

**ВЛИЯНИЕ ВОСПАЛЕНИЯ В УВЕАЛЬНОМ ТРАКТЕ НА ПРОЦЕССЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В СЕТЧАТКЕ ЖИВОТНЫХ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ СВЕТОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ**

**В. В. Савко**, д. м. н., **Вашах Зияд Махмуд Ахмед**, аспирант

Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова АМН Украины

*З метою з'ясування впливу запального процесу в увеальному тракті на показники перекисного окислення ліпідів в сітківці після тривалого світлового впливу проведено експериментальне дослідження на 23 кроликах. Співставлення даних, одержаних в трьох групах тварин — опромінених світлом високої інтенсивності (8), зазнавших світловий вплив на фоні алергічного увеїту (8) та контрольних (7) — показало, що при світловому впливі в сітківці кроликів рівень малонового діальдегіду і дієїнових кон'югатів значно збільшується відносно контролю — до 130 % та 120 % відповідно. Встановлено, що запальний процес в увеальному тракті при тривалому світловому опроміненні сприяє суттєвому підвищенню рівня малонового діальдегіду в сітчастій оболонці тварин.*

**Ключевые слова:** увеит, сетчатка, перекисное окисление липидов, световое воздействие, эксперимент.

**Ключові слова:** увеїт, сітківка, перекисне окислення ліпідів, світловий вплив, експеримент.

**Введение.** Одним из распространенных заболеваний сетчатой оболочки у лиц старше 40–50 лет является возрастная макулярная дегенерация (ВМД). По данным Национального института глаза (США), среди причин, приводящих к слепоте, возрастная макулярная дегенерация занимает второе место после диабетической ретинопатии [4, 14].

Частота заболевания растет параллельно с возрастом. Заболеваемость в возрастной группе от 65 до 74 лет составляет 20 %, в то время как среди 75–84-летних возрастает до 35 %. Финальная стадия заболевания отмечается в 1 % случаев и достигает 5 % в самой пожилой возрастной группе [13, 19, 23].

До настоящего времени этиология возрастной макулярной дегенерации полностью не изучена, поэтому адекватных и эффективных методов терапии нет.

С целью задержки прогрессирования заболевания используют медикаментозную терапию (сосудорасширяющие, дезагреганты, витамины С и Е, бета-каротин в комбинации с препаратами цинка, препараты, которые улучшают тканевое дыхание — кокарбоксилаза, АТФ). Положительный эффект от лечения с помощью криптонового, аргонного, гелий-неонового лазеров является непродолжительным. Существуют также хирургические методы лечения, которые направлены в основном на улучшение поступления крови в задний полюс и включают разные виды ревазуляризаационных и вазореконструктивных операций. С помощью перечисленных методов лечения можно достичь только незначительной стабилизации процесса и частичного восстановления зрительных функций [1, 2, 3, 12, 15, 17, 24].

Такое положение заставляет вести поиск новых направлений в лечении возрастной макулярной дегенерации. Это возможно только в результате углубленного изучения патогенеза данного заболевания.

В ряде таких исследований последних лет среди заболеваний органа зрения особое внимание уделено увеитам, сопровождающимся повышенной генерацией свободно-радикальных соединений кислорода [6, 9, 10, 25]

Было выяснено, что в патогенезе макулярной дегенерации важнейшим звеном является дисбаланс процессов свободно-радикального окисления (белков, липидов и др. компонентов) и антирадикальной системы («гашение» радикалов) экзогенного и эндогенного характера. В результате этого дисбаланса в организме резко повышается концентрация пероксидов и снижается уровень функциональных групп белков (карбоксильных, тиоловых и др.). В этих исследованиях получены, в частности, данные о снижении концентрации эндогенных антиоксидантов или отсутствии их изменений в организме больных с макулярной дегенерацией [5, 11, 16, 20, 21, 23, 26].

В этой связи, учитывая роль свободно-радикальных соединений в патогенезе возрастной дегенерации сетчатки как в научном, так и в практическом отношении, представляется актуальным выяснение особенностей развития дегенеративного процесса, протекающего на фоне воспалительного поражения увеального тракта.

Учитывая все вышесказанное, **целью** настоящей работы было: изучить влияние воспалительного процесса в увеальном тракте на процессы пере-

кисного окисления липидов в сетчатке животных при длительном световом воздействии.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Экспериментальные исследования проводились на 23 кроликах (массой 2,1–2,8 кг), которые были разделены на три группы: 1 (контрольная) — 7 животных, 2 (с воздействием света) — 8 животных, 3 (с воздействием света и аллергическим увеитом) — 8 животных.

Способ моделирования увеальной хориоретинальной дегенерации предусматривает общее облучение экспериментальных животных светом высокой интенсивности, отличающийся тем, что для достижения возможности получения модели увеальной хориоретинальной дегенерации у животного предварительно моделировали аллергический увеит.

Предлагаемый нами способ осуществляется следующим образом. У животного вызывали общую сенсibilизацию организма посредством пятикратного подкожного введения в область верхней части бедра 50 мг бычьего сывороточного альбумина, растворенного в 1 мл<sup>3</sup> стерильного фосфатного буфера. Через 7 дней после окончания общей сенсibilизации конъюнктивальную полость правого глаза животного промывали физиологическим раствором, закапывали 30 % альбуцид. После эпибульбарной (Sol. dicaini 0,5 %) и ретробульбарной (Sol. novokaini 2 %) анестезии глазное яблоко фиксировали лапчатым пинцетом, конъюнктивальную полость тщательно осушивали ватным тампоном. В переднюю камеру правого глаза на 12 часах в 1–2 мм от плоскости лимба вводили разрешающую дозу 5 мг бычьего сывороточного альбумина, растворенного в 1 мл<sup>3</sup> стерильного фосфатного буфера. Конъюнктивальную полость промывали 30 % раствора альбуцида, место пункции роговицы тушировалось 1 % раствором бриллиантовой зелени.

На следующий день после введения разрешающей дозы антигена в переднюю камеру глаза у животного развивался увеит. В этот же день ему начинали производить ежедневное общее облучение светом высокой интенсивности, максимально приближенным к солнечному спектральному диапазону (350–1150 нм), в квадратной комнате площадью 10 м<sup>2</sup>. Облучение проводили ежедневно в режиме светового дня с 9 до 19 часов двумя дуговыми ртутно-вольфрамовыми лампами типа ДРД — 1000 (плотность потока световой энергии 30 мВт/см<sup>2</sup>, напряжение 220 В, мощность 1000 Вт, фитопоток 20000 МФТ), расположенными на стенках на равном расстоянии от пола до потолка. Животные находились в клетках с решетчатыми боковыми и внутренними стенками, внутренняя стенка обклеена алюминиевой фольгой. Длительность аллергического увеита в среднем составила 9 недель.

При проведении эксперимента соблюдались все рекомендации относительно исследований на животных, принятые международным сообществом при изучении органа зрения.

Все животные обследовались посредством биомикроскопии на целевой лампе — как при отборе экспериментальных животных (исключая аномалии), так и для наблюдений в процессе эксперимента.

В тканях изолированной сетчатки определялась концентрация малонового диальдегида и диеновых конъюгатов.

Принцип метода определения содержания малонового диальдегида состоит в том, что при температуре 100°C в кислой среде малоновый диальдегид реагирует с 2-тиобарбитуровой кислотой, образуя окрашенный триметиновый комплекс с максимумом поглощения при длине волны 532 нм.

К исследуемому гомогенату объемом 0,1 мл приливали 3 мл 1 % ортофосфорной кислоты (рН 2,0), 1 мл 0,6 % раствора тиобарбитуровой кислоты и 0,1 мл 0,28 % раствора сернокислого железа. Пробирки помещали в кипящую водяную баню на 60 мин. Затем пробирки охлаждали в холодной воде при 0°C — 2°C и добавляли 4 мл бутанола, тщательно перемешивали и центрифугировали 10 мин при 3 тыс. об/мин.

Измеряли оптическую плотность верхней фазы на спектроколориметре «Specol — 210» при длине волны 535 нм против бутанола.

Расчет содержания продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, проводили с учетом коэффициента молярной экстинкции малонового диальдегида —  $1,56 \cdot 10^5$  моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> и выражали в мкмоль/г ткани.

Коэффициент вариации методики — 5,2 %.

Принцип метода определения диеновых конъюгатов состоит в том, что при перекисном окислении на стадии образования свободных радикалов в молекулах полиненасыщенных высших жирных кислот возникает система сопряженных двойных связей, что сопровождается появлением нового максимума в спектре поглощения 233 нм.

К 0,5 мл исследуемой жидкости (гомогената) добавляли 4,5 мл экстрагирующей смеси гептана с изопропиловым спиртом в соотношении 1:1 (V:V). После экстракции к смеси добавляли 0,5 мл дистиллированной воды и отбирали из верхней (гептановой) фазы расслоившейся пробы 0,5 мл и смешивали с 2,5 мл этилового спирта.

Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-26 при 233 нм против этилового спирта.

Содержание диеновых конъюгатов рассчитывали с учетом молярного коэффициента экстинкции  $2,2 \cdot 10^5$  М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> и выражали в мкмоль/г ткани.

Полученные данные обрабатывали с помощью статистического пакета SPSS 11.0.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.** Определение уровня малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в сетчатке глаза животных как при световом воздействии, так и при сочетании светового воздействия и увеита выявило существенное повышение их содержания (табл. 1, рис. 1).

Как видно из представленных данных, уровень малонового диальдегида в группе животных при воздействии света повышен до 135 % по сравнению с нормой, а при световом воздействии на фоне увеита возрастал до 160 % по сравнению с нормой.

При сравнении групп интактных животных после светового воздействия и светового воздействия при увеите повышение уровня малонового диальдегида в последнем случае составило 18,5 %.

В группе животных при воздействии света уровень диеновых конъюгатов повышен до 120,1 % по сравнению с нормой, а в группе при сочетании светового воздействия и увеита — до 135,2 % по сравнению с нормой.

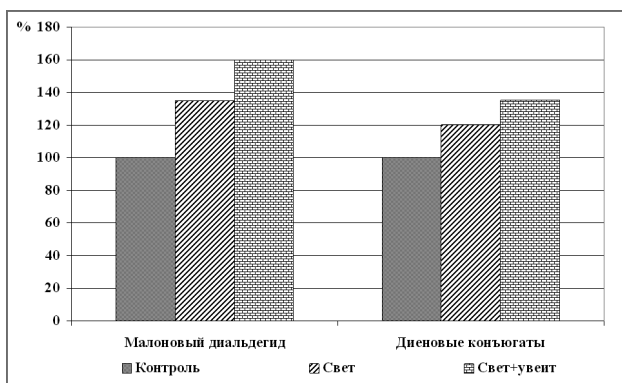
При этом следует отметить, что в группе животных при воздействии света и увеите отмечается тенденция к повышению содержания диеновых конъюгатов до 112,6 % по сравнению с группой животных, подвергнутых только воздействию света.

Таблица 1

**Содержание малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в сетчатке глаза животных кроликов при световом воздействии и увеите (мкмоль/г ткани)**

Исследуемый показатель	Статистич. показатель	Условия эксперимента		
		Контроль	Свет	Свет+увеит
Малоновый диальдегид	n	7	8	8
	M	911,60	1230,65	1458,56
	m	46,20	64,52	72,40
	p1	—	<0,01	<0,001
	%1	100	135,0	160,0
	p2	—	—	<0,05
	%2	—	100	118,5
Диеновые конъюгаты	n	7	8	8
	M	186,42	223,90	252,04
	m	9,50	12,42	13,20
	p1	—	<0,05	<0,01
	%1	100	120,1	135,2
	p2	—	—	>0,05
	%2	—	100	112,6

Примечание: p<sub>1</sub> — уровень значимости различий данных по отношению к норме, рассчитанный с помощью t-теста для независимых выборок; p<sub>2</sub> — уровень значимости различий данных при сравнении группы «Свет+увеит» по отношению к группе «Свет», рассчитанный с помощью t-теста для независимых выборок.



**Рис. 1. Относительный уровень малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в сетчатке глаза животных кроликов при световом воздействии и увеите (в % относительно контроля)**

Полученные нами результаты, свидетельствующие о резком усилении процессов перекисного окисления липидов в сетчатке при световом воздействии у животных с экспериментальным аллергическим увеитом, можно рассматривать как важный механизм повышения патогенного влияния света на сетчатку при воспалительных заболеваниях увеального тракта.

Это подтверждается результатами наших предыдущих исследований, выявивших усиление патогенного действия света на сетчатку у животных с экспериментальным увеитом.

**ВЫВОДЫ**

1. Выявлено, что при световом воздействии в сетчатке кроликов уровень малонового диальдегида и диеновых конъюгатов существенно увеличивается до 135 % и 120 % соответственно, относительно контроля.

2. Установлено, что воспалительный процесс в увеальном тракте на фоне длительного светового воздействия способствует значительному повышению уровня малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в сетчатке кроликов — до 160 % и 135 % соответственно по отношению к контрольной группе.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Венгер Г. Е., Солдатова А. М., Косоковская В. Н. Эффективность антиоксидантной терапии у больных склеротической макулодистрофией // Матеріали 1-ої міжнародної конференції «Сучасні аспекти судинно-ендокринних захворювань органу зору». — Київ, Україна. — 2000. — С. 101–102.
2. Доганова Л. П., Шульгина Л. А., Осадчий А. В. Использование нового природного антиоксиданта в лечении глазных болезней // Тезисы докладов VII съезда офтальмологов России. — Часть 2. — Москва. — 2000. — С. 307.
3. Журавлева Л. В., Чурилова И. В. Эффективность антиоксидантов в комплексном лечении больных возрастной макулодистрофией // Тезисы докладов VII съезда офтальмологов России. — Часть 2. — Москва. — 2000. — С. 311.
4. Золотаревский А. В. Макулодистрофия — проблема общебиологическая // Новое в офтальмологии. — 1997. — № 4. — С. 43–44.
5. Каган В. Е., Кулиев И. Я., Спиричев В. Б. Накопление продуктов перекисного окисления липидов и подавление электрической активности сетчатки E-авитаминозных крыс при действии света высокой интенсивности // Бюлл. эксп. биол. — 1981. — Т.91. — № 2. — С. 165–167.
6. Наследов А. SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках. // Спб.: Питер, 2005. — 416 с.
7. Новые методы биохимического анализа. // Изд. Ленинградского универ. — 1991. — 395 с.
8. Солдатова А. М. Роль свободнорадикальных, окислительно-восстановительных процессов и видимого света в патогенезе склеротической макулодистрофии / Офтальмологический журн. — 1992. — № 5–6. — С.273–280.
9. Age-related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss // Arch. Ophthalmol. — 2001. — Vol. 119. — P. 1417–1436.
10. Algevre P. V., Marshall J., Seregard S. Age-related maculopathy and the impact of blue light hazard // Acta Ophthalmol. Scand. — 2006. — Vol. 84. — № 1. — P. 4–15.

11. **Algevre P. V., Seregard S.** Age-related maculopathy: pathogenetic features and new treatment modalities // *Acta Ophthalmol.* — 2002. — Vol. 80. — P. 136–143.
12. **Ames B. N., Shigenaga M. K., Hagen T. M.** Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of the aging // *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* — 1993. — Vol. 90. — P. 7915–7922.
13. **Beatty S., Koh H. H., Henson D.** The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration // *Surv. Ophthalmol.* — 2000. — Vol. 45. — № 2. — P. 115–134.
14. **Delcourt C., Cristol J. P., Tessier F.** Age-related macular degeneration and antioxidant status in the POLA study // *Arch. Ophthalmol.* — 1999. — Vol. 117. — P. 1384–1390.
15. **Donoso L. A., Kim D., Frost A.** The role of inflammation in the pathogenesis of age-related macular degeneration // *Surv. Ophthalmol.* — 2006. — Vol. 51. — № 2. — P. 137–152.
16. **Edwards A. O., Malek G.** Molecular genetics of AMD and current animal models // *Angiogenesis.* — 2007. — Vol. 10. — № 2. — P. 119–132.
17. **Eye Disease Case-Control Study Group.** Antioxidant status and neovascular age-related macular degeneration // *Arch. Ophthalmol.* — 1993. — Vol. 111. — P. 104–109.
18. **Hollyfield J. G., Bonilha V. L., Rayborn M. E.** Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration // *Nat. Med.* — 2008. — Vol. 14. — P. 194–198.
19. **Klein R., Knudtson M. D., Klein B. E., Wong T. Y.** Inflammation, complement factor h, and age-related macular degeneration: the Multi-ethnic Study of Atherosclerosis // *Ophthalmology.* — 2008. — Vol. 115. — № 10. — P. 1742–1749.
20. **Mares J. A., Moeller S. M.** Diet and age-related macular degeneration: expanding our view // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2006. — Vol. 83. — P. 733–734.
21. **Mares-Perlman J. S., Brady W. E., Klein R.** Serum antioxidants and age-related macular degeneration in a population-based case-control study // *Arch. Ophthalmol.* — 1995. — Vol. 113. — P. 1518–1523.
22. **Militante J., Lombardini J. B.** Age-related retinal degeneration in animal models of aging: possible involvement of taurine deficiency and oxidative stress // *Neurochem. Res.* — 2004. — Vol. 29. — № 1. — P. 151–160.
23. **Winkler B. S., Boulton M. E., Gottsch J. D.** Oxidative damage and age-related macular degeneration // *Mol. Vis.* — 1999. — Vol. 5. — P. 32–38.

Поступила 15.06.2011

Рецензент д-р мед. наук Н. Ф. Леус

#### INFLUENCE OF THE UVEAL TRACT INFLAMMATION ON THE PROCESSES OF PEROXIDE OXIDATION OF LIPIDS IN THE ANIMAL RETINA IN LONG-TERM LIGHT EFFECT

Savko V. V., Vashah Ziyad Mahmud Ahmed

Odessa, Ukraine

To determine the influence of the inflammatory process in the uveal tract on the indices of the peroxide oxidation of lipids in the retina after the long-term light effect there were made experimental studies on 23 rabbits.

The comparison of data obtained in three groups of animals showed that in light effect the level of malonic dialdehyde and dienic conjugates increases significantly — up to 135 % regarding the controls (up to 120 %).

It is established that the inflammatory process in the uveal tract against the background of the long-term light effect promotes significant elevation of the POL indices level in the rabbit retina, which may be considered as a mechanism of increased pathogenic effect of the light on the retina in the inflammatory diseases of the ocular vascular membrane.

