

УДК 617.13–002:616.379–008.64–092.9–07+577.11

Вивчення окисно-відновних потенціалів тіолової системи в рогівці при експериментальному кератиті на фоні розвитку діабету

Т. М. Жмудь, к. м. н.

Вінницький національний
медичний університет
ім. М. І. Пирогова

E-mail: Gtatyana@email.ua

Ключові слова: кератит, стрептозототициновий діабет, відновлена форма глутатіона, окислена форма глутатіона.

Ключевые слова: кератит, стрептозототициновий діабет, відновлена форма глутатіона, окислена форма глутатіона.

Вступ. На сьогоднішній день кератити являють собою серйозну проблему офтальмології через широкую розповсюдженість, схильність до хронізації процесу, труднощі в лікуванні і нерідко важкі наслідки, такі як перфорація рогівки, ускладнена катаракта, вторинна глаукома, неврит зорового нерва, ендодальміт та ін. [2].

В останній час залишаються недостатньо вивченими етіологія і патогенез кератитів, що обумовлює відсутність високоефективних методів їх лікування. Використання традиційних методів лікування не завжди призводить до видужання хворого і попереджує виникнення рецидивів. Це обумовлює актуальність пошуку нових методів патогенетичної дії при кератитах [3].

При кератиті спостерігається помутніння рогівки, що розвивається внаслідок її інфільтрації, яка супроводжується зменшенням прозорості і блиску, порушенням сферичності і чутливості [13].

В цілому ряді досліджень виявлена роль поверхневих структур ока в захисно-приспосувальних реакціях органа зору. Так, виявлена нова функціональна особливість кон'юнктиви, пов'язана з транспортом важливого детоксиканта глутатіона [8, 9, 11].

Введение. Проведение исследований патологических состояний тканей поверхности глазного яблока на сегодняшний день остается актуальным.

Цель. Изучить состояние окислительно-восстановительных потенциалов тиоловой системы в роговице при экспериментальном кератите на фоне развития диабета.

Материалы и методы. Для проведения экспериментов было использовано 52 кролика, которые были разделены на три группы: первая — контрольная группа (8 кроликов), вторая — опытная группа, животные с кератитом (23 кролика), третья — опытная группа, животные с кератитом на фоне стрептозототицинового диабета (21 кролик). В ткани роговицы производили определение восстановленного и окисленного глутатиона.

Результаты. В условиях развития экспериментального кератита и стрептозототицинового диабета установлено снижение уровня восстановленного и возрастание уровня окисленной формы в ткани роговицы

Выводы. 1. При развитии кератита нарушение глутатинового статуса в тканях роговицы более значительно выражено у животных с диабетом, уровень восстановленного глутатиона у них был понижен по сравнению с животными с кератитом без стрептозототицинового диабета на 11,4 % — в первый срок, во 2 срок — на 18,0 %, в 3 срок — на 25,5 %. 2. При развитии экспериментального кератита и стрептозототицинового диабета отмечено возрастание уровня окисленной формы глутатиона в роговице. В различные сроки наблюдения концентрация окисленного глутатиона в роговице в этих условиях повысилась на 7,1 %, 10,1 % и 20,0 %.

Всі захисні функції глутатіон виконує в своїй відновленій формі, окислений глутатіон функціонувати в реакціях захисту тканин ока не може, і якщо він не відновлюється глутатіонредуктазою, то вільно дифундує з тканин, що веде до зниження загального рівня глутатіона в кришталику [6, 7].

Завдяки цій функціональній особливості кон'юнктиви в сльозу потрапляє значна кількість глутатіона, і його концентрація в цій біологічній рідині перевищує рівень в плазмі крові. Безумовно, що високий рівень глутатіона в сльозі з урахуванням його функціональних показників дозволяє їй представляти сильний захисний бар'єр для тканин ока і, особливо, рогівки.

Відновлений глутатіон через власне окислення відновлює і нейтралізує перекис водню, а також органічні гідроперекиси, приймає участь в процесах детоксикації, забезпечує стабільність білкових і ліпідних структур клітинних мембран [7].

В забезпеченні внутрішньоклітинного балансу окисно-відновної системи глутатіона важливу роль відіграє тіоловий статус, який визначає швидкість

окислення тіолових груп під впливом окисного стресу в тканинах і біологічних рідинах ока.

Інтегральним показником тіолового статусу являється рівень вільних сульфідних груп і глутатіона.

На цей час проведені дослідження, в яких виявлено, що розвиток кератиту різко порушує глутатионовий статус в тканині рогівки, що спостерігалось у тварин з алергічним кон'юнктивітом. Рівень відновленого глутатіона в останньому випадку був відносно знижений на 25 % [1].

Кератит у тварин з алергічним кон'юнктивітом супроводжувався значним пошкодженням окисно-відновних процесів в рогівці. Активність цитозольного ферменту — лактатдегідрогенази — знижувалася на 14,3 % — в перший строк спостереження, а показник активності мітохондріального ферменту (малатдегідрогенази) — на 17,6 % — в другий строк спостереження у тварин з кератитом на фоні кон'юнктивіта порівняно з групою, де кератит розвивався без запального процесу в кон'юнктиві [1].

Особливо перспективним в цьому напрямку є стан тіолової системи в рогівці при запальних захворюваннях переднього відділу ока в умовах розвитку діабету.

В результаті досліджень було встановлено, що при розвитку стрептозотоцинового діабету відмічається різке падіння відновленого потенціалу глутатинової системи, в першу чергу за рахунок різкого зниження рівня відновленої форми кофермента [6, 12, 13].

Було також показано, що при дослідженні різних форм глутатіона у пацієнтів з початковими стадіями діабетичної ретинопатії рівень його відновленої форми знижувався на 60 %, потенціал неферментативної і ензиматичної антиоксидантної системи в сітківці — рівень відновленого глутатіона — значно знижувався [5].

На сьогоднішній день відсутні дані про зміни глутатинового статусу в рогівці при експериментальному кератиті на фоні розвитку експериментального діабету.

Мета роботи — вивчити стан окисно-відновних потенціалів тіолової системи в рогівці при експериментальному кератиті на фоні розвитку діабету.

Матеріали і методи

Для проведення експериментів було використано 52 кролика породи шиншила масою 2,2–2,9 кг.

Піддослідні тварини були розділені на три групи: перша — контрольна група (8 кроликів), друга — дослідна група 23 тварини з кератитом, третя — дослідна група, тварини з кератитом в умовах стрептозотоцинового діабету (21 кролик).

При проведенні експерименту були дотримані рекомендації відносно досліджень на тваринах, що прийняті міжнародним товариством при вивченні органа зору.

Експериментальний кератит у тварин викликали інтрастромальною ін'єкцією 50 мкл 0,2 % ендотоксин ліпополісахариду на фосфатному буфері [10].

Діабет викликали шляхом ін'єкції стрептозотоцина (55 мг на 1 кг маси тіла, інтраперитонеально). Інсулін вводився діабетичним тваринам з метою попередження зниження ваги при умові підтримання гіперглікемії (рівень цукру в крові коливався від 20 до 25 мМ).

В тканині рогівки в строки: 24 год, 48 та 72 год визначали відновлений і окислений глутатіон.

Для визначення відновленого глутатіона готували гомогенат тканини з застосуванням 6 % хлорної суспензії в співвідношенні 1:10 (вага тканини: об'єм середовища для гомогенізації). Після центрифугування при 5°C протягом 10 хв при 1000 об/хв надосадкову рідину нейтралізували 1,75 М розчином трьохзаміщеного фосфата калія. В отриманому нейтральному екстракті визначали вміст відновленого глутатіона за допомогою ензиматичного метода (мкмоль/г тканини).

Принцип методу визначення окисленої форми глутатіона полягає в тому, що в результаті ферментативного відновлення глутатіона глутатіонредуктазою відбувається окислення відновленої форми нікотинамідаденіндинуклеотидфосфата (НАДФН₂), спад якого реєструють спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм.

Хід роботи. Гомогенат готували в співвідношенні 1:10 (вага тканини: об'єм середовища для гомогенізації). Після закінчення визначення вмісту тіолової форми глутатіона, в ту ж кювету добавляли 0,1 мл 11 мМ розчину НАДФН. Перемішували і реєстрували оптичну щільність (E_4) при довжині хвилі 340 нм. Добавляли 0,01 мл суспензії глутатіонредуктази (0,018 Ед/мл реакційного розчину) і реєстрували оптичну щільність розчину після закінчення реакції (E_3). Діапазон визначаємих рівнів відновленої і окисленої форми — від 5 до 200 мкг/мл відповідного розчину. Середнє значення коефіцієнта варіації для вказаного діапазону відновленої форми — 4,0 %, окисленої форми — 5,0 %. Для вимірювань використовували спектрофотометр СФ-26 з робочим діапазоном по шкалі «оптична щільність» в оптимальному інтервалі від 0,1 до 0,5. Вміст окисленого глутатіона вимірювали в мкмоль/г тканини.

Отримані дані піддавали статистичній обробці за допомогою пакета SPSS 11.0 [4].

Результати та їх обговорення

Дані про вимірювання концентрації відновленої і окисленої форми глутатіона в рогівці при розвитку експериментального кератита і стрептозотоцинового діабету представлені в таблиці 1.

При визначенні рівня відновленої форми глутатіона в рогівці тварин в умовах розвитку діабета було встановлено, що його показники знизились до (11,64±0,84) мкмоль/г, що склало — 77,0 %, порівняно з нормою (15,12±0,87) мкмоль/г (p<0,01).

Як видно з представлених даних, рівень відновленої форми глутатіона в рогівці тварин в групі з кератитом знизився до 65,0 %, що становило (9,83±0,69) мкмоль/г — через 24 години (p<0,001), до 59,7 %, тобто (9,02±0,60) мкмоль/г — через 48 годин спостереження (p<0,001), і до 70,6 %, складаючи при цьому (10,68±0,72) мкмоль/г — через 72 години в порівнянні з нормою (p<0,001).

Із даних, приведених в таблиці 1, видно, що рівень відновленого глутатіона в рогівці тварин з ке-

Таблиця 1. Зміна концентрації відновленої і окисленої форми глутатіона в рогівці при розвитку експериментального кератита і стрептозотозинного діабету

Досліджу- ваний по- казник	Статис- тич. по- казники	Норма	Строки досліджень			
			24 го- дини	48 годин	72 го- дини	
			Кератит			
GSH, мкмоль/г	n	15	15	15	14	
	M	15,12	9,83	9,02	10,68	
	m	0,87	0,69	0,60	0,72	
	p	–	<0,001	<0,001	<0,001	
	%	100,0	65,0	59,7	70,6	
	p ₁	–	–	–	–	
	% ₁	–	100,0	100,0	100,0	
	Кератит+діабет					
	n	15	15	14	13	
	M	15,12	8,71	7,40	7,96	
	m	0,87	0,64	0,48	0,68	
	p	–	<0,001	<0,001	<0,001	
	%	100,0	57,6	48,9	52,64	
	p ₁	–	>0,05	<0,05	<0,05	
% ₁	–	88,6	82,0	74,5		
GSSG, мкмоль/г	Кератит					
	n	15	15	15	14	
	M	1,28	1,70	1,78	1,65	
	m	0,08	0,12	0,13	0,10	
	p	–	<0,01	<0,01	<0,05	
	%	100,0	132,8	139,1	128,9	
	p ₁	–	–	–	–	
	% ₁	–	100,0	100,0	100,0	
	Кератит+діабет					
	n	15	15	14	13	
	M	1,28	1,82	1,96	1,98	
	m	0,08	0,14	0,13	0,12	
	p	–	<0,01	<0,001	<0,001	
	%	100,0	142,2	153,1	154,7	
p ₁	–	>0,05	>0,05	<0,05		
% ₁	–	107,1	110,1	120,0		

Примітка: p – рівень значимості відмінностей в залежності від строку по відношенню до норми; p₁ – рівень значимості відмінностей в залежності від строку по відношенню до групи «Кератит».

ратитом і діабетом знижувався через 24 години — до 57,6 %, тобто (8,71±0,64) мкмоль/г порівняно з нормою (p<0,001).

Через 48 години спостереження даний показник був знижений до 48,9 % (7,40±0,48) мкмоль/г по відношенню до норми (p<0,001), а через 72 години знизився до 52,6 %, складаючи (7,96±0,68) мкмоль/г відносно норми (p<0,001).

При співставленні даних двох дослідних груп, можна відмітити, що рівень відновленого глутатіона в рогівці при кератиті і модельованому стрептозотозинному діабеті знижувався в більшій мірі порівняно з даними, коли кератит викликали у тварин без діабету. Так, через 24 години зниження складало

11,4 %, через 48 годин — 18 % (p<0,05), через 72 години — 25,5 % (p<0,05).

Слід зазначити, що рівень окисленої форми глутатіона в рогівці тварин в умовах розвитку діабету був підвищений до — (1,57±0,11) мкмоль/г, що склало — 122,7 %, порівняно з нормою (1,28±0,08) мкмоль/г.

В результаті проведених досліджень було показано, що рівень окисленої форми глутатіона в рогівці тварин з кератитом підвищився до 132,8 % (1,70±0,12) мкмоль/г — через 24 години (p<0,01), до 139,1 % (1,78±0,13) мкмоль/г — через 48 годин спостереження (p<0,01), і до 128,9 % (1,65±0,10) мкмоль/г — через 72 години відносно норми (p<0,05).

Рівень окисленого глутатіона в рогівці тварин з кератитом і діабетом підвищувався через 24 години — до 142,2 % (1,82±0,14) мкмоль/г порівняно з нормою (p<0,01).

Через 48 годин даний показник був підвищений до 153,1 %, що склало (1,96±0,13) мкмоль/г по відношенню до норми (p<0,001). Через 72 години також відмічається збільшення рівня окисленого глутатіона 154,7 %, тобто (1,98±0,12) мкмоль/г відносно норми (p<0,001).

Необхідно відмітити, що в усі строки спостереження у тварин з кератитом в умовах розвитку діабету відмічається підвищення концентрації окисленого глутатіона, в порівнянні з групою тварин з кератитом без діабета. Так, через 24 години збільшення складало — 7,1 %, через 48 годин — 10,1 %, через 72 години — 20,0 %.

Узагальнюючи отримані дані по вивченню стану окисно-відновних потенціалів тілової системи в рогівці при експериментальному кератиті на фоні розвитку діабета, необхідно відмітити значне порушення відновленого потенціалу глутатіонової системи в тканині рогової оболонки. При кератиті на фоні діабету це порушення мало більш різкий характер, ніж у тварин з кератитом без діабету.

Висновки

1. Виявлено, що при розвитку кератита порушення глутатіонового статусу в тканині рогівки більше виражено у тварин з діабетом, рівень відновленого глутатіона був знижений порівняно з групою тварин з кератитом без діабету через 24 години на 11,4 %, через 48 годин — на 18,0 %, через 72 години — на 25,5 %.

2. При розвитку експериментального кератита і стрептозотозинного діабета відмічено зростання рівня окисленої форми глутатіона в рогівці. В різні строки спостереження концентрація окисленого глутатіона в рогівці в цих умовах підвищилась на 7,1 %, 10,1 % і 20,0 %.

Література

1. **Гайдамака Т. Б., Рафалюк С. Я.** Влияние наличия синдрома сухого глаза на состояние тиоловой системы при эндотоксин-индуцированном кератите в эксперименте // Офтальмол. журн. — 2014. — № 6. — С. 72–77.
2. **Дрожжина Г. И.** Вирусные заболевания роговицы и конъюнктивы // Здоров'я України. — 2002. — № 5. — С. 35–36.
3. **Майчук Ю. Ф.** Фармакотерапия воспалительных заболеваний глаз: вчера, сегодня, завтра // Материалы научно-практич. конф. «Актуальные вопросы воспалительных заболеваний глаз». — Москва, 2002. — С. 7–17.
4. **Наследов А.** SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках / Наследов А. — СПб.: Питер, 2005. — 416 с.
5. **Олейник Т. В.** Современные патогенетически ориентированные пути профилактики и лечения начальных стадий диабетической ретинопатии: дис. ...д-ра мед. наук / Т. В. Олейник. — Донецк, 2010. — 268 с.
6. **Петруня А. М.** Исследование тиолового обмена и окислительно-восстановительных процессов в роговице при экспериментальном конъюнктивите / Петруня А. М., Мухаммед Абдульрахман Кутайни // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. — 2012. — Вип. 1 (109). — С. 259–272.
7. **Селиванова О. В.** Клинико-экспериментальное обоснование коррекции уровня тиоловых соединений в ткани конъюнктивы и слезной жидкости при медикаментозном лечении конъюнктивитов: автореф. дис. канд. мед. наук: спец. 14.01.18 «Офтальмология» / Селиванова О. В. — Киев, 2011. — 20 с.
8. **Семесько С. Г.** Клиническое значение исследования антиоксидантного статуса в офтальмологии // Вестн. офтальмол. — 2005. — № 3. — С. 44–47.
9. **Azar D. T.** Altered epithelial-basement membrane interactions in diabetic corneas / Azar D. T., Spurr-Michaud S. J. // Arch. Ophthalmol. — 1992. — Vol. 110. — P. 537–540.
10. **Bergmeyer H. U.** Methods of enzymatic analyses / H. U. Bergmeyer. — 1984. — 2220 p.
11. **Bilen H.** Conjunctival flora in patients with type 1 or type 2 diabetes mellitus / H. Bilen, O. Ates, N. Astam, H. Uslu, G. Akcay, O. Baykal // Adv. Ther. — 2007. — Vol. 24. — P. 1028–1035.
12. **Chikama T.** Deviated mechanism of wound healing in diabetic corneas / T. Chikama, M. Wakuta, Y. Liu, T. Nishida // Cornea. — 2007. — Vol. 26 Suppl. 1: S75–S81.
13. **Citic M., Berker N., Haksever H.** Conjunctival impression cytology in non-proliferative and proliferative diabetic retinopathy // Int. J. Ophthalmol. — 2014. — Vol. 7. — P. 321–325.
14. **Didenko T. N.** Clinical and pathogenetic features of neurotrophic corneal disorders in diabetes / Didenko T. N., Smoliakova G. P., Sorokin E. L., Egorov V. V. // Vestn. Oftalmol. — 1999. — Vol. 115. — P. 7–11.

Поступила 22.06.2015