

© Колесников А.В., 2013
УДК: 617.7-003.821-053.9-06

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЙ СТАТУС ИРИДОЦИЛИАРНОГО КОМПЛЕКСА И КАМЕРНОЙ ВЛАГИ ГЛАЗА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КАТАРАКТЕ БЕЗ ЛЕЧЕНИЯ И НА ФОНЕ МЕСТНОЙ ТЕРАПИИ РАСТВОРОМ ИОНОЛА

А.В. Колесников

Рязанский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, г. Рязань

При экспериментальной катаракте изучен свободнорадикальный статус иридоцилиарного комплекса и камерной влаги глаза и влияние на него местного применения прямого антиоксиданта ионола. Экспериментальная катаракта индуцировалась введением в стекловидное тело раствора диквата дибромида. Развитие катаракты сопровождалось активизацией ПОЛ и резким угнетением антиоксидантной защиты иридоцилиарного комплекса с самопроизвольной нормализацией всех биохимических показателей к 14-м суткам опыта. В камерной влаге наблюдалась активизация ПОЛ во все сроки опыта, а антиоксидантные ферменты в ней использованными нами методами обнаружить не удалось. Местное применение ионола вызывало замедление ПОЛ в камерной влаге глаза, что указывает на патогенетическую направленность его действия при катаракте.

Ключевые слова: катаракта, иридоцилиарный комплекс, камерная влага, окислительный стресс, антиоксиданты.

Катаракта – наиболее частая патология глаз, приводящая к резкому снижению зрения. Из всех теорий патогенеза катаракты наиболее обоснованной является свободнорадикальная, в основу которой заложен тезис о первичности нарушений структуры и функции мембран вследствие патологической активации свободнорадикального окисления биополимеров хрусталика и снижения активности антиоксидантных ферментов [1,2,5,12,19]. Однако, антикатарактальных препаратов с прямой антиоксидантной активностью (АО) не существует [10], а известные средства не обладают достаточной эффективностью, так как направлены на коррекцию отдельных метаболических нарушений в хрусталике [2,5,10]. В качестве возможного антикатарактального средства оправдано исследование классического синтетического фенольного жирорастворимого антиоксиданта ионола, обладающего выраженной антирадикальной

активностью [4], который используется в различных областях медицины для предотвращения нарушений, вызванных развитием окислительного стресса, однако, в офтальмологической практике он не применяется.

Ранее нами при экспериментальной катаракте было показано значительное увеличение активности перекисного окисления липидов (ПОЛ) и снижение активности антиоксидантных ферментов в хрусталике [9], а также выявлен выраженный антиоксидантный эффект местного применения ионола в ткани хрусталика [7]. Целью настоящего исследования явилось изучение при экспериментальной катаракте свободнорадикального статуса иридоцилиарного комплекса и камерной влаги глаза без лечения и при местном применении прямого синтетического антиоксиданта ионола.

Материалы и методы

Экспериментальная катаракта была вызвана путем химической индукции сво-

боднорадикального окисления биополимеров тканей глаза по методу Buyan D.K., 1991 [14] на 60 кроликах-самцах (120 глаз) породы Шиншилла средним весом 2 кг и возрастом 8 – 10 месяцев. Под местной инстилляционной анестезией 2% раствором лидокаина в стекловидное тело обоих глаз вводили однократно 30 μ л стерильного раствора токсина диквата дибромида (600 нмоль), который способен индуцировать свободнорадикальные процессы в биологических тканях. Лечение начинали с 7-х суток, когда у всех животных формировались начальные катарактальные изменения хрусталиков. Ионол применяли в виде 2,2% масляного раствора и оценивали его эффективность в сравнении с широко используемыми антикатарактальными средствами: «Офтан Катахромом» и масляным раствором α -токоферола ацетата. Указанная концентрация ионола (2,2%) была определена нами как оптимальная антиоксидантная доза в предварительных исследованиях [6].

В зависимости от вида проводимой терапии все животные были разделены на 4 серии, включая серию без лечения (контроль катаракты). Для биохимических исследований в сериях с лечением животных выводили из опыта методом газовой эмболии под тиопенталовым наркозом на 14, 28, 42 и 56 сутки, а без лечения еще и на 7-е сутки, т. е. к моменту начала терапии (на каждый срок 3 животных). Норма биохимических показателей была определена на 9 интактных животных. Сразу после забоя глаза энуклеировали и на холоде выделяли тракционно с отрывом по зубчатой линии радужку и цилиарное тело одним блоком (иридоцилиарный комплекс). Гомогенат иридоцилиарного комплекса готовили на льду с использованием высокоскоростного роторного гомогенизатора Heidolph D1AX 900 (насадка 6G), после чего его центрифугировали с охлаждением при 600-800 г 15 минут ($t=+20^{\circ}\text{C}$). Часть полученного супернатанта замораживали в жидком азоте, другую часть подвергали биохимическим исследованиям в день забора материала. Камерную влагу забирали через парацентез стерильным шприцом в объеме 0,24 мл и помещали в шприце на лед.

Для характеристики свободнорадикального статуса в гомогенате иридоцилиарного комплекса и камерной влаги определяли активность ПОЛ по концентрации малонового диальдегида (кМДА) тиобарбитуровым тестом [3]; общую функциональную ёмкость антиоксидантной системы (АОС) по продолжительности лаг-фазы (лаг-МДА) и по скорости накопления МДА (сМДА) [11, 13, 15], а также по активности антиоксидантных глутатион-зависимых ферментов: Se-зависимой глутатионпероксидазы (GSH-per) – по Paglia D.E., Valentine W.N., 1967 в модификации Ланкина В.З [8, 18], и глутатион-SH-трансферазы (GSH-tr) – по Keen J.N., Iakoby W.B., 1978 [17]. Состояние тиол-дисульфидной системы оценивали по концентрации восстановленного глутатиона (GSH) по Habeeb, Habeeb, 1972 [16].

Результаты исследования обработаны методом вариационной статистики с использованием программы Statistica 6.

Результаты и их обсуждение

Введение в стекловидное тело диквата дибромида не вызывало какой-либо клинически видимой патологической реакции со стороны увеального тракта. К 7-м суткам формировались начальные помутнения хрусталика в кортикальных отделах, в последующие сроки изменения в хрусталике прогрессировали, а к концу эксперимента отмечалась грубая дезорганизация и разрушение волокон кортекса и увеличение интенсивности помутнений хрусталика.

Биохимические показатели иридоцилиарного комплекса и камерной влаги глаз приведены в таблицах 1 и 2. Как видно из таблицы 1, в ткани иридоцилиарного комплекса на 7-е сутки опыта кМДА достигала $0,6434 \pm 0,1353$ мкмоль/ мг ткани и достоверно превышала норму в 2,1 раза ($p \leq 0,01$), тогда как в последующие сроки наблюдения достоверных отличий от нормы не выявлено. Скорость накопления МДА на 7-е сутки составляла $2,205 \pm 0,362$ мкмоль/мг ткани в час и была выше нормы в 2,4 раза ($p \leq 0,01$), а на протяжении дальнейшего наблюдения она соответствовала показателю в интактной ткани (табл. 1).

Продолжительность лаг-фазы накопления МДА в гомогенате изучаемой ткани к 7-м суткам опыта уменьшалась в 3 раза по сравнению с нормой, а в остальные сроки достоверных отличий показателя от нормы не отмечалось (табл. 1). Полученные данные свидетельствуют о самопроизвольной нормализации показателей ПОЛ в ткани иридоцилиарного комплекса.

Активность глутатионзависимых антиоксидантных ферментов в иридоцилиарном комплексе также имела тенденцию к самопроизвольной нормализации. На 7-е сутки активность GSH-peg была достоверно выше показателя у интактных животных на 108,6%, на 14-е сутки – на 33,6%, а в последующие сроки наблюдения она соответствовала норме (табл. 1). Активность GSH-тг к 7-м суткам недостоверно увеличилась (на 303 %), на 14-е сутки снизилась до уровня интактных животных и в дальнейшем значимых колебаний относительно нормы не было выявлено (табл. 1). Используемый нами метод определения активности глутатионредуктазы позволил обнаружить лишь ее следы в ткани иридоцилиарного комплекса. Концентрация восстановленного глутатиона к 7-м суткам опыта составляла $4,548 \pm 0,8$ мкмоль/г белка и снизилась относительно нормы на 52,04%, тогда как уже к 14-м суткам и до конца эксперимента этот показатель достоверно от нормы не отличался (табл. 1).

В камерной влаге глаз концентрация МДА на 7-е сутки опыта увеличилась до $6,35 \pm 3,16$ мкмоль/мл влаги и достоверно превышала норму в 3,3 раза, а к 14-м суткам величина этого показателя практически не отличалась от предыдущего срока (табл. 2). На 28-е сутки была зафиксирована максимальная величина кМДА в исследуемой жидкости, превышающая показатели у интактных животных в 4,2 раза. В дальнейшем, на 42-е и 56-е сутки опыта уровень МДА значительно снизился, оставаясь, однако, достоверно выше нормы в 3,7 и в 3,1 раза (табл. 2). Используемыми нами методами исследования антиоксидантные ферменты в камерной влаге обнаружить не удалось.

Биохимические исследования на фоне лечения проводились только в камерной влаге, так как в ткани иридоцилиарного комплекса происходила самопроизвольная нормализация процессов ПОЛ.

Инстилляционное введение в конъюнктивальную полость 2,2% масляного раствора ионола сопровождалось существенным снижением кМДА в камерной влаге относительно контрольной группы в течение всего эксперимента (табл. 2, рис. 1). На 14-е сутки опыта кМДА была достоверно ниже контроля на 44,7%, а в последующие сроки степень снижения достигала в среднем 60% (табл. 2, рис. 1). По сравнению с данными у интактных животных на фоне лечения ионолом кМДА только на 14-е сутки была достоверно выше нормы на 86,3%, в последующие сроки она имела тенденцию к снижению и на 42-й и 56-й день изучаемый показатель достоверно от нормальных значений не отличался (табл. 2, рис. 2). При лечении «Офтан Катахромом» и масляным раствором α -токоферола ацетата на протяжении всего срока исследования кМДА практически не отличалась от контроля и была значительно выше уровня интактных животных (табл. 2, рис. 1, 2).

В ткани иридоцилиарного комплекса на 7-е сутки опыта происходило увеличение кМДА, что свидетельствует об индукции ПОЛ. В то же время изменения показателей антиоксидантной защиты характеризуют напряжение АОС, причем активация как GSH-peg, так и GSH-тг говорит об отсутствии значительного разрушения мембранных фосфолипидов до ГП ПНЖК и свободных ПНЖК. Снижение уровня кGSH, вероятно, связано с повышенным его расходом в ферментативном звене АО защиты. Описанные изменения свидетельствуют об отсутствии патологического характера ПОЛ в ткани иридоцилиарного комплекса. Начиная с 14 суток и до конца эксперимента все биохимические показатели были сравнимы с интактной тканью, что свидетельствует о самопроизвольной нормализации свободнорадикального статуса иридоцилиарного комплекса.

Таблица 1

Биохимические показатели иридоцилиарного комплекса животных разных серий

серия животных	сутки опыта				
	7	14	28	42	56
	M±m	M±m	M±m	M±m	M±m
КОНЦЕНТРАЦИЯ МДА (мкмоль/мг ткани)					
интактные	0,3132±0,0571				
p	≤0,01				
контроль катаракты (без лечения)	0,6434±0,1353	0,3063±0,0669	0,3193±0,1115	0,302±0,0743	0,3173±0,0388
p	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01
p1	≤0,01	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
СКОРОСТЬ НАКОПЛЕНИЯ МДА В ГОМОГЕНАТЕ ТКАНИ (мкмоль/мг ткани в час)					
интактные	0,917±0,114				
p	≤0,01				
контроль катаракты	2,205±0,362	0,926±0,136	0,918±0,122	0,92±0,103	0,918±0,089
p	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01
p1	≤0,01	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЛАГ-ФАЗЫ НАКОПЛЕНИЯ МДА В ГОМОГЕНАТЕ ТКАНИ (минуты)					
интактные	29,50±3,71				
p	≤0,01				
контроль катаракты	10±3,58	30±4,85	30±5,47	30±4,90	29,5±5,15
p	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01
p1	≤0,01	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗЫ (ЕД/г белка)					
интактные	37,61±5,39				
p	≤0,01				
контроль катаракты	78,48±11,73	50,26±8,59	37,31±4,10	37,4±5,85	37,69±4,10
p	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01
p1	≤0,01	≤0,05	>0,05	>0,05	>0,05
АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОН-SH-ТРАНСФЕРАЗЫ (ЕД/г белка)					
интактные	551,78±50,74				
p	≤0,01				
контроль катаракты	604,1±39,08	533,77±53,03	566,48±67,81	570,96±67,24	561,36±71,92
p	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01
p1	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
КОНЦЕНТРАЦИЯ ВОСТАНОВЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА (мкмоль/г белка)					
интактные	9,48±2,11				
p	≤0,01				
контроль катаракты	4,55±0,8	9,66±1,56	9,51±1,39	9,37±2,18	9,43±1,39
p	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01
p1	≤0,01	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Примечание: М – среднее арифметическое, ДИ – доверительный интервал, p – уровень значимости одновыборочного t-критерия для конкретной выборки, p1 – разница в сравнении с интактными животными

Таблица 2

Концентрация МДА в камерной влаге животных разных серий (мкмоль/мл влаги)

серия животных	сутки опыта				
	7	14	28	42	56
	M±m	M±m	M±m	M±m	M±m
интактные	1,93±0,61				
p	≤0,01				
контроль катаракты (без лечения)	6,35±3,16	6,49±0,74	8,07±2,66	7,13±0,71	5,93±1,80
p	≤0,05	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01
p1	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01
лечение «Офтан Катахромом»		6,49±1,069	8,03±3,04	7,33±1,07	6,11±1,28
p	-	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01
p1	-	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01
P2	-	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
лечение токоферолом		6,38±1,16	7,93±2,04	7,02±1,28	5,78±1,81
p	-	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01
p1	-	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01
P2	-	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
лечение 2,2% раствором ионола		3,66±0,80	2,91±1,07	6,04±0,73	5,05±0,61
p	-	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01
p1	-	≤0,01	>0,05	>0,05	>0,05
P2	-	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01

Примечание: M – среднее арифметическое, ДИ – доверительный интервал, p – уровень значимости одновыборочного t-критерия для конкретной выборки, p1 – разница в сравнении с интактными животными, p2 – разница в сравнении с сериями контроля, катаракты (без лечения).

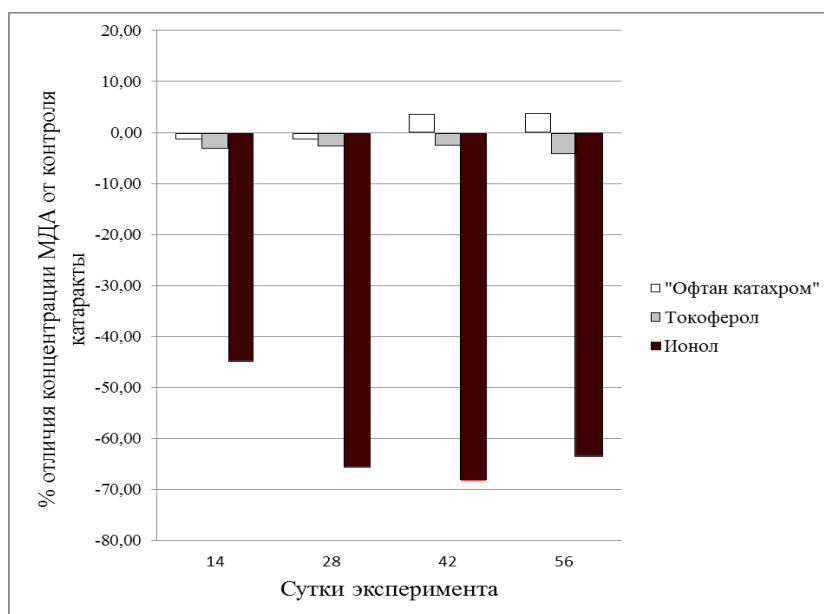


Рис. 1. Изменения концентрации МДА в камерной влаге глаза животных серий лечения по сравнению с контролем катаракты

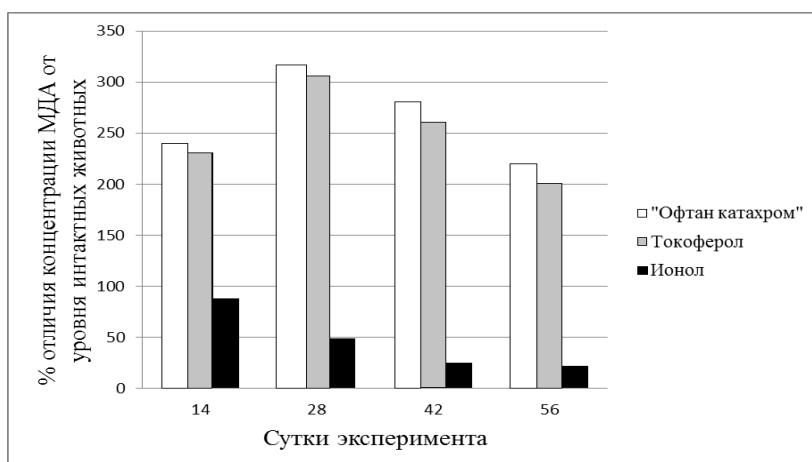


Рис. 2. Изменения концентрации МДА в камерной влаге глаза животных серий лечения по сравнению с уровнем интактных животных

В камерной влаге глаза протекание ПОЛ по цепному механизму невозможно, т. к. она имеет в своем составе лишь следы ПНЖК, поэтому выявленное увеличение на 7-е сутки к МДА, вероятно, является вторичным и связано с увеличением к этому сроку активности ПОЛ и в хрусталике, что было показано нами ранее [9], и в иридоцилиарном комплексе, а отсутствие изменений кМДА в камерной влаге к 14-м суткам по сравнению с 7-и можно объяснить увеличением активности ПОЛ в хрусталике при снижении его в ткани иридоцилиарного комплекса. Максимальное увеличение кМДА в камерной влаге на 28-е сутки по времени совпадает с максимальной активностью ПОЛ в ткани хрусталика, тогда как уменьшение величины этого показателя на 42-е и 56-е сутки соответствует снижению активности ПОЛ в хрусталике [9].

При применении ионола было получено выраженное снижение содержания МДА в камерной влаге относительно контроля в течение всего эксперимента, что говорит об уменьшении активности ПОЛ на фоне лечения. К 42-м и 56-м суткам опыта кМДА достоверно не отличалась от уровня интактных тканей, что свидетельствует о нормализации процессов пере-

кисного окисления липидов под влиянием ионола. Так как экспериментальная катаракта была вызвана прямой индукцией ПОЛ, то снижение его активности при использовании ионола является патогенетическим обоснованием его терапевтической эффективности

Применение «Офтан Катахрома» не вызывало существенного изменения процессов ПОЛ в камерной влаге, что связано с отсутствием в его составе веществ, обладающих антиоксидантными свойствами. Низкий биохимический эффект препарата α -токоферола ацетата связан с отсутствием антиоксидантной активности сложного эфира токоферола.

Выводы

1. Формирование экспериментальной дикват-индуцированной катаракты приводит к активации ПОЛ и угнетению антиоксидантной системы иридоцилиарного комплекса с самопроизвольной нормализацией изучаемых биохимических показателей к 14-м суткам опыта. В камерной влаге глаза наблюдается повышенный уровень продуктов ПОЛ на протяжении всего периода наблюдения.

2. Снижение содержания продуктов ПОЛ в камерной влаге глаза на фоне применения 2,2% раствора ионола указывает

на патогенетическую направленность терапевтического действия препарата при данном типе экспериментальной катаракты.

3. Полученные результаты создают экспериментальную основу для внедрения в клиническую практику антикатарактальных средств, обладающих антиоксидантной активностью.

Литература

1. Бабижаев М.А. Свободно радикальное окисление липидов и тиоловых групп при катарактогенезе / М.А. Бабижаев, А.М. Деев // Биофизика. – 1986. – Т. 31, вып. 1. – С. 109-114.
2. Багиров Н.А. Современные проблемы катарактогенеза / Н.А. Багиров // Офтальмол. журн. – 2000. – № 6. – С. 98-102.
3. Гаврилова В.Е. Анализ методов определения продуктов ПОЛ / В.Е. Гаврилова, А.Р. Гаврилова, А.М. Мазул // Вопр. мед. химии. – 1987. – №1. – С. 118-120.
4. Зарудий Ф.С. 2,6-Ди-третбутил-4-метилфенол (дибунол, ионол, тонарол) классический антиоксидант / Ф.С. Зарудий // Хим.-фармац. журн. – 2001. – Т. 35, № 3. – С. 42-48.
5. Катаракта / З.Ф. Веселовская [и др.]; под ред. проф. З.Ф. Веселовской. – Киев: Книга плюс, 2002. – 208 с.
6. Колесников А.В. Подбор эффективной антиоксидантной дозы ионола для ткани хрусталика при местном инстилляционном введении его масляного раствора / А.В. Колесников // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2006. – №2. – С. 46-49.
7. Колесников А.В. Экспериментальное исследование антикатарактальной эффективности прямого антиоксиданта ионола / А.В. Колесников // Кубан. науч. мед. вестн. – 2011. – №1(124). – С. 174-179.
8. Ланкин В.З. Ингибирование перекисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментативными системами (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза) при экспериментальном злокачественном росте / В.З. Ланкин, С.М. Гуревич // Докл. АН СССР. – 1976. – Т. 226, №3. – С.705-708.
9. Лихванцева В.Г. Свободнорадикальный статус хрусталика при экспериментальной дикват-индуцированной катаракте / В.Г. Лихванцева, А.В. Колесников // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2006. – №3. – С. 6-13.
10. Мальцев Э.В. Перспективы развития медикаментозного лечения катаракт / Э.В. Мальцев, Н.А. Багиров, Ясир Аль Шариф // Офтальмол. журн. – 2002. – №2. – С. 46-49.
11. Мид Дж. Свободно-радикальные механизмы повреждения липидов и их значение для клеточных мембран / Дж. Мид // Свободные радикалы в биологии: в 2-х т.: пер. с англ. / под ред. У. Прайора. – М.: Мир, 1979. – Т. 1. – С. 68-87.
12. Морфология жидких сред глаза (новая теория инволютивного катарактогенеза): монография / В.Н. Шабалин [и др.]. – М.: Медицина, 2004. – 244 с.
13. Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging / R.P. Patel [et al.] // Free Radical Biol. Med. – 2001. – Vol. 31. – P. 1570-1581.
14. Bhuyan K.C. Free radical enhancer xenobiotic is an inducer of cataract in rabbit / K.C. Bhuyan, D.C. Bhuyan, S.M. Podos // Free Radic. Res. Commun. – 1991. – Pt. 2. – P. 12-13.
15. Effect of antioxidants on oxidative modification of LDL / H. Esterbauer [et al.] // Ann. Med. – 1991. – Vol. 23. – P. 573-581.
16. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman // Archives of biochemistry and biophysics. – 1959. – Vol. 82, №1. – P. 70-77.
17. Keen J.N. Glutathione transferases catalysis of nucleophilic reactions of glutathione / J.N. Keen, W.B. Jakoby // Biological chemistry. – 1978. – Vol. 253, № 16. – P. 5854-5858.
18. Paglia D.E. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase / D.E. Paglia, W.N. Valentine // The Journal of laboratory and clinical medicine. – 1967. – Vol. 70. – P. 158-169.

19. Spector A. Oxidation and aspects of ocular pathology / A. Spector // CLOAO J. – 1990. – Vol. 16, №1(Suppl.). – P. 8-10.

**FREE RADICAL STATUS OF IRIDOCILIARY COMPLEX AND EYE AQUEOUS HUMOR
IN EXPERIMENTAL CATARACT WITHOUT TREATMENT AND ON THE BACKGROUND
OF IONOL SOLUTION LOCAL THERAPY**

A.V. Kolesnikov

In experimental cataract, free radical status of iridociliary complex and of aqueous humor has been studied along with the effect of local application of the direct ionol antioxidant. Experimental cataract was induced by introduction of diquat-dibromide into the vitreous body. The development of cataract was accompanied by POL activation and sharp depression of antioxidant protection with spontaneous normalization of all biochemical indices by the 14-th experimental day. POL activation in the aqueous humor was observed over the whole experimental period, but antioxidant enzymes were not revealed with the techniques applied. Local application of ionol resulted in POL slowing-down in the aqueous humor, which indicates pathogenic tendency of its action in cataract.

***Key words:* cataract, iridociliary complex, aqueous humor, oxidizing stress, antioxidants.**

Колесников А.В. — к.м.н., доц. кафедры глазных и ЛОР-болезней ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.

Работа выполнена при поддержке Гранта Президента РФ МК-4993.2012.7