

УДК 617.7-007.681:577.19-07

© В. Н. Сердюк, 2010.

СОСТОЯНИЕ ПРОЦЕССОВ ДЕТОКСИКАЦИИ И ОБЕЗВРЕЖИВАНИЯ ЛИПИДНЫХ ГИДРОПЕРОКСИДОВ В СЕТЧАТКЕ И ЗРИТЕЛЬНОМ НЕРВЕ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЛАУКОМЫ

В. Н. Сердюк

*Областная клиническая офтальмологическая больница (директор – к.м.н. Сердюк В.Н.),
г. Днепропетровск.*

CONDITION OF PROCESSES DETOXICATION AND NEUTRALIZATIONS OF LIPID HYDROPEROXIDES IN THE RETINA AND THE OPTIC NERVE IN THE CONDITIONS OF THE EXPERIMENTAL GLAUCOMA

V. N. Serdyuk

SUMMARY

The work was on the rabbits which one has been modeled glaucoma. We estimated the activity of ferments in the eye tissue and dynamics of glaucoma process. The results turned out are indicative of decline in activity of ferments glutationperoxydasa and glutation-S-transferasa in the retina and optic nerve tissue.

СТАН ПРОЦЕСІВ ДЕТОКСИКАЦІЇ ТА ЗНЕШКОДЖЕННЯ ЛІПІДНИХ ГІДРОПЕРОКСИДІВ У СІТКІВКИ ТА ЗОРОВОМУ НЕРВІ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ГЛАУКОМИ

В. М. Сердюк

РЕЗЮМЕ

Робота була виконана на кролях з модельованою глаукомою. Визначали активність ферментів глутатіонпероксидази та глутатіон-S-трансферази в тканинах сітківки і зорового нерва в динаміці розвитку глаукомного процесу. Отримані результати свідчать про зниження активності ферментів глутатіонпероксидази та глутатіон-S-трансферази в тканинах сітківки та зорового нерва ока.

Ключевые слова: процессы детоксикации, липидные гидропероксиды, экспериментальная глаукома.

Несмотря на прогресс современной медицины, совершенствование методов диагностики и техники оперативного вмешательства, внедрение новых технологий и высококачественных лекарственных препаратов, глаукома по-прежнему является «непредсказуемой» патологией, которая всегда содержит риск неблагоприятного исхода, отражающегося не только на качестве жизни пациента, но и его состоянии, вплоть до полной инвалидизации [1,9,17].

Поэтому изучение этой патологии, серьезно нарушающей зрительные функции, и, следовательно, физическую и социальную адаптацию, внедрение технологий, позволяющих проводить прогнозирование течения заболевания, развитие осложнений, патогенетическую терапию и профилактику прогрессирования процесса является одной из актуальных проблем современной офтальмологии [2,3,7,10,15,20,22].

Результаты многочисленных исследований привели к значительному прогрессу в представлениях о причинах развития первичной глаукомы, однако мно-

гие ключевые моменты в этиологии и патогенезе этого заболевания и сегодня еще изучены недостаточно [11,12,13,18].

Целый ряд авторов указывает на роль старения, как пускового фактора патологических процессов, развивающихся в зрительном анализаторе. Исследования последних лет показали, что формирование метаболического благополучия обуславливает превалирование анаболических процессов над катаболическими, характерными для инволютивных изменений. То есть, в основе развития процессов старения, прежде всего, лежит метаболическая дисфункция, в любом из ее проявлений. Однако современная клиническая концепция развития первичной глаукомы как проблемы метаболической дезадаптации представляется сложной и малоизученной [14,16,19,21].

В ряде исследований было установлено увеличение количества первичных, вторичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов в тканях дренажной системы глаз больных глаукомой по мере

развития заболевания. Было высказано также предположение об участии процесса ПОЛ в развитии дистрофических изменений в тканях дренажной системы глаз больных открытоугольной глаукомой. Тем не менее, к настоящему моменту фактов, для того, чтобы рассматривать перекисное окисление липидов в качестве первичного пускового механизма развития глаукомы недостаточно.

Цель настоящей работы заключалась в изучении состояния процессов детоксикации и обезвреживания липидных гидропероксидов в условиях экспериментальной глаукомы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования проводились на 32 кроликах (массой 2,5 – 3,2 кг).

При проведении эксперимента соблюдались все рекомендации относительно исследований на животных, принятые международным сообществом при изучении зрения и офтальмологических изысканий.

Экспериментальные кролики были поделены на 4 группы: контроль, 1 срок (3 недели), 2 срок (6 недель) и 3 срок (10 недель) исследования.

В контрольной группе находилось 9 животных, над которыми не производились какие-либо эксперименты. В трех экспериментальных группах было по 8, 7 и 8 кроликов в каждой, соответственно.

Все животные исследовались посредством биомикроскопии на щелевой лампе, как при отборе экспериментальных животных (исключая аномалии), так и для наблюдений в процессе эксперимента. Все животные перед экспериментом и в ходе эксперимента подвергались измерению внутриглазного давления. Животные подвергались общей анестезии путем введения кетамина 50 мг/кг, местно применяли глазные капли 0,5 % раствор прокаина гидрохлорида, инстиллируемые в конъюнктивальный мешок за 1 минуту до инъекции.

В переднюю камеру глаза все животные получали инъекции раствора гиалуроната, перед этим иглой в районе лимба отбиралось 0,15 мл камерной влаги, которая использовалась для биохимических исследований. Инъекции производили в правый глаз, а в левый глаз, служивший относительным контролем, вводили эквивалентное количество растворителя (сбалансированный солевой раствор), на котором готовился раствор гиалуроната.

Немедленно после инъекции кролики проверялись путем биомикроскопии для оценки травмы, возможно вызываемой в процессе инъекции.

Тонометрия производилась через каждые несколько часов.

В конце эксперимента все кролики были забиты с помощью летальной дозы пентобарбитола натрия (100 мг на кг, вводимого в маргинальную ушную вену). В тканях изолированной сетчатки и зрительного нерва производили определение активности ферментов глутатион – S – трансферазы и глутатионпероксидазы.

Определение активности глутатион – S – трансферазы.

Принцип метода определения активности глутатион – S – трансферазы основан на регистрации оптической плотности раствора, зависящей от количества образуемого конъюгированного глутатиона в результате взаимодействия его с 1- хлор- 2, 4-динитробензолом (ХДНБ). Увеличение концентрации конъюгированного глутатиона в инкубационном растворе вызывает повышение оптической плотности раствора в ультрафиолетовой области спектра [8].

Ход определения. Активность глутатион – S – трансферазы определяли следующим образом: смешивали непосредственно в опытной микрокювете 0,2 мл субстратно-буферной смеси, содержащей 1 мМ восстановленного глутатиона, 1 мМ 1-хлор-4-динитробензола, 100 мМ К-фосфатный буфер, pH 6,5 и 0,2 мл исследуемой ткани. В одной из контрольных пробирок смешивали только 0,2 мл 100 мМ К- фосфатного буфера и 0,2 мл исследуемой ткани, а в другой 0,2 мл 10 мМ К- фосфатного буфера. При необходимости экстракт исследуемой ткани разводили 10 мМ К- фосфатным буфером. Тотчас перемешивали и измеряли оптическую плотность полученных растворов, используя 1-см термостатируемые кюветы (37 °С) на приборе “Спекол – 210” при длине волны 360 нм, каждые 60 сек. в течение 10-15 мин. Коэффициент вариаций 5%. Активность фермента выражали в нкат/г ткани.

Определение глутатионпероксидазы.

Принцип определения. Активность глутатионпероксидазы определяли спектрофотометрически по скорости образования окисленного глутатиона с помощью сопряженной реакции с НАДФН-зависимым ферментом глутатионредуктазой, регистрируя изменение оптической плотности при окислении НАДФН [4].

Ход определения.

Для определения в пробирку вносили 0,1 мл раствора, содержащего в 0,1 М К-фосфатного буфера (pH 7,5) 2 мМ ЭДТА и 10 мМ восстановленного глутатиона и 0,1 мл материала для исследования. Через 3 мин инкубации при 25°С вносили 0,01 мл 40 мМ гидроперекиси трет-бутила. Спустя 5 мин в реакционную смесь добавляли 3,84 мл 0,5 М трис-НС1 буфера (pH 7,7) с 1 мМ ЭДТА. 2 мл полученного раствора сразу после этого вносили в кювету и добавляли 0,05 мл 3,5 мМ НАДФН и 0,02 мл глутатионредуктазы (0,06 ед.). Быстро перемешивали и определяли изменение оптической плотности при 340 нм в течение 1 мин на спектрофотометре «Спекол-210». Коэффициент вариации 1,8%. Активность фермента выражали в мккат/г ткани. Данные обрабатывались с помощью соответствующих методов статистического анализа [5,6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные, относительно активности ферментов тиолового обмена и детоксикации в сетчатке глаз

кроликов при развитии экспериментальной глаукомы представлены в таблице 1 и на диаграмме (рис. 1).

Таблица 1.

Активность глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы в сетчатке и зрительном нерве при развитии экспериментальной глаукомы

Исследуемый показатель	Статистич. показатель	Норма	Условия эксперимента		
			1 срок	2 срок	3 срок
Глутатионпероксидаза (мккат/г ткани)	n	9	8	7	8
	M	521,11	490,00	465,71	423,75
	m	6,61	6,27	6,18	3,55
	p	-	>0,05	<0,01	<0,00001
	%	100	94,0	89,4	81,3
Глутатион-S-трансфераза (нкат/г ткани)	n	9	8	7	8
	M	524,44	485,00	427,14	400,00
	m	7,75	6,88	5,85	7,68
	p	-	<0,05	<0,0001	<0,00001
	%	100	92,5	81,4	76,3

Примечание: p-уровень значимости различий данных по отношению к норме, рассчитанный с помощью t-теста для независимых выборок.

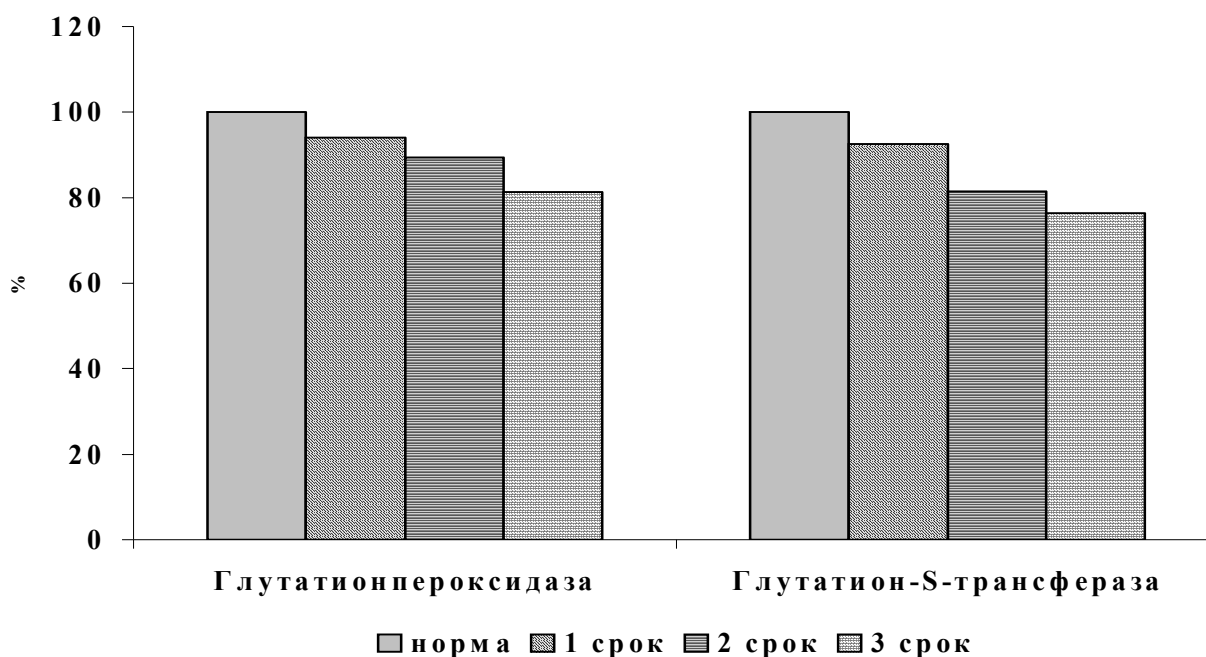


Рис. 1. Относительные изменения активности глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы в сетчатке и зрительном нерве при развитии экспериментальной глаукомы (в % по отношению к норме)

Исследуя активность антиоксидантного фермента тиолового обмена – глутатионпероксидазы, можно отметить ее существенное понижение при развитии глаукоматозного процесса. В 1 срок активность фермента снизилась до $490,00 \pm 6,27$ (94%), по сравнению с нормой – $521,11 \pm 6,61$. Однако в этот период развития глаукоматозного процесса различия в активности изучаемого фермента по отношению к норме статистически не достоверны. По мере развития

экспериментальной глаукомы, отмечается дальнейшее понижение активности глутатионпероксидазы: во 2 срок показатели активности снизились до $465,71 \pm 6,18$, что составило 89,4%. В последний срок развития экспериментальной глаукомы (3 срок) активность изучаемого фермента уменьшилась до $423,75 \pm 3,55$ (81,3%).

Активность глутатион-S-трансферазы в сетчатке и зрительном нерве при развитии эксперименталь-

ной глаукомы также снижалась во все сроки наблюдения. Так в 1 срок развития экспериментальной глаукомы показатели активности фермента снизились до $485,00 \pm 6,88$, что составило 92,5% по отношению к норме ($524,44 \pm 7,75$), при этом при этом степень достоверности различий составляет $p < 0,05$, во 2 срок наблюдения активность глутатион-S-трансферазы падает до $427,14 \pm 5,85$ (81,4%), в 3 срок развития экспериментальной глаукомы отмечается дальнейшее снижение активности изучаемого фермента и составляет $-400,00 \pm 7,68$ (76,3%).

ВЫВОДЫ

В целом анализ результатов проведенных экспериментальных исследований с использованием модели ПОУГ свидетельствует о заметном снижении скорости процессов обезвреживания липидных гидропероксидов, осуществляемых ферментом глутатионпероксидазой и еще более выраженным ингибированием глутатион-S-трансферазной реакции. В последнем случае нарушается обезвреживание различных экзогенных токсических веществ посредством связывания их молекул с глутатионом и образованием нетоксичных конъюгатов. Все это приводит к накоплению в сетчатке и зрительном нерве липидных перекисей и токсических ингредиентов, которые могут оказывать негативное влияние на структурно-функциональные параметры нервных клеток при развитии ПОУГ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волков В. В. Трехкомпонентная классификация открыто-угольной глаукомы на основе представлений о ее патогенезе // Глаукома. – 2004. – №1. – С. 57-67.
2. Егорова Т. Е. Простагландины в лечении глаукомы // Клин. офтальмология. – 2004. – Т. 5. – №3. – С. 127-132.
3. Луценко Н. С. Гормонально-метаболические нарушения при первичной открыто-угольной глаукоме и патогенетическое обоснование их коррекции в комплексном лечении: автореф. дис. Докт. мед. наук : 14.01.18. – Одесса. – 2007. – 18 с.
4. Модель М. А. К определению активности глутатионпероксидазы // Вопр. мед. химии. – 1989, № 4. – С. 132 – 133.
5. Наследов А. SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках. // Спб.: Питер, 2005. – 416 с.
6. Новые методы биохимического анализа. // Изд. Ленинградского универ. – 1991. – 395 с.
7. Agar A., Li S. Retinal ganglion cell line apoptosis induced by hydrostatic pressure / Brain Res. – 2006. – V. 1086. – P. 191-200.
8. Awashi Y. C., Dao D. D., Saneto R. P. Interrelationship between anionic and cationic forms of glutathione-S-transferases of human liver // Biochem. J. 1980. - 191. – p. 1–10.
9. Boland M. V., Quigley H. A. Risk factors and open-angle glaucoma: classifications and application / J Glaucoma. – 2007. – V. 16. – № 4. – P. 406-418.
10. Chergel D., Griffiths H. R., Hilton E. J. Systemic reduction in glutathione levels occurs in patients with primary open angle glaucoma / Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2005. – V. 46. – P. 877-883.
11. Chidlow G., Wood J. P. M., Casson R. J. Pharmacological neuroprotection for glaucoma / Drugs. – 2007. – V. 67. – № 5. – P. 725-759.
12. Govindarajan B., B. Govindarajan, J. Laird, R. Sherman. Neuroprotection in glaucoma using calpain-1 inhibitors: regional differences in calpain-1 activity in the trabecular meshwork, optic nerve and implications for therapeutics / Neurol Disord Drug Target. – 2008. – V. 7. – № w3. – P. 295-304.
13. Guo L., Salt T. E., Maass A. Assessment of neuroprotective effects of glutamate modulation on glaucoma related retinal ganglion cell apoptosis in vivo / Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2006. – V. 47. – P. 626-633.
14. Johnson T. V., Bull N. D., Hunt D. P. Local mesenchymal stem cell transplantation confers neuroprotection in experimental glaucoma / Invest Ophthalmol. Vis. Sci. – 2009. – V. 20. – P. 356-359.
15. Kumar D. M., Agarwal N. Oxidative stress in glaucoma: a burden of evidence / J Glaucoma. – 2007. – V. 16. – P. 334-343.
16. Moraczewski A. L., Lee R. K., Palmberg P. F. et al. Outcomes of treatment of neovascular glaucoma with intravitreal bevacizumab / Br J Ophthalmol. – 2009. – V. 93. – P. 589-593.
17. Moreno M. C., Sande P., Marcos H. A. Effect of glaucoma on the retinal glutamate/glutamine cycle activity / FASEB J. – 2005. – V. 19. – № 9. – P. 1161-2.
18. Neufeld A. H. Pharmacologic neuroprotection with an inhibitor of nitric oxide synthase for the treatment of glaucoma / Brain res. Bull. – 2004. – V. 62. – P. 455-459.
19. Pache M., Flammer J. A sick eye in a sick body? Systemic findings in patients with primary open-angle glaucoma / Surv. Ophthalmol. – 2006. – V. 51. – № w3. – P. 179-212.
20. Roh Y., Moon C., Kim S. Glutathione depletion induces differential apoptosis in cells of mouse retina, in vivo. // Neuroscience Let. – 2007. – Vol. 417 (3). – P. 266–270.
21. Schober M. S., G. C. Childlow et al. Bioenergetic-based neuroprotection and glaucoma / Clin. & Exp. Ophthalmol. – 2008. – V. 36. – № 4. – P. 377-385.
22. Weber A. J., C. D. Harman, S. Viswanathan. Effects of optic nerve injury, glaucoma, and neuroprotection on the survival, structure, and function of ganglion cells in the mammalian retina / J Physiol. – 2008. – V. 18. – P. 4393-4400.