

А.Ф. Самигуллина¹, Е.А. Нургалева¹, А.А. Сорокин²
**ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В ТКАНЯХ ГЛАЗНОГО ЯБЛОКА
В ПОСТРЕАНИМАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

¹ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет»

Минздрава России, г. Уфа

²ГБУЗ «Республиканский кардиологический центр», г. Уфа

Представлены результаты оценки состояния прооксидантной и антиоксидантной систем в тканях глазного яблока в постреанимационном периоде. Проведены хронические (5 недель) патофизиологические эксперименты на 173 нелинейных половозрелых крысах-самцах с моделированием клинической смерти пережатием сосудисто-нервного пучка сердца и смертельной кровопотерей. Показано, что независимо от модели умирания максимальная интенсификация процессов перекисного окисления липидов и свободнорадикального окисления в тканях глазного яблока происходит в ранние сроки после оживления и на 10-21-е сутки постреанимационного периода на фоне измененной активности систем антирадикальной защиты.

Ключевые слова: глутатион, глазное яблоко, ишемия-реперфузия, каталаза, свободнорадикальное окисление.

A.F. Samigullina, E.A. Nurgaleeva, A.A. Sorokin
**OXIDATIVE STRESS IN THE EYE TISSUES
IN THE POSTRESUSCITATION PERIOD UNDER EXPERIMENT**

The article presents the results of the assessment of the state of prooxidant and antioxidant systems of the eye tissues in the postresuscitation period. Chronic (5 weeks) pathophysiological experiments were conducted on 173 nonlinear mature male rats with a model of clinical death by compression of the neurovascular bundle of the heart and fatal blood loss. It is shown that, regardless of the model of dying, the maximum intensification of the processes of lipid peroxidation and free radical oxidation in the eye tissues occurs early after recovery and at 10-21 day of postresuscitation period against the background of a changed activity of antiradical protection systems.

Key words: glutathione, eyeball, ischemia-reperfusion, catalase, free radical oxidation.

В настоящее время в патогенезе развития многих глазных заболеваний немаловажная роль отводится процессам перекисного окисления липидов (ПОЛ). Увеличение интенсивности свободнорадикального окисления (СРО) является пусковым механизмом развития витреоретинальной пролиферации и изменений системы гемостаза при тромбозе центральной вены сетчатки [3]. Развитие возрастной макулярной дегенерации расценивается как результат сочетанного взаимодействия активации процессов СРО и местных гемодинамических нарушений [4,5], а при возникновении гемофтальма усиление процессов СРО наблюдается не только в стекловидном теле (СТ), но и в сетчатке, особенно в рецепторном слое и пигментном эпителии. Отсутствие прямого контакта СТ с сетчаткой приводит к изоляции антиоксидантной системы СТ от сетчатки и ускоренному ее повреждению [1].

Изученные данные о механизмах свободнорадикального повреждения структур глаза в основном базируются на моделях локального нарушения их оксигенации. В то же время остается открытым вопрос о состоянии биохимического гомеостаза тканей глазного яблока при критических состояниях, сопровождающихся расстройствами энергетического, водно-электролитного обмена, кислотно-основного состояния, а также о неизменно развивающейся постреанимационной патологии органов и систем.

Цель исследования – оценить состояние процессов перекисного окисления липидов в тканях глазного яблока в постреанимационном периоде в эксперименте.

Материал и методы

Были проведены хронические (5 недель) патофизиологические эксперименты на 163 нелинейных половозрелых крысах-самцах. Клиническая смерть моделировалась путем пережатия сосудисто-нервного пучка (ПСНП) (первая опытная группа, n=81) и воспроизведением острой смертельной кровопотери (СК) (вторая опытная группа, n=72) с последующей реанимацией. Во время оживления регистрировалось время появления сердечной деятельности, первого вдоха, роговичных рефлексов. Все эксперименты выполнялись в соответствии с нормативными документами, регламентирующими гуманное обращение с животными. Наблюдение за динамикой общего состояния животных проводилось в течение 5 недель после эксперимента. Забор глазных яблок для исследования проводился на 1-е, 3-е, 5-е, 7-, 10-, 14-, 21-, 28-, 35-е сутки после оживления, забой экспериментальных животных выполнялся под наркозом методом одномоментной декапитации.

Контрольные группы крыс (по n=10) подвергались наркозу (эфирному в группе ПСНП и кетаминному в группе СК) без моделирования клинической смерти.

Оценка процессов свободнорадикального окисления в гомогенатах тканей глазного яблока проводилась путем определения ТБК-реагирующих продуктов с помощью набора реактивов «ТБК-АГАТ» (фирма ООО АГАТ-МЕД, Москва), а также методом хемиллюминесцентного анализа с использованием отечественного хемиллюминометра ХЛ-003. Исследовали Fe²⁺-индуцированную хемиллюминесценцию, которая позволяет выявлять накопление перекисных радикалов. Состояние антиоксидантной системы в тканях глазного яблока определялось путем регистрации каталазной активности (Королюк М.А., 1988) и уровня восстановленного глутатиона (Patterson et al. в модификации Путилиной, 1982).

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы IBM SPSS Statistics v. 21 с использованием непараметрических критериев.

Результаты и обсуждение

Изучение хемиллюминесценции тканей глаза в постреанимационном периоде после клинической смерти от ПСНП выявило значимое повышение спонтанной светимости во все сроки за исключением 35-х суток наблюдения, что, вероятно, свидетельствует о постоянной напряженности процессов свободнорадикального окисления в результате сочетанного воздействия светового потока и усиленной оксигенации тканей при реперфузии. Показатели железоиндуцированной хемиллюминесценции (амплитуда медленной вспышки и светосумма) были достоверно повышены по сравнению с контролем в ранние сроки (1-е, 3-и сутки) и на второй неделе (10-14-е сутки) после оживления. В остальные сроки значения изучаемых параметров были либо на уровне контроля, либо незначительно отличались от него (табл. 1).

Таблица 1

Показатели ХЛ тканей глазного яблока в постреанимационном периоде (Ме [25%;75%]), отн.ед.							
Показатели СРО		Спонтанная светимость		Светосумма		Амплитуда медленной вспышки	
Контроль		0,21 [0,14; 0,30]		0,73 [0,68; 0,77]		2,21 [2,12; 2,28]	
		ПСНП		СК		ПСНП	
		СК		СК		СК	
Время после реанимации, сутки	1-е	0,53**[0,41; 0,72]	0,29 [0,19; 0,57]	0,92**[0,84; 0,99]	0,76[0,68; 1,10]	4,50**[3,40; 5,92]	2,64[1,68; 5,40]
	3-и	0,42**[0,36; 0,68]	0,24[0,11; 0,80]	1,48**[0,96; 1,93]	1,18**[0,89; 1,83]	4,35**[3,06; 5,62]	4,08**[3,72; 5,16]
	5-е	0,37*[0,18; 0,42]	0,30[0,12; 0,53]	0,74[0,62; 0,82]	0,79[0,61; 0,85]	2,04[1,80; 2,15]	2,32[1,92; 2,15]
	7-е	1,46*[1,08; 1,74]	0,18[0,06; 0,80]	0,83[0,89; 0,87]	0,80[0,76; 0,97]	2,26[2,25; 2,31]	2,12[2,01; 2,28]
	10-е	0,89*[0,46; 1,98]	0,12[0,08; 0,31]	1,44**[1,36; 1,54]	0,81[0,62; 0,85]	5,04**[4,67; 5,58]	2,23[1,76; 2,01]
	14-е	0,79*[0,64; 1,15]	0,23[0,18; 1,03]	0,80*[0,78; 0,89]	0,64[0,68; 0,92]	2,42*[1,92; 2,47]	1,88[1,79; 2,05]
	21-е	0,68*[0,61; 0,81]	0,19[0,10; 0,83]	0,73[0,66; 0,79]	1,53**[1,29; 1,66]	2,14[1,98; 2,25]	4,93**[4,48; 5,64]
	28-е	0,27*[0,27; 0,41]	0,20[0,17; 0,38]	0,69[0,67; 0,73]	0,94*[0,77; 1,13]	1,97[1,82; 2,15]	2,58*[1,87; 3,14]
	35-е	0,22[0,12; 0,49]	0,24[0,08; 0,56]	0,76[0,71; 0,78]	0,73[0,61; 0,74]	2,26[1,91; 2,37]	2,14[1,85; 2,28]

* p<0,05, ** p<0,01 – статистически значимые различия по сравнению с контролем (критерий Манна-Уитни).

В группе после СК значения хемиллюминесценции имели некоторые отличия: спонтанная светимость на протяжении всего эксперимента имела лишь тенденцию к повышению. Также изменения были характерны для показателей амплитуды медленной вспышки и параметров светосуммы. Статистически значимым их повышение было лишь на 3-и, 21-е и 28-е сутки постреанимационного периода, причем уровень подъема значений был менее выраженным, чем в группе ПСНП. Вероятнее всего, это было обусловлено более выраженными микроциркуляторными расстройствами в данной группе, в результате этого нарушается доставка кислорода к тканям глазного яблока и, как следствие, снижаются процессы СРО и ПОЛ при СК по сравнению с ПСНП.

Изучение ТБК-рп в группе ПСНП показало иную динамику в отличие от показателей ХЛ данной группы (табл. 2). В ранние сроки происходило накопление вторичных метаболитов ПОЛ, и только на 5-е сутки постреанимационного периода превышение содержания ТБК-рп на 23,3% от уровня контроля стало достоверным (p=0,0409).

Таблица 2

Содержание ТБК-реагирующих продуктов в тканях глазного яблока в постреанимационном периоде (Ме[25%;75%]), мкМ/г

Время после реанимации, сут.	ПСНП	СК
Контроль	1,09 [0,96;1,21]	1,09 [0,96;1,21]
1-е	1,31 [1,17; 1,54]	1,42 [1,21; 1,52]
3-и	1,25 [0,96; 1,60]	2,0 [1,15; 2,24]
5-е	1,35* [1,10; 2,10]	1,38* [1,22; 1,96]
7-е	1,28 [0,77; 1,85]	1,61* [0,82; 1,85]
10-е	1,73** [1,35; 2,90]	1,84** [1,40; 2,68]
14-е	2,24** [1,25; 2,60]	2,31** [1,76; 2,80]
21-е	1,80* [1,35; 2,10]	2,11* [1,92; 2,53]
28-е	1,79** [1,28; 2,45]	1,64** [1,15; 2,08]
35-е	1,49* [1,30; 1,85]	1,51* [1,26; 1,92]

* p<0,05, ** p<0,01 – статистически значимые различия по сравнению с контролем (критерий Манна-Уитни).

На 7-е сутки вновь отмечалась лишь тенденция к повышению исследуемых показателей, но с 10-х суток постреанимационного периода и до конца наблюдения уровень содержания ТБК-реагирующих продуктов был значимо выше по сравнению с контрольными величинами. Наиболее выраженное превышение уровня ТБК-рп было отмечено на 14-, 21- и 28-е сутки, составившее 205,5% (p=0,0031), 165,1% (p=0,0242) и 164,2% (p=0,0035) соответственно.

В группе СК тенденция к накоплению ТБК-рп, выявляемая с первых суток после

оживления, с 5-х суток постреанимационного периода переходила в устойчивое, статистически значимое превышение показателей контроля (126,6%, $p=0,0356$). Данное достоверное повышенное содержание ТБК-реагирующих продуктов в тканях глазного яблока регистрировалось до конца периода наблюдения (табл. 2).

Изменения активности каталазы тканей глазного яблока после клинической смерти вследствие ПСНП носили следующий характер (табл. 3). На 1-е и 3-и сутки наблюдалось достоверное ее повышение на 46,3% ($p=0,0010$) и на 63,9% ($p=0,0005$) соответственно.

Таблица 3

Показатели антирадикальной защиты в тканях глазного яблока в постреанимационном периоде (Ме[25%; 75%])

Время после реанимации, сутки	Каталаза, мМ/мин·мг		Восстановленный глутатион G-SH, мг%	
	ПСНП	СК	ПСНП	СК
Контроль	5,40 [4,00; 4,50]	6,15 [4,85; 9,05]	11,23[8,97; 13,42]	12,10[9,40; 14,27]
1-е	7,90** [7,30; 9,50]	8,30* [3,90; 10]	15,85**[13,40; 17,31]	14,91*[12,00; 16,83]
3-и	8,85** [8,50; 9,80]	7,40* [6,20; 10,60]	16,71**[14,79; 18,36]	18,62**[16,12; 21,92]
5-е	5,35 [4,50; 5,90]	10,30* [4,40; 12,60]	13,45[11,73; 18,38]	10,14[8,47; 13,50]
7-е	9,45** [8,50; 9,70]	18,50** [16,50; 23,30]	10,80[7,00; 19,50]	12,84[10,30; 15,14]
10-е	10,85** [10,40; 12,00]	7,15 [6,10; 8,00]	11,23[8,54; 14,00]	11,59[9,25; 4,50]
14-е	10,60** [9,20; 11,00]	9,20** [8,40; 10,80]	9,64[7,28; 13,14]	10,23[15,82; 20,39]
21-е	6,30 [5,40; 7,30]	11,40** [10,50; 13,10]	11,19[8,16; 19,50]	13,43[11,14; 19,00]
28-е	6,10 [5,50; 7,00]	7,20** [6,15; 10,50]	13,18[11,00; 15,50]	12,69[24,51; 30,03]
35-е	4,65 [3,90; 6,70]	7,20** [5,00; 9,80]	12,67[9,77; 14,16]	14,08[12,38; 19,01]

* $p<0,05$, ** $p<0,01$ – статистически значимые различия по сравнению с контролем (критерий Манна-Уитни).

К 5-м суткам показатели активности каталазы тканей глазного яблока в группе ПСНП резко падали до уровня контроля. Повторное достоверное повышение исследуемых величин регистрировалось на 7-е сутки – на 75% ($p=0,0004$). В последующие сроки активность каталазы оставалась по-прежнему высокой. Наивысший пик активности наблюдался на 10-е сутки ($p=0,0002$), причем и на 14-е сутки показатели оставались высокими, превышая исходные данные на 96,2% ($p=0,0002$). В последующие дни вплоть до конца периода наблюдения достоверных различий по сравнению с контролем не выявлено.

В группе СК уже с первых суток после оживления регистрировалось достоверное повышение активности каталазы на 34,9% ($p=0,0046$) (табл. 3). Последующие исследования показали статистически значимую активацию данного ферментативного звена антирадикальной защиты практически во все сроки наблюдения. Исключение составляли 10-е сутки постреанимационного периода, когда показатели каталазной активности приближались к контрольным значениям и достоверно от них не отличались.

При оценке уровня восстановленного глутатиона (ВГ), характеризующего неферментативное звено антирадикальной защиты, в первые трое суток было отмечено достоверное повышение его содержания по отношению к контрольным величинам в обеих опытных группах (табл. 3). Данное непродолжительное увеличение ВГ в тканях глазного яблока, по всей видимости, является компенсаторной реакцией, косвенно свидетельствующей об активизации глутатионовых фермент-

ных систем антиоксидантной защиты [2]. В последующие сроки наблюдения отмечалась тенденция к снижению уровня содержания ВГ по сравнению с контрольными величинами.

Заключение

Несмотря на различные модели умирания, динамика показателей свободнорадикального окисления и антирадикальной защиты в постреанимационном периоде у экспериментальных животных была сравнимой и имела определенное сходство, что свидетельствует о наличии общебиологических механизмов выхода организма из постагрессивных состояний. В обеих экспериментальных моделях нами были отмечены две волны усиления процесса ПОЛ в тканях глазного яблока – на 1-е и 3-и сутки постреанимационного периода, а также на 10- и 14-е сутки после оживления. В то же время ограничение липопероксидации и радикалообразования у животных, перенесших смертельную кровопотерю, согласно полученным результатам, может быть обусловлено более выраженными нарушениями микроциркуляции и оксигенации тканей во время ишемии и реперфузии. Выявленное нарушение равновесия между прооксидантной и антиоксидантной системами с накоплением продуктов перекисного окисления липидов, активизацией каталазной и глутатионовой систем защиты свидетельствует о наличии окислительного стресса, который вносит существенный вклад в усиление ишемических и реперфузионных повреждений и может являться предрасполагающим фактором для формирования пролиферативных и дегенеративных изменений органа зрения в отдаленном постреанимационном периоде.

Сведения об авторах статьи:

Самигуллина Айгуль Фидратовна – к.м.н., ассистент кафедры офтальмологии с курсом ИПО ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450000, г. Уфа, ул. Ленина, 3. Тел./факс: 8(347) 275-97-65. E-mail: saf-09@mail.ru.
Нургалева Елена Александровна – д.м.н., профессор кафедры патологической физиологии ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450000, г. Уфа, ул. Пушкина 96/98. Тел./факс: 8(347) 273-85-71. E-mail: nurgaleeva@bk.ru.
Сорокин Алексей Александрович – врач анестезиолог-реаниматолог ГБУЗ «РКЦ». Адрес: 450106, г. Уфа, ул. Ст. Кувыкина, 96. Тел.: 8(347) 255-50-39. E-mail: doctor_lemoor@mail.ru.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антиоксидантная защита сетчатки при экспериментальном гемофтальме у кроликов / Х.П. Тахчиди [и др.] // Офтальмохирургия. – 2003. – № 2. – С. 14-16.
2. Минаева, Л. В. Экспериментальная оценка роли изменений системы глутатиона в реализации побочных цитотоксических эффектов повторного введения циклофосфана: автореф. дисс.... канд. мед. наук. – СПб., 2007. – 26 с.
3. Содержание компонентов комплемента и активных продуктов тиобарбитуровой кислоты в слезной жидкости при экссудативно-геморрагических поражениях сетчатки / С.В. Харинцева [и др.] // Материалы IX съезда офтальмологов России. – М., 2010. – С. 211-212.
4. Харинцева, С.В. Состояние системы «ПОЛ-антиоксидантная защита» у больных с макулярной дегенерацией / С.В. Харинцева, Л.А. Голуб // Круглый стол. МАКУЛА 2008: Всерос. семинар. – С. 306-307.
5. Zarbin, M.A. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration // Archives of Ophthalmology. – 2004. – Vol. 122. – № 4. – P. 598-614.

УДК 617.713-089.843

© Е.О. Филиппова, О.И. Кривошеина, И.В. Запускалов, 2015

Е.О. Филиппова^{1,2}, О.И. Кривошеина¹, И.В. Запускалов¹
**ИНТРАСТРОМАЛЬНАЯ ИМПЛАНТАЦИЯ
 ТРЕКОВЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МЕМБРАН В ЛЕЧЕНИИ
 ЭНДОТЕЛИАЛЬНО-ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСТРОФИИ РОГОВИЦЫ**
¹ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет»
 Минздрава России, г. Томск
²ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский
 Томский политехнический университет», г. Томск

В работе изучена возможность применения трековых полимерных мембран в лечении эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы. Выполнена серия экспериментов на 8 кроликах породы шиншилла, которым моделировали эндотелиально-эпителиальную дистрофию роговицы. Через 3 недели после развития патологического процесса животным интрастромально имплантировали трековые полимерные мембраны «ТОМТРЕК» на основе полимера полиэтилентерефталата (ПЭТФ) с диаметрами пор 0,4 мкм и плотностью 5•106 пор/см². Поры в мембранах формировались при облучении полимера ПЭТФ ионами ⁴⁰Ar⁺8 с энергией 41,5 МэВ с последующей химической обработкой в растворе щелочи. Через 5 недель осуществляли забор материала. Установлено, что интрастромальная имплантация трековых полимерных мембран при эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы в эксперименте протекает без отторжения имплантата и способствует стабилизации патологического процесса в роговой оболочке.

Ключевые слова: эндотелиально-эпителиальная дистрофия роговицы, кератопластика, трековые полимерные мембраны.

Е.О. Filippova, O.I. Krivosheina, I.V. Zapuskalov
**INTRASTROMAL IMPLANTATION OF POLYMER TRACK MEMBRANE
 IN THE ENDOTHELIAL - EPITHELIAL CORNEAL DYSTROPHY TREATMENT**

This work searches the possibility of using nuclear track membrane for ophthalmology in endothelial - epithelial corneal dystrophy treatment. Experiments were carried out on 8 rabbits. The disease model was made after track membrane implantation. The track membrane "TOMTREK" based on PET with pores diameters 0.4 μm and 5*106 pores/cm² density was implanted after 3 weeks of forming disease model.

The pores were formed by irradiating the polymer PET 40Ar +8 ions with energy 41,5 MeV. After irradiation, the membrane was chemically treated in the alkaline solution. After 5 weeks eyes were enucleated and fixed for light microscopy. Morphological results found that implantation of track porous membranes in the corneal stroma at endothelial - epithelial corneal dystrophy proceeded without rejection of the implant and helped to stabilize the pathological process in the cornea.

Key words: endothelial - epithelial corneal dystrophy, keratoplasty, polymer track membrane.

Ведущее место среди причин слепоты и слабовидения занимают повреждения и заболевания роговицы. Эндотелиально-эпителиальная дистрофия (ЭЭД) роговицы является наиболее распространенной причиной корнеального слабовидения на территории Российской Федерации [2]. ЭЭД роговицы – тяжелое и прогрессирующее заболевание, трудно поддающееся лечению [3]. В патогенезе ЭЭД ведущую роль иг-

рает несостоятельность барьерной функции слоя клеток эндотелия, что ведет к пропитыванию внутриглазной жидкостью стромы с постепенным распространением отека на всю толщину роговой оболочки, следствием чего являются нарушение прозрачности роговицы и значительное снижение остроты зрения [2,3]. Постепенно в патологический процесс вовлекается передний эпителий с возникновением шерохо-