

<https://doi.org/10.21516/2072-0076-2024-17-1-74-82>



Экспериментальное обоснование применения тиоктовой кислоты и индометацина на ранней стадии нейродегенеративного процесса в сетчатке

В.В. Нероев^{1, 2}, Т.А. Павленко¹ ✉, Н.Б. Чеснокова¹, О.В. Безнос¹, Т.Д. Охочимская¹, А.Ю. Панова¹

¹ ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, ул. Садовая-Черногрозская, д. 14/19, Москва, 105062, Россия

² ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1, Москва, 127473, Россия

Цель работы — оценить возможность применения тиоктовой кислоты и индометацина в виде глазных капель для лечения нейродегенеративного процесса в сетчатке на ранней стадии. **Материал и методы.** В исследование были включены 20 кроликов породы шиншилла, из них у 16 кроликов воспроизводили нейродегенеративный процесс в сетчатке путем интравитреального введения 6-гидроксидопамина (6-ОНДА) в дозе 0,25 мг, 4 кролика (8 глаз) служили группой контроля. Для лечения использовали Индоколлир 0,1% и 0,5% раствор тиоктовой кислоты. Препараты инстиллировали в глаз по отдельности и совместно 5 раз в день в течение 7 дней. Оценивали реакцию зрачка на свет и состояние глазного дна. В гомогенатах сетчатки измеряли концентрацию дофамина и общего белка, активность α 2-макроглобулина (α 2-МГ) и супероксиддисмутазы (СОД). **Результаты.** При инстилляциях тиоктовой кислоты площадь повреждения сетчатки снижалась почти вдвое ($p < 0,005$), при применении индометацина — в меньшей степени, максимальное снижение отмечено при совместном применении препаратов ($p < 0,005$ по сравнению с группой без лечения). Оба препарата нормализовывали нарушенную реакцию зрачка на свет. Сниженная под влиянием 6-ОНДА концентрация дофамина в сетчатке ($0,050 \pm 0,009$ нг/мг против $0,095 \pm 0,031$ в норме, $p < 0,05$) после инстилляций тиоктовой кислоты и индометацина имела тенденцию к повышению и достоверно возрастала под влиянием комбинации препаратов до $0,141 \pm 0,037$ нг/мг ($p < 0,01$). Препараты по отдельности и совместно значительно повышали сниженную активность α 2-МГ: контроль — $5,5 \pm 1,2$ нг/мг; без лечения — $2,93 \pm 0,42$ нг/мг, ($p < 0,005$); тиоктовая кислота — $4,19 \pm 0,91$ нг/мг ($p < 0,05$); индометацин — $6,95 \pm 1,09$ нг/мг, ($p < 0,05$); комбинация препаратов — $7,25 \pm 0,63$ нг/мг ($p < 0,005$). Тиоктовая кислота и индометацин по отдельности и совместно повышали сниженную активность СОД: контроль — $13,30 \pm 5,68$ У/мг; без лечения — $5,41 \pm 1,50$ У/мг ($p < 0,05$); тиоктовая кислота — $8,25 \pm 1,27$ У/мг ($p < 0,02$); индометацин — $29,84 \pm 6,63$ У/мг, ($p < 0,01$); комбинация препаратов — $23,99 \pm 3,78$ У/мг ($p < 0,01$). **Заключение.** Комбинированное применение индометацина и тиоктовой кислоты наиболее эффективно предотвращает нарушения в глазу, вызванные 6-ОНДА, что делает такой метод терапии перспективным для лечения глазных заболеваний, сопровождающихся нейродегенерацией.

Ключевые слова: модель нейродегенерации сетчатки; нейротоксин 6-ОНДА; тиоктовая кислота; индометацин; дофамин; супероксиддисмутаза; α 2-макроглобулин; реакция зрачка на свет

Конфликт интересов: отсутствует.

Прозрачность финансовой деятельности: никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Для цитирования: Нероев В.В., Павленко Т.А., Чеснокова Н.Б., Безнос О.В., Охочимская Т.Д., Панова А.Ю. Экспериментальное обоснование применения тиоктовой кислоты и индометацина на ранней стадии нейродегенеративного процесса в сетчатке. Российский офтальмологический журнал. 2024; 17 (1): 74-82. <https://doi.org/10.21516/2072-0076-2024-17-1-74-82>

Experimental rationale for the use of thioctic acid and indomethacin in the therapy of the early stage of retinal neurodegeneration

Vladimir V. Neroev^{1, 2}, Tatiana A. Pavlenko¹ ✉, Natalya B. Chesnokova¹, Olga V. Beznos¹, Tatiana D. Okhotsimskaya¹, Anna Yu. Panova¹

¹ Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, 14/19, Sadovaya-Chernogryazskaya St., Moscow, 105062, Russia

² Moscow Evdokimov State Medical Stomatological University, 20, Bldg. 1, Delegatskaya St., Moscow, 127473, Russia
tanya1975_@inbox.ru

Purpose: to assess the possibility of using thioctic acid and indomethacin in eyedrops for the therapy of early stages of retinal neurodegeneration. **Material and methods.** The study was performed on 20 Chinchilla rabbits, including 16 rabbits in whom the neurodegenerative process in the retina was produced by intravitreal installation of 6-hydroxydopamine (6-OHDA), 0.25 mg per eye, and 4 rabbits (8 eyes) served as control. Thioctic acid 0.5% and Indocollir 0.1% were instilled separately and in combination 5 times daily for 7 days after the injection of 6-OHDA. Pupillary light reaction was estimated and eye fundus condition analyzed. Alpha2-macroglobuline (α 2-MG) and SOD activity, dopamine and protein concentrations were measured in retinal homogenates. **Results.** Instillations of thioctic acid reduced the retinal damage area almost by half as compared to the untreated group ($p \leq 0.005$). Indomethacin was less effective, but the combination of the two drugs brought about a maximal reduction of the damage area ($p \leq 0.05$ against the untreated group). Both preparations normalized the disturbed pupillary light reaction. The injection of 6-OHDA caused a decrease of dopamine concentration in the retina (0.050 ± 0.009 pg/mg as against 0.095 ± 0.031 pg/mg in healthy controls, $p \leq 0.05$). After instillations of indomethacin and thioctic acid, the concentration tended to increase, and it increased significantly after treatment with their combination (0.141 ± 0.037 pg/mg, $p \leq 0.01$ as against untreated animals). The activity of α 2-MG in retina decreased after a 6-OHDA injection (2.93 ± 0.42 pg/mg as against 5.5 ± 1.2 pg/mg in healthy controls, $p < 0.005$) just as they increased the decreased SOD (13.30 ± 5.68 U/mg in healthy controls, 5.41 ± 1.50 U/mg in untreated animals, $p < 0.05$). Both preparations applied separately or in combination caused a significant increase of α 2-MG activity (thioctic acid — 4.19 ± 0.91 pg/mg, indomethacin — 6.95 ± 1.09 pg/mg, combination — 7.25 ± 0.63 pg/mg, $p < 0.05$ as against the untreated animals) and SOD activity (thioctic acid — 8.25 ± 1.27 U/mg, indomethacin — 29.84 ± 6.63 U/mg, combination — 23.99 ± 3.78 U/mg, $p < 0.01$ as against the untreated animals). **Conclusion.** The combination of indomethacin and thioctic acid in eyedrops is the most effective for the prevention of eye damage caused by 6-OHDA, which makes this method promising for the treatment of eye diseases accompanied by neurodegeneration.

Keywords: model of retinal neurodegeneration; 6-OHDA neurotoxin; thioctic acid; indomethacin; dopamine; superoxide dismutase; alpha2-macroglobuline; pupillary light reaction

Conflict of interests: there is no conflict of interests.

Financial disclosure: no author has a financial or property interest in any material or method mentioned.

For citation: Neroev V.V., Pavlenko T.A., Chesnokova N.B., Beznos O.V., Okhotsimskaya T.D., Panova A.Yu. Experimental rationale for the use of thioctic acid and indomethacin in the therapy of the early stage of retinal neurodegeneration. Russian ophthalmological journal. 2024; 17 (1): 74-82 (In Russ.). <https://doi.org/10.21516/2072-0076-2024-17-1-74-82>

Распространенность нейродегенеративных заболеваний (НДЗ) как глаза, так и центральной нервной системы во всем мире растет, что связано с увеличением продолжительности жизни и загрязнением окружающей среды. Нейродегенеративные процессы в сетчатке являются ведущей причиной снижения зрения при таких распространенных инвалидизирующих заболеваниях, как возрастная макулярная дегенерация (ВМД), диабетическая ретинопатия (ДР), глаукома и др. В России число пациентов с ВМД превосходит 6 млн человек, а ДР приближается к 1 млн [1, 2]. Несмотря на достигнутые успехи, разработка эффективных методов лечения этих заболеваний, предотвращение их прогрессирования остаются сложной проблемой, имеющей важную социальную значимость.

Ключевыми патогенетическими механизмами, лежащими в основе гибели нервных клеток, по современным представлениям, является образование неправильно свернутых белков и их агрегатов (α -синуклеина, β -амилоида, тау-белков и др.) и митохондриальная дисфункция —

взаимосвязанные процессы, приводящие к окислительному стрессу и так называемому нейровоспалению, которое в свою очередь усиливает образование свободных радикалов. Поэтому для лечения НДЗ показано применение противовоспалительных и антиоксидантных препаратов [3]. Нашей задачей явилась разработка способа лечения локального нейродегенеративного процесса в глазу путем местного применения противовоспалительного препарата — индометацина и антиоксиданта — тиоктовой кислоты.

Противовоспалительное действие индометацина связано с ингибированием фермента циклооксигеназы, что приводит к угнетению синтеза простагландинов. На животных моделях токсического и ишемического повреждения мозга показано, что лечение индометацином снижает потерю нервных клеток в гиппокампе [4]. Однако в литературе нет единого мнения о влиянии индометацина на дофаминергические нейроны. В одних работах показано, что лечение индометацином не оказывает нейропротекторного действия на дофаминергические нейроны [5]. Другие исследования

показали, что индометацин предотвращает потерю дофаминергических клеток [6].

Механизм нейропротекторного действия индометацина также заключается в его способности увеличивать экспрессию $\alpha 2$ -макроглобулина ($\alpha 2$ -МГ), который, являясь внеклеточным шапероном, противодействует образованию неправильно свернутых белков и их агрегации, в том числе β -амилоидного белка, а также индуцирует их выведение. Предполагается, что с помощью этих механизмов индометацин замедляет развитие и прогрессирование болезни Альцгеймера [7].

Индометацин выпускается в виде глазных капель. При закапывании препарат проникает в переднюю камеру глаза и после однократной инстилляцией определяется во влаге передней камеры в течение нескольких часов. Показаниями к применению глазных капель индометацина является воспалительный процесс различной этиологии (Регистр лекарственных средств России, АТХ код S01BC01 «Индометацин»). В показаниях к применению глазных капель индометацина отсутствуют нейровоспалительные и нейродегенеративные процессы в глазу.

Тиоктовая кислота, также известная как α -липоевая кислота, — природное серосодержащее органическое соединение, синтезируется в митохондриях из октановой кислоты, обладает сильным антиоксидантным эффектом. Тиоктовая кислота функционирует как кофактор митохондриальных мультиферментных комплексов, оказывает прямое антиоксидантное действие за счет обезвреживания активных форм кислорода, усиливает поглощение глюкозы клетками и модулирует активность различных сигнальных молекул и факторов транскрипции. Тиоктовая кислота участвует в преобразовании арахидоновой кислоты в простагландин H, регуляции липидного и углеводного обмена. Многофакторность действия тиоктовой кислоты обосновывает целесообразность ее применения при нейродегенеративных процессах, что было доказано в экспериментальных и клинических исследованиях [8].

Исследования, проведенные на моделях нейродегенеративных заболеваний у животных, продемонстрировали улучшение показателей когнитивной функции при приеме тиоктовой кислоты [9]. Клинические наблюдения показали, что у пациентов с деменцией, принимавших тиоктовую кислоту, медленнее развивались когнитивные нарушения [10]. В экспериментальных исследованиях показана способность тиоктовой кислоты оказывать нейропротекторное действие в сетчатке. На модели ДР у мышей установлено, что тиоктовая кислота снижает повышенный синтез VEGF, защищает ганглиозные клетки и предотвращает истончение внутреннего и наружного слоев сетчатки [11]. При экспериментальном повреждении зрительного нерва у крыс внутривенное введение тиоктовой кислоты оказывало нейропротекторное действие на ганглиозные клетки сетчатки [12]. На мышинной модели глаукомы показано, что введение тиоктовой кислоты с пищей снижает окислительный стресс в сетчатке [13].

Таким образом, тиоктовая кислота и индометацин могут оказывать нейропротекторное действие при нейродегенеративных процессах. Однако отсутствуют данные о влиянии локального и совместного применения этих препаратов на физиологические и биохимические процессы в глазу.

Для оценки воздействия этих препаратов на ключевые звенья патогенеза нейродегенерации — нейровоспаление и окислительный стресс — нами использована модель воспроизведения ранних стадий этих процессов путем интравитреального введения дофаминергического ней-

ротоксина 6-гидроксидофамина (6-ОНДА) [14]. Являясь гидроксированным аналогом дофамина, 6-ОНДА способен захватываться транспортером дофамина и поступать в катехоламинергические нейроны, где он оказывает нейротоксическое действие. Поскольку 6-ОНДА не проходит через гистогематические барьеры, в том числе гематоофтальмический [15], то путем интравитреального введения можно создавать его необходимую концентрацию внутри глаза и избежать системного воздействия. Самоокисление 6-ОНДА способствует образованию перекиси водорода, супероксидных и гидроксильных радикалов, он усиливает образование перекиси водорода под действием моноаминоксидазы и ингибирует комплекс I в митохондриальной дыхательной цепи. Генерируемый таким образом окислительный стресс в нервных клетках приводит к нейровоспалению и гибели этих клеток путем апоптоза [16].

ЦЕЛЬ работы — оценить возможность применения тиоктовой кислоты и индометацина в виде глазных капель для лечения нейродегенеративного процесса в сетчатке на ранней стадии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе задействовано 20 кроликов породы шиншилла, самцы, весом 2,0–2,5 кг. Работу с животными проводили в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики в Российской Федерации» от 2016 г.

В качестве препарата, содержащего индометацин в концентрации 0,1%, использовали Индоколлор (Laboratoire CHAUVIN, Франция); 0,5% раствор тиоктовой кислоты в NaCl 0,9% готовили из концентрата тиоктовой кислоты 30 мг/мл для приготовления инфузионного раствора (ООО «ОЗОН», Россия).

Животные были разделены на 5 групп по 4 кролика. Первой (контрольной) группе животных интравитреально вводили 0,05 мл раствора NaCl 0,9%, содержащего аскорбиновую кислоту в концентрации 0,5%. Остальным животным (2–5-я группы) в оба глаза интравитреально вводили 0,25 мг 6-ОНДА (Sigma-Aldrich, США), растворенного в NaCl 0,9%, содержащем аскорбиновую кислоту в концентрации 0,5%, в объеме 0,05 мл. Вторая группа (нелеченные кролики) получала в оба глаза инстилляцией физиологического раствора 5 раз в день. Третья группа получала в оба глаза инстилляцией индометацина 3 раза до инъекции и далее 5 раз в день после нее. Четвертая группа получала в оба глаза инстилляцией раствора тиоктовой кислоты 3 раза до инъекции и далее 5 раз в день после нее. Пятая группа получала 3 раза до инъекции и далее 5 раз в день после нее инстилляцией раствора тиоктовой кислоты и через 15 мин инстилляцией индометацина. Лечение продолжали в течение 9 дней.

За состоянием сетчатки наблюдали с помощью цифровой фундус-камеры (Augo Optomed, Финляндия). Оценивали площадь поражения сетчатки в условных единицах, где общая площадь сетчатки принята за 4 условные единицы (баллы). Зрачковый рефлекс оценивали по прямой реакции зрачка на свет. Исследование проводили в темной комнате, направляя световой источник на 3 с непосредственно на исследуемый глаз. Реакцию зрачка на световое воздействие оценивали в условных единицах (баллах). Зрачковый дефект ранжировали по шкале от 0 до 4, где «0» означает отсутствие замедленной реакции, «1» — легкий (замедленная реакция на свет, около 1 с), «2» — умеренный (замедленная реакция на свет, больше 1 с), «3» — среднетяжелый (реакция на свет отсутствует, но зрачок правильной формы), «4» — тяжелый дефект (полное отсутствие реакции, изменение формы зрачка).

На 9-й день после интравитреальной инъекции проводили эвтаназию животных, энуклеировали глаза, извлекали сетчатку. Сетчатку гомогенизировали в NaCl 0,9% с помощью ультразвукового ручного гомогенизатора (UP50H, Hielscher, Германия), гомогенат центрифугировали 10 мин при 5000 об/мин для отделения нерастворимых компонентов, измерения проводили в надосадочной жидкости. Измеряли содержание дофамина методом иммуферментного анализа (ИФА) (Cloud-Clone Corp., США), активность $\alpha 2$ -МГ — ферментативным методом с помощью субстрата N-бензоил-DL-аргинин-п-нитроанилида (БАПНА) (Sigma-Aldrich., США) [17]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по торможению автоокисления кверцетина [18], калибровочную кривую строили с использованием человеческой рекомбинантной СОД (Рексод, ООО «НПП "Ферментные технологии"», Россия). Полученные данные выражали в расчете на содержание общего белка в пробе, определяемого по методу О. Lowry. Измерения проводили на фотометре Synergy MX (BioTek, США).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программных пакетов Excel и Statistica 10.0. Достоверность различий между группами оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна — Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По данным исследования глазного дна, на 7-е сутки после введения 6-OHDA повреждение сетчатки составляло от 1/4 до 1/2 ее поверхности. При инстилляциях тиоктовой кислоты площадь повреждения достоверно снижалась почти вдвое, при инстилляциях индометацина площадь повреждения снижалась в меньшей степени, а наибольшее снижение отмечено при совместном применении этих препаратов (рис. 1, таблица).

Введение 6-OHDA вызывает достоверное снижение концентрации дофамина в сетчатке (рис. 2). В группе кроликов, получавших инстилляцию тиоктовой кислоты, наблюдается тенденция к увеличению содержания дофамина в сетчатке по сравнению с животными без лечения. Сниженная под влиянием 6-OHDA концентрация дофа-

мина в сетчатке ($0,050 \pm 0,009$ пг/мг против $0,095 \pm 0,031$ в норме, $p < 0,05$) после инстилляций тиоктовой кислоты и индометацина имела тенденцию к повышению и достоверно возрастала под влиянием комбинации препаратов до $0,141 \pm 0,037$ пг/мг ($p < 0,01$).

В группе животных, получавших индометацин, среднее по группе содержание дофамина в сетчатке приближается к контрольному, но большой разброс содержания дофамина у разных животных объясняет отсутствие статистической достоверности различия по отношению к нелеченым животным. Однако при совместном применении этих препаратов содержание дофамина в сетчатке не только не падает после инъекции 6-OHDA, но даже превосходит контрольный уровень, что свидетельствует о стимулировании компенсаторного ответа на действие дофаминергического нейротоксина со стороны синтезирующих дофамин клеток. Нами впервые показано влияние индометацина и тиоктовой кислоты на уровень дофамина в сетчатке. Выявленный эффект сохранения содержания дофамина именно при их совместном применении открывает предпосылки для клинического применения такой комплексной терапии.

После инъекции 6-OHDA у нелеченых кроликов на 2-е сутки отмечено снижение реакции зрачка на свет, и это нарушение прогрессировало вплоть до 9-х суток наблюдения (рис. 3). У кроликов, получавших инстилляцию индометацина и тиоктовой кислоты по отдельности и в комбинации, изменения реакции зрачка на свет не происходило. Из дофамина синтезируются основные нейротрансмиттеры симпатической нервной системы — норадреналин и адреналин, и поэтому дофамин играет большую роль в регуляции активности симпатической нервной системы, а модель с введением 6-OHDA рассматривается также и как модель симпатэктомии [19]. Снижение концентрации дофамина после интравитреальной инъекции 6-OHDA может происходить не только в сетчатке, но и в структурах переднего отдела глаза, что влияет на реакцию зрачка на свет. Поскольку снижение реакции зрачка на свет связано с вызванным 6-OHDA снижением дофаминергической и

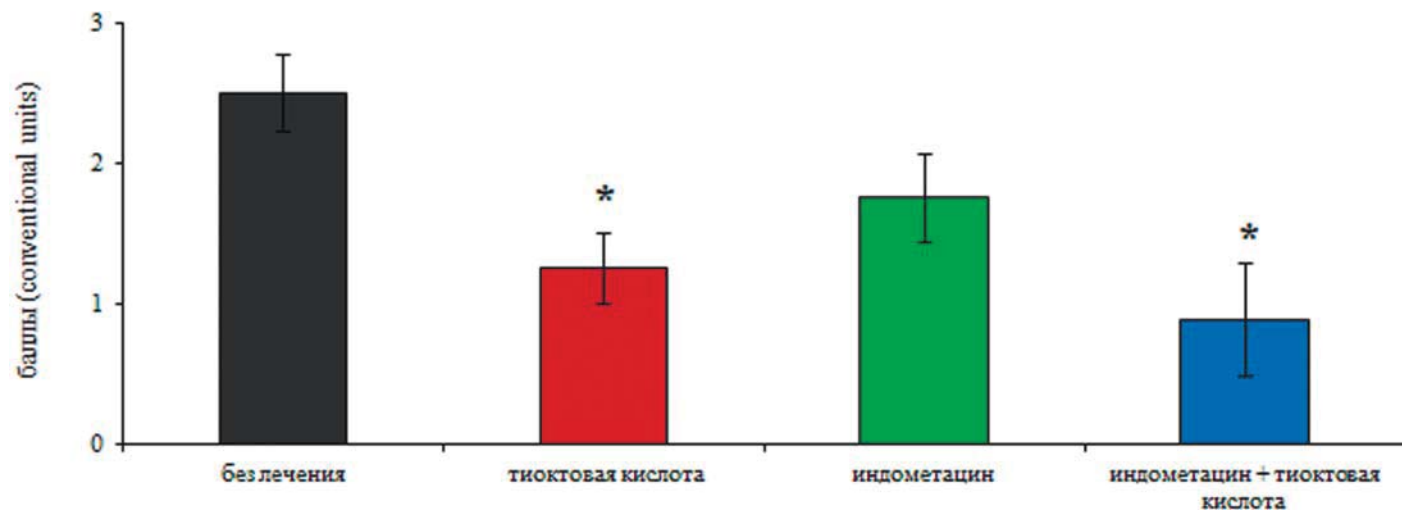
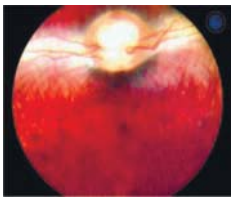
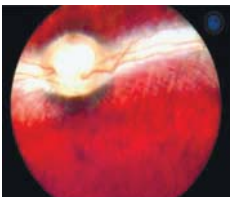
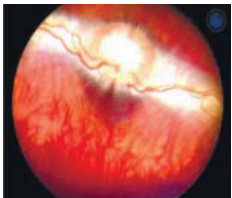
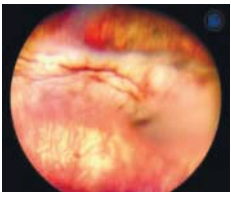
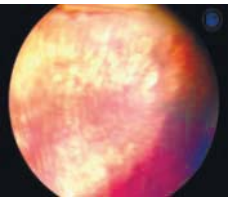
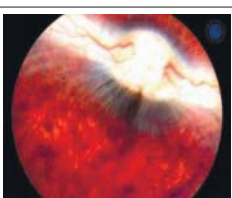
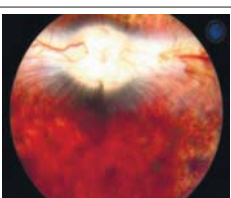
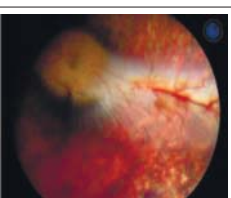
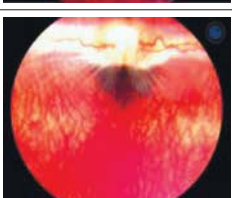
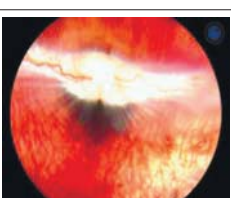
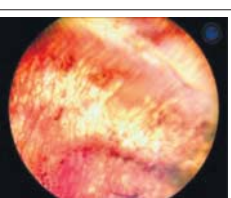
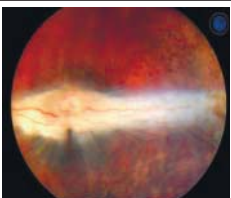
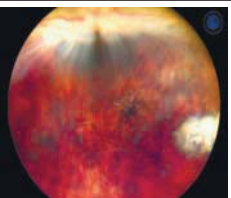


Рис. 1. Площадь (баллы) повреждения сетчатки у кроликов с моделью нейродегенеративного процесса в сетчатке через неделю после интравитреального введения 6-OHDA 0,25 мг на фоне лечения индометацином 0,1% и тиоктовой кислотой 0,5%. * — $p < 0,05$ по сравнению с группой без лечения

Fig. 1. Area (conventional units) of retinal damage in rabbits with experimental retinal neurodegeneration on the 7 day after the intravitreal injection of 0.25 mg 6-OHDA. Comparison of untreated animals and ones treated with topical indomethacin 0.1% and thioctic acid 0.5%. Black bar — untreated animals, red bar — treated with thioctic acid, green bar — treated with indomethacin, blue bar — treated with combination of preparations. * — $p < 0.05$ compared with untreated group

Таблица. Фото глазного дна кролика с моделью нейродегенеративного процесса в сетчатке до и через неделю после интравитреального введения 6-OHDA 0,25 мг на фоне лечения индометацином 0,1% и тиоктовой кислотой 0,5%

Table. Eye fundus images of rabbits with experimental retinal neurodegeneration before and 7 days after intravitreal injection of 0.25 mg 6-OHDA treated with topical indomethacin 0.1% and thiocctic acid 0.5%

Группы Groups	До воздействий Intact eye	После воздействий Model of neurodegeneration		Изменения глазного дна Eye fundus abnormalities
1. Контроль (интравитреальное введение NaCl 0,9% с аскорбиновой кислотой 0,5%) 1. Controls (intravitreal NaCl 0.9% in ascorbate 0.5%)				Атрофические изменения и геморрагии отсутствуют, сосуды сетчатки без патологии No atrophy or hemorrhages, retinal blood vessels without signs of pathology
2. Без лечения (интравитреальное введение нейротоксина 6-OHDA 0,25%) 2. Intravitreal 6-OHDA 0.25 mg, untreated				Геморрагическая васкулопатия с носовой и височной стороны от ДЗН, значительная площадь атрофии в заднем полюсе и всех квадрантах глазного дна Haemorrhagic vasculopathy on nasal and temporal sides of optic disc, significant area of atrophy in all quadrants
3. Лечение тиоктовой кислотой 0,5% 3. Treatment with topical thiocctic acid 0.5%				Геморрагический васкулит по ходу одной из сосудистых аркад, участки атрофии отсутствуют Haemorrhagic vasculite in one of the vascular arcades, no atrophic areas
4. Лечение индометацином 0,1% 4. Treatment with topical indomethacin 0.1%				Сужение ретиальных сосудов с височной стороны от ДЗН, зона атрофии на периферии глазного дна Constriction of retinal vessels on the temporal side of optic disc, zone of atrophy on the periphery
5. Лечение тиоктовой кислотой 0,5% и индометацином 0,1% 5. Treatment with combination of thiocctic acid 0.5% and indomethacin 0.1%				Незначительные явления геморрагического васкулита, участки атрофии отсутствуют, локальный сгусток фибрина в стекловидном теле Minor signs of haemorrhagic vasculite, no atrophic areas, single fibrin clot in the vitreous

симпатической иннервации, есть основание полагать, что с помощью индометацина и тиоктовой кислоты можно нивелировать недостаточность этих систем. Подобное действие этих препаратов нами было выявлено впервые.

Препараты по отдельности и совместно значительно повышали сниженную активность $\alpha 2$ -МГ: контроль — $5,5 \pm 1,2$ пг/мг; без лечения — $2,93 \pm 0,42$ пг/мг, ($p < 0,005$); тиоктовая кислота — $4,19 \pm 0,91$ пг/мг ($p < 0,05$); индометацин — $6,95 \pm 1,09$ пг/мг, ($p < 0,05$); комбинация препаратов — $7,25 \pm 0,63$ пг/м, ($p < 0,005$). Снижение активности $\alpha 2$ -МГ в сетчатке после введения 6-OHDA указывает на потребление этого белка для связывания и удаления активированных при воспалении протеолитических ферментов и образовавшихся провоспалительных цитокинов (рис. 4). В то же время снижение уровня $\alpha 2$ -МГ, обладающего шаперонной активностью, способствует образованию неправильно свернутых белков и их агрегатов, что характерно для нейродегенеративного процесса. У кроликов, получавших инстилляции индометацина, снижения активности $\alpha 2$ -МГ в сетчатке не происходило, напротив, его уровень был даже

выше контрольного, что можно объяснить способностью индометацина стимулировать экспрессию $\alpha 2$ -МГ [7]. У кроликов, получавших тиоктовую кислоту, активность $\alpha 2$ -МГ в сетчатке была выше, чем у нелеченых животных, но, по-видимому, за счет других механизмов, а именно за счет своего антиоксидантного действия, предохраняющего этот белок от разрушения, вызванного окислительным стрессом [20]. При совместном применении индометацина и тиоктовой кислоты уровень активности $\alpha 2$ -МГ в сетчатке был такой же, как и при применении одного индометацина. Тем не менее совместное применение этих препаратов оправдано различием в механизме их действия: индометацин увеличивает синтез этого белка, а тиоктовая кислота предохраняет его от разрушения.

Активность антиоксидантного фермента СОД в сетчатке после введения 6-OHDA достоверно снижается, что способствует развитию окислительного стресса. Тиоктовая кислота и индометацин по отдельности и совместно повышали сниженную активность СОД: контроль — $13,3 \pm 5,68$ U/мг; без лечения — $5,41 \pm 1,5$ U/мг ($p < 0,05$);

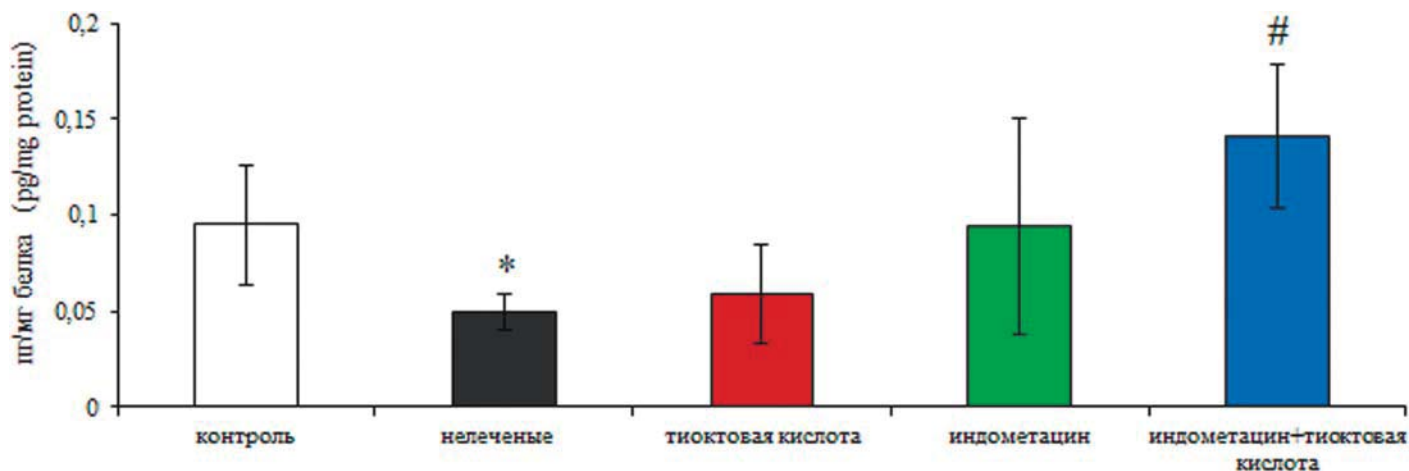


Рис. 2. Концентрация дофамина (пг/мг) в сетчатке кроликов с моделью нейродегенеративного процесса в сетчатке через 9 дней после интравитреального введения 6-OHDA 0,25 мг на фоне лечения индометацином 0,1% и тиоктовой кислотой 0,5%. # — $p < 0,05$ по сравнению с группой без лечения. * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Fig. 2. Dopamine concentration (pg/mg protein) in retina of rabbits with experimental retinal neurodegeneration 9 days after intravitreal injection of 0.25 mg 6-OHDA treated with topical indomethacin 0.1% and thiocetic acid 0.5%. White bar — controls (injection of saline), black bar — untreated animals, red bar — treated with thiocetic acid, green bar — treated with indomethacin, blue bar — treated with combination of preparations. # — $p < 0.05$ compared with untreated group. * — $p < 0.05$ compared with healthy controls

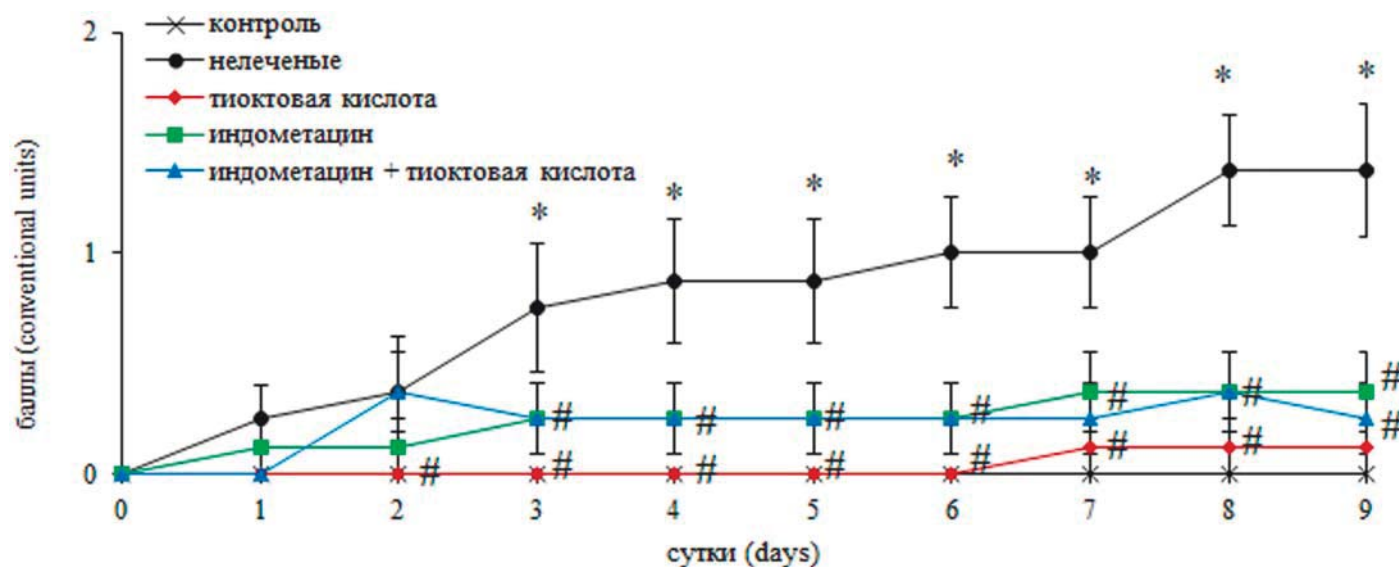


Рис. 3. Изменение зрачкового рефлекса (баллы) у кроликов с моделью нейродегенеративного процесса в сетчатке после интравитреального введения 6-OHDA 0,25 мг на фоне лечения индометацином 0,1% и тиоктовой кислотой 0,5%. # — $p < 0,05$ по сравнению с группой без лечения. * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Fig. 3. Changes of pupillary light reaction (conventional units) of rabbits with experimental retinal neurodegeneration after intravitreal injection of 0.25 mg 6-OHDA treated with topical indomethacin 0.1% and thiocetic acid 0.5%. Black line — untreated animals, red line — treated with thiocetic acid, green line — treated with indomethacin, blue line — treated with combination of preparations. # — $p < 0.05$ compared with untreated group. * — $p < 0.05$ compared with healthy controls

тиоктовая кислота — $8,25 \pm 1,27$ U/мг ($p < 0,02$); индометацин — $29,84 \pm 6,63$ U/мг, ($p < 0,01$); комбинация препаратов — $23,99 \pm 3,78$ U/мг ($p < 0,01$).

При инстилляциях тиоктовой кислоты активность фермента остается на уровне нормы, а инстилляции индометацина приводят к значительному увеличению активности СОД с превышением контрольного уровня почти в 2 раза. Не исключено, что стимуляция антиоксидантных ферментов является одним из механизмов противовоспалительного действия индометацина [21]. При совместном применении тиоктовой кислоты и индометацина активность СОД была

на высоком уровне, но не выше значений, отмечаемых при инстилляциях одного индометацина (рис. 5). Учитывая роль тиоктовой кислоты в обеспечении метаболических процессов в митохондриях, ее антиоксидантные свойства, можно полагать, что она дополняет действие индометацина при окислительном стрессе, играющем важную роль в развитии нейродегенеративного процесса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Избирательная токсичность 6-OHDA в дофаминергических нейронах, его способность вызывать окислительное

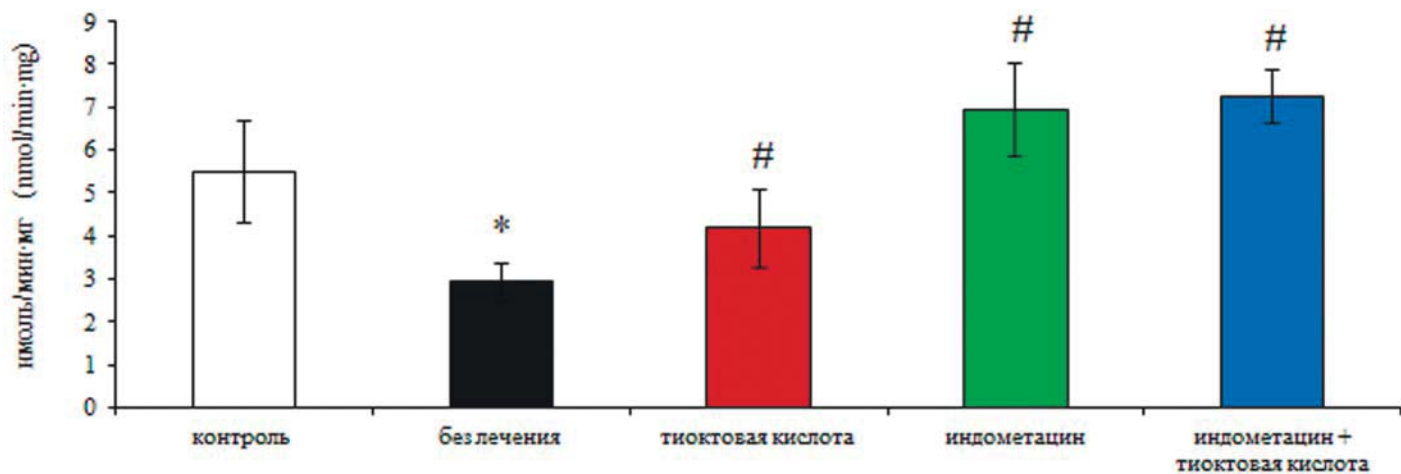


Рис. 4. Активность α2-макробулина (нмоль/мин·мг) в сетчатке кроликов с моделью нейродегенеративного процесса в сетчатке через 9 дней после интравитреального введения 6-OHDA 0,25 мг на фоне лечения индометацином 0,1% и тиоктовой кислотой 0,5%. # — $p < 0,05$ по сравнению с группой без лечения. * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Fig. 4. Alpha2-macroglobulin activity (nmol/min-mg protein) in retina of rabbits with experimental retinal neurodegeneration 9 days after intravitreal injection of 0.25 mg 6-OHDA treated with topical indomethacin 0.1% and thiocetic acid 0.5%. White bar — controls (injection of saline), black bar — untreated animals, red bar — treated with thiocetic acid, green bar — treated with indomethacin, blue bar — treated with combination of preparations. # — $p < 0.05$ compared with untreated group. * — $p < 0.05$ compared with healthy controls

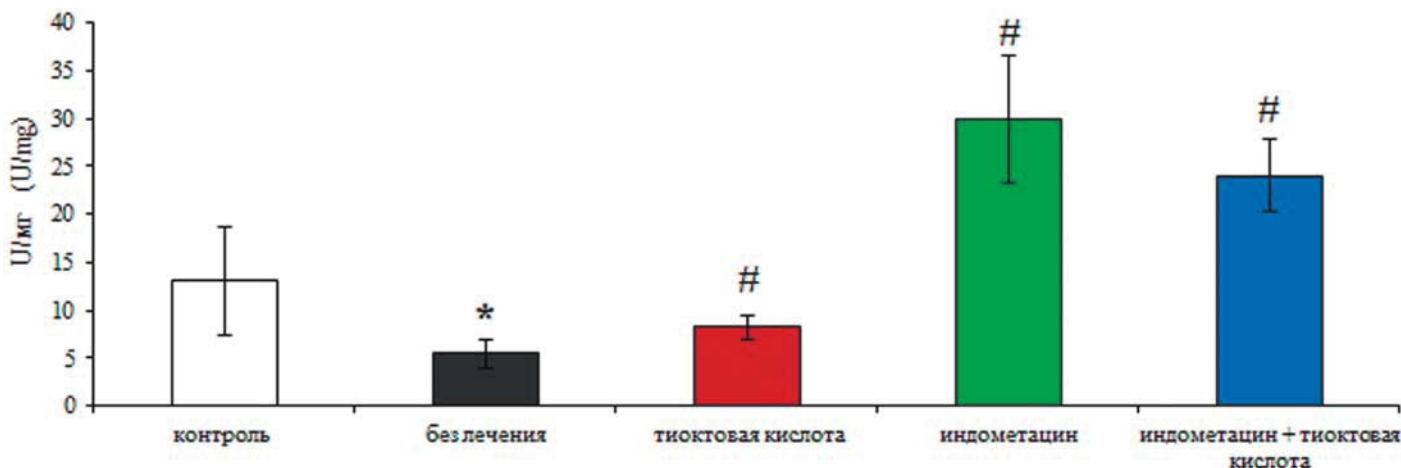


Рис. 5. Активность СОД (U/mg) в сетчатке кроликов с моделью нейродегенеративного процесса в сетчатке через 9 дней после интравитреального введения 6-OHDA 0,25 мг на фоне лечения индометацином 0,1% и тиоктовой кислотой 0,5%. # — $p < 0,05$ по сравнению с группой без лечения. * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Fig. 5. Superoxide dismutase activity (U/mg protein) in retina of rabbits with experimental retinal neurodegeneration 9 days after intravitreal injection of 0.25 mg 6-OHDA treated with topical indomethacin 0.1% and thiocetic acid 0.5%. White bar — controls (injection of saline), black bar — untreated animals, red bar — treated with thiocetic acid, green bar — treated with indomethacin, blue bar — treated with combination of preparations. # — $p < 0.05$ compared with untreated group. * — $p < 0.05$ compared with healthy controls

повреждение клеток и нейровоспаление позволяют использовать этот нейротоксин для моделирования нейродегенеративных процессов и оценивать на этих моделях различные фармакологически активные соединения в качестве кандидатов при различных неврологических заболеваниях [22]. Для моделирования локальной глазной патологии 6-OHDA привлекается еще и тем, что он не проходит гистогематические барьеры и остается в области введения, не вызывая системных эффектов.

Окислительный стресс и нейровоспаление являются ключевыми звеньями патогенеза нейродегенеративных процессов, поэтому противовоспалительные препараты и антиоксиданты рассматриваются в качестве перспективных средств для лечения нейродегенерации. В данной работе впервые изучено действие в виде глазных капель противо-

воспалительного препарата индометацина и антиоксиданта тиоктовой кислоты на биохимические и физиологические процессы в глазах кроликов с моделью нейродегенерации сетчатки, вызванной интравитреальным введением 6-OHDA. Оба препарата в отдельности показали положительное влияние на состояние глаза после введения этого нейротоксина. Оно выражалось в уменьшении площади повреждения сетчатки, выявляемого при осмотре глазного дна, предотвращении изменения реакции зрачка на свет, поддержании уровня дофамина, α2-МГ, СОД в сетчатке. Комбинированное применение индометацина и тиоктовой кислоты наиболее эффективно предотвращало развитие нарушений в глазу, вызванных 6-OHDA, что делает такой метод терапии перспективным для лечения глазных болезней, сопровождающихся нейродегенерацией.

Литература/References

1. Нероев В.В. Офтальмология Российской Федерации в цифрах: краткий сборник. Москва; 2021. [Neroev V.V. Ophthalmology of the Russian Federation in numbers: a brief collection. Moscow; 2021 (In Russ.)].
2. Ивахненко О.И., Нероев В.В., Зайцева О.В. Возрастная макулярная дегенерация и диабетическое поражение глаз. Социально-экономические аспекты заболеваемости. *Вестник офтальмологии*. 2021; 137 (1): 123–9. [Ivakhnenko O.I., Neroev V.V., Zaytseva O.V. Age-related macular degeneration and diabetic eye lesion. Socio-economic aspects. *Vestnik oftal'mologii*. 2021; 137 (1): 123–9 (In Russ.)]. doi.org/10.17116/oftalma202113701123
3. Литвиненко И.В., Красаков И.В., Бисага Г.Н., Скулябин Д.И., Полтавский И.Д. Современная концепция патогенеза нейродегенеративных заболеваний и стратегия терапии. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. Спецвыпуски. 2017; 117 (6–2): 3–10. [Litvinenko I.V., Krasakov I.V., Bisaga G.N., Skulyabin D.I., Poltavsky I.D. Modern conception of the pathogenesis of neurodegenerative diseases and therapeutic strategy. *Zhurnal neurologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2017; 117 (6–2): 3–10 (In Russ.)]. doi.org/10.17116/jnevro2017117623-10
4. Hain EG, Sparenberg M, Rasińska J, et al. Indomethacin promotes survival of new neurons in the adult murine hippocampus accompanied by anti-inflammatory effects following MPTP-induced dopamine depletion. *J Neuroinflammation*. 2018; 26; 15 (1): 162. doi: 10.1186/s12974-018-1179-4
5. Kurkowska-Jastrzebska I, Babiuch M, Joniec I, et al. Indomethacin protects against neurodegeneration caused by MPTP intoxication in mice. *Int Immunopharmacol*. 2002; 2 (8): 1213–8. doi: 10.1016/s1567-5769(02)00078-4
6. Vijitruth R, Liu M, Choi DY, et al. Cyclooxygenase-2 mediates microglial activation and secondary dopaminergic cell death in the mouse MPTP model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation*. 2006; 27; 3: 6. doi: 10.1186/1742-2094-3-6
7. Guan PP, Yang LQ, Xu GB, et al. Indomethacin disrupts the formation of β -Amyloid plaques via an α 2-Macroglobulin-activating Irf1-dependent mechanism. *Int J Mol Sci*. 2021; 30; 22 (15): 8185. doi: 10.3390/ijms22158185
8. Тутельян В.А., Махова А.А., Погожева А.В. и др. Липоевая кислота: физиологическая роль и перспективы клинического применения. *Вопросы питания*. 2019; 88 (4): 6–11. [Tutelyan V.A., Makhova A.A., Pogozheva A.V., et al. Lipoic acid: physiological role and prospects for clinical application. *Problems of Nutrition*. 2019; 88 (4): 6–11 (In Russ.)]. doi: 10.24411/0042-8833-2019-10035
9. Molz P, Schroder N. Potential therapeutic effects of lipoic acid on memory deficits related to aging and neurodegeneration. *Front Pharmacol*. 2017; 8: 849. doi: 10.3389/fphar.2017.00849
10. Shinto L, Quinn J, Montine T, et al. A randomized placebocontrolled pilot trial of omega-3 fatty acids and alpha lipoic acid in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2014; 38 (1): 111–20. doi: 10.3233/JAD-130722
11. Kan E, Alici Ö, Kan EK, Ayar A. Effects of alpha-lipoic acid on retinal ganglion cells, retinal thicknesses, and VEGF production in an experimental model of diabetes. *Int Ophthalmol*. 2017; 37 (6): 1269–78. doi: 10.1007/s10792-016-0396-z
12. Liu R, Wang Y, Pu M, Gao J. Effect of alpha lipoic acid on retinal ganglion cell survival in an optic nerve crush model. *Mol Vis*. 2016 Sep 23; 22: 1122–1136. PMID: 27703307
13. Inman DM, Lambert WS, Calkins DJ, Horner PJ. α -Lipoic acid antioxidant treatment limits glaucoma-related retinal ganglion cell death and dysfunction. *PLoS One*. 2013; 5; 8 (6): e65389. doi: 10.1371/journal.pone.0065389
14. Павленко Т.А., Чеснокова Н.Б., Безнос О.В. и др. Способ моделирования нейродегенеративного процесса в глазу. Патент РФ № 2022115041, 2022. [Pavlenko T.A., Chesnokova N.B., Beznos O.V., et al. A method for modeling the neurodegenerative process in the eye. Patent RF # 2022115041, 2022 (In Russ.)].
15. Hernandez-Baltazar D, Zavala-Flores LM, Villanueva-Olivo A. The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. *Neurologia*. 2017; 32 (8): 533–9. doi: 10.1016/j.nrl.2015.06.011
16. Ставровская А.В., Воронков Д.Н., Ольшанский А.С. и др. Взаимосвязь локализации повреждений дофаминовой иннервации стриатума и их поведенческих проявлений на 6-гидроксидофамининдуцированной модели паркинсонизма у крыс. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2021; 15 (2): 42–9. [Stavrovskaya A.V., Voronkov D.N., Olshansky A.S., et al. The relationship between the location of a lesion in the striatal dopaminergic innervation and its behavioral manifestation in a 6-hydroxydopamine-induced model of Parkinson's disease in rats. *Annals of clinical and experimental neurology*. 2021; 15 (2): 42–9 (In Russ.)]. doi: 10.25692/ACEN.2021.2.6
17. Веремеенко К.Н., Васильева Т.Г., Доброгорская Л.Н., Краева Л.Н., Гончарова В.П. α 2-макроглобулин в спинномозговой жидкости при нейрохирургических заболеваниях. *Вопросы медицинской химии*. 1989; 6: 48–51. [Veremeenko K.N., Vasilyeva T.G., Dobrogorskaya L.N., Kraeva L.N., Goncharova V.P. α 2-macroglobulin in cerebrospinal fluid in neurosurgical diseases. *Questions of medical chemistry*. 1989; 6: 48–51 (In Russ.)].
18. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. *Вопросы медицинской химии*. 1990; 2: 88–91. [Kostyuk V.A., Potapovich A.I., Kovaleva Zh.V. A simple and sensitive method for determining the activity of superoxide dismutase based on the oxidation reaction of quercetin. *Voprosy meditsinskoj khimii*. 1990; 2: 88–91 (In Russ.)].
19. Jin Y, Fan J, Li F, Bi L, Pei G. Local sympathetic denervation of femoral artery in a rabbit model by using 6-hydroxydopamine in situ. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 874947. doi: 10.1155/2014/874947
20. Siddiqui T, Zia MK, Ali SS, et al. Reactive oxygen species and anti-proteinases. *Arch Physiol Biochem*. 2016; 122 (1): 1–7. doi: 10.3109/13813455.2015.1115525
21. Kirkova M, Kassabova T, Russanov E. In vivo effects of indomethacin-I. Activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation. *Gen Pharmacol*. 1992; 23 (3): 503–7. doi: 10.1016/0306-3623(92)90119-5
22. Pantic I, Cumic J, Skodric SR, Dugalic S, Brodski C. Oxidopamine and oxidative stress: Recent advances in experimental physiology and pharmacology. *Chem Biol Interact*. 2021; 25: 336: 109380. doi: 10.1016/j.cbi.2021.109380

Вклад авторов в работу: В.В. Нероев — руководство проектом; Т.А. Павленко — концепция и дизайн исследования, проведение исследований, интерпретация данных, написание текста, научное редактирование; Н.Б. Чеснокова — написание текста, научное редактирование; О.В. Безнос — проведение исследований, статистическая обработка данных, техническое редактирование; Т.Д. Охотимская, А.Ю. Панова — проведение исследований, анализ данных.

Authors' contribution: V.V. Neroev — project administration; T.A. Pavlenko — research concept and design, article writing, scientific editing; N.B. Chesnokova — research concept and design, article writing, scientific editing; O.V. Beznos — data collection and processing, article writing, preparation of illustrations; T.D. Okhotsimskaya, A.Yu. Panova — data collection and processing.

Поступила: 30.05.2023. Переработана: 07.06.2023. Принята к печати: 08.06.2023

Originally received: 30.05.2023. Final revision: 07.06.2023. Accepted: 08.06.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ/INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, ул. Садовая-Черногрозская, д. 14/19, Москва, 105062, Россия

² ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, ул. Десятская, д. 20, стр. 1, Москва, 127473, Россия

Владимир Владимирович Нероев — академик РАН, д-р мед. наук, профессор, директор¹, заведующий кафедрой глазных болезней², ORCID 0000-0002-8480-0894

Татьяна Аркадьевна Павленко — канд. мед. наук, начальник отдела патофизиологии и биохимии¹, ORCID 0000-0001-8032-4248

Наталья Борисовна Чеснокова — д-р биол. наук, профессор, главный специалист отдела патофизиологии и биохимии¹, ORCID 0000-0002-7856-8005

Ольга Валерьевна Безнос — врач клинической лабораторной диагностики отдела патофизиологии и биохимии¹, ORCID 0000-0001-7557-4955

Татьяна Дмитриевна Охотимская — канд. мед. наук, врач-офтальмолог отдела патологии сетчатки и зрительного нерва¹, ORCID 0000-0003-1121-4314

Анна Юрьевна Панова — канд. мед. наук, младший научный сотрудник отдела патологии глаз у детей¹, ORCID 0000-0003-2103-1570

Для контактов: Татьяна Аркадьевна Павленко,
tanya1975_@inbox.ru

¹ Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, 14/19, Sadovaya-Chernogryazskaya St., Moscow, 105062, Russia

² Moscow Evdokimov State Medical Stomatological University, 20, Bldg. 1, Delegatskaya St., Moscow, 127473, Russia

Vladimir V. Neroev — Academician of the RAS, Dr. of Med. Sci., professor, director¹, head of chair of eye diseases², ORCID 0000-0002-8480-0894
Tatiana A. Pavlenko — Cand. of Med. Sci., head of the department of pathophysiology and biochemistry¹, ORCID 0000-0001-8032-4248

Natalya B. Chesnokova — Dr. of Biol. Sci., professor, principal specialist of the department of pathophysiology and biochemistry¹, ORCID 0000-0002-7856-8005

Olga V. Beznos — physician of clinical-diagnostic laboratory, department of pathophysiology and biochemistry¹, ORCID 0000-0001-7557-4955

Tatiana D. Okhotsimskaya — Cand. of Med. Sci., ophthalmologist, department of pathology of the retina and optic nerve¹, ORCID 0000-0003-1121-4314

Anna Yu. Panova — Cand. of Med. Sci., researcher, department of children's eye pathology¹, ORCID 0000-0003-2103-1570

For contacts: Tatiana A. Pavlenko,
tanya1975_@inbox.ru