

УДК 616.713-001.4-91.8.-06:612.015.11]-092.9

©А. Ю. Герасимець, А. А. Гудима, І. І. Герасимець

ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського”

ОСОБЛИВОСТІ ПРО- Й АНТИОКСИДАНТНИХ МЕХАНІЗМІВ ТА МОРФОЛОГІЧНИХ ЗМІН РОГІВКИ КРОЛЯ ЗА УМОВ МЕХАНІЧНОЇ НЕПРОНИКАЮЧОЇ ТРАВМИ

ОСОБЛИВОСТІ ПРО- Й АНТИОКСИДАНТНИХ МЕХАНІЗМІВ ТА МОРФОЛОГІЧНИХ ЗМІН РОГІВКИ КРОЛЯ ЗА УМОВ МЕХАНІЧНОЇ НЕПРОНИКАЮЧОЇ ТРАВМИ – В умовах механічної непроникаючої травми у тканині рогівки посилюється ліпопероксидація, порушуються показники ферментативної ланки антиоксидантного захисту, виникають виражені морфологічні зміни, які за інтенсивністю та часом появи відповідають найбільшим відхиленням біохімічних показників.

ОСОБЕННОСТИ ПРО- И АНТИОКСИДАНТНЫХ МЕХАНИЗМОВ И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЯ РОГОВИЦЫ КРОЛЯ ПРИ МЕХАНИЧЕСКОЙ НЕПРОНИКАЮЩЕЙ ТРАВМЫ – В условиях механической непроникающей травмы в ткани роговицы усиливается липопероксидации, нарушаются показатели ферментативной звена антиоксидантной защиты, возникают выраженные морфологические изменения, которые по интенсивности и времени появления соответствуют самым отклонением биохимических показателей.

FEATURES OF PRO- AND ANTIOXIDANT MECHANISMS AND MORPHOLOGICAL CHANGES OF THE RABBIT CORNEAL UNDER THE MECHANICAL IMPERMEABLE INJURY – In the conditions of mechanical impermeable injury of the corneal tissue lipoperoxydation increases, indicators of the fermentative link of the antioxidant protection are violated, expressed morphological changes arise, that by the intensity and time of occurrence correspond to the greatest deviation of biochemical parameters.

Ключові слова: антиоксиданти, антиоксидантна система, пероксидне окиснення ліпідів, непроникаюча травма.

Ключевые слова: антиоксиданты, антиоксидантная система, пероксидное окисление липидов, непроникающая травма.

Key words: antioxidants, antioxidant system, lipid peroxidation, impermeable injury.

ВСТУП За умов нормального функціонування організму постійно підтримується динамічна рівновага між про- та антиоксидантними системами. Порушення цієї рівноваги у бік переважання генерації активних форм кисню та їх метаболітів, виснаження антиоксидантної системи та порушення її збалансованості призводять до окиснювального стресу [7, 9, 11]. Вивчення змін співвідношення прооксидантних та антиоксидантних систем у динаміці післятравматичного періоду при непроникаючому пошкодженні рогівки і їх морфологічне підтвердження є важливим завданням сучасної експериментальної офтальмології. Морфологічні зміни ілюструють адекватність вибраної тактики лікування та достовірність діагностичних критеріїв під час лікування.

Метою роботи стало вивчити зміни інтенсивності ліпопероксидації, антиоксидантного захисту та морфологічні відхилення в рогівці кроля в умовах непроникаючого поранення.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Експериментальні дослідження проводили на статевозрілих кролях породи шиншила масою від 2,5 до 3,0 кг згідно з дотриманням норм біоетики. Для оцінки патофізіологічних змін у рогівці після непроникаючого її поранення тварини поділили на 3 групи: контрольна група – інтактні тварини (6 кролів); група тварин з непроникаючим пораненням рогівки та консервативним лікуванням, термін спостереження через 3, 7, 10 та 14 діб після травми (24 кролі).

Експериментальну модель пошкодження рогівки відтворювали на обох очах кроля під місцевою анестезією 0,5 % розчином алкаїну та ретробульбарною анестезією 2 % розчином лідокаїну 1,0 мл. Трепаном діаметром 7 мм у верхній половині рогівки наносили концентричну епітеліальну насічку, видаляли епітелій разом з переднім шаром строми товщиною до 0,2 мм. Впродовж терміну спостереження проводили інстиляцію розчину антибіотика фторхінолонового ряду – “Вігамокс” (1 крапля 3 рази на день), корнеопротектора – “Корнергель” 4 рази на день.

Активність пероксидного окиснення ліпідів оцінювали за вмістом у 10 % гомогенаті рогівки малонового діальдегіду [6], стан антиоксидантної системи – за активністю супероксиддисмутазу [9] і каталази [1].

Для гістологічних досліджень брали рогівку піддослідних тварин на 3, 7, 10 та 14 добу з моменту травми та після лікування консервативним способом. Зразки органа фіксували за загальноприйнятими методиками. Зрізи фарбували гематоксиліном та еозином [12]. Огляд та фотографування мікропрепаратів проводили під мікроскопом Mikros 400 та цифровим фотоапаратом Nikon Cool Pix 4500.

Статистичну обробку результатів виконано у відділі системних статистичних досліджень університету в програмному пакеті Statsoft STATISTIKA.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ Зважаючи на дані таблиці 1, на 3 добу в групі тварин з консервативним способом лікування у гомогенаті рогівки кролів рівень МДА зріс, порівняно з контрольною групою, на 7,9 % ($p < 0,05$), СОД – знизилась на 38,8 % ($p < 0,05$), каталаза – зросла на 164,6 %

Таблиця 1. Динаміка вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту в гомогенаті рогівки кроля за умов механічної травми та консервативного лікування ($M \pm m$)

Показник	Контроль (n=6)	Механічна травма рогівки			
		3 доба (n=6)	7 доба (n=6)	10 доба (n=6)	14 доба (n=6)
МДА (ммоль·л ⁻¹)	7,67±0,08	8,28±0,16*	8,93±0,20*	8,13±0,08*	7,63±0,13
СОД (%)	44,95±0,51	27,50±0,65*	32,68±0,87*	36,13±0,69*	39,33±0,30*
Каталаза (%)	12,08±0,19	31,97±0,60*	36,85±0,41*	43,42±0,37*	43,9±0,35*

Примітка. * – достовірність відмінностей стосовно контрольної групи, $p < 0,05$.

($p < 0,05$). За даними світлової мікроскопії, на 3 добу після травми при консервативному способі лікування відмічено ураження багат шарового неороговіваючого епітелію, що проявлялось його стоншенням та нерівномірним покриттям виразкового дефекту. Структура розташування колагенових волокон порушувалась за рахунок появи набряку, часткової інфільтрації лейкоцитами й еозинофілами, та порушення направленості колагенових фібрил (рис. 1).

На 7 добу після травми концентрація МДА зростала максимально – на 16,4 % стосовно групи інтактних тварин ($p < 0,05$). Рівень СОД підвищився на 18,8 % від попереднього терміну спостереження, однак відрізнявся від показника контрольної групи ($p < 0,05$). Концентрація каталази продовжувала зростати та була на 205 % вищою, ніж у контрольній групі ($p < 0,05$). Мікроскопічно у досліджуваній тканині спостерігали різке наростання набряку у власній речовині рогівки. Пучки колагенових волокон розшаровувались, деформуючи тканину. Багат шаровий плоский неороговіваючий епітелій залишався стоншеним, його проліферація була незначною. Проте кількість клітин гострого запалення візуально зменшувалась (рис. 2).

На 10 добу спостереження концентрація МДА у гомогенаті рогівки залишалась на 6 % вищою контрольної групи ($p < 0,05$). Рівень СОД та каталази продовжував зростати відповідно на 10,6 та 17,8 %, порівняно з попереднім терміном спостереження, однак статистично достовірно відрізнялись від показників інтактних тварин ($p < 0,05$). Через 10 діб експерименту відмічались ознаки відновлення структури рогівки. В передньому багат шаровому плоскому неороговіваючому епітелії відмічено збільшення шарів епітелію та зміну структури епітеліоцитів. Структура колагенових волокон частково відновлювалась (рис. 3), проте не у всіх тварин. Окремі колагенові волокна залишались різко розшарованими за рахунок набряку. Запальна інфільтрація була мінімізованою.

На 14 добу експерименту рівень МДА вернувся до показника контрольної групи та статистично від нього не відрізнявся ($p > 0,05$). Концентрація СОД продовжувала наближатись до групи інтактних тварин, проте була на 12,5 % нижчою ($p < 0,05$). Каталаза залишалась на високому рівні – на 263,4 % вищою контрольної групи ($p < 0,05$). На 14 добу експерименту гістологічно спостерігався набряк пучків колагенових волокон, що призводило до їх дисконтакції, а також порушенням регенерації багат шарового плоского неороговіваючого епітелію, і проявлялось його гіперплазією (рис. 4).

На основі отриманих даних можна стверджувати, що травматична виразка рогівки супроводжується вираженою інтенсифікацією ПОЛ та зниженням активності ферментативної ланки антиоксидантного захисту – СОД, зростанням активності каталази. Такий перебіг запального процесу є характерним при багатьох травматичних ураженнях інших локалізацій [4, 2]. Це пов'язано із безпосереднім пошкодженням, розвитком запалення та гіпоксії, на тлі якої відмічається активація ПОЛ [3]. Морфологічно в ділянці виразки рогівки відмічено порушення співвідношення шарів та відсутність на певних ділянках епітеліального покриття, які найбільше проявлялись на 3 добу. На 7 добу настало потоншення шару епітеліальної тканини, на

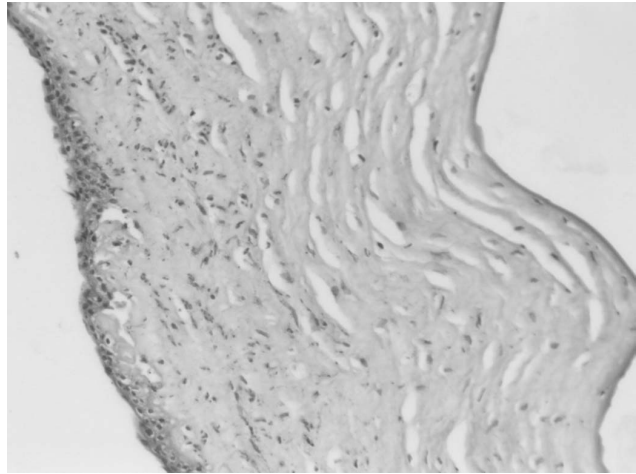


Рис. 1. Стоншення шару багат шарового плоского епітелію, інфільтрація лейкоцитами та еозинофілами, порушення направленості колагенових фібрил тканини рогівки тварини через 3 доби після травматичної ерозії. Забарвлення гематоксиліном і еозином. $\times 200$.

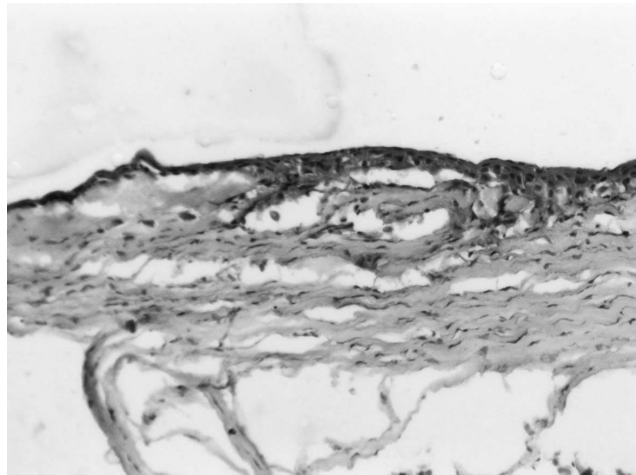


Рис. 2. Зростання шарів переднього багат шарового плоского неороговіваючого епітелію. Часткове відновлення структури колагенових волокон. Забарвлення гематоксиліном і еозином. $\times 200$.

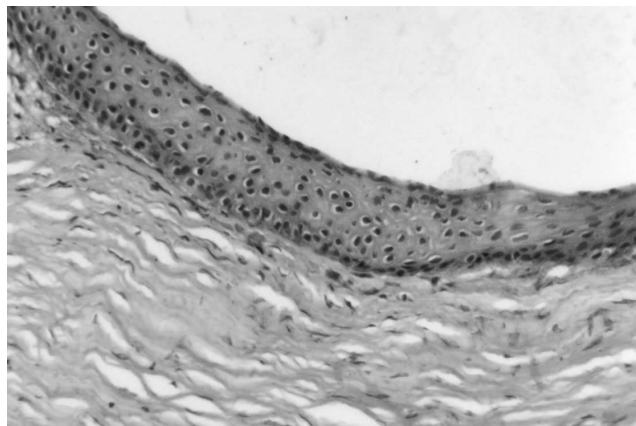


Рис. 3. Виражена проліферація багат шарового плоского неороговіваючого епітелію рогівки, розволокнення пучків колагенових волокон у дослідних тварин на 10 добу після травматичної ерозії. Забарвлення гематоксиліном і еозином. $\times 200$.

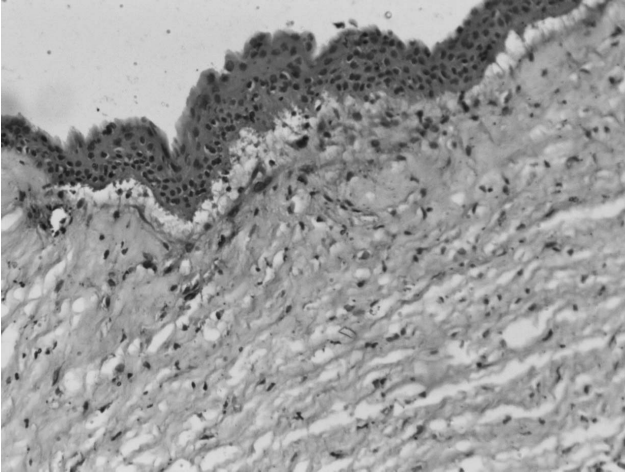


Рис. 4. Гіперплазія багат шарового плоского неороговівуючого епітелію, виражений набряк передньої пограничної мембрани, дисконкомпактація колагенових волокон, незначна запальна інфільтрація тканини рогівки через 14 діб після травматичної ерозії. Забарвлення гематоксилином і еозином. $\times 200$.

10 добу – збільшення шарів епітелію та зміна структури епітеліоцитів, на 14 добу з'явилась їх гіперплазія. Боуменова мембрана була видалена під час нанесення травми. В стромі рогівки на 3 добу спостерігали набряк, порушення направленості колагенових фібрил та інфільтрацію лейкоцитами. На 7 добу наростав набряк у власній речовині рогівки. На 10 добу структура колагенових волокон частково відновлювалась. Запальна інфільтрація тканини зменшилась. На 14 добу експерименту гістологічно спостерігали помірний набряк пучків колагенових волокон.

Отримані результати вказують на те, що одним із провідних механізмів вторинного пошкодження рогівки після її механічного пошкодження є поява активних форм кисню, що призводить до зростання ліпопероксидації у тканині рогівки, виснаження активності СОД на тлі стабільного підвищення активності каталази. Проведене морфологічне дослідження рогівки показало, що виявлені морфологічні відхилення за інтенсивністю та часом появи відповідають найбільшій інтенсифікації ПОЛ. Отримані результати слід враховувати при розробці нових способів лікування та кератопротекції при механічному пошкодженні рогівки.

ВИСНОВКИ 1. В умовах експериментального механічного пошкодження рогівки відмічається інтенси-

фікація пероксидного окиснення ліпідів, яка проявляється суттєвим збільшенням у тканині рогівки МДА, виснаженням активності СОД на тлі стабільного підвищення активності каталази. Максимум відхилень настає на 7 та 10 добу.

2. Виявлені біохімічні відхилення супроводжувалися порушенням структури рогівки в ділянці травми, які за ступенем прояву та часом відповідають найбільшим відхиленням біохімічних показників.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Практикум по биохимии / под ред. С. Е. Северина, Т. А. Соловьевой. – М. : Изд-во МГУ, 1989. – С. 160–161.
2. О влиянии антиоксидантов на выраженность эндотоксикоза при экспериментальном перитоните / А. П. Власов, Т. В. Тарасова, Г. Ю. Судакова [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2000. – Т. 63, № 6. – С. 58–61.
3. Затковська О. Я. Роль попереднього гострого емоційного стресу в перебігу комбінованої травми в експерименті / О. Я. Затковська, А. А. Гудима // Актуальні проблеми транспортної медицини. – 2011. – № 1 (23). – С. 120–123.
4. Костенко В. С. Возможности плазмафереза в комплексной терапии синдрома эндогенной интоксикации. Новый отечественный аппарат для проточного, фильтрационного плазмафереза АПФ-1 "Гемофер" / В. С. Костенко // Біль, знеболювання і інтенсивна терапія. – 2001. – № 2 (Д). – С. 57–59.
5. Свободнорадикальные процессы в биосистемах : учебн. пособие / Т. Н. Попова, А. Н. Пашков, А. В. Семенихина [и др.]. – 2008. – 192 с.
6. Влияние антиоксидантной и лазерной терапии на состояние мембран эритроцитов при экспериментальном перитоните / Д. В. Срубилин, Д. А. Еникеев, В. А. Мышкин [и др.] // Мед. вестн. Башкортостана. – 2009. – № 2. – С. 102–106.
7. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases / N. Ballatori, S. M. Krance, S. Notenboom [et al.] // Biol. Chem. – 2009. – Vol. 390(3). – P. 191–214.
8. Clinical outcomes of xeno-free allogeneic cultivated limbal epithelial transplantation for bilateral limbal stem cell deficiency / S. Basu, M. M. Fernandez, S. Das [et al.] // Br J Ophthalmol. – 2012, Dec. – Vol. 96 (12). – P. 1504–1509.
9. Brooks D. E. Matrix metalloproteinase inhibition in corneal ulceration / D. E. Brooks, F. J. Ollivier // Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract. – 2004. – Vol. 34, № 3. – P. 611–622.
10. Hara H. Xenotransplantation—the future of corneal transplantation? / Hara H., Cooper D. K. // Cornea. – 2011, Apr. – Vol. 30 (4). – P. 371–378.
11. Nagano T. Differential regulation of collagen degradation by rabbit keratocytes and polymorphonuclear leukocytes / T. Nagano, M. Nakamura, T. Nishida // Curr. Eye Res. – 2002. – Vol. 24, № 3. – P. 240–243.
12. Гистология : учебник для студ. мед.вузов / под. ред. Ю. И. Афанасьева, Н. А. Юриной. – изд. 5-е, перераб. и доп. – М. : Медицина, 1999. – 744 с.

Отримано 22.01.14