

ПОДБОР ЭФФЕКТИВНОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ ДОЗЫ ИОНОЛА ДЛЯ ТКАНИ ХРУСТАЛИКА ПРИ МЕСТНОМ ИНСТИЛЛЯЦИОННОМ ВВЕДЕНИИ ЕГО МАСЛЯНОГО РАСТВОРА

А.В. Колесников

Рязанский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова

В настоящей работе представлены результаты подбора эффективной антиоксидантной дозы ионола для ткани хрусталика при введения его масляного раствора в конъюнктивальную полость глаза (в эксперименте). Проведённое исследование показало, что инстилляцией высоких концентраций раствора ионола (22% и 10%) индуцируют перекисного окисления липидов хрусталика, а 2,2% раствора – сопровождаются увеличением антиоксидантного потенциала исследуемой ткани. Эти результаты позволяют патогенетически обосновать лечение катаракты 2,2% раствором ионола.

Старческая катаракта – это дегенеративно-дистрофическое заболевание глаза, основным проявлением которого является потеря прозрачности хрусталика [6]. В структуре снижения зрения у лиц пожилого возраста старческая катаракта занимает лидирующую позицию, тогда как эффективных средств консервативного лечения данной патологии не предложено [1, 7]. Вероятно, этот факт можно объяснить отсутствием в распоряжении врача препаратов с патогенетически обоснованным механизмом действия. Так, в настоящее время наиболее обоснованной можно считать свободнорадикальную теорию этиопатогенеза старческой катаракты А. Спектра [14]: вследствие избыточной генерации свободных радикалов фотохимическим (воздействие ультрафиолетовой части солнечного излучения), физическим (радиация), химическим (смог, озон и др.) и другими путями на фоне общего снижения антиоксидантной защиты стареющего организма происходит патологическая активация свободнорадикальных процессов, что сопровождается окислением белков, липидов и других макромолекул. Этот процесс приводит к разрушению мембран, агрегации белков, нарушениям ионного равновесия и грубым нарушениям метаболизма, то есть, к помутнению хрусталика [1, 6, 7]. Предложенные в настоящее время антикатарактальные препараты направлены на коррекцию отдельных метаболических нарушений, тогда как лекарственных средств с доказанной прямой антиоксидантной активностью нет [7].

Наше внимание привлёк синтетический фенол – 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол (ионол) – как вещество, способное задерживать помутнение хрусталика и увеличивать активность глутатион-SH-трансферазы эпителия хрусталика в системе *in vitro* в условиях присутствия в инкубационной среде 4-гидроксиноненаля [8, 9]. Ионол обладает доказанной высокой антирадикальной и антиоксидантной активностью в различных системах *in vivo* и *in vitro*, способен предотвращать окислительную модификацию белков [8, 13]. Ионол применяется в клинической практике для уменьшения зоны некроза в острый период инфаркта

миокарда, для ускорения рубцевания язв желудка, при раке мочевого пузыря в виде 10% суспензии местно. Ионол в офтальмологии в настоящее время не применяется. Имеются экспериментальные данные о прооксидантном эффекте высоких доз 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола в некоторых тканях [8].

Целью настоящего исследования стало выбрать эффективную для ткани хрусталика антиоксидантную дозу препарата ионола при регулярном введении его масляного раствора в конъюнктивную полость глаза

Материалы и методы

Работа выполнена на 25 здоровых кроликах-самцах (50 глаз) породы Шиншилла средним весом 2 кг и возрастом 8 – 10 месяцев. Из них на 5 животных были определены номы биохимических показателей хрусталика.

Животные были разбиты на 4 серии по 5 кроликов в каждой (по 10 глаз): 1) инстилляцией растворителя – стерильного рафинированного оливкового масла (М); 2) инстилляцией 22% масляного раствора ионола (И22); 3) инстилляцией 10% масляного раствора ионола (И10); 4) инстилляцией 2,2% масляного раствора ионола (И2,2). Концентрации растворов были выбраны эмпирически с учётом данных о клиническом использовании исследуемого соединения и эффективной антиоксидантной концентрации ионола в системах *in vivo* и *in vitro* [8], а так же данных о фармакокинетике ионола [8] и липотропных глазных лекарственных форм [3]. Растворы ионола готовили путём растворения соответствующей навески 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола в стерильном рафинированном, не обогащённом витамином Е оливковым масле. Препараты ионола и растворитель вводили 3 раза в день в течение 30 суток. Критериями выбора эффективной концентрации считали улучшение показателей состояния антиоксидантной системы и отсутствие активации перекисного окисления липидов хрусталика.

Для оценки активности перекисного окисления липидов хрусталика определяли концентрацию малонового диальдегида (кМДА) тиобарбитуровым тестом [6]; общую функциональную ёмкость АОС исследуемой ткани оценивали по продолжительности лаг-фазы (лаг-МДА) и по скорости накопления МДА (сМДА) в инкубируемом гомогенате хрусталика [15]. С целью детальной характеристики функционирования ферментативного звена антиоксидантной системы определяли активность глутатион-зависимых антиоксидантных ферментов: Se-зависимой глутатионпероксидазы (GSH-per) – по Paglia D.E., Valentine W.N. (1967) в модификации Ланкина В.З. [4, 12], глутатионредуктазы (GSSG-red) – по Carbery J., Maunervik B. (1975) [10] и глутатион-SH-трансферазы (GSH-tr) – по Keen J.N., Iakoby W.B. (1978) [11]. Материал для биохимических исследований забирали из энуклеированного глаза сразу после забоя животного на холоде. Гомогенат готовили на льду с использованием высокоскоростного роторного гомогенизатора Heidolph DIAX 900, после чего его центрифугировали с охлаждением при 600-800 g 15 минут ($t=+2^{\circ}\text{C}$). Часть полученного супернатанта замораживали в жидком азоте, часть сразу подвергали биохимическим исследованиям в день забора. Замороженные пробы до момента определения активности ферментов хранили в вертикальной морозильной камере SANYO Ultra LOW MDF-192 при -29°C не более 2 – 3 недель. Результаты исследования обработаны методом вариационной статистики с использованием программы Statistica 6.

Результаты и их обсуждение

В результате проведённых биохимических анализов хрусталиков интактных животных кМДА составила 0,0034 (0,0028; 0,004) мкмоль/мг ткани; лаг-МДА – 42,5 (39,2; 45,9) минуты; сМДА 0,099 (0,0645; 0,1335) мкмоль/мг ткани в час; активность GSH-per – 6,53 (5,16; 7,89) ЕД/г белка; активность GSSG-red – 9,4 (7,81; 10,98) ЕД/г белка; активность GSH-tr – 15,98 (14,05; 17,9) ЕД/г белка.

Инстилляцией 22% и 10% растворов ионола сопровождалось увеличением кМДА в 4,4 и 2,7 раза ($p < 0,05$) по сравнению с данными у контрольных животных; укорочением лаг-МДА в 1,7 и 1,6 раза ($p < 0,05$); уменьшением содержания GSH на 66,4% и 58,6% ($p < 0,05$); активацией GSH-per хрусталика на 53,6% и 17% ($p < 0,05$); снижением активности GSSG-red на 61,3% и 25,3% ($p < 0,05$) соответственно обозначенным концентрациям. Активность GSH-tr при использовании И10 была не достоверно выше таковой в интактной ткани на 13,5% ($p > 0,05$), а при применении И22 – не достоверно ниже на 15,9% ($p > 0,05$).

Закапывание 2,2% раствора ионола достоверно значительно увеличило продолжительность лаг-фазы накопления малонового диальдегида с 42,5 мин до 52,5 мин; активность глутатион-SH-трансферазы с 16 ЕД/г белка до 27,5 ЕД/г белка ($p < 0,05$), глутатионредуктазы с 9,4 ЕД/г белка до 13,2 ЕД/г белка ($p < 0,05$). Ионол обладает выраженными антирадикальными и антиоксидантными свойствами [8], то есть введение этого соединения в биологическую систему увеличивает её АО потенциал. Этим можно объяснить обнаруженное улучшение функционального состояния АОС хрусталика при использовании 2,2% раствора (в виде увеличения продолжительности лаг-МДА и снижения сМДА в хрусталике). Ионол в высоких дозах способен индуцировать ПОЛ тканей в системах *in vivo* и *in vitro*, что связывают с продуктами его метаболизма. Применение 10% и 22% растворов ионола в нашем опыте сопровождается индукцией ПОЛ в ткани хрусталика, что в соответствии с литературными данными можно объяснить действием продуктов метаболизма 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола [8]. Сокращение лаг-МДА и увеличение сМДА при применении 10% и 22% растворов ионола, видимо, связано с индукцией ПОЛ, так как чрезмерная активация ПОЛ сопровождается истощением эндогенной АОС [5, 8].

Цитозольный фермент антиперекисной защиты – тетрамерная Se-зависимая GSH-пероксидаза инактивирует органические гидроперекиси и перекись водорода, однако она не способна восстанавливать гидроперокси-группы фосфолипидов (ФЛ) [5]. Гидропероксиды (ГП) остатков полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) GSH-per может превратить в оксикислоты только после гидролиза мембранных ФЛ фосфолипазой A_2 . Один из изоферментов GSH-tr, субстратом которого являются органические ГП, способен восстанавливать за счёт редуцирующих эквивалентов глутатиона ГП остатков ПНЖК до стабильных оксикислот по суммарной реакции, идентичной глутатионпероксидазной. Причём, GSH-tr способна восстанавливать ГП ПНЖК непосредственно в составе ФЛ без их гидролиза, то есть в месте их образования без разрушения структурных компонентов мембраны [5]. Считают, что в физиологических условиях при инициации перекисного окисления мембранных ФЛ восстановление ГП ПНЖК в их составе (когда фосфолипаза A_2 не активна) осуществляется именно глутатион-SH-трансферазой. При патологии, когда имеет место ацидоз, перегрузка клетки ионами Ca^{++} и процесс ПОЛ приобретает патологический характер, активируется фосфолипаза A_2 . Это в свою очередь сопровождается гидролизом ФЛ мембран и попаданием в цитозоль ГП ПНЖК и

самых ПНЖК. В этих условиях GSH-tr инактивируется продуктами гидролиза ФЛ, тогда как GSH-peg абсолютно к ним резистентна; кроме того, цитоплазматическая глутатионпероксидаза получает доступ к своему субстрату [5]. То есть, GSH-peg и GSH-tr выполняют в клетке одинаковую роль, но в разных условиях. С этих позиций можно объяснить полученную нами индукцию глутатионпероксидазы хрусталика при использовании 10% и 22% растворов и угнетение активности GSH-tr при использовании 22% раствора ионола активацией ПОЛ. По литературным данным 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол способен индуцировать глутатион-SH-трансферазу эпителия хрусталика [8, 9]. Этим можно объяснить увеличение активности этого фермента при использовании 2,2% и 10% растворов. Так как применение 10% препарата ионола увеличило активность GSH-tr несмотря на активацию ПОЛ, истощение антиоксидантной системы, индукцию GSH-peg, видимо, можно говорить о прямом индуцирующем влиянии 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола на глутатион-SH-трансферазу. Увеличение активности GSH-peg при использовании 2,2% раствора ионола можно объяснить индуцирующим влиянием 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола на этот фермент, а снижение активности при применении 10% и 22% растворов – его окислением и инактивацией продуктами перекисной деградации биополимеров.

Выводы

Таким образом, ионол при введении в виде масляного раствора в конъюнктивальную полость глаза у интактных животных в зависимости от дозы оказывает разнонаправленное действие на свободнорадикальный статус хрусталика: 10% и 22% растворы – прооксидантное, а 2,2% раствор – антиоксидантное.

Полученные результаты дают экспериментальную основу для использования 2,2% масляного раствора ионола для патогенетически обоснованного лечения катаракты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Современные проблемы катарактогенеза/ Багиров Н.А. // Офтальмол. журн. – 2000. – № 6. – С. 98 – 102.
2. Анализ методов определения продуктов ПОЛ / Гаврилова В.Б., Гаврилова А.Р., Мазул Л.М. // Вопр. мед. химии. – 1987. – № 1. – С. 118-120.
3. . Глазные лекарственные формы в фармации. / Гендролис А.-Ю. А – М.: Медицина, 1988. – 256 с.
4. Ингибирование перекисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментативными системами (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза) при экспериментальном злокачественном росте / Ланкин В.З., Гуревич С.М. // ДАН СССР. – 1976.- Т. 226. – № 3. – С.705 – 708.
5. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Свободнорадикальные процессы в норме и при заболеваниях сердечно-сосудистой системы. Издание второе, исправленное и дополненное. – М.: РКНПК МЗ РФ, 2001. – 78 с.
6. Хрусталик. /Мальцев Э. В. – М.: Медицина, 1988. – 192 с.
7. . Перспективы развития медикаментозного лечения катаракт / Мальцев Э.В., Багиров Н.А., Ясир Аль Шариф // Офтальмол. журн – 2002. – № 2. – С. 46 – 49.

8. Фенольные биоантиоксиданты/ Н.К. Зенков, [и др.] – Новосибирск: СО РАМН, 2003. – 328 с.
9. Attenuation of 4-hydroxynonenal-induced cataractogenesis in rat lens by butylated hydroxytoluene/ S.K. Srivastata, S. Awasthi, L. Wang [et al]// Current eye research. – 1996. – Vol. 15. – P. 749 – 754.
10. Purification and characterization of the flavoenzyme, glutathione reductase from rat liver /Carbery J., Maunervik B. // The Journal of biological chemistry. – 1975. – Vol. 250. – № 14. – P. 5425 – 5480.
11. Glutathione transferases catalysis of nucleophilic reactions of glutathione /Keen J.N., Jakoby W.B. // Biological chemistry. – 1978. – Vol. 253, № 16. – P. 5854 – 5858.
12. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase / Paglia D.E., Valentine W.N // The Journal of laboratory and clinical medicine. – 1967. – Vol. 70. – P. 158 – 169.
13. Preventive effect of several antioxidants after oxidative stress on rat brain homogenates/ L. Horakova, [et al] // General physiology and biophysics. – 2000. – Vol. 19. – P. 195 – 205.
14. The search for a solution to senile cataracts. Proctor lecture / Spector A. // Investigative ophthalmology & visual science. – 1984. – Vol. 25. – № 2. – P. 130 – 146.
15. Lipide peroxidation in isolated mitochondria /Tappel A.L., Zalkin H. // Archives of biochemistry. – 1959. – Vol. 80, № 2. – P. 326-332.

THE CHOICE OF OF EFFICIENT ANTIOXIDANT DOSE OF IONOL FOR THE TISSUE OF LENS IN LOCAL INSTILLATION INTRODUCTION OF ITS OIL SOLUTION

A.V.Kolesnikov

In given work are represented the results of a selection for an effective antioxidation dose of ionol for crystalline lens, during introduction its oil solution into a conjunctive sac (experimental study). This research showed that putting into eye ionol's solutions of high concentrations (22% and 10%) make more active lipid's peroxidation in crystalline lens. And putting into eye 2,2 per cent of ionol's solution give an increasable antioxidation potential of an examination tissue. These results let us patogenetically base a cataract's treatment of a solution of ionol which has a concentration 2,2 per cent.