

УДК: 617.764-008.8:617.721.6-002-092.9-07+577.11

ПОКАЗАТЕЛИ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И СОДЕРЖАНИЯ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА И ДИЕНОВЫХ КОНЬЮГАТОВ В КРОВИ И СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ УВЕИТЕ

В. Н. Сакович, д-р мед. наук, профессор, **Аль Кайяли Фади Закария**, аспирант

Днепропетровская государственная медицинская академия

В експерименті на 19 кроликах вивчали стан процесів вільно-радикального окислення ліпідів (ПОЛ) і активності ферментів антиоксидантної системи в умовах моделювання переднього увеїта. Встановлено, що розвиток увеїта супроводжується збільшенням інтенсивності ПОЛ (про що свідчить підвищення концентрації малонового діальдегіду та дієнових кон'югатів), а також зниженням активності ферментів антиоксидантної системи. Одержані результати в значній мірі співпадають з даними інших досліджень, які встановили аналогічні порушення при травматичних та бактеріальних увеїтах. Автори роблять висновки про доцільність пошуку засобів зниження оксидативного стресу, зокрема, застосування пробіотиків, що мають не тільки прямі антиоксидантні властивості, але й можливо мають регулюючий вплив на ензиматичну антиоксидантну систему.

Ключевые слова: экспериментальный увеит, активность ферментов антиоксидантной системы, свободно-радикальное окисление липидов

Ключові слова: експериментальний увеїт, активність ферментів, вільно-радикальне окислення ліпідів

Введение. Большое процентное соотношение увеитов среди заболеваний глаз, хроническое рецидивирующее течение и недостаточно эффективное лечение их обуславливают тяжелые последствия воспалительных заболеваний сосудистого тракта глаз и высокую частоту слепоты и инвалидности по зрению вследствие увеитов [4, 5, 9].

Актуальность проблемы обусловлена не только относительно высокой частотой увеитов, но и развитием тяжелых анатомических изменений тканей глаза, которые приводят к снижению или полной утрате зрительных функций [2, 17].

Чаше всего воспаление сосудистого тракта развивается у лиц молодого и среднего возраста и нередко снижает их профессиональную трудоспособность, приводит к инвалидности и даже слепоте.

В ряде исследований показано значение свободно-радикальных процессов и, в частности, активных форм кислорода в патогенезе воспалительных заболеваний. По всей вероятности, роль свободно-радикальных соединений кислорода особенно значима при воспалительных заболеваниях сосудистого тракта глаза [1, 6, 13, 14].

Однако следует отметить, что до последнего времени основное внимание при воспалительных заболеваниях сосудистого тракта глаза уделялось продуктам перекисного окисления липидов.

В то же время основными пусковыми факторами развития реакций перекисидации являются активные формы кислорода, которые способны вызывать повреждения не только липидов, но и всех компонентов клетки, что может играть важную роль в патогенезе увеального воспаления [3, 8, 10, 16, 18].

В данное время считается рациональной противовоспалительная терапия увеитов с ограниченной кортикостероидной и иммуносупрессивной терапией. На помощь противовирусным и противобактериальным препаратам приходят пробиотики — биопрепараты на основе живых микробных структур. Они применяются в медицине и ветеринарии для коррекции микрофлоры желудочно-кишечного тракта, для борьбы с вирусными и бактериальными инфекциями [11, 15, 19].

Важной особенностью пробиотиков является их способность повышать специфическую и неспецифическую иммунную реактивность организма хозяина, усиливать клеточный и гуморальный ответ.

Целью настоящей работы было изучение состояния процессов свободно-радикального окисления липидов и ферментов антиоксидантной защиты в условиях моделирования переднего увеита.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ. Экспериментальные исследования проводились на 28 кроликах (массой 2,0–2,6 кг).

Моделирование увеита проводилось 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 % аль-

© В. Н. Сакович, Аль Кайяли Фади Закария, 2011

буцид, после чего проводили эпибульбарную (Sol. dicaini 0,5 %) и ретробульбарную (Sol. povokaini 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 слои стромы роговицы. Конъюнктивальная полость промывалась 30 % раствором альбумина, 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 крови и слезной жидкости кроликов контрольной группы (10 животных) принятых за норму и экспериментальной — до и после развития увеита (9 животных) — производили определение концентрации малонового диальдегида и диеновых конъюгатов, а также активности ферментов супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы.

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 (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 сернистого 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 «Spesol — 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 методики — 5,2 %.

Определение диеновых конъюгатов основано на 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⁻¹·см⁻¹ и выражали в мкмоль/мл исследуемой жидкости или мкмоль/г ткани

При определении активности супероксиддисмутазы (СОД) оценивают степень торможения определяемой СОД реакции восстановления нитросинего тетразолия супероксидными радикалами.

Для этого 0,02 мл гомогената сетчатки или тканевого экстракта вводили в 3 мл инкубационной среды, содержащей 0,41 мМ нитросинего тетразолия, 0,33 мМ ЭДТА, 0,01 мМ N-метилфеназония 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.

О реакции судили по разнице между первым и вторым показаниями спектрофотометра. За единицу активности принимали сокращение реакции восстановления нитросинего тетразолия в два раза. Коэффициент вариации методики — 6,2 %. Активность фермента выражали в условных единицах на грамм ткани.

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

Реакцию вызывали посредством добавления 0,1 мл материала для исследований гомогената, приготовленного на 0,05М трис-НСl-буфере (рН 7,8) к 2 мл 0,03 % раствора перекиси водорода. В холодную 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 методики — 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 определения 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°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 (рН 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 методики — 1,8 %. Активность фермента выражали в мкат/г ткани [12].

Полученные данные обрабатывали с помощью статистического пакета SPSS 11.0 [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Данные об активности антиоксидантных ферментов и уровне перекисного окисления липидов в крови (табл. 1) и слезной жидкости (табл. 2) кроликов представлены на графиках (рис. 1–4).

Уровень малонового диальдегида в крови животных до развития увеита составил 100,6 %, а в группе с выраженным увеитом — 150,3 % по сравнению с контролем. Уровень малонового диальдегида у животных до развития увеита, по сравнению с группой животных с выраженным увеитом составил 149,4 %.

Таблица 1

Активность антиоксидантных ферментов и уровень продуктов перекисного окисления липидов в крови кроликов в условиях моделирования аллергического увеита

Исследуемые показатели	Стат. показатели	Контрольная группа n=10	Опытная группа	
			До развития увеита n=9	Выраженный увеит n=9
Малоновый диальдегид, мкмоль/мл	M±m	17,9±1,1	18,0±1,2	26,9±1,5
	p	—	>0,05	<0,001
	%	100,0	100,6	150,3
	p1	—	—	<0,001
Диеновые конъюгаты, мкмоль/мл	M±m	3,5±0,2	3,4±0,2	4,8±0,3
	p	—	>0,05	<0,01
	%	100,0	97,1	137,1
	p1	—	—	<0,01
Супероксиддисмутаза, усл. ед/мл	M±m	17,6±0,8	17,9±0,9	15,0±0,8
	p	—	>0,05	<0,05
	%	100,0	101,7	85,2
	p1	—	—	<0,05
Глутатионпероксидаза, нкат/мл	M±m	486,2±34,0	492,5±35,1	325,7±25,0
	p	—	>0,05	<0,01
	%	100,0	101,3	67,0
	p1	—	—	<0,01
Каталаза, нкат/мл	M±m	510,6±38,4	512,4±37,2	377,8±27,5
	p	—	>0,05	<0,05
	%	100,0	100,4	74,0
	p1	—	—	<0,05
	%1	—	100,0	73,7

Примечание:

p — уровень значимости различий данных по отношению к норме, рассчитанный с помощью t- критерия для независимых выборок;

p1 — уровень значимости различий данных в группе при моделировании увеита по отношению к исходным данным, рассчитанный с помощью t- критерия для зависимых выборок.

В слезной жидкости содержание малонового диальдегида в группе животных с выраженным увеитом составило — 249,1 % по сравнению с контролем, а по сравнению с группой до развития увеита — 244,8 %.

Содержание диеновых конъюгатов в крови в группе животных с выраженным увеитом, по сравнению с контрольной группой составило — 137,1 %, а по сравнению с животными до развития увеита — 141,2 %.

В слезной жидкости уровень диеновых конъюгатов у животных с выраженным увеитом составил — 220 % по сравнению с контролем, и по сравнению с животными до развития увеита — 220 %.

Активность супероксиддисмутазы в крови животных с выраженным увеитом составила — 85,2 % по сравнению с контролем, а по сравнению с животными до развития увеита — 83,8 %.

Таблица 2

Активность антиоксидантных ферментов и уровень продуктов перекисного окисления липидов в слезной жидкости кроликов в условиях моделирования аллергического увеита

Исследуемые показатели	Стат. показатели	Контрольная группа n=10	Опытная группа	
			До развития увеита n=9	Выраженный увеит n=9
Малоновый диальдегид, мкмоль/мл	M±m	5,7±0,3	5,8±0,4	14,2±0,8
	p	—	>0,05	<0,001
	%	100,0	101,8	249,1
	p1	—	—	<0,001
Диеновые конъюгаты, мкмоль/мл	M±m	0,5±0,03	0,5±0,04	1,1±0,07
	p	—	>0,05	<0,001
	%	100,0	100,0	220,0
	p1	—	—	<0,001
Супероксиддисмутаза, усл. ед/мл	M±m	48,7±2,3	50,2±3,2	40,2±2,9
	p	—	>0,05	<0,05
	%	100,0	103,1	82,5
	p1	—	—	<0,05
Глутатионпероксидаза, нкат/мл	M±m	150,7±11,0	154,3±11,8	90,4±7,4
	p	—	>0,05	<0,01
	%	100,0	102,4	60,0
	p1	—	—	<0,01
Каталаза, нкат/мл	M±m	64,6±4,3	65,2±4,0	44,5±3,2
	p	—	>0,05	<0,05
	%	100,0	100,9	68,9
	p1	—	—	<0,01
	%1	—	100,0	68,3

Примечание:

p — уровень значимости различий данных по отношению к норме, рассчитанный с помощью t- критерия для независимых выборок;

p1 — уровень значимости различий данных в группе при моделировании увеита по отношению к исходным данным, рассчитанный с помощью t- критерия для зависимых выборок.

В слезной жидкости активность супероксиддисмутаза у животных с выраженным увеитом по сравнению с контролем составила — 82,5 %, а по сравнению с животными до развития увеита — 80,1 %.

Показатели активности глутатионпероксидазы в крови животных с выраженным увеитом составили — 67 % по сравнению с контрольной группой, а по сравнению с группой животных до развития увеита — 66,1 %.

Активность глутатионпероксидазы в слезной жидкости кроликов при выраженном увеите составила — 60 % по сравнению с контрольной группой, а по сравнению с группой животных до развития увеита — 58,6 %.

Активность каталазы в крови кроликов при развитии увеита составила 74 % по сравнению с контролем, а по сравнению с группой животных до развития увеита — 73,7 %.

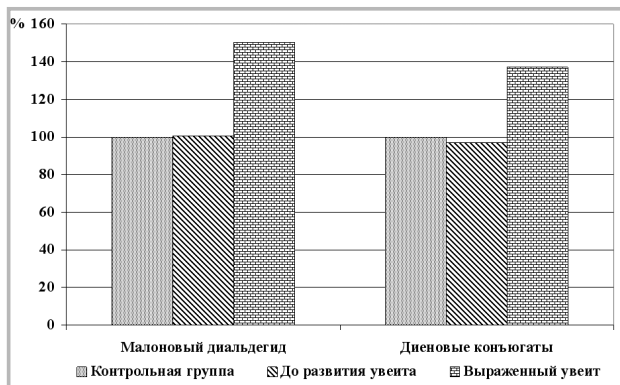


Рис. 1. Относительный уровень продуктов перекисного окисления липидов в крови кроликов в условиях моделирования аллергического увеита (в % относительно нормы)

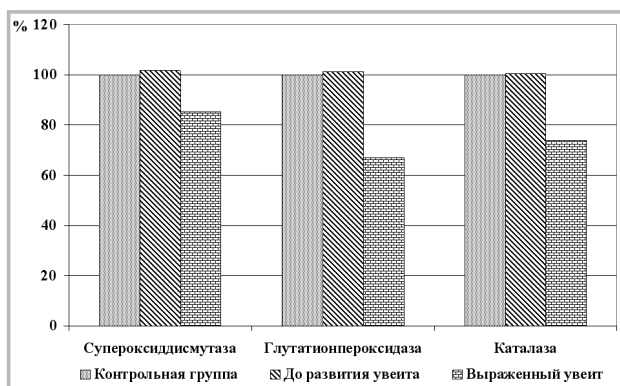


Рис. 2. Относительный уровень активности антиоксидантных ферментов в крови кроликов в условиях моделирования аллергического увеита (в % относительно нормы)

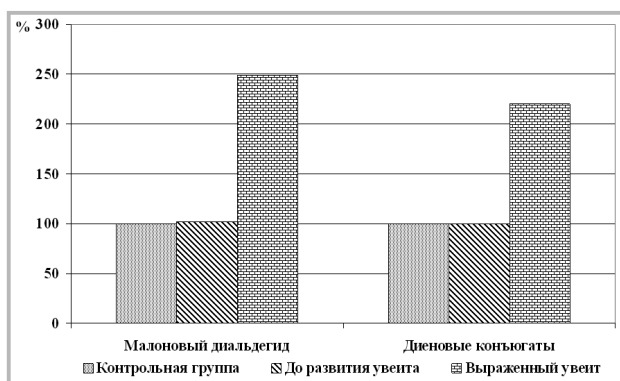


Рис. 3. Относительный уровень продуктов перекисного окисления липидов в слезной жидкости кроликов в условиях моделирования аллергического увеита (в % относительно нормы)

В слезной жидкости активность каталазы у животных с выраженным увеитом составила — 68,9 % относительно контроля, а по сравнению с животными до развития увеита — 68,3 %.

Результаты данного исследования показали, что при развитии увеита интенсивность процессов

перекисного окисления липидов возрастает, в результате чего повышается концентрация малонового диальдегида и диеновых конъюгатов, нарушаются окислительно-восстановительные процессы, что выражается в снижении активности изучаемых ферментов.

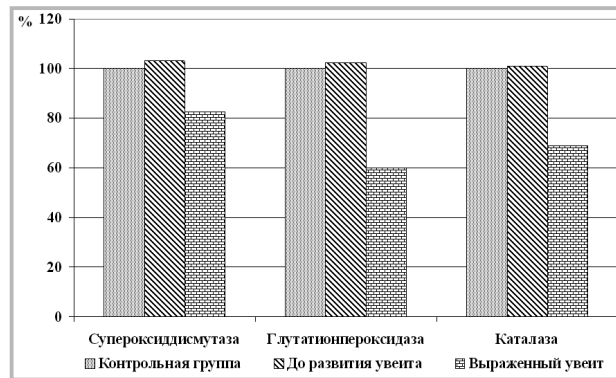


Рис. 4. Относительный уровень активности антиоксидантных ферментов в слезной жидкости кроликов в условиях моделирования аллергического увеита (в % относительно нормы)

Представленные данные о характере нарушения процессов перекисидации липидов и угнетении системы обезвреживания свободных радикалов при переднем аллергическом увеите в значительной мере согласуются с результатами других исследований, выявивших состояние оксидативного стресса при травматических и бактериальных увеитах [1, 10, 13, 16, 18].

Полученные нами данные обосновывают целесообразность поиска способов снижения оксидативного стресса при увеите. Весьма перспективными в этом направлении, на наш взгляд, представляются препараты пробиотиков, которые не только сами обладают прямыми антиоксидантными свойствами, но и по всей вероятности могут оказывать регулирующее воздействие на энзиматическую антиоксидантную систему.

ВЫВОДЫ

1. При переднем увеите в тканях глаза возникает состояние оксидативного стресса, что выражается в резком повышении интенсивности процессов перекисного окисления липидов, приводящем к возрастанию концентрации малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в слезной жидкости (на 149,1 % и 120 % соответственно).

2. При развитии воспалительного процесса в сосудистом тракте нарушаются окислительно-восстановительные процессы в тканях органа зрения, о чем свидетельствуют изменения активности ферментов в слезе. Так активность супероксиддисмутазы снижается на 17,5 %, глутатионпероксидазы — на 40 %, каталазы — на 29,1 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Архипова Л. Т., Долгова И. Г.**, Прогностическая значимость местных и системных показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы при проникающих ранениях глаз и их динамике на фоне местного применения антиоксидантов // Вестн. офтальмол. — 2001. — № 5. — С. 37–40.
2. **Барсуков В. В.** Структурно-функціональні зміни макулярної області і їх корекція при інтермедіарних увеїтах // Автореф. дис. канд. мед. наук. — 1994. — 16 с.
3. **Быковская Г. Н.** Особенности иммунопатологических проявлений при односторонних и двусторонних увеитах // Тез. докл. VII съезда офтальмологов России. — Ч.2. — Москва. — 2000. — С. 138–139.
4. **Горджян Т. А.** Новые аспекты медикаментозной терапии воспалительных заболеваний глаз // Тез. докл. VII съезда офтальмологов России. — Ч.2. — Москва. — 2000. — С. 144–145.
5. **Зайцева Н. С., Кацнельсон Л. А.** Увеиты. — Москва: Медицина, 1984. — 320 с.
6. **Камилов Ф. Х., Винькова Г. А., Коробейникова Э. Н.** Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы в слезной жидкости при посттравматическом увеите // Клин. лаб. Диагност. — 2001. — № 8. — С. 23–34.
7. **Наследов А.** SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках. // Спб.: Питер, 2005. — 416 с.
8. **Alien J. B., McGahan M. C., Ferrell J. B.** Nitric oxide synthase inhibitors exert differential time-dependent effects on LPS-induced uveitis // Exp. Eye Res. — 1996. — Vol. 62. — P. 21–28.
9. **Araki S., Mochizuki M., Yamaguchi K.** Familial clustering of human T lymphotropic virus type 1 uveitis // Brit. J. Ophthalmol. — 1993. — Vol. 77. — № 11. — P. 747–748.
10. **Augustin A. J., Boker T., Blumenroder S. H.** Free radical scavenging and antioxidant activity of allopurinol and oxypurinol in experimental lens-induced uveitis // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 1994. — Vol. 35. — P.3897–3904.
11. **BenEzra D., Cohen E., Maftzir G.** Prediction of treatment outcome in uveitis // BenEzra D (ed): Uveitis update, Dev. Ophthalmol. Basel. Kager. — 1999. — Vol. 31. — P. 160–165.
12. **Bergmeyer H. U.** Methoden der enzymatischen Analyse. — Herausgegeben von H. U. Bergmeyer. — Berlin. — 1986. — S. 2254–2265.
13. **Bodamyali T., Stevens C. R., Blake D. R.** Reactive oxygen/nitrogen species and acute inflammation: A physiological process // Free Rad. Inflamm. — 2000. — P. 11–16.
14. **Bombeck C. A., Li J., Billiar T. R.** Reactive oxygen species, nitric oxide and apoptosis // Free Rad. Inflamm. — 2000. — P. 207–219.
15. **Bosch-Morell F., Roma J., Puertas F. J.** Efficacy of the antioxidant ebselen in experimental uveitis // Free Rad. Biol. Med. — 1999. — Vol. 27. — № 3–4. — P. 388–391.
16. **Liversidge J., Gordon S., Dick A.** Nitric oxide in experimental autoimmune uveoretinitis // Free Rad. Ophthalm. Dis. — 2008. — P. 107–121.
17. **Mc Cluskey P., Towler H., Lightman S.** Management of chronic uveitis // Br. J. Ophthalmol. — 2000. — Vol. 320. — P. 555–558.
18. **Parks D. J., Cheung M. K., Chan C. C.** The role of nitric oxide in uveitis // Arch. Ophthalmol. — 1994. — Vol. 112. — № 4. — P. 544–546.
19. **Soukiasian S. H., Foster C. S., Raizman M. B.** Treatment strategies for scleritis and uveitis associated with inflammatory bowel disease // Amer. J. Ophthalmol. — 1994. — Vol. 118. — № 5. — P. 601–611.

Поступила 22.04.2011

Рецензент канд. мед. наук Н. И. Нарицына

INDICES ENZYME ACTIVITY OF THE ANTIOXIDANT SYSTEM AND CONTENT OF MALONIC DIALDEHYDE AND DIENE CONJUGATES IN THE BLOOD AND LACRIMAL FLUID EXPERIMENTAL UVEITIS

Sakovich V. N., Al Kayyali Fadi Zakariya

The state of oxidative stress in the eye tissues develop in anterior uveitis, which is manifested by the sharp increase in the intensity of the processes of the peroxide oxidation of lipids leading to the growth of the concentration of malonic dialdehyde and diene conjugates in the lacrimal fluid (by 149.1 % and 120 % respectively).

In development of the inflammatory process in the vascular tract the oxidation-reduction processes in the tissues of the visual organ are disturbed, which are characterized by changes of the enzyme activity in the tear (activity of superoxidisedismutase is by 17.5 %, glutathionperoxidase — by 40 %, catalase — by 29.1 %).

