

УДК 617.723–002+617.7–007.681–092.9]-07:678.048

СОСТОЯНИЕ ЭНЗИМАТИЧЕСКОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В ТКАНЯХ ГЛАЗА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ У ЖИВОТНЫХ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМ УВЕИТОМ

В. В. Савко, д-р мед. наук, **Хелифи Аmani**, аспирант,

Т. В. Пархоменко, старший лаборант

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова НАМН Украины»

Експериментальні дослідження проведені на 31 кролика. Вивчали концентрацію та активність ферментів супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази. Встановлено, що в умовах наявності запального процесу в увеальному тракті моделювання гіпертензії супроводжується значним зниженням активності супероксиддисмутази на 546 %, глутатіонпероксидази на 50,7 %, каталази на 48 % в тканинах кута передньої камери ока.

Ключевые слова: экспериментальная гипертензия, аллергический увеит, антиоксидантная система, ткани глаза

Ключові слова: експериментальна гіпертензія, алергічний увеїт, антиоксидантна система, тканини ока.

ВВЕДЕНИЕ. Увеличение продолжительности жизни населения на современном этапе способствует значительному росту инволютивных заболеваний, ведущих к инвалидности — в том числе, и к глаукоме [1,7].

В структуре глазных заболеваний, ведущих к слепоте, инвалидизации, нарушающей качество жизни, главенствующая роль принадлежит первичной глаукоме. За последние 20 лет инвалидность по глаукоме увеличилась с 6,2 до 40,2 %, что обуславливает не только медицинскую, но и социальную актуальность проблемы [9, 18].

Трудности в лечении глаукомы состоят в том, что, с одной стороны, современная офтальмология имеет в своем арсенале большой выбор лекарственных препаратов, методик консервативного и хирургического лечения, а с другой — не всегда данные мероприятия оказываются в достаточной степени эффективными. Это объясняется сложностью патогенетических механизмов развития заболевания, а также симптоматическим, а не патогенетическим подходом к его лечению и профилактике [15].

В настоящее время установлено, в частности, что в патогенезе заболевания играют роль изменения иммунных факторов, эластотонических свойств склеры, возраст, расовая принадлежность, сосудистая дисрегуляция, артериосклероз и т. д. Менее изучена роль метаболических изменений.

Особо следует отметить данные последних лет о значении свободно-радикальных процессов и, в частности, активных форм кислорода в патогенезе нейродегенеративных заболеваний. По всей веро-

ятности, при глаукоматозном поражении тканей глаза, роль свободно-радикальных соединений кислорода особо значима. Однако до последнего времени основное внимание при изучении патогенеза первичной открытоугольной глаукомы уделялось продуктам перекисного окисления липидов в камерной влаге и дренажной системе. Так, в ряде экспериментальных и клинических исследований показано изменение содержания продуктов липопероксидации и антиокислительных ферментов в трабекулярном аппарате и крови больных первичной открытоугольной глаукомой [2, 8, 11, 12, 15].

В то же время основными пусковыми факторами развития реакций пероксидации являются активные формы кислорода, которые способны вызывать повреждения не только липидов, но и всех компонентов клетки (белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов, мембран), что может играть важную роль в патогенезе этого заболевания [3, 10, 13, 14, 17, 19, 20].

Особый интерес при этом представляют воспалительные заболевания органа зрения, в частности, увеиты, сопровождающиеся нарушением оксидативного стресса, вследствие повышения генерации свободных радикалов [8]. В офтальмологической литературе имеется достаточное количество сообщений о высокой доле увеитов среди заболеваний глаз, хроническое рецидивирующее течение которых, наряду с недостаточно эффективным лечением, обуславливает тяжелые последствия вос-

© В. В. Савко, Хелифи Аmani, Т. В. Пархоменко, 2011

палительных заболеваний сосудистого тракта глаз и высокую частоту слепоты и инвалидности по зрению вследствие увеитов [4, 8].

Поэтому изучение данной патологии, серьезно нарушающей зрительные функции и приводящей к развитию осложнений, разработка способов патогенетической терапии и профилактики прогрессирования процесса, способных снизить количество осложнений этого заболевания, является одной из актуальных проблем современной офтальмологии.

Целью нашей работы было изучение состояния энзиматической антиоксидантной системы в тканях глаза при развитии экспериментальной глаукомы на фоне воспалительного процесса увеального тракта.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ. Экспериментальные исследования проводились на 31 кролике (массой 2,0–2,6 кг).

Первую — контрольную группу составили 10 кроликов, вторую группу (глаукома) составили 8 кроликов, третью (увеит) — 7 кроликов, четвертую (глаукома+увеит) — 6 кроликов.

При проведении эксперимента соблюдались все рекомендации относительно исследований на животных, принятые международным сообществом.

Все животные обследовались посредством биомикроскопии на щелевой лампе на этапе отбора экспериментальных животных (исключая аномалии) и в ходе наблюдений в процессе эксперимента.

Животные подвергались общей анестезии путем введения кетамина 50 мг/кг, местно применяли глазные капли 0,5 % раствор прокаина гидрохлорида, инстиллируемые в конъюнктивальный мешок за 1 минуту до инъекции. Моделирование глаукомы и увеита проводилось практически одновременно [6, 18].

Предлагаемый нами способ моделирования аллергического увеита осуществлялся следующим образом. Животному, фиксированному в специальном станке, проводили общую сенсibilизацию организма пятикратным подкожным введением в область верхней части бедра 50 мг бычьего сывороточного альбумина, растворенного в 1 мл³ стерильного фосфатного буфера. Интервал между инъекциями составлял 7 дней.

Через 7 дней после окончания общей сенсibilизации животному промывали конъюнктивальную полость правого глаза физиологическим раствором, закапывали 30 % альбуцид, после чего проводили эпibuльбарную (Sol. dicaini 0,5 %) и ретробульбарную (Sol. novokaini 2 %) анестезии. Левый глаз был контрольным. Глазное яблоко фиксировали лапчатым пинцетом, конъюнктивальную полость тщательно осушивали ватным тампоном. Разрешающую дозу 5 мг бычьего сывороточного альбумина, растворенного в 0,1 мл³ стерильного фосфатного буфера, вводили в переднюю камеру правого глаза на 12 часах в 1–2 мм от плоскости лимба. Иглу инсулинового шприца вводили косо в слои стромы роговицы. Конъюнктивальная полость промывалась 30 % раствором 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.

Для моделирования гипертензии раствор гиалуроната вводился в переднюю камеру, перед этим иглой в районе лимба отбиралось 0,15 мл камерной влаги, которая использовалась для биохимических исследований. Инъекции производили в правый глаз, а в левый глаз, служивший отно-

сительным контролем, вводили эквивалентное количество растворителя (сбалансированный солевой раствор), на котором готовился раствор гиалуроната.

Уровень ВГД у животных опытной группы повышался более чем в 2 раза по сравнению с контролем, в котором уровень ВГД составлял (9,5±0,6) мм рт. ст. Для выведения животных из эксперимента использовали летальную дозу пентобарбитола натрия (100 мг на кг, вводимого в маргинальную ушную вену).

В камерной влаге и ткани угла передней камеры производили определение концентрации активности ферментов супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы [2].

Об активности супероксиддисмутазы (СОД) судят по степени торможения определяемой СОД реакции восстановления нитросинего тетразолия супероксидными радикалами.

Для определения активности СОД 0,02 мл камерной влаги или тканевого экстракта вводили в 3 мл инкубационной среды, содержащей 0,41 мМ нитросинего тетразолия, 0,33 мМ ЭДТА, 0,01 мМ N-метилфеназона метилсульфата. Измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 540 нм, затем добавляли в кювету спектрофотометра 0,1 мл 0,8 мМ НАДФН, перемешивали и оставляли в темноте на 10 мин, после чего повторно измеряли оптическую плотность.

О реакции судили по разнице между первым и вторым показаниями спектрофотометра. За единицу активности принимали количество фермента, вызывающего 50 % торможение реакции восстановления нитросинего тетразолия. Коэффициент вариации метода 6,2 %. Активность фермента выражали в условных единицах на г ткани.

Принцип метода определения каталазы основан на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс.

Реакцию запускали добавлением 0,1 мл материала для исследований (гомогената или камерной влаги, приготовленного на 0,05М трис-НСl-буфере (рН 7,8)) к 2 мл 0,03 % раствора перекиси водорода. В холостую пробу вместо материала вносили 0,1 мл дистиллированной воды. Реакцию останавливали через 10 мин добавлением 1 мл 4 % молибдата аммония. Интенсивность развившейся окраски измеряли на спектрофотометре «Спекол-210» при длине волны 410 нм против контрольной пробы, в которую вместо перекиси водорода вносили 2 мл воды. Активность каталазы тканей выражали в мкат/г ткани. Коэффициент вариации метода 8,7 %.

Активность глутатионпероксидазы определяли спектрофотометрически по скорости образования окисленного глутатиона с помощью сопряженной реакции с НАДФН-зависимым ферментом глутатионредуктазой, регистрируя изменение оптической плотности при окислении НАДФН.

Для этого в пробирку вносили 0,1 мл раствора, содержащего в 0,1 М К-фосфатного буфера (рН 7,5), 2 мМ ЭДТА и 10 мМ восстановленного глутатиона и 0,1 мл материала для исследования. Через 3 мин инкубации при 25°С вносили 0,01 мл 40 мМ гидроперекиси трет-бутила. Спустя 5 мин в реакционную смесь добавляли 3,84 мл 0,5 М трис-НСl буфера (рН 7,7) с 1 мМ ЭДТА. Сразу после этого, 2 мл полученного раствора вносили в кювету и добавляли 0,05 мл 3,5 мМ НАДФН и 0,02 мл глутатионредуктазы (0,06 ед.). Быстро перемешивали и определяли изменение оптической плотности при 340 нм в течение 1 мин на спектрофотометре «Спекол-210». Коэффициент вариации метода 1,8 %. Активность фермента выражали в мкат/г ткани.

Данные обрабатывались с помощью соответствующих методов статистического анализа [5].

Таблица. 1

Активность антиоксидантных ферментов в камерной влаге кроликов при экспериментальной глаукоме и увеите

Исследуемый показатель	Статистич. показатели	Контроль	Условия эксперимента		
			Глаукома	Увеит	Глаукома+ увеит
Супероксид-дисмутаза, усл. ед/мл	n	10	8	7	6
	M	16,80	12,70	12,08	10,07
	m	0,65	0,68	0,62	0,65
	p1	—	<0,001	<0,001	<0,001
	%1	100	75,6	71,9	59,9
	p2	—	—	>0,05	<0,05
	%2	—	100	95,1	79,3
	p3	—	—	—	<0,05
Глутатион-пероксидаза, нкат/мл	n	10	8	7	6
	M	8,32	6,02	5,80	4,65
	m	0,60	0,40	0,32	0,30
	p1	—	<0,01	<0,01	<0,001
	%1	100	72,4	69,7	55,9
	p2	—	—	>0,05	<0,05
	%2	—	100	96,3	77,2
	p3	—	—	—	<0,05
Каталаза, мккат/мл	n	10	8	7	6
	M	0,17	0,14	0,13	0,11
	m	0,01	0,01	0,01	0,01
	p1	—	<0,05	<0,05	<0,001
	%1	100	82,4	76,5	64,7
	p2	—	—	>0,05	>0,05
	%2	—	100	92,9	78,6
	p3	—	—	—	>0,05
%	—	—	100	84,6	

Примечание: p1 — уровень значимости различий данных по отношению к контролю; p2 — уровень значимости различий данных по отношению к группе «Глаукома»; p3 — уровень значимости различий данных по отношению к группе «Увеит».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Данные, полученные при изучении активности антиоксидантных ферментов в камерной влаге и в ткани угла переднего отдела глаза кроликов при различных условиях эксперимента (глаукоме, увеите и глаукоме с увеитом) представлены на рисунках 1 и 2.

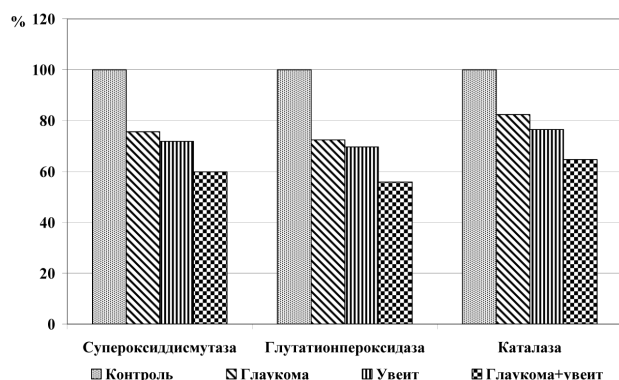


Рис. 1. Относительная активность антиоксидантных ферментов в камерной влаге кроликов при экспериментальной глаукоме и увеите (в % относительно контроля)

Изучая активность супероксиддисмутазы в камерной влаге и в ткани угла переднего отдела

глаза, можно отметить снижение ее во всех экспериментальных группах по сравнению с нормой ($16,80 \pm 0,65$ и $24,80 \pm 1,52$ усл. ед/мл).

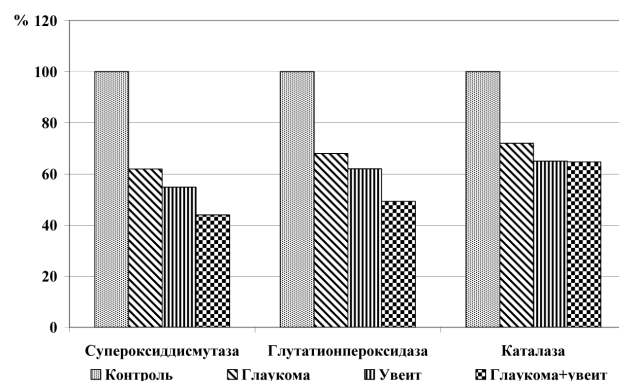


Рис. 2. Относительная активность антиоксидантных ферментов в ткани угла переднего отдела глаза кроликов при экспериментальной глаукоме и увеите (в % относительно контроля)

В группе животных с глаукомой активность изучаемого фермента составила — 75,6 % (в камерной влаге) и 61,9 % (в ткани угла переднего отдела глаза). У животных с увеитом снижение активности супероксиддисмутазы составило — 95,1 % (в камерной

Активность антиоксидантных ферментов в ткани угла переднего отдела глаза кроликов при экспериментальной глаукоме и увеите

Исследуемый показатель	Статистич. показатели	Контроль	Условия эксперимента		
			Глаукома	Увеит	Глаукома+ увеит
Супероксид-дисмутаза, усл. ед/г	n	10	8	7	6
	M	24,80	15,36	13,60	10,90
	m	1,52	1,20	0,82	0,60
	p1	—	<0,001	<0,001	<0,001
	%1	100	61,9	54,8	44,0
	p2	—	—	>0,05	<0,05
	%2	—	100	88,5	71,0
	p3	—	—	—	<0,05
Глутатион-пероксидаза, нкат/г	n	10	8	7	6
	M	14,25	9,69	8,84	7,02
	m	0,80	0,62	0,60	0,48
	p1	—	<0,001	<0,001	<0,001
	%1	100	68,0	62,0	49,3
	p2	—	—	>0,05	<0,01
	%2	—	100	91,2	72,4
	p3	—	—	—	<0,05
Каталаза, мккат/г	n	10	8	7	6
	M	17,10	12,32	11,12	8,90
	m	1,24	0,90	0,70	0,62
	p1	—	<0,01	<0,001	<0,001
	%1	100	72,0	65,0	52,0
	p2	—	—	>0,05	<0,01
	%2	—	100	90,3	72,2
	p3	—	—	—	<0,05
%	—	—	100	80,0	

Примечание: p1 — уровень значимости различий данных по отношению к контролю; p2 — уровень значимости различий данных по отношению к группе «Глаукома»; p3 — уровень значимости различий данных по отношению к группе «Увеит».

влаге) и 88,5 % (в ткани переднего отдела глаза) по сравнению с группой животных с глаукомой.

В группе животных с глаукомой и увеитом также наблюдается понижение активности супероксиддисмутазы до 79,3 % (в камерной влаге) и до 71 % (в ткани угла переднего отдела глаза) по отношению к группе «глаукома», а относительно группы «увеит» — до 83,4 % (в камерной влаге) и до 80,1 % (в ткани угла переднего отдела глаза).

Исследования активности глутатионпероксидазы выявили ее понижение в камерной влаге и в ткани угла переднего отдела глаза при моделировании глаукомы в условиях экспериментального увеита по сравнению с нормой ($8,32 \pm 0,60$ и $14,25 \pm 0,80$ нкат/мл).

Активность глутатионпероксидазы в группе животных с глаукомой снижается, что составило 72,4 % (в камерной влаге) и 68 % (в ткани угла переднего отдела глаза) по сравнению с нормой. В группе животных с увеитом наблюдается снижение уровня исследуемого фермента до 96,3 % (в камерной влаге) и 91,2 % (в ткани угла переднего отдела глаза) по сравнению с группой «глаукома». У животных с глаукомой и увеитом активность глутатионпероксидазы падает по сравнению с группой «глаукома» до 77,2 % (в камерной влаге) и до 72,4 % (в ткани угла переднего отдела глаза), а по сравнению с группой

«увеит» — до 80,2 % (в камерной влаге) и до 79,4 % (в ткани угла переднего отдела глаза).

Активность каталазы в камерной влаге и в ткани угла переднего отдела глаза кроликов опытной группы снижается по сравнению с нормой ($0,17 \pm 0,01$ мккат/мл и $17,10 \pm 1,24$ мккат/мг).

В группе животных с глаукомой снижение активности каталазы составило — 82,3 % (в камерной влаге) и 72 % (в ткани угла переднего отдела глаза) по сравнению с нормой. У животных с увеитом наблюдается уменьшение активности фермента до 92,9 % (в камерной влаге) и 90,3 % (в ткани угла переднего отдела глаза) по сравнению с группой «глаукома». При развитии экспериментальной гипертензии и увеита у животных происходит уменьшение активности каталазы по сравнению с группой животных «глаукома» — до 78,6 % (в камерной влаге) и до 72,2 % (в ткани угла переднего отдела глаза), а по сравнению с группой «увеит» — до 84,6 % (в камерной влаге) и до 80 % (в ткани угла переднего отдела глаза).

Полученные нами данные о состоянии активности ферментов антиоксидантной системы в камерной влаге и тканях угла передней камеры при гипертензии у животных с аллергическим увеитом в значительной мере объясняют механизм резкого повышения уровня продуктов перекисного окисле-

ния липидов в тканях глаза в этих условиях. В целом, данные настоящего исследования в комплексе с результатами предыдущей работы [6] в значительной мере раскрывают важное звено патогенеза увеальной глаукомы, когда наличие воспалительного процесса в увеальном тракте повышает степень оксидативного стресса. Роль последнего достаточно обоснована как существенный элемент в механизме развития первичной открытоугольной глаукомы.

ВЫВОДЫ:

1. При моделировании экспериментальной гипертонии существенно снижается активность ферментов антиоксидантной системы в камерной влаге, что особенно резко проявляется у животных с аллергическим увеитом. В последнем случае активность супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и каталазы снижается на 40,1 %; 44,1 % и 35,3 % соответственно.

2. В условиях наличия воспалительного процесса в увеальном тракте, воспроизведение глаукомы сопровождается значительным падением активности супероксиддисмутазы (на 56 %), глутатионпероксидазы (на 50,7 %) и каталазы (на 48 %) в тканях угла передней камеры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев В. Н., Мартынова Е. Б., Садков В. И. Роль перекисного окисления в патогенезе первичной открытоугольной глаукомы // Офтальмол. журн. — 2000. — № 1. — С. 12–17.
2. Камиллов Ф. Х., Винькова Г. А., Орлова Н. С. Активность перекисного окисления липидов и антиоксидантных ферментов в слезной жидкости при посттравматическом увеите // Клин. лаб. Диагност. — 1999. — № 7. — С. 12–14.
3. Кашинцева Л. Т., Михейцева И. Н., Безкоровайная И. Н. Содержание эндотелина и оксида азота в плазме крови животных при экспериментальной глаукоме // Офтальмол. журн. — 2003. — № 4. — С. 87–91.
4. Кравчук Е. А. Роль свободно-радикального окисления в патогенезе заболеваний глаз // Вест. Офтальмол. — 2004. — № 5. — С. 48–51.
5. Наследов А. SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках. // Спб.: Питер, 2005. — 416 с.

6. Савко В. В., Хелифи Аmani Бент Аяши. Влияние аллергического увеита на показатели перекисного окисления липидов камерной влаги при экспериментальной глаукоме // Офтальмол. журн. — 2010. — № 6. — С. 21–25.
7. Boland M. V., Quigley H. A. Risk factors and open-angle glaucoma: classifications and application / J Glaucoma. — 2007. — V. 16. — № 4. — P. 406–418.
8. Bosch-Morell F., Roma J., Puertas F. J. Efficacy of the antioxidant ebselen in experimental uveitis // Free Radic. Biol. Res. — 1999. — Vol. 27. — № 3–4. — P. 388–391.
9. Chen J., Kadlubar F. A new clue to glaucoma pathogenesis // Am. J. Med. — 2003. — Vol. 114. — P. 697–698.
10. Chidlow G., Wood J. P. M., Casson R. J. Pharmacological neuroprotection for glaucoma / Drugs. — 2007. — V. 67. — № 5. — P. 725–759.
11. Eksioglu U., Tunctan B. Elevated aqueous humor nitric oxide levels differ in patients with different types of glaucoma // Abstracts 4th I. G. S. — 2003. — P. 82.
12. Izzotti A., Sacca S. C., Cartiglia C. Oxidative deoxyribonucleic acid damage in the eyes of glaucoma patients / Am J Med. — 2003. — V. 114. — P. 638–646.
13. Kumar D. M., Agarwal N. Oxidative stress in glaucoma: a burden of evidence / J Glaucoma. — 2007. — V. 16. — P. 334–343.
14. Liverside J., Gordon S., Dick A. Nitric oxide in experimental autoimmune uveoretinitis // Free radicals in ophthalmic disorders, edited by Zierhut M. et al. Informa Healthcare USA, Inc. — 2008. — P. 107–121.
15. Maber P., Hanneken A. The molecular basis of oxidative stress-induced cell death in an immortalized retinal ganglion cell line / Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2005. — Vol. 46. — P. 749–757.
16. Moraczewski A. L., Lee R. K., Palmberg P. F. et al. Outcomes of treatment of neovascular glaucoma with intravitreal bevacizumab / Br J Ophthalmol. — 2009. — V. 93. — P. 589–593.
17. Moreno M. C., Campanelli J. L., Sande P. Retinal oxidative stress induced by high intraocular pressure / Free Radic. Biol. Med. — 2004. — V. 37. — P. 803–812.
18. Moreno M. C., Marcos H. A. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injection of hyaluronic acid / Exp. Eye Res. — 2005.
19. Tezel G., Yang X, Cai J. Proteomic identification of oxidatively modified retinal proteins in a chronic pressure-induced ret model of glaucoma / Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2005. — V. 46. — P. 3177–3187.
20. Weber A. J., C. D. Harman, S. Viswanathan. Effects of optic nerve injury, glaucoma, and neuroprotection on the survival, structure, and function of ganglion cells in the mammalian retina / J Physiol. — 2008. — V. 18. — P. 4393–4400.

THE STATE OF ENZYMATIC ANTIOXIDANT SYSTEM IN THE EYE TISSUES IN EXPERIMENTAL HYPERTENSION IN ANIMALS WITH ALLERGIC UVEITIS

V. V. Savko, Khelifi Amani, T. V. Parkhomenko

Odessa, Ukraine

The experimental studies were conducted on 31 rabbit. The determination of the concentration of the enzyme activity of superoxidisedismutase, catalase and glutathionperoxidase was made in the humor and tissues of the anterior chamber angle.

It is shown that under the conditions of the inflammatory process in the uveal tract the reproduction of glaucoma is accompanied by a significant drop in the activity of superoxidisedismutase (by 56 %), glutathionperoxidase (by 50,7 %) and catalase (by 48 %) in the tissues of the anterior chamber angle.