баланса при ССГ, динамика изменения в СЖ животных: а – АОА; б – активности СОД; в – накопления МДА. Данные на графиках а-в представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$). Различия достоверны: * - между временными точками $p < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ с тестом Тьюки) по сравнению с животными с ССГ без терапии

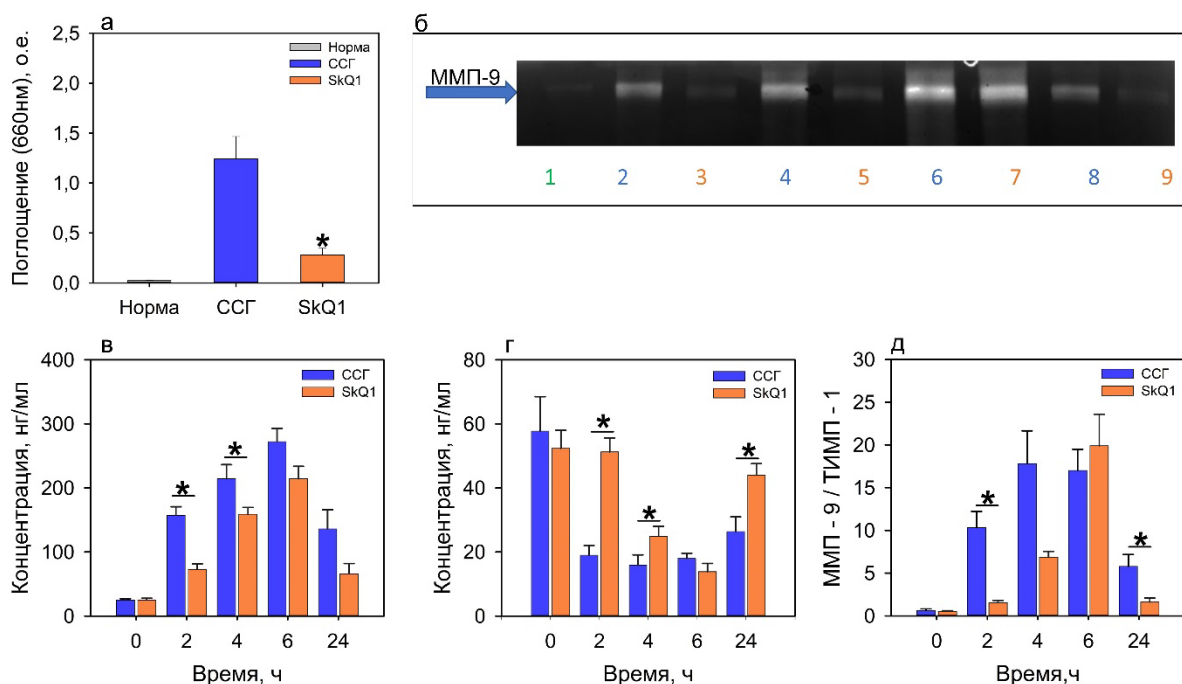


Рисунок 12 – SkQ1 предотвращает разрушение межклеточных контактов в роговице: а – сорбция роговицы к метиленовому синему; б – желатиновая зимограмма СЖ (1 – норма, 2 и 3 – ССГ и SkQ1 через 2 часа, 4 и 5 – ССГ и SkQ1 через 4 часа, 6 и 7 – ССГ и SkQ1 через 6 часов, 8 и 9 – ССГ и SkQ1 через 24 часа после индукции модели; в – ММП-9, г – ТИМП-1; д – стехиометрия ММП-9 к ТИМП-1 в СЖ. Данные на графиках в-д представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$). Различия достоверны: * - между временными точками $p < 0,05$ (непарный t-тест) по сравнению с животными с ССГ без терапии

SkQ1 демонстрирует выраженное противовоспалительное действие через 6 часов после начала индукции модели. По данным липидного анализа в этом случае происходит ингибирование биосинтеза практически всех основных провоспалительных оксипинов (рис. 13а). В частности, наблюдается снижение уровней ключевых медиаторов воспаления – простагландинов E2 и F2 альфа, и LTB4, а также снижение соотношения арахидоновой и докозагексаеновой кислот. Таким образом, можно заключить, что SkQ1 обладает широким действием и является наиболее эффективным средством для профилактики и лечения синдрома сухого глаза, в том числе вызванного нарушением мигательного рефлекса.

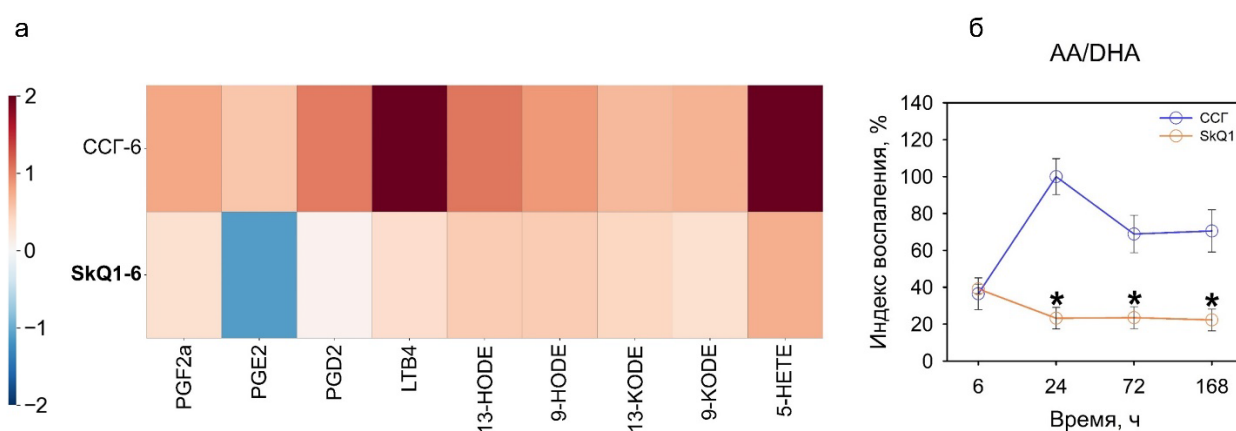


Рисунок 13 – Динамика содержания липидных медиаторов в СЖ при применении SkQ1: а - тепловая карта изменения содержания оксипинов в СЖ через 6 часов после начала индукции ССГ по результатам ВЭЖХ-МС/МС; б – соотношение арахидоновой к докозагексаеновой кислоте в СЖ. Данные на графике б представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$). Различия достоверны: * - между временными точками $p < 0,05$ (t-тест) по сравнению с животными с ССГ без терапии

III. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная диссертационная работа была посвящена изучению механизмов развития ОС и его патогенетической роли при ССГ, связанном с нарушением мигательного рефлекса, а также поиску подходов для его коррекции. В первой части работы мы разработали экспериментальную модель ССГ, вызванного нарушением мигательного рефлекса. Ключевым результатом исследования стало выявление ОС как возможного патогенетического фактора развития ССГ, связанного с нарушением мигательного рефлекса. Показано, что более 60% в антиоксидантную защиту глаза вносит аскорбиновая кислота, высокой активностью обладает СОД в СЖ. При развитии ССГ происходит снижение

концентрации низкомолекулярных антиоксидантов и АОА, а также СОД активности; в это же время происходит накопление МДА в СЖ.

Это исследование является первым, в котором проведено количественное определение сигнальных липидных медиаторов в СЖ у людей и кроликов в отсутствие воспаления глаз и сравнение их профилей. Сравнительный анализ показал сходство липидного состава СЖ кроликов с таковым у человека, что является дополнительным подтверждением использования этого вида для изучения динамики изменений липидома СЖ и тестирования методов лечения воспалительных заболеваний глазной поверхности человека. Разработанный метод позволил выявить изменения профиля ПНЖК и оксипинонов при развитии ССГ. Продемонстрирована возможная ключевая роль липидных продуктов липоксигеназного пути метаболизма арахидоновой и линолевой кислот при развитии воспаления глазной поверхности при ССГ, вызванном нарушением мигательного рефлекса.

Мы показали высокую эффективность комплексной терапии ДМСО и Зилеутоном. Общая заживляющая активность ДМСО заключается в подавлении выработки простагландинов. В то же время Зилеутон избирательно ингибирует LTB₄ способствует разрешению воспаления за счет повышения уровня докозагексаеновой кислоты. Таким образом, эти соединения действуют синергетически, охватывая практически все аспекты механизма, лежащего в основе воспалительной реакции при ССГ. На основании этих данных мы предполагаем, что предложенный терапевтический подход в будущем может стать одним из перспективных методов лечения ССГ.

В совокупности наши результаты демонстрируют эффективность применения глазных капель с 7,5 мкМ SkQ1 для профилактики ССГ. Мы описали новые свойства SkQ1: способность повышать активность антиоксидантных ферментов, подавлять ПОЛ и сохранять барьерную функцию эпителия роговицы при нарушении мигательного рефлекса.

ВЫВОДЫ

1. Нарушение мигательного рефлекса приводит к развитию ССГ у кроликов, характеризуется выраженными клинико-морфологическими изменениями роговицы и нарушением барьерной функции глазной поверхности, а также сопровождается биохимическими изменениями в слезной жидкости, ведущими к развитию окислительного стресса и провоспалительному ответу.

2. При ССГ, вызванном нарушением мигательного рефлекса, происходит изменение липидного состава и индекса воспаления слёзной жидкости; ключевую роль в этом выполняют ферменты семейства липоксигеназ.
3. Местное введение ДМСО оказывает выраженное действие на клиническую картину заболевания и подавляет накопление продуктов перекисного окисления липидов в слёзной жидкости.
4. Применение высокоспецифичного ингибитора 5-липоксигеназы – Зилеутона оказывает явное положительное действие на накопление провоспалительных оксилипинов в слёзной жидкости на фоне нарушения мигательного рефлекса.
5. Митохондриально-адресованный антиоксидант SkQ1 препятствует развитию окислительного стресса и накоплению провоспалительных медиаторов в слёзной жидкости, а также сохраняет барьерную функцию эпителия роговицы.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.015.7 по специальности 1.5.5. Физиология человека и животных (биологические науки):

1. Zernii E. Y., Gancharova O. S., Baksheeva V. E., Golovastova M. O., Kabanova E. I., Savchenko M. S., Tiulina V. V., Sotnikova L. F., Zamyatnin A. A., Philippov P. P., Senin I. I. Mitochondria-Targeted Antioxidant SkQ1 Prevents Anesthesia-Induced Dry Eye Syndrome // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2017. – vol. 2017, №2. – P. 9281519. EDN: XNUKWF. Импакт-фактор 5,14 (JIF). (1,33/0,44)*
2. Тюлина В.В., Кабанова Е.И., Сапего Н.Ю., Сотникова Л.Ф., Сенин И.И., Зайцев С.Ю. Окислительный стресс в митохондриях при аутоиммунных заболеваниях // *Ветеринария, зоотехния и биотехнология*. – 2017. – № 11. – С. 70-76. EDN: ZTHSVT. Импакт-фактор 0,343 (РИНЦ). (0,38/0,15)*
3. Zernii E. Y., Baksheev V. E., Kabanova E. I., Tiulina V. V., Golovastova M. O., Gancharova O. S., Savchenko M. S., Sotikova L. F., Zamyatnin A. A., Filippov P. P., Senin I. I. Effect of General Anesthesia Duration on Recovery of Secretion and Biochemical Properties of Tear Fluid in the Post-Anesthetic Period // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2018. – vol. 165, № 2. – pp. 269-271. EDN: LUTGOV. Импакт-фактор 0,7 (JIF). (0,21/0,1)*

4. Baksheeva V. E., Gancharova O. S., Tiulina V. V., Iomdina E. N., Zamyatnin A. A., Philippov P. P., Zernii E. Y., Senin I. I. Iatrogenic Damage of Eye Tissues: Current Problems and Possible Solutions // *Biochemistry-Moscow*. – 2018. – vol. 83, № 12-13. – pp. 1563-1574. EDN: GVMCUO. Импакт-фактор 2,1 (JIF). (1,05/0,35)*
5. Чистяков Д. В., Азбукина Н. В., Астахова А. А., Горяинов С. В., Чистяков В. В., Тюлина В. В., Ганчарова О. С., Бакшеева В. Е., Замятнин мл. А. А., Филиппов П. П., Сергеева М. Г., Сенин И. И., Зерний Е. Ю. Изменение содержания воспалительных оксилипинов в слезной жидкости при периоперационном синдроме сухого глаза // *Биологические мембраны*. – 2019. – Т. 36, № 6. – С. 450-456. EDN: BEBIKW. Импакт-фактор 0,446 (РИНЦ). (0,38/0,15)*
6. Chistyakov D. V., Azbukina N. V., Astakhova A. A., Goriainov S. V., Chistyakov V. V., Tiulina V. V., Baksheeva V. E., Kotelin V. I., Fedoseeva E. V., Zamyatnin A. A., Philippov P. P., Kiseleva O. A., Bessmertny A. M., Senin I. I., Iomdina E. N., Sergeeva M. G., Zernii E. Y. Comparative lipidomic analysis of inflammatory mediators in the aqueous humor and tear fluid of humans and rabbits // *Metabolomics*. – 2020. – vol. 16, № 2. – P. 27. EDN: ZAHNZR. Импакт-фактор 3,5 (JIF). (0,9/0,27)*
7. Chistyakov D. V., Gancharova O. S., Baksheeva V. E., Tiulina V. V., Goriainov S. V., Azbukina N. V., Tsarkova M. S., Zamyatnin A. A., Philippov P. P., Sergeeva M. G., Senin I. I., Zernii E. Y. Inflammation in Dry Eye Syndrome: Identification and Targeting of Oxylin-Mediated Mechanisms // *Biomedicines*. – 2020. – vol. 8, № 9. – P. 344. EDN: ELJREK. Импакт-фактор 4,5 (JIF). (1,26/0,45)*
8. Baksheeva V.E., Tiulina V.V., Iomdina E.N., Petrov S.Y., Filippova O.M., Kushnarevich N.Y., Suleiman E.A., Eyraud R., Devred F., Serebryakova M.V., Shebardina N.G., Chistyakov D.V., Senin I.I., Mitkevich V.A., Tsvetkov P.O., Zernii E.Y. Tear nanoDSF Denaturation Profile Is Predictive of Glaucoma // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – vol. 24, № 8. – P. 7132. EDN: GYKRQO. Импакт-фактор 5,6 (JIF). (0,92/0,28)*
9. Тюлина В.В., Сенин И.И. Метод получения слёзной жидкости для изучения её антиоксидантных свойств // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2023. – Т. 175, № 4. – С. 494-499. EDN: GXDKTN. Импакт-фактор 0,528 (РИНЦ). (0,39/0,2)*
10. Tiulina V. V., Senin I. I. The Quantitative Determination of the Total Antioxidant Activity of Tears // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. – 2024. – vol. 18, № S1. – pp. S18-S25. EDN: UCYFDI. Импакт-фактор 0,36 (JIF). (0,68/0,34)*

11. Тюлина В.В., Лаврушкина С.В., Довгий А.И., Сенин И. И. Защитное действие кондиционированной среды мезенхимных стволовых клеток костного мозга на роговицу кроликов с нарушением рефлекса моргания / // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2025. – Т. 179, № 3. – С. 364–369. EDN: KEASID. Импакт-фактор 0,528 (РИНЦ). (0,37/0,17)*

* – Объём в условных печатных листах/вклад автора в условных печатных листах

Список сокращений

АК – аскорбиновая кислота

АОА – антиоксидантная активность

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ДМСО – диметилсульфоксид

МДА – малоновый диальдегид

ММП-9 – металлопротеиназа-9

ОС – окислительный стресс

ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СЖ – слёзная жидкость

СОД – супероксиддисмутаза

ССГ – синдром сухого глаза

ТИМП-1 – тканевый ингибитор матриксных металлопротеиназ 1 типа

СОХ – циклооксигеназы

LOX – липоксигеназы

LTB4 – лейкотриен В4