

УДК 617.7-001.37-06:617.713/.711-003.92-07+577.11

Исследование продуктов перекисного окисления липидов в слезной жидкости у больных с рубцовыми изменениями конъюнктивы и роговицы после ожогов глаз

С. А. Якименко, д. мед. н., проф., Амжад Альбин, аспирант, Т. В. Пархоменко, ст. лаборант

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова НАМН Украины», Одесса (Украина)

E-mail: ojohi glaz@te.net.ua

Вступ. Актуальність дослідження обумовлена ступенем ускладнень, пов'язаних з інтенсифікацією процесів перекисного окислення ліпідів внаслідок опіку ока та вивчення доцільності застосування препаратів, що знижують негативний вплив продуктів цих процесів на тканини ока.

Мета дослідження. Вивчити процес перекисного окислення ліпідів за даними про рівень малонового діальдегіду та кон'югатів слезної рідини у хворих з опіками ока та вплив на цей процес застосування препаратів «Штучна слеза» і «Рестасіс».

Матеріал і методи. Клінічні дослідження виконано у 24 хворих з опіками ока та 12 здорових осіб для контролю. В основній групі (14 осіб) в комплексній терапії одержували препарати «Штучної слези» та «Рестасіс», а група співставлення (10 осіб) — тільки звичайне комплексне лікування опіків ока.

До та після лікування в слезній рідині у хворих обох груп визначали вміст малонового діальдегіду і дієнових кон'югатів у порівнянні цих даних з даними контрольної групи.

Результати. При застосуванні препаратів «Штучна слеза» та «Рестасіс» спостерігалось зниження концентрації малонового діальдегіду і дієнових кон'югатів в слезній рідині на 20,1 % та 14,7 % відповідно.

Висновок. Включення в комплекс медикаментозної терапії вказаних препаратів сприяє нормалізації рівня продуктів перекисного окислення ліпідів в слезній рідині обпеченого ока.

Ключові слова: роговка, опік, малоновий діальдегід, кон'югати, слезна рідина

Ключовые слова: роговица, ожог, малоновый диальдегид, конъюгаты, слезная жидкость

Investigation of products of peroxide oxidation of lipids in the lacrimal fluid of patients with eye burns

Yakimenko S. A., Amzhad Albinas, Parkhomenko T. V.

State Institution The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of the NAMS of Ukraine, Odessa, (Ukraine)

Introduction. The urgency of work is determined by finding out of action of preparations «Artificial tear» and Restasis in treatment of eye burns.

Purpose. To investigate a condition of processes of peroxide oxidation of lipids on the level of malonic dialdehyde and diene conjugates of the lacrimal fluid in patients with eye burns.

Material and methods. Clinical studies were made in patients with eye burns. The studies were made in 12 healthy persons for the control. During treatment 2 groups of patients were studied: a group of comparison (10 patients) — patients with severe consequences of burns, with application of standard complex treatment, the basic group (14 patients) — patients with severe consequences of eye burns, who has been included preparations of «Artificial tear» and Restasis in a complex therapy. The contents of malonic dialdehyde and diene conjugates were determined in the patients' lacrimal fluid of patients.

Results. In application of preparations «Artificial tear» and Restasis the concentration of malonic dialdehyde and diene conjugates has decreased by 20.1 % and 14.7 % accordingly.

Conclusion. Inclusion of preparations of «Artificial tear» and Restasis in the complex of medicamentous therapy promotes more expressed normalization of the level of products of peroxide oxidation of lipids in the lacrimal fluid.

Key words: cornea, burn, malonic dialdehyde and diene conjugates, lacrimal fluid

Введение. В настоящее время химический ожог глаз представляется как многогранное общее заболевание — ожоговая болезнь. Поэтому использование лечебных методов должно основываться на знании патогенетических механизмов ожогового процесса [5].

Ожоговая травма вызывает комплекс местных и общих нарушений в организме. Течение воспалительного процесса при ожогах глаз тяжелых степеней отличается значительной продолжительностью, нередко сопровождается тяжелыми осложнениями, завершается инвалидизирующими исходами и требует применения интенсивной медикаментозной терапии и хирургического лечения. Тяжесть течения и исходы химических ожогов глаз в значительной степени зависят от качества и эффективности патогенетически направленного лечения и, особенно, на этапе оказания первой неотложной помощи [6, 7, 14, 16].

Исследованиями ряда авторов изучены патохимические сдвиги, которые отражают состояние метаболических процессов в обожженной роговице и представляют основу патогенеза ожоговой болезни глаз [17].

В цепи патологических изменений начальными и во многом определяющими последующее течение являются процессы повреждения роговичной ткани. Обширная дезэпителизация роговицы и конъюнктивы, быстрое проникновение химического агента в глубжележащие структуры, сопровождающееся нарушением эпителиально-стромальных связей, гибелью или выраженным повреждением кератоцитов, деструкцией и переориентировкой коллагеновых волокон, разрушением межучасточного вещества (кислых мукополисахаридов) приводят уже в самые начальные сроки после ожоговой травмы к существенным, а иногда, и необратимым нарушениям всех процессов жизнедеятельности роговичной ткани, к анатомическим и функциональным изменениям. Образующиеся в этот период участки погибшей ткани провоцируют возникновение процессов аутоинтоксикации и аутосенсibilизации, присоединяющихся к механизмам развития ожогового процесса [12, 15].

Установлено, что ожоговое повреждение уже в ранние сроки приводит к нарушению состояния липидных структур клеточных мембран. Это проявляется в активации системы перекисного окисления липидов (ПОЛ). В первые сутки после ожога увеличение ПОЛ связано со стрессиндуцированным фактором, а нарастающая в дальнейшем аутосенсibilизация организма усугубляет патологические изменения в тканях глаза. Активация и неконтролируемость процессов ПОЛ ведет к активному выходу медиаторов воспаления и других биологически активных субстанций. Продукты свободно-радикального окисления обладают непо-

средственным влиянием на скорость и качество регенерации роговицы, поэтому их избыток ухудшает течение ожогового процесса, приводит к неблагоприятным исходам. Для последующего патогенетически обоснованного лечения химических ожогов следует знать особенности развития изменений со стороны системы ПОЛ, что требует дополнительного изучения этих процессов при данной патологии [1, 4, 9, 13].

Вызванные ожогом изменения метаболических процессов являются причиной накопления продуктов ПОЛ (малонового диальдегида и диеновых конъюгатов) в тканях глаза, что в свою очередь приводит к повреждению структур белков, мембран и нуклеиновых кислот [4, 18].

Согласно современным представлениям, развитие ожогового процесса глаз сопровождается интенсификацией свободно-радикальных процессов не только на уровне целостного организма больного, но и в тканях глаза, которое проявляется повышением интенсификации ПОЛ и сопровождается нарушением антиоксидантной активности и состава липидов, их способности к окислению и образованию радикалов, разрушающих клеточную мембрану и ухудшающих течение ожоговой травмы глаз [4].

Лечение ожогов глаз, имеющее патогенетическую ориентацию, направлено на коррекцию звеньев механизма развития ожогового процесса: удаление повреждающего агента, усиление метаболических процессов, восполнение дефицита компонентов роговичной ткани, противовоспалительные, антибактериальные мероприятия, снижение степени интоксикации и уровня аутосенсibilизации, нормализацию внутриглазного давления, стимуляцию защитных и регенераторных процессов [8, 14, 19].

В связи с этим актуальным является поиск новых препаратов, направленных на стимуляцию регенерации поврежденных тканей и способствующих не только восстановлению структуры тканей, но и скорейшей нормализации биохимических процессов при ожоговой болезни.

Цель работы: исследовать состояние процессов перекисного окисления липидов по уровню малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в слезной жидкости у больных с рубцовыми изменениями конъюнктивы и роговицы после ожогов глаз.

Материал и методы

Клинические исследования проведены у больных с последствиями ожогов глаз, находящихся на стационарном лечении в ожоговом отделении ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова НАМН Украины».

Для контроля исследования проведены у 12 здоровых лиц.

В процессе лечения выделено 2 группы больных: группа сравнения (10 больных) — пациенты с тяжелыми послед-

ствиями ожогов, с применением стандартного комплексного лечения и основная группа (14 больных) — пациенты с тяжелыми последствиями ожогов глаз и с синдромом сухого глаза, в комплексную терапию которых были включены препараты «Искусственной слезы» и «Рестасис».

В слезной жидкости больных определяли содержание малонового диальдегида и диеновых конъюгатов.

Принцип метода определения содержания малонового диальдегида состоит в том, что при температуре 100 °С 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 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 0–2 °С и добавляли 4 мл бутанола, тщательно перемешивали и центрифугировали 10 мин при 3 тыс. об/мин.

Измеряли оптическую плотность верхней фазы на спектроколориметре «Spocol — 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/г ткани.

Коэффициент вариации методики — 5,2 % [3].

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⁻¹·см⁻¹ и выражали в мкмоль/г ткани [11].

Полученные данные подвергались статистической обработке с помощью пакета SPSS 11.0 [2].

Результаты и их обсуждение

Данные о состоянии процессов перекисного окисления липидов по уровню малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в слезной жидкости у больных с последствиями ожогов глаз представлены на диаграмме (рис. 1).

Как видно из представленных данных, уровень малонового диальдегида в группе больных с последствиями ожогов глаз и традиционной терапией до лечения был повышен до 154,6 %, по сравнению с контролем, а после лечения снизился до 123,5 %. Таким образом, после лечения уровень малонового диальдегида снизился на 20,1 % по отношению к контрольной группе больных и на 31,1 % — в сравнении с исходным.

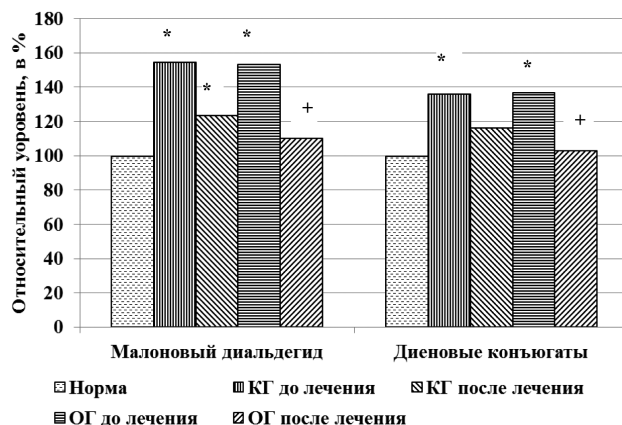


Рис. 1. Относительный уровень продуктов перекисного окисления липидов в слезной жидкости у больных после ожога в контрольной (КГ) и основной (ОГ) группах до и после лечения. * - уровень значимости различий данных по отношению к норме $p < 0,05$; + — уровень значимости различий данных группы «после лечения» по отношению к данным «до лечения» $p < 0,05$.

В основной группе больных уровень малонового диальдегида до лечения был повышен до 154,6 % по сравнению с контрольными данными, а после лечения составил — 123,5 %. Следовательно, при применении препаратов «Искусственной слезы» и «Рестасис» уровень малонового диальдегида снизился на 28,1 % по отношению к контрольной группе больных и на 43,1 % — в сравнении с исходным.

Уровень диеновых конъюгатов в группе больных с ожогами глаз и традиционным лечением до лечения был повышен до 136,2 % по сравнению с контролем, а после лечения снизился до 116,2 %. Таким образом, после лечения уровень диеновых конъюгатов снизился на 14,7 % по отношению к контрольной группе больных и на 20 % по отношению к исходному.

В основной группе больных уровень диеновых конъюгатов до лечения был повышен до 137,0 %, по сравнению с контрольными данными, а после лечения составил — 103,1 %. Следовательно, при применении препаратов «Искусственной слезы» и «Рестасис» уровень диеновых конъюгатов снизился на 24,8 % по отношению к контрольной группе больных и на 33,9 % — в сравнении с исходным.

Полученные нами результаты можно сопоставить с данными О. М. Панько, где было показано, что в условиях тяжелого ожога глаз отмечается повышение интенсивности процессов перекисного окисления липидов, а также изменение параметров системы антиоксидантной защиты в тканях глаза [4].

Наши клинические исследования, проведенные у больных с последствиями ожогов переднего отдела глаза, показали, что у них так же, как и у больных со свежими ожогами глаз, наблюдается повышение

процессов перекисного окисления липидов в слезной жидкости.

Таким образом, как традиционное лечение, так и лечение с дополнительным включением препаратов «Искусственная слеза» и «Рестатсис» снижает уровень продуктов перекисного окисления липидов в тканях глаза, о чем свидетельствуют результаты исследования слезы у этих больных. Однако только в основной группе отмечалось достоверное снижение малонового диальдегида и диеновых конъюгатов по отношению к уровню до лечения.

Выводы

1. У больных с послеожоговыми рубцовыми изменениями конъюнктивы и роговицы отмечается повышение процессов перекисного окисления липидов в слезной жидкости пациентов обеих исследованных групп, о чем свидетельствует

увеличение концентрации малонового диальдегида (на 53,4–54,6 %) и диеновых конъюгатов (на 36,2–37,0 %).

2. Проведение как традиционного лечения, так и лечения с включением в комплекс медикаментозной терапии препаратов «Искусственной слезы» и «Рестатсис» способствует более выраженной нормализации уровня продуктов перекисного окисления липидов в слезной жидкости, что свидетельствует о нормализации перекисного окисления липидов в тканях глаза под влиянием проводимого лечения. При этом у больных основной группы уровень малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в слезной жидкости снижался на 28,1 % и 24,8 % соответственно, тогда как в группе сравнения степень уменьшения концентрации малонового диальдегида и диеновых конъюгатов снизилась на 20,1 % и 14,7 % соответственно.

Литература

1. **Камилов Ф. Х., Винькова Г. А., Коробейникова Э. Н.** Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы в слезной жидкости при посттравматическом увеите // Клиническая лаб. диагностика. — 2001. — № 8. — С.23–34.
2. **Наследов А.** SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках. // Спб.: Питер, 2005. — 416 с.
3. Новые методы биохимического анализа. // Изд. Ленинградского универ. — 1991. — 395 с.
4. **Панько О. М.** Обґрунтування та ефективність застосування нового антиоксидантного препарату «Ербісол» при важких опіках очей: дис. ...канд. мед. наук: 14.01.18 «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова НАМН Украины» / **Панько О. М.** — Одесса, 2003. — 185 с.
5. **Пучковская Н. А., Якименко С. А., Непомящая В. Я.** Ожоги глаз. — Москва: Медицина, 2001. — 272 с.
6. **Якименко С. А.** Новая классификация ожогов глаз с учетом клинического значения современных данных об их патогенезе // Офтальмол. журнал. — 2006. — № 3. — С.246–249.
7. **Якименко С. А.** К вопросу о классификации стадий ожогового процесса в глазу // Офтальмол. журнал. — 2014. — № 4. — С.92–94.
8. **Якименко С. А.** // Офтальмол. журнал. — 2012. — № 4. — С.92–94.
9. **Antia N. H.** The soap and water treatment of burns // Natl. Med. J. India. — 2001. — Vol.14. — P. 316–320.
10. **Bendeddouche K., Assaf E., Emadisson H.** Air bags and eye injuries: chemical burns and major traumatic ocular lesions — a case study // J. Fr. Ophthalmol. — 2003. — Vol. 26. — P. 819–823.
11. **Bergmeyer H. U.** Methoden der enzymatischen Analyse. — Herausgegeben von H. U. Bergmeyer. — Berlin, 1986. — S.2198–2203.
12. **Friend J., Hassell J. R.** Biochemistry of the cornea In: Kaufman H. E., Barron B. A., McDonalds H. B. eds. The Cornea. — New York: Churchill Livingstone. — 1998. — P. 47–67.
13. **Hoffman H. M., Choi J. H., Clousing D. P.** Corneal epithelial testing strategies for safety evaluation of ophthalmic formulations // Cut. Ocul. Toxicol. — 2007. — Vol.26. — P. 311–327.
14. **Kuckelkorn R., Schrage N., Keller G.** Emergency treatment of chemical and thermal eye burns // Acta Ophthalmol. Scand. — 2002. — Vol.80. — P. 4–10.
15. **Liang H.** LPS-stimulated inflammation and apoptosis in corneal injury models / Liang H., Brignole-Baudouin F., Labbe A. // Mol Vis. — 2007. — Vol.13. — P. 1169–1180.
16. **Schrage N. F., Langefeld S., Zschocke J.** Eye burns: an emergency and continuing problem // Burns. — 2000. — Vol.26. — P. 689–699.
17. **Seong M. C., Kim M. J., Tchah H. W.** Chemical burns of the cornea due to soda lime used for line marking on the playground // J. Korean Ophthalmol. Soc. — 2005. — Vol.46. — P. 1737–1740.
18. **Shirzadeh E.** Bilateral Chemical Burns of the Cornea Due to Limewater: A Specific case // Iran Red Cresc Med. J. — 2013. — Vol. 15. — P. 11–12.
19. **Van Haeringen N. J.** Clinical Biochemistry of tears // Surv. Ophthalmol. — 1981. — Vol. 26. — P. 84–96.

Поступила 07.04.2014

References

1. **Kamilov FKh, Vinkova GA, Korobeinikova EN.** Lipid peroxidation and antioxidant system in the tear fluid in posttraumatic uveitis. *Klinicheskaia lab. Diagnostika.* 2001;8:23–34. Russian.
2. **Nasledov A.** SPSS computer data analysis in psychology and social sciences. Spb.: Piter; 2005. 416 p.
3. New methods of biochemical analysis. Izd. Leningradskogo univer. 1991; 395 p.
4. **Panko OM.** Rationale and efficacy of a new antioxidant drug «Erbisol» in severe burns of eyes: thesis for Candidate of Med. Science: 14.01.18. SI «The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of NAMS of Ukraine». Odessa. 2003. 185 p.
5. **Puchkovskaia NA, Yakimenko SA, Nepomyashchaia VYa.** Eye Burns. Moscow: Meditsina; 2001. 272 p.
6. **Yakimenko SA.** New classification of eye burns considering the clinical significance of recent data about their pathogenesis. *Oftalmol Zh.* 2006;3:246–9. Russian.
7. **Yakimenko SA.** On classification of stages of burn process in the eye. *Oftalmol Zh.* 2014;4:92–4. Russian.
8. **Yakimenko SA.** Офтальмол. журнал. 2012;4:92–4. Russian.
9. **Antia NH.** The soap and water treatment of burns. *Natl. Med. J. India.* 2001;14:316–20.
10. **Bendeddouche K, Assaf E, Emadisson H.** Air bags and eye injuries: chemical burns and major traumatic ocular lesions — a case study. *J. Fr. Ophthalmol.* 2003;26:819–23.
11. **Bergmeyer HU.** Methoden der enzymatischen Analyse. Herausgegeben von H. U. Bergmeyer. Berlin; 1986. 2198–203.
12. **Friend J, Hassell JR.** Biochemistry of the cornea In: Kaufman HE, Barron BA, McDonalds HB, eds. *The Cornea.* New York: Churchill Livingstone; 1998. 47–67.
13. **Hoffman HM, Choi JH, Clousing DP.** Corneal epithelial testing strategies for safety evaluation of ophthalmic formulations. *Cut. Ocul. Toxicol.* 2007;26:311–27.
14. **Kuckelkorn R, Schrage N, Keller G.** Emergency treatment of chemical and thermal eye burns. *Acta Ophthalmol. Scand.* 2002;80:4–10.
15. **Liang H, Brignole-Baudouin F, Labbe A.** LPS-stimulated inflammation and apoptosis in corneal injury models. *Mol Vis.* 2007;13:1169–80.
16. **Schrage NF, Langefeld S, Zschocke J.** Eye burns: an emergency and continuing problem. *Burns.* 2000;26:689–99.
17. **Seong MC, Kim MJ, Tchah HW.** Chemical burns of the cornea due to soda lime used for line marking on the playground. *J. Korean Ophthalmol. Soc.* 2005;46:1737–40.
18. **Shirzadeh E.** Bilateral Chemical Burns of the Cornea Due to Limewater: A Specific case. *Iran Red Cresc Med. J.* 2013;15:11–2.
19. **Van Haeringen N J.** Clinical Biochemistry of tears. *Surv. Ophthalmol.* 1981; 26: 84–96.

Received 07.04.2014