

УДК 617.7-007.681:577.19-07

© В.Н. Сердюк, 2011.

## ИЗУЧЕНИЕ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА ГЛУТАТИОНА В СЕТЧАТКЕ И ЗРИТЕЛЬНОМ НЕРВЕ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМЫ У КРОЛИКОВ

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

### STUDYING OF REGENERATIVE POTENTIAL OF GLUTATION IN THE RETINA AND THE OPTIC NERVE AT MODELLING OF THE OPENANGLE GLAUCOMA AT RABBITS

**V. N. Serdyuk**

#### SUMMARY

The work was on the rabbits which one has been modeled glaucoma. We estimated the level of glutation in the eye tissue and dynamics of glaucoma process. The results turned out are indicated of decline in the level of reduce, oxydize and total glutation in the retina and optic nerve tissue

### ВИВЧЕННЯ ОНОВЛЮЮЧОГО ПОТЕНЦІАЛУ ГЛУТАТИОНА В СІТКІВЦІ ТА ЗОРОВОМУ НЕРВІ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ВІДКРИТОКУТОВОЇ ГЛАУКОМИ У КРОЛИКІВ

**В. М. Сердюк**

#### РЕЗЮМЕ

Робота була виконана на кролях з моделюваною глаукомою. Визначали рівень глутатіону в тканинах сітківки і зорового нерва в динаміці розвитку глаукомного процесу. Отримані результати свідчать про зменшення рівня відновленого, окисленого та загального глутатіону в тканинах сітківки та зорового нерва ока.

**Ключевые слова:** антиоксидантная система, глутатион, сетчатка, зрительный нерв, экспериментальная глаукома.

Вопросы патогенеза ПОУГ остаются в центре внимания офтальмологов, и до настоящего времени в литературе не существует единого мнения о первопричине заболевания [2,3].

Развитие ПОУГ обуславливается микроструктурными изменениями на клеточном уровне вследствие нарушения многих процессов, приводящих к снижению уровня естественной нейропротекции и ускорению апоптоза нервных клеток [12,17,18,19].

В общем же вопросы патогенеза открытоугольной глаукомы, несмотря на огромное количество работ, выполненных в этом направлении, требует дальнейшего изучения, что необходимо, в частности, для разработки новых более совершенных методов лечения этого заболевания.

Наиболее изученными метаболическими процессами при ПОУГ являются процессы перекисного окисления липидов антиоксидантной системы. Участие процессов свободно-радикального окисления (СРО) в патогенезе глаукомы принято рассматривать в двух аспектах [1,11,15,16].

Во-первых, это те патологические изменения с участием активных форм кислорода и их метаболи-

тов, которые приводят к деструктивным процессам в дренажном аппарате глаза.

Существует предположение о том, что активный отток водянистой влаги может снижаться из-за повышенного содержания во влаге «аномальных метаболитов» и их токсического воздействия. Такими метаболитами, в частности, могут быть продукты перекисного окисления липидов [1,4,8,10,14].

Во-вторых, это – цитотоксическое действие свободных радикалов на сетчатку и зрительный нерв.

Проведенные экспериментальные и клинические исследования показывают, что все биологические, эндокринные и многие другие процессы в организме прямо или косвенно связаны со структурой и функцией биологических мембран.

У большинства исследователей не вызывает сомнений то, что в основе процесса повреждения клеточных мембран лежит процесс СРО или, по-другому, ПОЛ, оказывающий воздействие клеточное деление, биосинтез простагландинов, нуклеиновых кислот, лейкотриенов, реакцию окислительного фосфорилирования, регуляцию проницаемости мембран и многое другое [7,9,13].

В последнее время механизмы развития глаукомной атрофии зрительного нерва рассматривают в сравнении с другими нейро-дегенеративными заболеваниями.

Цель работы заключалась в изучении восстановительного потенциала глутатиона в сетчатке и зрительном нерве при моделировании открытоугольной глаукомы у кроликов.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

При проведении экспериментов 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 восстановленной и окисленной формы глутатиона.

Принцип метода определения содержания восстановленного глутатиона: в результате реакции между глутатионом и метилглиоксалем в присутствии

фермента глиоксилазы происходит образование конъюгата S-лактоилглутатиона, имеющего максимум поглощения при длине волны 240 нм.

Принцип определения окисленной формы глутатиона состоит в том, что в результате ферментативного восстановления глутатиона глутатионредуктазой происходит окисление НАДФН, убыль которого регистрируется спектрофото-метрически при длине волны 340 нм. Среднее значение коэффициента вариации для восстановленной формы – 4 %, окисленной формы – 5 %. Для измерений использовали спектрофотометр СФ-26. Содержание глутатиона выражали в мкмоль/г ткани.

Полученные при экспериментальных исследованиях количественные данные были подвергнуты статистическому анализу. Для выявления достоверности различий между средними арифметическими величинами использовали критерии Стьюдента, и различия считали достоверными, если уровень значимости был не более 5 %, т. е. при вероятности различий не менее 95 %. Данные обрабатывались с помощью соответствующих методов статистического анализа [5,6].

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные исследований уровня глутатиона в сетчатке и зрительном нерве при развитии экспериментальной глаукомы представлены в таблице 1 и на диаграмме (рис. 1).

Как видно из представленных данных, при развитии экспериментальной глаукомы уже в 1 срок отмечается достоверное снижение концентрации восстановленного глутатиона до 80,3%, что составило  $1,88 \pm 0,07$  по сравнению с нормой ( $2,34 \pm 0,06$ ). Во 2 срок содержание глутатиона также снижается до 67,9% ( $1,59 \pm 0,05$ ), в 3 срок содержание восстановленного глутатиона еще более снижено –  $1,36 \pm 0,05$  (58,1%).

Анализируя данные относительно содержания окисленной формы глутатиона, можно отметить также достоверное понижение его концентрации во все сроки исследования.

Так в 1 срок концентрация окисленного глутатиона снизилась до 84,6%, что составило  $0,44 \pm 0,02$ , во 2 срок развития экспериментальной глаукомы содержание окисленного глутатиона понизилось до 78,8% ( $0,41 \pm 0,02$ ). В последний период наблюдения (в 3 срок) можно отметить дальнейшее снижение концентрации окисленного глутатиона до 73,1% ( $0,38 \pm 0,02$ ).

При изучении концентрации общего уровня глутатиона, было отмечено его снижение во все сроки развития экспериментальной глаукомы. В 1 срок отмечается снижение концентрации общего глутатиона до 81,1% ( $2,32 \pm 0,09$ ), по сравнению с нормой ( $2,86 \pm 0,04$ ), при этом степень достоверности различий довольно высокая -  $p < 0,0001$ , во 2 срок наблюдения – 69,6% ( $1,99 \pm 0,04$ ), в последний период развития

экспериментальной глаукомы (в 3 срок) – 60,8% (1,74±0,07).

#### ВЫВОДЫ

Обобщая результаты исследований восстановительного потенциала глутатиона в сетчатке и зрительном нерве при моделировании открытоугольной глаукомы у кроликов необходимо отметить о значительной роли глутатиона в функционировании нервной ткани, в поддержании стабильности ее мембранных структур.

Также существуют данные о снижении уровня глутатиона в крови больных первичной открытоугольной глаукомой.

Также существуют данные о снижении уровня глутатиона в крови больных первичной открытоугольной глаукомой.

Таблица 1

Содержание восстановленного, окисленного и общего глутатиона в сетчатке и зрительном нерве при развитии экспериментальной глаукомы

Исследуемый показатель	Статистич. показатель	Норма	Условия эксперимента		
			1 срок	2 срок	3 срок
Глутатион восстановленный (мкмоль/г ткани)	n	9	8	7	8
	M	2,34	1,88	1,59	1,36
	m	0,06	0,07	0,05	0,05
	p	-	<0,000	<0,000	<0,000
	%	100	80,3	67,9	58,1
Глутатион окисленный (мкмоль/г ткани)	n	9	8	7	8
	M	0,52	0,44	0,41	0,38
	m	0,02	0,02	0,02	0,02
	p	-	<0,05	<0,01	<0,001
	%	100	84,6	78,8	73,1
Общий глутатион (мкмоль/г ткани)	n	9	8	7	8
	M	2,86	2,32	1,99	1,74
	m	0,04	0,09	0,04	0,07
	p	-	<0,0001	<0,00001	<0,00001
	%	100	81,1	69,6	60,8

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

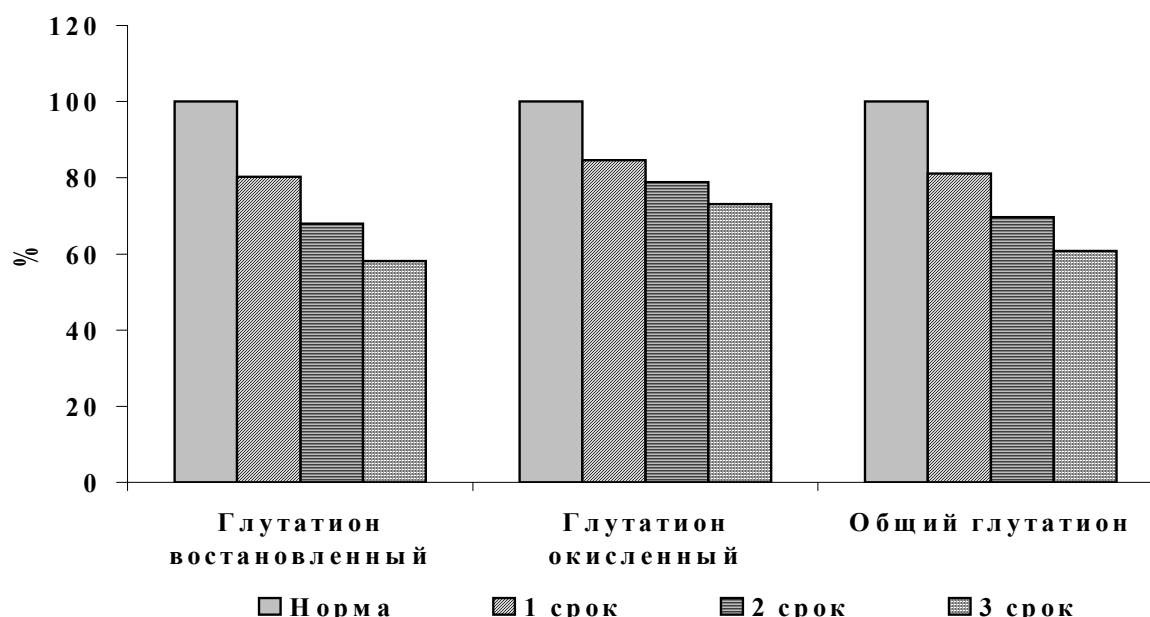


Рис. 1. Относительный уровень восстановленного, окисленного и общего глутатиона в сетчатке и зрительном нерве при развитии экспериментальной глаукомы (в % по отношению к норме)

гольной глаукомы.

Необходимо отметить также о важном значении выявленных нарушений в глутатионовой системе в патогенезе нейро-дегенеративного процесса при ПОУГ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев В.Н., Мартынова Е.Б., Садков В.И. Роль перекисного окисления липидов в патогенезе первичной открытоугольной глаукомы // Офтальмол. журн. - 2000. - №1. - С. 12-17.
2. Кашинцева Л. Т. Адренергические и кальциевые механизмы развития глаукомного процесса и перспективы патогенетического лечения больных открытоугольной глаукомой / Л.Т. Кашинцева, Г.Н. Крыжановский, Е.М. Липовецкая, О.П. Копп // Офтальмол. журн. - 1995. - № 3. - С. 133-137.
3. Линник Л.Ф., Оглезнева О.К., Соколовская Т.В. Комплексный подход к лечению глаукоматозной оптической нейропатии // Современные технологии лечения глаукомы: Сб. науч. ст. науч.-практ. конф. – М., 2003. - С. 285-288.
4. Луценко Н. С. Гормонально-метаболические нарушения при первичной открыто-угольной глаукоме и патогенетическое обоснование их коррекции в комплексном лечении: автореф. дис. канд. мед.наук : 14.01.18. – Запорожье. – 2007. – 18 с.
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. Baez S., Seguilal J., Widersten M., Johansson A.-S. Glutathione transferases catalyse the detoxication of oxidized metabolites of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes / Biochem. J. – 1997. – Vol. 324. – P. 25-28.
8. Boland M. V., Quigley H. A. Risk factors and open-angle glaucoma: classifications and application / J Glaucoma. – 2007. – V. 16. - № 4. – P. 406-418.
9. 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.
10. Greve E.L. The Editor's selection // Glaucoma abstracts. - 1996. - Vol. 7, №1. - P. 7-25.
11. Kumar D. M., Agarwal N. Oxidative stress in glaucoma: a burden of evidence / J Glaucoma. – 2007. – V. 16. – P. 334-343.
12. 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.
13. 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.
14. Moreno M. C., Marcos H. A. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injection of hyaluronic acid / Exp. Eye Res. – 2005.
15. 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.
16. Sator M. O. Reduction of intraocular pressure in a glaucoma patient undergoing hormone replacement therapy / M.O. Sator, J. Akramian, B. Joura et al. // Maturitas. - 1998. - Vol. 29. - P. 93-95.
17. Schober M. S., G. C. Childlow et al. Bioenergetic-based neuroprotection and glaucoma / Clin. & Exp. Ophthalmol. – 2008. – V. 36. - № 4. – P. 377-385.
18. 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.
19. Yucel Y. The evidence for glaucoma as a neurodegenerative disease // International Glaucoma Review Supplement. -2006.-Vol.8, N3.-P.27-29.