

УДК 614.7-007.681-089-06-002:612.461.2
© Сердюк В.Н., Малая Н.А., Семенко В.В., 2011

ВЛИЯНИЕ ОКСИДА АЗОТА НА ВЫРАЖЕННОСТЬ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ И УРОВЕНЬ СОЕДИНИТЕЛЬНОТКАННЫХ БЕЛКОВ ПОСЛЕ АНТИГЛАУКОМАТОЗНОЙ ОПЕРАЦИИ

Сердюк В.Н., Малая Н.А., Семенко В.В.

Днепропетровская областная клиническая офтальмологическая больница

В данное время хирургическое лечение первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ) продолжает оставаться одним из ведущих методов, который позволяет приостановить прогрессирующий глаукоматозный процесс [7,10,11,14].

Нестойкость лечебного эффекта антиглаукоматозных вмешательств, как правило, связывают с быстрым рубцеванием путей оттока внутриглазной жидкости, созданных во время проведения антиглаукоматозных вмешательств, с образованием кистозных фильтрационных подушек, с развитием в послеоперационном периоде иридоциклитов, гипотонии, цилиохориоидальных отслоек [2,3,15,18,19].

Чрезмерное рубцевание закрывает пути искусственного оттока внутриглазной жидкости, что приводит к последствиям оперативного вмешательства и выражается в рецидиве повышения внутриглазного давления с дальнейшим прогрессированием глаукоматозного процесса. Многочисленные попытки офтальмологов по профилактике этого осложнения отмечаются недостаточной эффективностью [2,7,14].

Результаты экспериментальных исследований многих авторов свидетельствуют о том, что активные формы кислорода играют существенную роль в патогенезе послеоперационной воспалительной реакции, а дополнительная их генерация в условиях эксперимента повышает степень воспалительного процесса после оперативного вмешательства в глаз [4,8,12].

В этом аспекте особенного внимания заслуживают результаты исследований по поводу роли свободно-радикальных соединений в процессах заживления ран и развития фиброза [5,9,17]. В этих работах показано, что свободно-радикальные формы кислорода усиливают образование фиброзной ткани, способствуют персистенции пролиферации фибробластов и пролонгации фибротического процесса.

В связи с этим особую актуальность приобретают исследования по выяснению роли свободно-радикальных соединений в развитии процесса рубцевания после хирургического лечения глаукомы и поиск путей регуляции этого процесса [3,4,8,13].

В настоящее время установлено, что в тканях глаза образуются кислородные соединения азота, в первую очередь оксид азота, который в свою очередь в последствии в цепи свободно-радикальных превращений переходит в пероксинитрит - высокореакционное соединение [6,16,17].

В то же время роль пероксинитрита в результативности хирургического лечения ПОУГ совершенно не изучается. Поэтому представляется интересным выяснить как протекают послеоперационные процессы при избыточном образовании кислородных соединений азота.

Цель работы: изучить влияние оксида азота на выраженность воспалительной реакции и уровень соединительно-тканых белков после анти-

глаукоматозной операции.

Материалы и методы. В серии экспериментов нами проведено изучение влияния свободнорадикальных форм кислорода, а также инсталляции аргина - донора оксида азота на степень послеоперационной воспалительной реакции.

Исследования были проведены на 42 кроликах породы Шиншилла. Всем животным было проведено оперативное вмешательство, моделирующее склеротомию при антиглаукоматозных операциях. После проведения акинезии, эпibuльбарной и ретробульбарной анестезии, производилась отсепаровка конъюнктивы глазного яблока от лимба в верхних квадрантах. После чего, на 12 часах, перпендикулярно лимбу, производились 2 параллельных разреза склеры, на расстоянии 5,0 мм друг от друга. Склера между разрезами расслаивалась с последующим расслоением лимба и склеры в проекции нанесенных разрезов с образованием квадратного склерального кармана шириной 5,0 мм и длиной 6,0 мм, глубина расслоения склеры составляла 2/3 ее толщины.

Животные были разделены на 4 группы. Первой группе (10 животных) проводилось только оперативное вмешательство. Животные второй группы (12 животных) в послеоперационном получали инстилляцию 2 % раствора гипоксантина, содержащего 0,2 % ксантинооксидазы и 0,2 % аминотриазола, (смесь, приводящая к образованию свободнорадикальных соединений кислорода). Животные третьей группы (10 животных) - получали инстилляцию раствора аргинина (субстрат синтеза оксида азота). Животные четвертой группы (10 животных) получали инстилляцию гипоксантина и аргинина.

Степень выраженности послеоперационной воспалительной реакции оценивалась полуколичественно в балах на основе учета выраженности основных признаков воспалительного процесса, возникающего в ответ на хирургическую травму склеры. Оценка степени послеоперационной воспалительной реакции проводилась по следующей схеме:

1 балл – конъюнктивальная инъекция сосудов, перикорнеальная инъекция сосудов, иритация в пределах физиологической нормы.

2 балла – конъюнктивальная инъекция выражена в области склерального разреза и отсутствует на остальном протяжении конъюнктивы, перикорнеальная инъекция сосудов умеренно выражена в проекции склерального разреза и отсутствует на остальном протяжении. Отечность роговицы слабо выражена в верхней трети роговицы, рисунок радужки сглажен, зрачок правильной формы, реакция на свет замедлена.

3 балла - конъюнктивальная и перикорнеальная инъекция выражена на всем протяжении конъюнктивы, перикорнеальная инъекция выражена по всей окружности лимба, роговица умеренно

отечна в верхней трети, радужка отечна, формирующиеся задние синехии, реакции зрачка на свет отсутствуют.

4 балла - конъюнктивальная и перикорнеальная инъекция выражены на всем протяжении конъюнктивы и лимба, заметны явления хемоза, отек стромы роговицы в проекции склеральных разрезов, формирование складок десцеметовой оболочки, радужка отечна, единичные преципитаты на задней поверхности роговицы, реакция зрачка на свет отсутствует.

5 баллов - конъюнктивальная и перикорнеальная инъекция резко выражены на всем протяжении, заметны выраженные явления хемоза, преципитаты на всей задней поверхности роговицы.

Различия между показателями воспалительных реакций в отдельных экспериментальных группах

оценивались с помощью методов непараметрической статистики с использованием критериев Крускала-Уоллиса и Манна-Уитни [3].

Определение уровня оксипролина в периферической крови и белках склеры проводилось согласно известного метода Неймана и Логана.

Результаты и их обсуждение. Данные относительно выраженности послеоперационной воспалительной реакции в различных условиях эксперимента приведены в таблице 1.

Как видно из представленных данных, в послерационном периоде в условиях экзогенных свободнорадикальных форм кислорода отмечается более тяжелое протекание воспалительной реакции, что сопровождалось возникновением выраженного перифокального отека, смешанной инъекции глазного яблока.

Таблица 1. Выраженность воспалительной реакции при моделировании операции склеротомии в различных условиях эксперимента

	Экспериментальные группы							
	1		2		3		4	
	№ жив	Степень воспали-т. реакции	№ жив	Степень воспали-т. реакции	№ жив	Степень воспали-т. реакции	№ жив	Степень воспали-т. реакции
Статистич. Показатели по тесту Крускала-Уоллиса	1	4	1	3	1	4	1	4
	2	3	2	4	2	4	2	3
	3	3	3	4	3	3	3	5
	4	2	4	3	4	4	4	4
	5	3	5	3	5	3	5	5
	6	3	6	4	6	3	6	5
	7	3	7	4	7	3	7	5
	8	4	8	4	8	3	8	4
	9	2	9	4	9	4	9	4
	10	3	10	4	10	3	10	3
			11	3				
			12	4				
Средние ранги	13,10		23,50		18,70		50,30	
χ^2	12,68							
p	0,005							

Примечание. p - уровень значимости различий данных между экспериментальными группами.

Таблица 2. Ранговая оценка выраженности воспалительной реакции при моделировании операции склеротомии в различных условиях эксперимента при сравнении данных групп по отношению к группе «Оперативное воздействие»

Статистические показатели	Условия эксперимента	
	Оперативное воздействие (1)	Оперативное воздействие + воздействие свободнорадикальных соединений кислорода (2)
n	10	12
Средний ранг	8,30	14,17
Сумма рангов	83,00	170,00
U		28,00
W		83,00
p		0,019
	Оперативное воздействие (1)	Оперативное воздействие + воздействие оксида азота (3)
n	10	10
Средний ранг	8,90	12,10
Сумма рангов	89,00	121,00
U		34,00
W		89,00
p		0,165
	Оперативное воздействие (1)	Оперативное воздействие + воздействие свободнорадикальных соединений кислорода и оксида азота (4)
n	10	10
Средний ранг	6,90	14,10
Сумма рангов	69,00	141,00
U		14,00
W		69,00
p		0,004

Примечание. P – уровень значимости при сравнении данных экспериментальных групп с использованием U- критерия Манна-Уитни.

Таблица 3. Ранговая оценка выраженности воспалительной реакции при моделировании операции склеротомии в различных условиях эксперимента при сравнении данных групп по отношению к 2 и 3 группам

Статистические показатели	Условия эксперимента	
	Оперативное воздействие + воздействие свободнорадикальных соединений кислорода (2)	Оперативное воздействие + воздействие оксида азота (3)
n	12	10
Средний ранг	12,83	9,90
Сумма рангов	154,00	99,00
U		44,00
W		99,00
p		0,222
	Оперативное воздействие + воздействие свободнорадикальных соединений кислорода (2)	Оперативное воздействие + воздействие свободнорадикальных соединений кислорода и оксида азота (4)
n	12	10
Средний ранг	9,50	13,90
Сумма рангов	114,00	139,00
U		36,00
W		114,00
p		0,079
	Оперативное воздействие + воздействие оксида азота (3)	оперативное воздействие + воздействие свободнорадикальных соединений кислорода и оксида азота (4)
n	10	10
Средний ранг	7,70	13,30
Сумма рангов	77,00	133,00
U		22,00
W		77,00
p		0,023

Примечание. p - уровень значимости при сравнении экспериментальных групп с использованием U-критерия Манна-Уитни

Изучение тяжести послеоперационной воспалительной реакции в условиях применения оксипролина показало, что при воздействии свободнорадикальных соединений кислорода степень воспалительной реакции повышается (23,50), по сравнению с группой животных, которым проводилось лишь оперативное воздействие.

Воздействие оксида азота также повышает степень воспалительной реакции, но в меньшей степени, по сравнению с воздействием соедине-

ний кислорода и составило в ранговом соотношении 18,70.

При совместном воздействии соединений кислорода и азота отмечается развитие сильной послеоперационной воспалительной реакции, что составило в ранговом соотношении 30,30.

Данные относительно уровня оксипролина в белках склеро-конъюнктивальной ткани после оперативного вмешательства в различных условиях эксперимента представлены в таблице 4.

Таблица 4. Уровень оксипролина в белках склеро-конъюнктивальной ткани после оперативного вмешательства (склеротомии) в различных условиях эксперимента

Стат. показатели	Условия эксперимента.			
	Склеротомия 1	Склеротомия + воздействие свободно-радикальных соединений кислорода (2)	Склеротомия + воздействие оксида азота (3)	Склеротомия + воздействие свободно-радикальных соединений кислорода и оксида азота (4)
n	10	12	10	10
M	240,10	321,17	274,50	386,70
m	10,43	13,41	10,10	15,82
SD	32,99	46,47	31,93	50,03
p1	-	0,000	0,029	0,000
% 1	100	133,8	114,3	161,1
p2	-	-	0,014	0,005
% 2	-	100	85,5	120,4
p3	-	-	-	0,000
% 3	-	-	100	140,9

Примечание: p1, p2, p3 - уровень значимости различия данных по отношению к соответствующей (1-й, 2-й, 3-й) экспериментальным группам, рассчитанный с помощью t-теста для независимых выборок.

Как видно из представленных данных в группе с применением экзогенных свободно-радикальных форм кислорода концентрация оксипролина значительно превышает контрольные показатели (240,10±10,43) и составляет 321,17±13,41 (133,8%). При воздействии оксида азота уровень этой аминокислоты достоверно ниже контрольных показателей и составил 274,50±10,10 (114,3%). При совместном воздействии свободно-радикальных соединений и оксида азота концентрация оксипролина превышает контрольные показатели, составляя 386,70±15,82 (161,1%).

Также отмечается высокий уровень исследуемого показателя по сравнению с группой с применением свободно-радикальных соединений кислорода, что составило 120,4% и 140,9% относительно группы с применением оксида азота.

Выводы:

1. Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что наряду с активными формами кислорода (супероксидный радикал) в патогенезе воспалительного процесса после антиглаукоматозной операции существенную роль играют также окислы азота (нитроксильный радикал). Об этом свидетель-

стает достоверно самая высокая степень воспалительной реакции при их сочетанном воздействии.

2. Установлено, что воздействие оксида азота – предшественника нитроксильного радикала значительно повышает скорость биосинтеза соединительнотканых белков в рубце в послеоперационном периоде. Уровень оксипролина повышается в этих условиях до 114,3%.

Перспективы дальнейших исследований. В данном исследовании показано влияние свободно-радикальных форм азота и кислорода на выраженность послеоперационной реакции. В дальнейших исследованиях целесообразно уделить внимание поиску способов уменьшения воспалительной реакции за счёт воздействия на продукцию свободных радикалов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. **Наследов А.** SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках. // Спб.: Питер, 2005. - 416 с.
2. **Перетягин О. А., Сердюк В.Н.** Влияние оксидативного стресса на степень воспалительной реакции и уровень оксипролина в тканях корнеосклеральной зоны после экспериментальной склеротомии // Офтальмол. журн. - 2006. - № 6. - С. 42-45.
3. **Светлова О. В., Засева М.В., Суржиков А. В.** Развитие теории оттока водянистой влаги и перспективные гипотензивные воздействия // Глаукома. -2003.- №1 с51 - 59.
4. **Bellocq A., Azoulay E., Marullo S.** Reactive oxygen and nitrogen intermediates increase transforming growth factor- α release from human epithelial alveolar cells through two different mechanisms // Am. J. respire. Cell. Moll. Biol. - 1999. - Vol. 21. - P. 128-136.
5. **Bergamini C. M.5 Gambetti S., Dondi A.** Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage.// Cur.Pharm.Design. - 2004. - Vol. 10 (14). - P. 1611-1626.
6. **Bodamyali T., Stevens C. R., Blake D. R.** Reactive oxygen/nitrogen species and acute inflammation: A physiological process // Free Radicals and inflammation. - 2000. - P. 11-16.
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. **Brown G. C, Borutaite V.** Interactions between nitric oxide, oxygen, reactive oxygen species and reactive nitrogen species // Proteins: Structure and Function. - 2006. - Vol. 34. - №5. - P. 953-956.
9. **Calder C. J., Nicholson L. B., Robertson M. J.** TNF activation and nitric oxide production in EAU// Free Rad. Ophthalmol. Disorders. - 2008. -p.217
10. **Chidlow G., Wood J.P.M., Casson R.J.** Pharmacological neuroprotection for glaucoma / Drugs. - 2007. - V. 67. - № 5. - P. 725-759.
11. **Kumar D. M., Agarwal N.** Oxidative stress in glaucoma: a burden of evidence / J Glaucoma. - 2007. - V. 16. - P. 334-343.
12. **Liversidge J., Gordon S., Dick A.** Nitric oxide in experimental autoimmune uveoretinitis// Free Rad. Ophthalmol. Disorders. - 2008. - p.217
13. **Neufeld A. H.** Pharmacologic neuroprotection with an inhibitor of nitric oxide synthase for the treatment of glaucoma / Brain res. Bull. - 2004. - V.62.-P. 455-459.
14. **Pache M., Flammer J.** A sick eye in a sick body? Systemic findings in patients with primary open-angle glaucoma / Surv. Ophthalmol. - 2006. - V. 51.-New3.-P. 179-212.
15. **Pena J. D. O., Agapova O., Gabelt B. A.T.** Increased elastin expression in astrocytes of the lamina cribrosa in response to elevated intraocular pressure // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. - 2001. - Vol. 42. - №10. - P. 2303-2314.
16. **Sacca S. C, Pascotto A., Camicione P., Capris P.** Oxidative DNA damage in the human trabecular meshwork // Arch. Ophthalmol. - 2005. - Vol.123. -P. 458-463.
17. **Vodovotz Y., Chesler L., Chong H.** Regulation of transforming growth factor piby nitric oxide // Cancer Res. - 1999. - Vol. 59. - P. 2142-2149.
18. **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.
19. **Wu G. S., Rao N. A.** Peroxynitrite and ocular inflammation // Free Rad. Ophthalmol. Disorders. -2008.-p.217.

Сердюк В.Н., Малая Н.А., Семенко В.В. Влияние оксида азота на выраженность воспалительной реакции и уровень соединительнотканых белков после антиглаукоматозной операции // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, № 2. – С. 168-171.

Исследование проводилось на 42 кроликах с моделированием антиглаукомного оперативного вмешательства. Изучалась выраженность послеоперационной воспалительной реакции, а также определялся уровень оксипролина в белках склеро-конъюнктивальной ткани после оперативного вмешательства и изменение этих показателей под воздействием свободнорадикальных соединений кислорода и оксида азота. Полученные данные свидетельствуют о достоверном увеличении степени воспалительной реакции и концентрации аминокислоты оксипролина в белках склеро-конъюнктивальной ткани под воздействием свободно-радикальных соединений кислорода и оксида азота, и ещё больше – при их совместном воздействии.

Ключевые слова: антиглаукомная операция, воспаление, оксид азота.

Сердюк В.М., Мала Н.О., Семенко В.В. Вплив оксиду азоту на вираженість запальної реакції і рівень сполучнотканинних білків після антиглаукоматозної операції // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, № 2. – С.168-171.

Дослідження проводилось на 42 кролях з моделюванням антиглаукомної операції. Вивчалась вираженість післяопераційної запальної реакції, а також визначався рівень оксипроліна в білках склеро-кон'юнктивальної тканини після операції та зміни цих показників під впливом вільнорадикальних сполучень кисню та оксиду азоту. Отримані дані свідчать про достовірне збільшення ступеню запальної реакції і концентрації оксипроліна в білках склеро-кон'юнктивальної тканини під впливом вільнорадикальних сполучень кисню та оксиду азоту, а ще більше – при їх сумісній дії.

Ключові слова: антиглаукомна операція, запалення, оксид азоту

Serdyk V., Mala N., Semenko V. Nitric oxide influence on the expression of inflammatory reaction and connective tissue protein level after antiglaucoma surgery // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, № 2. – С. 168-171.

42 adult Chinchilla rabbits were used in this study. Model of antiglaucoma surgery was developed. We studied postoperative inflammation and hydroxyproline concentration in sclera-conjunctive tissue proteins, as well as change of these values under oxygen free radicals and nitric oxide influence. Results suggests significant increase of both postoperative inflammation degree and hydroxyproline concentration in sclera-conjunctive tissue proteins under oxygen free radicals and nitric oxide influence. This influence was stronger under co-influence of both substances.

Key words: antiglaucoma surgery, inflammation, nitric oxide

Надійшла 14.01.2011 р.
Рецензент: проф. І.О.Комаревцева