

© А. В. Колесников, О. И. Баренина, А. В. Шулькин

УДК 617.741 + 004.1 + 085.27

АКТИВНОСТЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ХРУСТАЛИКА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КАТАРАКТЕ НА ФОНЕ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ АНТИОКСИДАНТОВ*

А. В. Колесников, О. И. Баренина, А. В. Шулькин (Рязань, Россия)

Представлена экспериментальная оценка влияния местного применения прямого синтетического антиоксиданта ионола в сравнении с природным биоантиоксидантом – апикомпозицией, на свободнорадикальный статус хрусталика при формировании катаракты. Апикомпозиция состояла из меда, нативного маточного молочка и прополиса. Экспериментальная катаракта индуцировалась введением в стекловидное тело раствора диквата дибромида. Изучалась динамика катарактального процесса, а также в гомогенате хрусталика определялась выраженность окислительного стресса, суммарная ёмкость антиоксидантной системы, а также активность антиоксидантных ферментов. Показано, что инстилляции в конъюнктивальную полость раствора ионола приводили к регрессу и стабилизации помутнений хрусталика, значительному снижению активности перекисного окисления липидов, нормализации активности глутатион-зависимых антиоксидантных ферментов. Клинические и биохимические эффекты апикомпозиции также были достаточно выражены, но более результативным по всем показателям оказался ионол. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о патогенетической обоснованности использования при катаракте как синтетических, так и природных антиоксидантов.

Ключевые слова: катаракта, свободнорадикальный статус хрусталика, антиоксиданты, ионол, апикомпозиция.

* Статья подготовлена по результатам работы Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (1-4 октября 2013 г.) в рамках реализации Программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет» на 2012–2016 гг.

Колесников Александр Вячеславович – кандидат медицинских наук, доцент кафедры глазных и ЛОР-болезней, Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации

E-mail: kolldoc@mail.ru

Баренина Ольга Игоревна – аспирант кафедры глазных и ЛОР-болезней, Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации

E-mail: kolyuchk@mail.ru

Шулькин Алексей Владимирович – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры фармакологии с курсом фармации и фармакотерапии факультета дополнительного профессионального образования, Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации

E-mail: alekseyshulkin@rambler.ru

Введение.

Перекисное окисление липидов (ПОЛ), развивающееся в результате повышенной продукции свободных радикалов и снижения активности антиоксидантной системы защиты (АОС), носит цепной свободнорадикальный характер и приводит к изменению структуры и функции мембран, что в свою очередь вызывает глубокие нарушения метаболизма и гибель клеток [1–2].

Типичным примером свободнорадикальной патологии является катаракта, развитие которой во многом обусловлено повышенной продукцией свободных радикалов на фоне истощения АОС хрусталика [3–5]. Тем не менее, в настоящее время не существует местных антикатарактальных препаратов с доказанной прямой антиоксидантной активностью в ткани хрусталика, поэтому актуальной и теоретически обоснованной является разработка таких препаратов. Ранее нами в эксперименте *in vivo* исследован в качестве возможного антикатарактального средства 2,2 % масляный раствор ионола (2,6-ди-*tert*-бутил-4-метилфенол) – синтетический пространственно-затрудненный фенол, обладающий доказанной высокой антирадикальной и антиоксидантной активностью в системах *in vitro* [6]. Применение ионола при экспериментальной дикват-индуцированной катаракте существенно снижало активность ПОЛ, увеличивало суммарную емкость АОС и активность глутатион-зависимых антиоксидантных ферментов в ткани хрусталика [6]. Известно, что синтетические препараты обладают целым рядом побочных эффектов, в связи с чем, в последние годы во всем мире возрос интерес к биологически активным веществам природного происхождения, в том числе, к биоантиоксидантам. Среди них одной из

наиболее высоких активностей обладают продукты пчеловодства, содержащие в своем составе полифенольные соединения [7]. При этом, более выраженный эффект достигается при комбинировании в одном препарате разных апипродуктов. Поэтому целью настоящего исследования являлось сравнение активности ПОЛ и состояния АОС хрусталика при экспериментальной катаракте на фоне местного применения ионола и апикомпозиции.

Материал и методы.

Работа выполнена на 39 кроликах-самцах (78 глаз) породы Шиншилла, средним весом 2000 ± 200 г и возрастом 8–10 месяцев. На 3 интактных животных (6 глаз) были определены нормальные значения исследуемых показателей. Экспериментальная катаракта воспроизводилась на обоих глазах 36 животных (72 глаза) химической индукцией свободнорадикального окисления биополимеров тканей глаза по методу Bhuyan K. C., Bhuyan D. C., 1991 [8] в нашей модификации, для чего в стекловидное тело вводили однократно 30 мкл стерильного раствора диквата дибромид в дозе 600 нмоль. В дальнейшем данные животные были разделены на 3 серии: первая серия – 12 кроликов (24 глаза) – контроль катаракты без лечения, вторая серия – введение 2,2 % масляного раствора ионола (И2,2) на фоне экспериментальной патологии, третья серия – введение апикомпозиции (АК), включающей в себя экстракт прополиса, 50 % водный раствор меда, 2 % водный раствор нативного маточного молочка на фоне экспериментальной катаракты.

Помутнения хрусталика определяли методами проходящего света и биомикроскопии. К концу каждого интервала выведения животных из опыта оценивали динамику катарактального процесса по 3

критериям: прогресс (нарастание патологических изменений), стабилизация и регресс (уменьшение патологических изменений). Лечение начинали с 7-х суток, когда формировались начальные признаки помутнения хрусталиков, и проводили путем инстилляций препаратов в конъюнктивальную полость глаз 3 раза в день.

Препараты на основе продуктов пчеловодства готовились по авторской технологии. Для биохимических исследований животных выводили из опыта методом газовой эмболии под тиопенталовым наркозом на 14, 28, 42 и 56 сутки эксперимента. На каждый срок из опыта выводили по 3 кролика (6 глаз). Затем глаза энуклеировали и выделяли кортекс хрусталика. В его гомогенате определяли концентрацию ТБК-реактивных продуктов ПОЛ (в дальнейшем, условно, малонового диальдегида (МДА) – кМДА) (Гаврилова В. Е. и др., 1987); суммарную емкость АОС ткани (по продолжительности лаг-фазы накопления МДА (лаг-МДА) и максимальной скорости накопления МДА за 5-ти минутный интервал (сМДА) в инкубируемом при 37°C в течение 60 минут гомогенате тканей) (Patel R. P. et al., 2001); концентрацию небелковых (GSH) сульфгидрильных групп (по методу Ellman G. L., 1959); активность Se-зависимой глутатионпероксидазы (GPx) (по Paglia D. E., Valentine W. N., 1967 в модификации Ланкина В. З., 1976), глутатион-S-трансферазы (GT) (по Keen J. N., Iakoby W. B., 1978).

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием программ «Биостат» и Statsoft Statistica 6.1. Характер распределения данных определяли по критерию Шапиро-Уилка. Для исследования статистической значимости показателей, имеющих нормальное распределение,

использовали тест ANOVA, а данных имеющих распределение отличное от нормального – тест Крускала-Уоллиса. Различия между сериями определяли по критерию Ньюмена-Кейсла.

Результаты.

Введение в стекловидное тело раствора диквата дибромида вызывало появление начальных признаков катаракты у части животных на 2 сутки, тогда как к 7 суткам эти изменения наблюдались у всех животных. Зафиксировано появление мелких субкапсулярных и кортикальных вакуолей, единичных точечных помутнений в задних и передних корковых слоях. С 7 до 14 суток во всех глазах количество мелких вакуолей в коре несколько увеличивалось при неизменном размере уже имевшихся, появлялись симптомы диссоциации и зияния швов коры. Размеры и количество белковых агрегатов практически не изменялись. С 14-х до 28-х суток во всех случаях было зафиксировано слияние вакуолей, увеличение размеров и числа белковых агрегатов. Площадь зон диссоциации коры увеличивалась, зияние швов коры стало больше. Было отмечено формирование водяных щелей, при чем, к 28-м суткам их содержимое начало мутнеть. Появлялись участки разрушения волокон в местах выраженной диссоциации. Набухание ткани хрусталика увеличивалось, что проявлялось некоторым уменьшением глубины передней камеры. С 28-х до 42-х суток в 11 глазах было зафиксировано значительное разрушение волокон и упорядоченной структуры кортекса изучаемой ткани. Количество белковых агрегатов и их размеры, так как и вакуолей, практически не изменялось. Содержимое водяных щелей помутнело, их границы стали трудно различимы. Зоны разрушения волокон коры хрусталика заняли

всю площадь диссоциации. Степень набухания не изменилась. В 1 случае за этот период катаракта оставалась без динамики. С 42-х до 56-х суток эксперимента в 5 случаях нарастали дезорганизация и разрушение волокон кортекса, белковые агрегаты существенно увеличивались. Число вакуолей уменьшалось, а размеры несколько увеличивались за счёт слияние соседних. Водяные щели как морфологический элемент исчезали, на их месте сформировывались участки помутнения коры. В 1 глазу динамики катарактальных изменений хрусталика отмечено не было. У всех животных интравитреальная инъекция раствора диквата дибромида не вызывала воспалительной реакции оболочек глаза. Внутриглазной гипертензии зафиксировано не было. Формирование катаракты сопровождалось существенной активацией ПОЛ (повышение концентрации кМДА, снижение содержания GSH) при значимом истощении АОС (уменьшение активностей GPx и GT).

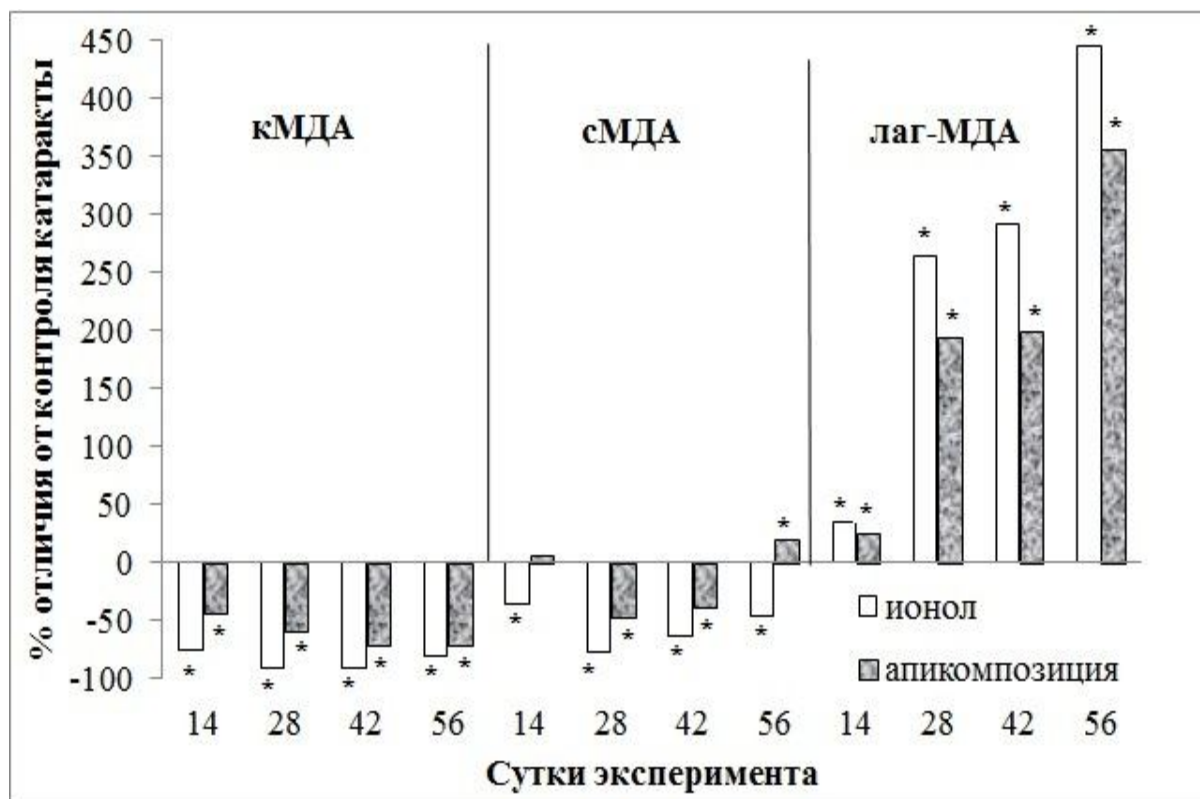
В глазах с прогрессирующей катарактой при использовании И2,2 и АК полностью отсутствовало формирование водяных щелей в коре хрусталика и грубых помутнений, во всех случаях не было зафиксировано явных признаков набухания ткани хрусталика (глубина передней камеры не менялась), не происходило формирования крупных белковых агрегатов и вакуолей. При терапии И2,2 до 28-х суток эксперимента не наблюдались симптом зияния швов коры и существенная деструкция волокон хрусталика, тогда как при лечении АК эти морфологические признаки были зафиксированы уже после 14-х суток опыта.

Биохимические эффекты проводимого лечения были следующие. На 14 и 28 сутки при лечении указанными средствами кМДА была ниже, чем в серии без лечения ($p < 0,05$) (рис. 1). По степени снижения кМДА наиболее эффективным был ионол (на 74,3 % и 90,0 % ниже контроля, $p < 0,05$). АК оказывала меньший, но достоверный эффект (на 43,8 и 58,8 % ниже контроля, $p < 0,05$). На 42 сутки характер и степень влияния испытуемых препаратов на кМДА были прежними (рис. 1). К концу срока наблюдения кМДА оставалась ниже контроля на фоне И2,2 на 80,2 %, а на фоне АК – на 70,2 % ($p < 0,05$), однако, нормы эти показатели не достигали.

Скорость накопления МДА при лечении ионолом на 14 сутки была на треть ниже контроля ($p < 0,05$), а на 28 сутки – на 77,1 % ($p < 0,05$) (рис. 1). На фоне АК сМДА на 28 сутки была ниже контроля на 46,9 % ($p < 0,05$). К 42 дню указанная тенденция сохранялась. На 56 сутки при использовании И2,2 отмечалась нормализация сМДА, а на фоне АК она превышала контроль на 20,0 % ($p < 0,05$) и оставалась существенно выше нормы.

На 14 сутки лаг-МДА была достоверно выше, чем в контроле при использовании И2,2 (на 34,5 %, $p < 0,05$) и АК (на 25,7 %, $p < 0,05$) (рис. 1). На 28 и 42 сутки было отмечено наибольшее значение лаг-МДА для И2,2 и АК, а к 56 дню данный показатель превышал контроль на фоне И2,2 на 444,4% ($p < 0,05$), АК – на 355,6% ($p < 0,05$). Применение И2,2 и АК позволило нормализовать продолжительность лаг-МДА во все сроки наблюдения.

Изменения кМДА, сМДА и лаг-МДА в хрусталике животных серий лечения по сравнению с контролем катаракты (* – $p < 0,05$ – достоверные различия по сравнению с показателями животных серии контроля катаракты).



Наиболее высокий уровень GSH на фоне лечения был установлен на 42 сутки, когда концентрация GSH превышала контроль на фоне И2,2 в 20,5 раза ($p < 0,05$), а на фоне АК – в 21,5 раз ($p < 0,05$) (рис. 2). На 56 сутки указанная тенденция сохранялась. Разница в концентрации GSH в сравнении с нормой на фоне И2,2 на протяжении всего опыта была недостоверной. При использовании АК концентрация GSH соответствовала норме и только на 28 сутки была снижена на 30,3% ($p < 0,05$).

Активность антиоксидантных ферментов изменялась неоднозначно в различных сериях (рис. 2). На 14 сутки активность GPx не отличалась от контроля для всех препаратов. На 28 день при использовании АК этот показатель превышал контроль на 40,0 % ($p < 0,05$), а на фоне И2,2 – на 32 %, 5 % ($p < 0,05$). На 42 сутки GPx была достоверно выше, чем в контроле на фоне

применения АК (на 125,7 %, $p < 0,05$) и И2,2 (на 112,5 %, $p < 0,05$). К 56 суткам GPx была достоверно выше контроля при лечении И2,2 (в 3,4 раза, $p < 0,05$), АК (в 3,3 раза, $p < 0,05$) и была идентична интактной ткани. Уже на 14 сутки активность GT была выше по отношению к контролю для И2,2 (на 102,9 %, $p < 0,05$), АК (на 26,6 %, $p < 0,05$). На 28 день на фоне всех препаратов активность фермента сохранялась на высоком уровне с увеличением разницы с контролем, а на 42 сутки превышала его при применении И2,2 в 5 раз ($p < 0,05$) и АК в 3 раза ($p < 0,05$). На 56 сутки активность GT при использовании И2,2 была на порядок выше, чем в серии контроля (в 9,8 раза, $p < 0,05$) и значительно превышала норму. На фоне АК активность GT превышала контроль в 5,3 раза ($p < 0,05$) и приближалась к норме.

Обсуждение.

На фоне применения И2,2 нами было получено выраженное снижение кМДА в ткани хрусталика относительно контроля, что отражает практическую нормализацию активности ПОЛ. Также было зафиксировано улучшение функционального состояния антиоксидантной системы хрусталика в виде увеличения продолжительности лаг-МДА и снижения сМДА в хрусталике. Являясь липофильным соединением, ионол обладает достаточно высокой антирадикальной активностью, что позволяет ему, инактивируя радикалы, уменьшать истощение эндогенных компонентов АОС ткани и пополнять пул липофильных антиоксидантов в исследуемой ткани [6]. Отсутствие достоверного изменения относительно нормальной ткани активности GPx, видимо, связано с предотвращением перекисной дегградации мембран под действием ионола. Без достаточного разрушения фосфолипидов мембран нет активации цитозольной Se-зависимой GPx, без достаточно высокой активности ПОЛ уменьшается степень окисления и инактивации этого фермента продуктами реакций свободнорадикального окисления биополимеров. Высокая активность GT может быть объяснена индукцией этого фермента ионолом и недостаточной для инактивации фермента активности ПОЛ [9]. Применение препарата на основе апипродуктов вызывало выраженное снижение активности ПОЛ и улучшение состояния АОС. Было зафиксировано существенное уменьшение кМДА, увеличение суммарной емкости АОС и улучшение функционального состояния ферментного глутатион-зависимого звена АОС. Выраженный антиоксидантный эффект комбинированного препарата, видимо, связан с прямым действием антиоксидантных

компонентов АК. Увеличение суммарной емкости АОС хрусталика может быть объяснено встраиванием прямых биоантиоксидантов АК в АОС хрусталика, а также более высокой активностью GPx и GT на фоне достаточно высокой концентрации восстановленного глутатиона. Отсутствие инактивации GT при повышенной относительно уровня нормы активности GPx может свидетельствовать о напряжении антиоксидантной защиты, которая предотвратила значительное разрушение мембран и инактивацию GT. Более высокая концентрация GSH в тканях хрусталика относительно группы контроля катаракты может быть связана со снижением активности ПОЛ и уменьшением потребления GSH. Вероятно, позитивное влияние компонентов АК на метаболизм хрусталика также могло способствовать поддержанию высокой концентрации GSH, так как для ферментативного восстановления этого трипептида необходим достаточный уровень НАДФ*H₂. Достигнутые изменения характера течения и тяжести патологического процесса согласуются с полученными биохимическими эффектами.

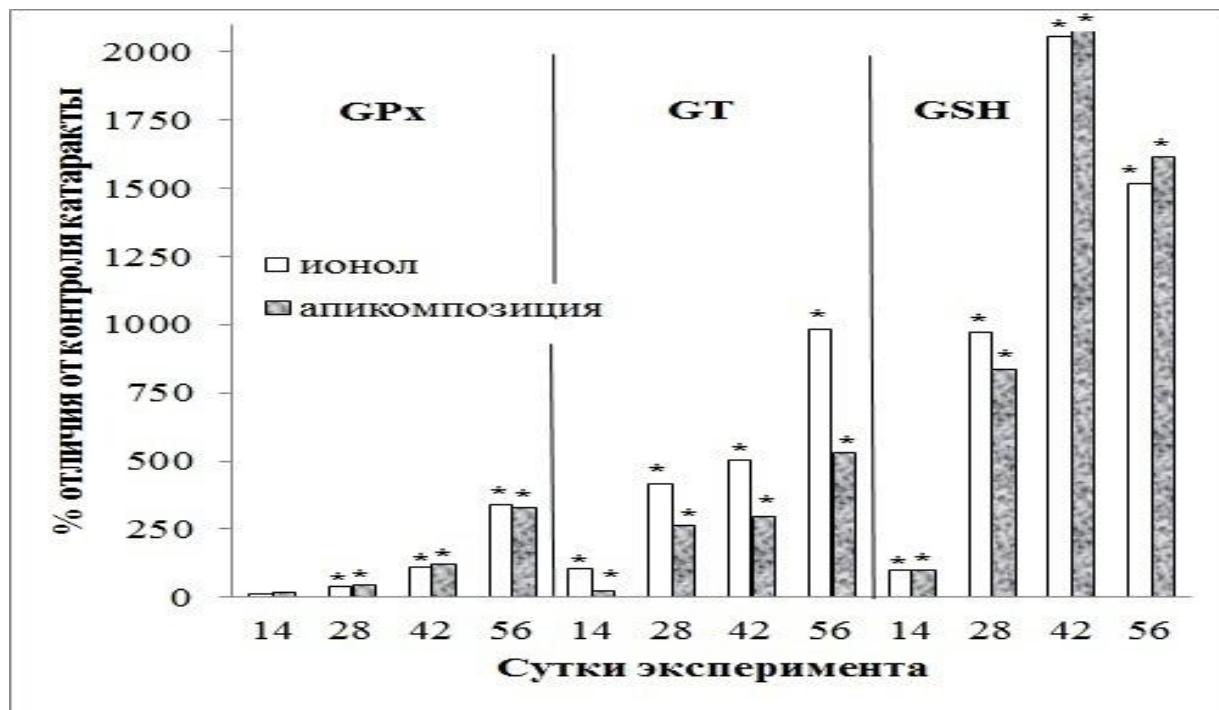
Выводы

1. При дикват-индуцированной модели катаракты ионол оказывает существенное антикатарактальное действие, достоверно снижает активность перекисного окисления липидов, обладает выраженным позитивным влиянием на активность глутатион-зависимых антиоксидантных ферментов и суммарную емкость антиоксидантной системы.

2. По комплексу морфо-биохимических показателей и антикатарактальному действию апикомпозиция экстракта прополиса, меда и нативного маточного молочка сопоставима с ионолом.

Рисунок 2.

Состояние глутатионового звена антиоксидантной системы в хрусталике животных серий лечения по сравнению с контролем катаракты (– $p < 0,05$ – достоверные различия по сравнению с показателями животных серии контроля катаракты).*



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Меньщикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К. и др.** Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. – М.: Слово, 2006. – 576 с.
2. **Semenza G. L.** Oxygen Sensing, Homeostasis, and Disease // *New England Journal Medicine*. – 2011. – Vol. 365. – Pp. 537–547.
3. **Berthoud V. M., Beyer E. C.** Oxidative Stress, Lens Gap Junctions, and Cataracts // *Antioxidant & Redox Signaling*. – 2009. – Vol. 11(2). – Pp. 339–353.
4. **Zheng Y., Liu Y., Ge J. et al.** Resveratrol protects human lens epithelial cells against H₂O₂-induced oxidative stress by increasing catalase, SOD-1, and HO-1 expression *Molecular Vision*. – 2010. – Vol. 16. – Pp. 1467–1474.
5. **Liu H., Smith A. J. O., Lott M. C. et al.** Sulforaphane Can Protect Lens Cells Against Oxidative Stress: Implications for Cataract Prevention // *Investigative Ophthalmology Visual Science*. – 2013. – Vol. 54(8). – Pp. 5236–5248.
6. **Колесников А. В.** Подбор эффективной антиоксидантной дозы ионола для ткани хрусталика при местном инстилляционном введении его масляного раствора // *Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова*. – 2006. – № 2. – С. 66–70.
7. **Вахонина Т. В.** Пчелиная аптека. – СПб.: Лениздат, 1992. – 188 с.
8. **Bhuyan K. C., Bhuyan D. C., Podos S. M.** Free radical enhancer xenobiotic is an inducer of cataract in rabbit // *Free Radical Research. Community*. – 1991. – Pt.2. – Pp. 12–13.
9. **Ланкин В. З., Тихазе А. К., Беленков Ю. Н.** Свободнорадикальные процессы в норме и при заболеваниях сердечно – сосудистой системы. – М.: РКНПК МЗ РФ, 2001. – 78 С.

© A. V. Kolesnikov, O. I. Barenina, A. V. Schulkin (Ryazan, Russia)

UDC 617.741 + 004.1 + 085.27

ACTIVITY OF LIPID PEROXIDATION AND CONDITION OF LENS ANTIOXIDANT SYSTEM ON THE EXPERIMENTAL CATARACT AGAINST THE BACKGROUND OF LOCAL ANTIOXIDANTS

A. V. Kolesnikov, O. I. Barenina, A. V. Schulkin (Ryazan, Russia)

In the present research we have made a comparative analysis of the influence of a local application of direct synthetic antioxidant ionol, and natural biological antioxidant apicomposition on the lens free-radical status during cataract formation. Apicomposition consisted of honey, native royal jelly and propolis. Experimental cataract was induced by a single injection of diquat dibromide water solution into the vitreous body. The dynamics of the cataract process and the severity of oxidative stress, total antioxidant system capacity and activity of antioxidant enzymes in the lens were determined. It is shown that instillation into the conjunctival cavity Ionol solution led to regression (50%) and stabilization (33 %) lens opacities, significant reduction the activity of lipid peroxidation, normalization activity of glutathione-dependent antioxidant enzymes. Clinical and biochemical effects of apicomposition were also quite pronounced, but more effective in all parameters was ionol. Thus, the findings suggest the feasibility of using synthetic and natural antioxidants for pathogenic cataract treatment.

Keywords: cataract, lens free radical status, antioxidants, ionol, apicomposition.

REFERENCES

1. **Menshchikova E. B., Lankin V. Z., Zenkov N. K. et al.** Oxidative stress. Pro-oxidants and antioxidants. – M.: Word 2006. – 576 p.
2. **Semenza G. L.** Oxygen Sensing, Homeostasis, and Disease // New England Journal Medicine. – 2011. – Vol. 365. – Pp. 537–547.
3. **Berthoud V. M., Beyer E. C.** Oxidative Stress, Lens Gap Junctions, and Cataracts // Antioxidant & Redox Signaling. – 2009. – Vol. 11 (2). – Pp. 339–353.
4. **Zheng Y., Liu Y., Ge J. et al.** Resveratrol protects human lens epithelial cells against H₂O₂-induced oxidative stress by increasing catalase, SOD-1, and HO-1 expression // Molecular Vision. – 2010 – Vol. 16. – Pp. 1467–1474.
5. **Liu H., Smith A. J. O., Lott M. C. et al.** Sulforaphane can protect lens cells against oxidative stress: implications for cataract prevention // Investigative Ophthalmology Visual Science. – 2013. – Vol. 54 (8). – Pp. 5236–5248.
6. **Kolesnikov A. V.** Selection of an effective antioxidant ionol doses for lens tissue when it is administered locally in oil solution / Russian Medical and Biological Journal named after academic I. P. Pavlov. – 2006. – № 2. – Pp. 66–70.
7. **Vakhonin T. V.** Bee pharmacy. – St. Petersburg.: Lenizdat, 1992. – 188 p.



8. **Bhuyan K. C., Bhuyan D. C., Podos S. M.** Free radical enhancer xenobiotic is an inducer of cataract in rabbit // Free Radical Research. Community. – 1991. – Rt. 2. – Pp. 12–13.
9. **Lankin V. Z., Tihaze A. K., Belenkov Y. N.** Free radical processes in health and cardiovascular diseases. – Moscow : RCSPC, 2001. – 78 p.

Kolesnikov Aleksandr Vyacheslavovich – PhD, docent at the Department of Eye and ENT diseases, Ryazan State Medical University

E-mail: kolldoc@mail.ru

Barenina Olga Igorevna – aspirant at the Department of Eye and ENT diseases at the Department, Ryazan State Medical University

E-mail: kolyuchk@mail.ru

Schulkin Aleksey Vladimirovich – PhD, assistant at the pharmacology department, Ryazan State Medical University

E-mail: alekseyschulkin@rambler.ru