

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ДЕТОКСИКАЦИИ ГИДРОПЕРОКСИДОВ В ТКАНЯХ ГЛАЗА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ КАТАРАКТЫ У ЖИВОТНЫХ СО СРЕПТОЗОТОЦИНОВЫМ ДИАБЕТОМ

Н. Ф. Леус, проф, **Бен Абдаллах Анис**, аспирант, **Ю. А. Журавок**, к.м.н.

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

Активність ферментів антиоксидантної системи тканин ока вивчалася на 49 кроликах, у яких на фоні стрептозотоцинового діабету моделювалася світлова катаракта. При цьому виявлено помітне зниження показників активності ферментів антиоксидантної системи. Ступінь зниження активності супероксиддисмутази дорівнювала 48,5 % в порівнянні з нормою та 84 % у порівнянні з тваринами, у яких катаракта розвивалася без ознак діабету.

Ключевые слова: моделирование катаракты, стрептозотоциновый диабет, активность ферментов антиоксидантной системы.

Ключові слова: моделювання катаракти, стрептозотоциновий діабет, активність ферментів антиоксидантної системи.

ВВЕДЕНИЕ. Катаракта является одной из ведущих причин снижения зрения, отмечаемого у пожилых людей. Эта проблема приобретает особую значимость в связи с глобальным увеличением возрастной категории людей, особенно в индустриальных странах. В настоящее время практически отсутствуют доступные методы медикаментозного лечения или профилактики этого заболевания [1, 7, 8, 10].

Благодаря многочисленным исследованиям получены убедительные доказательства того, что в патогенезе катаракты важнейшим звеном является дисбаланс процессов свободно-радикального окисления (белков, липидов и др. компонентов) и потенциала антирадикальной системы («гашение» радикалов) экзогенного и эндогенного характера. В результате этого дисбаланса в организме резко повышается концентрация пероксидов и снижается уровень функциональных групп белков (карбок- сильных, тиоловых и др.). Получены данные о снижении концентрации эндогенных антиоксидантов или отсутствии их изменений в организме больных катарактой. В то же время доказано, что отмечается индукция ферментов антирадикальной защиты (супероксиддисмутаза и каталаза). Одним из ключевых ферментов системы гашения свободно-радикальной формы кислорода является супероксиддисмутаза [11, 16, 18, 22].

Супероксиддисмутаза, являясь ферментом-антиоксидантом, принимает участие в регуляции окислительных процессов, при этом осуществляет детоксикацию супероксидного анион-радикала кислорода. Снижение активности этого фермента является одной из основных причин развития различных патологических процессов. Следует также отметить, что супероксиддисмутаза используют в качестве радиопротектора и антимутагенного фактора, оказывающего противосудорожное действие [14, 16, 20].

Появились сообщения о том, что одной из причин снижения активности защитных систем в хрусталике является недостаточное поступление в организм природных биоантиоксидантов и витаминов. Экспериментальным путем установлено, что одни витамины (токоферол, каротин, аскорбиновая кислота) являются наиболее важными антиоксидантами, которые защищают белки хрусталика от окислительного повреждения. Другие (витамины В₁, В₂, В₆, РР) являются кофакторами в ферментативных реакциях и принимают участие в синтезе и регенерации использованных компонентов антиокислительной системы. В ряде исследований показано, что недостаточность в диете витаминов Е, С, D, А повышает риск образования катаракты. Выявлена также зависимость между развитием катаракты и метаболическим обеспечением пиридоксинном и витамином Е [3, 7, 12, 19].

Учитывая, что помутнение хрусталика может быть вызвано непосредственным или опосредованным влиянием многочисленных катарактогенных факторов (ко- и синкатарактогенных), наличие разных клинических форм катаракты, а также различия в развитии патологических изменений в хрусталике при действии различных катарактогенов, необходимо изучение защитно-приспособительных механизмов устойчивости тканей глаза к катарактогенам в условиях моделирования патологического процесса либо отдельных его составляющих *in vitro* или на уровне целостного организма [13, 15, 17, 23].

В связи с этим можно сделать вывод, что только углубленные исследования состояния процессов свободно-радикального окисления и метаболизма в динамике катарактогенеза смогут послужить научным обоснованием для разработки эффективных

методов, вызывающих замедление развития катаракты, а возможно, и ее предупреждение.

Особый интерес в этом отношении представляют случаи возникновения катаракты у больных сахарным диабетом.

В литературе имеются данные о том, что в развитии диабетической катаракты важная роль принадлежит сорбитному пути усвоения глюкозы хрусталиком. Сорбит же накапливается по мере длительности диабета при избытке глюкозы в ткани, сопровождаемом возрастанием активности альдозоредуктазы, катализирующей превращение глюкозы в сорбит, и снижением активности сорбитдегидрогеназы, окисляющей сорбит до фруктозы. Кроме того, углеводы и прежде всего глюкоза и глюкозо-6-фосфат, способны к неэнзиматическому связыванию с белками в медленно развивающемся процессе гликозилирования в норме и резко возрастающем при диабете [12, 20, 22, 24].

Наряду с сорбитоловым механизмом нарушения функциональных свойств хрусталика, необходимо принять во внимание данные о развитии оксидативного стресса у больных диабетом и его важнейшей роли в патогенезе диабетических осложнений [6, 9, 22].

По всей вероятности, у больных диабетом развиваются патохимические процессы, понижающие устойчивость хрусталика к действию катарактогенных факторов.

В этой связи **цель** настоящей работы заключалась в изучении активности ферментов антиоксидантной системы тканей глаза при моделировании катаракты у животных со стрептозотониновым диабетом.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ. Экспериментальные исследования проводились на 49 кроликах (массой 2,5–3,2 кг).

Экспериментальный диабет вызывали путем интраперитонеального введения стрептозотонина (60 мг на кг веса животного), при этом накануне в течение ночи животные не получали пищи. Контрольным животным (14) проводилась инъекция растворителя (10 мМ цитратного буфера, pH 4,5).

При проведении эксперимента соблюдались все рекомендации относительно исследований на животных.

Моделирование световой катаракты осуществляли в течение 40 недель у кроликов породы Шиншилла. Опытные группы животных (3) подвергали воздействию облучения светом дуговой ртутной лампы типа ДРФ — 1000 (1000 Вт) высокой интенсивности в спектральном диапазоне от 350 до 1150 нм ежедневно в режиме светового дня в течение 9 часов. Контрольная группа составляла — 14 животных (28 глаз), группа «катаракта» — 12 животных (24 глаза), группа «диабет» — 13 животных (26 глаз), группа «катаракта+диабет» — 10 животных (20 глаз).

На протяжении эксперимента состояние хрусталиков оценивали биомикроскопически с использованием щелевой лампы фирмы «Карл Цейс». Зрачки предварительно расширялись инстилляциями 1–2 капель 1 % раствора атропина. Осмотр проводили перед началом и каждые две недели в течение всего эксперимента до его окончания.

При оценке изменений в хрусталиках экспериментальных животных учитывалось пять стадий [3].

В тканях хрусталика и камерной влаги определяли активность ферментов супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы.

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

В ходе определения активности СОД в 3 мл инкубационной среды, содержащей 0,41 мМ нитросинего тетразолия, вводили 0,02 мл гомогената хрусталика и камерной влаги или тканевого экстракта, 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 НАД·Н, перемешивали и оставляли в темноте на 10 мин, после чего повторно измеряли оптическую плотность.

За единицу активности принимали 50-процентное торможение реакции восстановления нитросинего тетразолия [5]. Коэффициент вариации 6,2 %. Активность фермента выражали в условных единицах на 1 г ткани.

Методика определения активности каталазы основана на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс.

При определении активности каталазы реакцию запускали добавлением 0,1 мл материала для исследований гомогената, приготовленного на 0,05М трис-НСl-буфере (pH 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 [2, 21]. Коэффициент вариации 8,7 %.

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

В ходе определения в пробирку вносили 0,1 мл раствора, содержащего в 0,1 М К-фосфатного буфера (pH 7,5) 2 мМ ЭДТА и 10 мМ восстановленного глутатиона и 0,1 мл материала для исследования. Через 3 мин инкубации при 25°C 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 (pH 7,7) с 1 мМ ЭДТА. 2 мл полученного раствора сразу после этого 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 1,8 %. Активность фермента выражали в мкат/г ткани [5].

Данные обрабатывались с помощью соответствующих методов статистического анализа [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Данные, полученные при изучении активности антиоксидантных ферментов в хрусталике и камерной влаги кроликов в различных условиях эксперимента (моделирование катаракты и диабета), представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Активность антиоксидантных ферментов в хрусталике кроликов при моделировании катаракты и диабета

Исслед. показатель	Ста. показатель	Условия эксперимента			
		Контроль	Катаракта	Диабет	Катаракта + диабет
Супероксиддисмутаза, усл. ед/ мг белка	n	14	12	13	10
	M	1,63	0,94	1,13	0,79
	m	0,14	0,06	0,07	0,05
	p	—	<0,001	<0,01	<0,001
	%	100	57,7	69,3	48,5
	p1	—	—	>0,05	>0,05
	%1	—	100	120,2	84,0
	p2	—	—	—	<0,001
%2	—	—	100	69,9	
Глутатионпероксидаза, нкат/мг белка	n	14	12	13	10
	M	0,74	0,36	0,54	0,29
	m	0,06	0,03	0,03	0,01
	p	—	<0,001	<0,01	<0,001
	%	100	48,6	73,0	39,2
	p1	—	—	<0,001	<0,05
	%1	—	100	150,0	80,6
	p2	—	—	—	<0,001
%2	—	—	100	53,7	
Каталаза, нкат/мг белка	n	14	12	13	10
	M	0,87	0,57	0,64	0,45
	m	0,06	0,04	0,05	0,03
	p	—	<0,001	<0,01	<0,001
	%	100	65,5	73,6	51,7
	p1	—	—	>0,05	<0,05
	%1	—	100	112,3	78,9
	p2	—	—	—	<0,01
%2	—	—	100	70,3	

Примечание: p — уровень значимости различий данных по отношению к норме, рассчитанный с помощью t — теста для независимых выборок; p1 — уровень значимости различий данных по отношению к группе «Катаракта», рассчитанный с помощью t — теста для независимых выборок; p2 — уровень значимости различий данных по отношению к группе «Диабет», рассчитанный с помощью t — теста для независимых выборок.

Изучая активность супероксиддисмутазы в хрусталике и камерной влаге, можно отметить снижение ее активности во всех группах по сравнению с нормой ($1,63 \pm 0,14$ и $16,98 \pm 0,67$ усл. ед/ мг).

Так в группе животных с катарактой активность супероксиддисмутазы составила 57,7 % в хрусталике и 65,1 % — в камерной влаге. У животных с диабетом активность антиоксидантного фермента составила 117 % (в хрусталике) и 116 % — в камерной влаге по сравнению с группой «катаракта». В группе животных с катарактой на фоне диабета отмечается значительное снижение активности фермента до 48,5 % — в хрусталике и 37,2 % — в камерной влаге по сравнению с нормой, по сравнению с группой «катаракта» она снижается — до 84 % (в хрусталике) и до 57,1 % (в камерной влаге), а по сравнению с группой «диабет» снижается до 71,8 % (в хрусталике) и до 49 % (в камерной влаге).

Таблица 2

Активность антиоксидантных ферментов в камерной влаге кроликов при моделировании катаракты и диабета

Исслед. показатель	Ста. показатель	Условия эксперимента			
		Контроль	Катаракта	Диабет	Катаракта + диабет
Супероксиддисмутаза, усл. ед/ мл	n	14	12	13	10
	M	16,98	11,06	13,90	9,40
	m	0,67	0,62	0,70	0,45
	p	—	<0,001	<0,01	<0,001
	%	100	65,1	81,9	55,4
	p1	—	—	<0,01	<0,05
	%1	—	100	125,7	85,0
	p2	—	—	—	<0,001
%2	—	—	100	67,6	
Глутатионпероксидаза, нкат/мл	n	14	12	13	10
	M	8,24	5,28	6,90	4,10
	m	0,56	0,40	0,36	0,18
	p	—	<0,001	>0,05	<0,001
	%	100	64,1	83,7	49,8
	p1	—	—	<0,01	<0,05
	%1	—	100	130,7	77,7
	p2	—	—	—	<0,001
%2	—	—	100	59,4	
Каталаза, мккат/мл	n	14	12	13	10
	M	0,16	0,11	0,13	0,09
	m	0,01	0,01	0,01	0,01
	p	—	<0,001	<0,05	<0,001
	%	100	68,8	81,3	56,3
	p1	—	—	>0,05	>0,05
	%1	—	100	118,2	81,8
	p2	—	—	—	<0,05
%2	—	—	100	69,2	

Примечание: p — уровень значимости различий данных по отношению к норме, рассчитанный с помощью t — теста для независимых выборок; p1 — уровень значимости различий данных по отношению к группе «Катаракта», рассчитанный с помощью t — теста для независимых выборок; p2 — уровень значимости различий данных по отношению к группе «Диабет», рассчитанный с помощью t — теста для независимых выборок.

Исследования активности глутатионпероксидазы выявили понижение ее активности в хрусталике и камерной влаге при моделировании катаракты и диабета по сравнению с нормой ($0,74 \pm 0,06$ и $8,24 \pm 0,56$ нкат/мл).

Активность глутатионпероксидазы в группе животных с катарактой снизилась до 48,6 % (в хрусталике) и до 64,1 % (в камерной влаге) по сравнению с нормой. У животных с диабетом отмечается повышение активности фермента до 122,2 % (в хрусталике) и до 112,3 % (в камерной влаге) по сравнению с группой «катаракта». При катаракте и диабете наблюдается снижение активности глутатионпероксидазы до 80,6 % (в хрусталике) и до 52,7 % (в камерной влаге) по сравнению с группой «катаракта», а по сравнению с группой «диабет» — до 65,9 % (в хрусталике), до 46,9 % (в камерной влаге).

Активность каталазы у животных с катарактой снижается до 65,5 % (в хрусталике) и до 68,8 % (в камерной влаге).

камерной влаге) по сравнению с нормой ($0,87 \pm 0,06$ и $0,16 \pm 0,01$ нкат/мг соответственно). У животных при развитии экспериментального диабета активность фермента составляет 112,3 % (в хрусталике) и 118,2 % (в камерной влаге) по сравнению с группой «катаракта». При катаракте на фоне диабета у животных отмечается снижение активности каталазы до 78,9 % (в хрусталике) и до 81,8 % (в камерной влаге) по сравнению с группой «катаракта», а по сравнению с группой «диабет» — до 70,3 % (в хрусталике) и до 69,2 % (в камерной влаге).

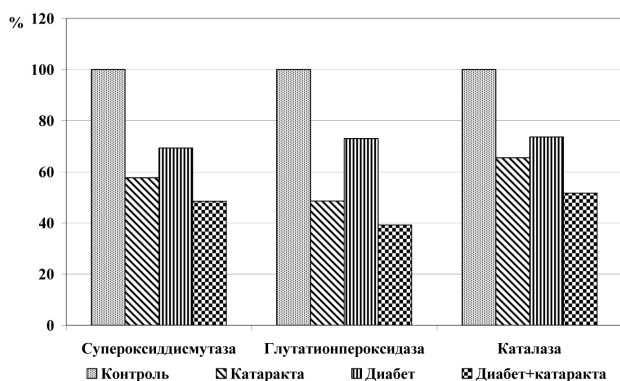


Рис. 1 Относительная активность антиоксидантных ферментов в хрусталике кроликов при моделировании катаракты и диабета (в % относительно контроля)

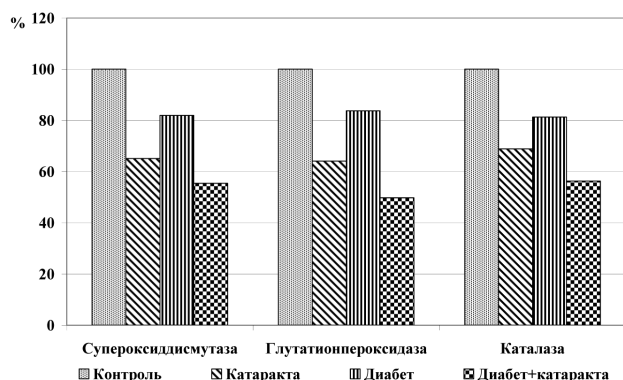


Рис. 2 Относительная активность антиоксидантных ферментов в камерной влаге кроликов при моделировании катаракты и диабета (в % относительно контроля)

Анализируя полученные нами результаты при моделировании световой катаракты у животных на фоне сахарного диабета, необходимо отметить степень нарушения защитных систем хрусталика к катарактогенному действию световой энергии в этих условиях.

Представленные данные выявили существенное снижение активности антиоксидантных ферментов как в хрусталике, так и в камерной влаге животных под влиянием световой энергии в условиях развития сахарного диабета. Степень этого снижения значительно превышает уменьшение антиоксидантного потенциала при развитии световой

катаракты у интактных животных. В то же время, само по себе развитие диабетического поражения тканей глаза приводит к заметному уменьшению активности ферментов антиоксидантной системы, в первую очередь — супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы. В механизме такого снижения можно рассматривать процессы гликолизирования данных ферментов, приводящих к нарушению их функциональных свойств.

В целом выраженная инактивация ферментов антиоксидантной системы тканей глаза при диабете приводит к более резким патохимическим сдвигам под воздействием такого катарактогенного фактора, как световая энергия. В этих условиях отмечается резкое снижение потенциала антиоксидантной системы, что несомненно снижает устойчивость хрусталика к катарактогенному действию света. И действительно, в нашей предыдущей работе установлено, что у животных с диабетом отмечается более быстрое и интенсивное развитие световой катаракты.

ВЫВОДЫ:

1. Воздействие световой энергии вызывает более значительное нарушение состояния энзиматической антиоксидантной системы хрусталика у животных с экспериментальным диабетом. Степень ингибирования ферментов в этих условиях по сравнению с условиями только светового воздействия составила для супероксиддисмутазы — 84 %, для глутатионпероксидазы — 80,6 %, для каталазы — 78,9 %.

2. В камерной влаге отмечается заметное уменьшение показателей активности ферментов антиоксидантной системы при моделировании световой катаракты у животных с диабетом. Степень снижения супероксиддисмутазы у диабетических животных и световом воздействии составляла 48,5 %, по сравнению с нормой и 84 % по сравнению с катарактальными животными без диабета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Веселовская З. Ф., Боброва Н. Ф., Вит В. В. Катаракта // Киев: Книга плюс. — 2002. — 208 с.
2. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. Метод определения активности каталазы. Лаб. дело 1988 № 1, 16–18 с.
3. Леус Н. Ф., Бен Абдаллах Анис Бен Слимен. Особенности развития катаракты у кроликов с экспериментальным диабетом // Офтальмол. журн. — 2010. — № 5. — С. 12–16.
4. Наследов А. SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках. // Спб.: Питер, 2005. — 416 с.
5. Новые методы биохимического анализа. // Изд. Ленинградского универ. — 1991. — 395 с.
6. Науменко В. Г. Патогенетична терапія ускладнень цукрового діабету // Межд. Эндокринолог. Журн. — 2006. — № 1. — С. 71–76.

7. **Ayala M., Michael R., Soderberg P.** Influence of exposure time for UV-radiation induced cataract // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2000. — Vol. 40 (1138). — P. 11–19.
8. **Beebe D. C.** Nuclear cataracts and nutrition: Hope for the intervention — early and late life // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 1998. — Vol. 39 (9). — P. 1531–1534.
9. **Chung S. S. M., Ho E. C. M., Lam K. S. L.** Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress // J. Am. Soc. Nephrol. — 2003. — Vol. 14. — P. S233–S236.
10. **Cumming R. G., Mitchell P., Smith W.** Diet and cataract // Ophthalmology. — 2000. — Vol. 107. — P. 450–456.
11. **Hashim Z., Zarina S.** Antioxidant markers in human senile and diabetic cataractous lenses // J. Coll. Physicians Surg. Pak. — 2006. — Vol. 16. — № 10. — P. 637–640.
12. **Hedge K. R., Varma S. D.** Prevention of cataract by pyruvate in experimentally diabetic mice // Moll. Cell. Biochem. — 2005. — Vol. 269. — P. 115–120.
13. **Hedge K. R., Kovtun S., Varma S. D.** Induction of ultraviolet cataracts in vitro: prevention by pyruvate // J. Ocul. Pharmacol. Ther. — 2007. — Vol. 23. — № 5. — P. 492–502.
14. **Jery I., Boisten V., Lupasco V.** Biochemical aspects in the pathogenesis of senile cataract // Oftalmologia. — 1997. — Vol. 41 (3). — P. 207–208.
15. **Knudtson M. D., Klein B. E., Klein R.** Age-related eye disease, quality of life, and functional activity // Arch Ophthalmol. — 2005. — Vol. 123 (6). — P. 807–814.
16. **Maurya O. P. S., Mohanty L.** Role of antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase in the development of cataract: study of serum levels in patients with senile and diabetic cataracts // AIOC 2006 PROCEEDING. — P. 142–143.
17. **McCarty C. A., Taylor H. R.** The genetics of cataract // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2001. — Vol. 42 (8). — P. 1677–1678.
18. **Meyer C. H., Secundo W.** Nutritional supplementation to prevent cataract formation // Dev Ophthalmol. — 2005. — Vol. 38. — P. 103–119.
19. **Mitchell P., Smith W., Cumming R. G.** Nutritional factors in the development of age-related eye disease // Asia Pac J Clin Nutr. — 2003. — Vol. 12. — Suppl. S5.
20. **Olofsson E. M., Marklund S. L., Behndig A.** Enhanced diabetic cataract in mice lacking Cu-Zn superoxide dismutase // Acta Ophthalmol. Scand. — 2007. — Vol. 85. — № 240. — P. 45–49.
21. **Qujeq D., Rezvani T.** Catalase (antioxidant enzyme) activity in streptozotocin-induced diabetic rats // Int. J. Diabet. And Metabolism. — 2007. — Vol. 15. — P. 22–24.
22. **Reyk D. M.** The retina: oxidative stress and diabetes // D. M. Reyk, M. C. Gillies, M. J. Davies // Redox Rep. — 2003. — Vol. 8 (4). — P. 187–192.
23. **Robman L. D., Taylor H.** External factors in the development of cataract // Eye. — 2005. — Vol. 19 (10). — P. 1074–1082.
24. **Varma S. D., Hedge K. R., Kovrun S.** Attenuation and delay of diabetic cataracts by antioxidants: effectiveness of pyruvate after onset of cataract // Ophthalmologica. — 2005. — Vol. 219. — P. 309–315.

Поступила 21.03.2011

Рецензент д-р мед наук. С. К. Дмитриев

THE STUDY OF THE ENZYME ACTIVITY OF THE ANTIOXIDANT EYE TISSUE SYSTEM IN MODELING CATARACT IN ANIMALS WITH STREPTOZOCIN DIABETES

N. F. Leus, Ben Abdallah Anis, Yu. A. Zhuravok

Odessa, Ukraine

The activity of the antioxidant system enzymes of the eye tissues is studied in modeling of cataract in animals with streptozotocin diabetes.

The experimental studies were conducted on 49 rabbits. The determination of the activity of the enzymes of superoxidodismutase, catalase and glutathionperoxidase was made in the tissues of the lens and humor.

The noticeable decrease of the indices of the enzyme activity of the antioxidant system in the humor was noted in modeling of light cataract in animals with diabetes. The degree of decrease in superoxidodismutase in diabetic animals and in light exposure was 48.5 % in comparison with the norm and 84 % in comparison with cataract animals without diabetes.

