

ВЛИЯНИЕ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО УВЕИТА НА ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ КАМЕРНОЙ ВЛАГИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЛАУКОМЕ

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

Т. В. Пархоменко, старший лаборант

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

Вивчався вплив алергічного увеїта на показники перекисного окислення ліпідів у камерній волозі ока при експериментальній глаукомі.

Дослідження проведено на 31 кролика, у яких на тлі експериментальної глаукоми моделювали алергічний увеїт.

Показано, що розвиток запального процесу в увеальному тракті у тварин з експериментальною глаукомою призводить до різкого підвищення вмісту як проміжних, так і кінцевих продуктів перекисного окислення ліпідів у камерній волозі.

Ключевые слова: экспериментальная глаукома, аллергический увеит, перекисное окисление липидов, камерная влага.

Ключові слова: експериментальна глаукома, алергічний увеїт, перекисне окислення ліпідів, камерна волога.

Введение. Актуальность и сложность проблемы лечения глаукомы состоит 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 эффективными. Это объясняется сложностью патогенетических механизмов развития заболевания, а также симптоматическим, а не патогенетическим подходом к его лечению и профилактике [2].

Существует более 60 различных форм глаукомы, среди которых есть формы с четко установленными причинами развития (врожденная глаукома, факотопическая, фактоморфическая и т. д.). В то же время первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) — это полиэтиологическое заболевание с пороговым эффектом, в патогенезе которого играют роль множество факторов риска (наследственность, возраст, наличие сахарного диабета, уровень внутриглазного давления) и патогенные факторы.

Развитие ПОУГ обуславливается микроструктурными изменениями на клеточном уровне вследствие нарушения многих процессов: инволютивных, биомеханических, механизмов кровообращения и сосудистой ауторегуляции, ускорением апоптоза нервных клеток и снижением уровня естественной нейропротекции [13, 18, 19].

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.

В этой связи, учитывая роль свободно-радикальных соединений в патогенезе заболевания,

представляется актуальным как в научном, так и в практическом отношении изучить особенности развития глаукоматозного процесса, протекающего на фоне воспалительного поражения увеального тракта [8–11, 15, 16, 17].

Известно, что глаукома — это заболевание, которое развивается у людей после 40 лет, а с возрастом его частота увеличивается в геометрической прогрессии [5, 6, 7, 12, 13].

В настоящее время в ряде исследований показано, что при воспалительных заболеваниях глазного яблока отмечается повышенная генерация свободно-радикальных соединений кислорода, оксида азота и других соединений [10, 11, 12]. Имеются данные, доказывающие роль свободно-радикальных процессов в патогенезе ПОУГ и в частности, в нарушении путей оттока камерной влаги — трабекулярного аппарата в углу передней камеры глаза [1, 2, 7].

В то же время в ряде исследований показано, что большое процентное соотношение увеитов среди заболеваний глаз, хроническое рецидивирующее их течение, наряду с недостаточно эффективным лечением обуславливают тяжелые последствия воспалительных заболеваний сосудистого тракта глаз и высокую частоту слепоты и инвалидности по зрению вследствие увеитов [4].

Цель работы: изучить влияние аллергического увеита на показатели перекисного окисления липидов в камерной влаге при экспериментальной глаукоме.

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

© В. В. Савко, Хелифи Аmani Бент Аяши, Т. В. Пархоменко, 2010

Первую — контрольную группу составили 10 кроликов, вторую группу (глаукома) составили 8 кроликов, третьей (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.

Предлагаемый нами способ осуществляется 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 [4]. Интервал между инъекциями составлял 7 дней.

Через 7 дней после окончания общей сенсibilизации животному промывали конъюнктивальную полость правого глаза физиологическим раствором, закапывали 30 % альбумид, после чего проводили эпибульбарную (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 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 слезы стромы роговицы. Конъюнктивальная полость промывалась 30 % раствором альбумида, 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 тот же день вводили также раствор гиалуроната, 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 относительным контролем, вводили эквивалентное количество растворителя (сбалансированный солевой раствор), на котором готовился раствор гиалуроната (моделирование глаукомы) [5,14].

Для выведения животных из эксперимента использовали летальную дозу пентобарбитола натрия (100 мг на кг, вводимого в маргинальную ушную вену).

В камерной влаге производили определение концентрации 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 исследуемой жидкости объемом 0,1 мл добавляли 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⁻¹·см⁻¹ и выражали в мкмоль/мл исследуемой жидкости или мкмоль/г ткани. Коэффициент вариации — 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 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⁻¹·см⁻¹ и выражали в мкмоль/мл исследуемой жидкости или мкмоль/г ткани.

Полученные при экспериментальных исследованиях количественные данные были подвергнуты статистическому анализу. Для выявления достоверности различий между средними арифметическими величинами использовали критерии Стьюдента и различия считали достоверными, если уровень значимости был не более 5 %, т. е. при вероятности различий не менее 95 % [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Содержание малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в камерной влаге кроликов при экспериментальной глаукоме и увеите представлено в таблице 1 и на диаграмме (рис. 1).

Так, в группе «глаукома» концентрация малонового диальдегида возрастала до 120,5 % ($61,91 \pm 3,58$), по сравнению с нормой ($51,37 \pm 3,26$), при этом степень достоверности различий составляла $p < 0,05$. В группах «увеит» и «глаукома+увеит» содержание продуктов перекисного окисления еще больше возрастало до 132,5 % ($68,07 \pm 4,19$) и 159,3 ($81,85 \pm 4,29$) по сравнению с нормой. Сравнивая данные группы «глаукома» и «глаукома+увеит», можно отметить повышенное содержание малонового диальдегида до 132,2 % в последней группе, уровень значимости составил $p < 0,01$.

Определение диеновых конъюгатов в камерной влаге при развитии экспериментальной глаукомы и увеита показало повышение их уровня, однако в группе «глаукома» это повышение не достоверно — $24,94 \pm 1,12$ (112,5 %) по сравнению с нормой ($22,16 \pm 1,29$). В группе «увеит» исследуемые данные были выше нормы ($27,33 \pm 1,3$), что составило 123,3 %, а в группе «глаукома+увеит» уровень диеновых конъюгатов составил $31,87 \pm 1,39$ (143,8 %).

Сравнивая показатели активности фермента в группах «глаукома» и «глаукома+увеит», можно отметить, что в последней группе активность диеновых конъюгатов повышена до 127,8 %.

Таблица 1

Содержание малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в камерной влаге кроликов при экспериментальной глаукоме и увеите

Исследуемый показатель	Статистические показатели	Контроль	Условия эксперимента		
			Глаукома	Увеит	Глаукома+увеит
Малоновый диальдегид нмоль/л	n	10	8	7	6
	M	51,37	61,91	68,07	81,85
	m	3,26	3,58	4,19	4,29
	p1	—	<0,05	<0,01	<0,0001
	%1	100	120,5	132,5	159,3
	p2	—	—	—	<0,01
	%2	—	100	—	132,2
	p3	—	—	—	<0,05
%3	—	—	100	120,2	
Диеновые конъюгаты нмоль/л	n	10	8	7	6
	M	22,16	24,94	27,33	31,87
	m	1,29	1,12	1,3	1,39
	p1	—	>0,05	<0,02	<0,001
	%1	100	112,5	123,3	143,8
	p2	—	—	—	<0,01
	%2	—	100	—	127,8
	p3	—	—	—	<0,05
%	—	—	100	116,6	

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

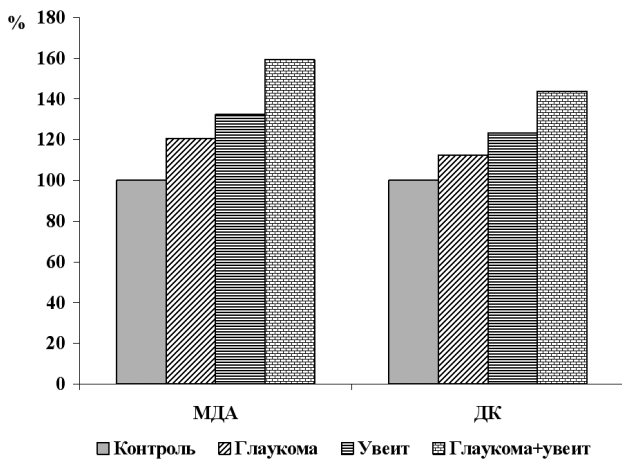


Рис. 1. Относительный уровень малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в камерной влаге кроликов при экспериментальной глаукоме и увеите (в % относительно контроля)

Анализируя полученные нами результаты биохимических исследований, необходимо отметить, что при развитии экспериментальной глаукомы в камерной влаге отмечается достоверно повышенный уровень конечного продукта ПОЛ — МДА. Это в значительной степени согласуется с известными

литературными данными о нарушении ПОЛ у больных с ПОУГ [1,9].

У животных с воспроизведением аллергического увеита содержание МДА и ДК было повышено в большей степени, чем у кроликов с экспериментальной глаукомой. Таким образом, на основании представленных данных с учетом роли ПОЛ а патогенезе ПОУГ, можно предполагать, что воспаление в увеальном тракте может способствовать развитию глаукоматозного процесса у больных с гипертензией или начальными формами ПОУГ.

Особый интерес представляют наши данные о состоянии ПОЛ при развитии аллергического воспаления у животных с моделированием глаукомы. В этих условиях нами в камерной влаге выявлялось резкое повышение уровня как промежуточных (ДК), так и конечных продуктов ПОЛ (МДА).

ВЫВОДЫ

При экспериментальной глаукоме отмечается значительное повышение уровня конечных продуктов ПОЛ — МДА.

Развитие воспалительного процесса в увеальном тракте у животных с экспериментальной глаукомой приводит к резкому повышению содержания как промежуточных, так и конечных продуктов ПОЛ в камерной влаге.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Курешева Н. И., Винецкая М. И., Еричев В. П. Роль свободнорадикальных реакций камерной влаги в развитии первичной открытоугольной глаукомы // Вестн. офтальмол. — 1996. — № 4. — С. 3–5.
2. Луценко Н. С. Гормонально-метаболические нарушения при первичной открытоугольной глаукоме и патогенетическое обоснование их коррекции в комплексном лечении: автореф. дис. канд. мед.наук : 14.01.18. — Запорожье. — 2007. — 18 с.
3. Наследов А. SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках. // Спб.: Питер, 2005. — 416 с.
4. Смалюх Н. В. Экспериментальное изучение эффективности фтореза фторафура при моделированном аллергическом увеите / Н. В. Смалюх // Офтальмологический журнал. — 1983. — № 7. — С. 397–399.
5. Equi R. A., Jumper M., Cha C. Hyaluronal polymer size modulates intraocular pressure / J Ocul. Pharmacol. Ther. — 1997. — V. 13. — № 4. — P. 289–295.
6. Epstein D. L., Kater A. W. Influences of glutathione and sulfhydryl containing compounds on aqueous humor outflow function / Exp, Eye Res. — 1990. — V. 50. — P. 785–793.
7. 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.
8. Liu K. M., Swann D. Inhibition of oxidative degradation of hyaluronic acid by uric acid / Curr. Eye Res. — 1984. — V. 3. — P. 1049–1053.

9. Kumar D. M., Agarwal N. Oxidative stress in glaucoma: a burden of evidence / *J Glaucoma*. — 2007. — V. 16. — P. 334–343.
10. Lieven C. J., Vrabec J. P., Levin L. A. The effect of oxidative stress on mitochondrial transmembrane potential in retinal ganglion cells / *Antioxid. Redox. Signal.* — 2003. — V. 5. — № 5. — P. 641–646.
11. Maher P., Hanneken A. Flavonoids protect retinal ganglion cells from oxidative stress-induced death / *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2005. — V. 46. — P. 4796–4803.
12. Maher P., Hanneken A. The molecular basis of oxidative stress-induced cell death in an immortalized retinal ganglion cell line / *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2005. — V. 46. — P. 749–757.
13. 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.
14. Moreno M. C., Marcos H. A. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injection of hyaluronic acid / *Exp. Eye Res.* — 2005.
15. 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.
16. Moreno M. C., Croxatto J. O., Campanelli J. L. Retinal damage after the chronic injection of hyaluronic acid in the rat anterior chamber / *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2002. — V. 43. — P. 2158.
17. Sacca S. C., Pascotto A., Camicione O. Oxidative DNA damage in human trabecular meshwork / *Arch. Ophthalmol.* — 2005. — V. 123. — P. 458–463.
18. Schori H. Vaccination for protection of retinal ganglion cells against death from glutamate cytotoxicity and ocular hypertension: implications for glaucoma / *PNAS.* — 2001. — V. 98. — № 6. — P. 3398–3403.
19. Tezel G., Yang X, Cai J. Proteomic identification of oxidatively modified retinal proteins in a chronic pressure-induced rat model of glaucoma / *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2005. — V. 46. — P. 3177–3187.

Поступила 04.08.2010

Рецензент канд.мед.наук. Н. И. Наричина

INFLUENCE OF ALLERGIC UVEITIS ON INDICES OF LIPID PEROXIDATION OF THE CHAMBER HUMOR IN EXPERIMENTAL GLAUCOMA

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

Odessa, Ukraine

The paper presents the study of the influence of allergic uveitis on the indices of lipid peroxidation in the chamber humor in experimental glaucoma.

The experimental studies were conducted on 31 rabbit, which were modeled allergic uveitis against the background of experimental glaucoma.

It is shown that development of the inflammatory process in the uveal tract in animals with experimental glaucoma leads to a sharp increase in the content of both intermediate and final products of POL in the chamber humor.

