



В. Н. Сердюк, В. В. Семенко,
Н. А. Малая

Областная клиническая
офтальмологическая больница,
г. Днепрпетровск

© Коллектив авторов

КОРРЕГИРУЮЩЕЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НЕЙРОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА СОСТОЯНИЕ ПРОЦЕССОВ ДЕТОКСИКАЦИИ И ОБЕЗВРЕЖИВАНИЯ ГИДРОПЕРОКСИДОВ СЕТЧАТКИ И ЗРИТЕЛЬНОГО НЕРВА ПРИ РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЛАУКОМЫ

Резюме. Работа выполнена на кроликах с моделированной глаукомой. Определяли активность ферментов глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы в тканях сетчатки и зрительного нерва в динамике развития глаукомного процесса. Полученные результаты свидетельствуют о снижении их активности по сравнению с нормой во все сроки контроля, а также о значительном уменьшении этого явления при применении нейропротекторных препаратов.

Ключевые слова: глаукома, глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза, мемантин, цитиколин.

Введение

Современная офтальмология имеет в своем арсенале большой выбор лекарственных препаратов, методик консервативного и хирургического лечения глаукомы, однако, несмотря на это лечение не всегда оказывается эффективным. Это объясняется сложностью патогенетических механизмов развития заболевания и симптоматическим, а не патогенетическим подходом к его лечению и профилактике [2, 5, 7, 14, 16, 17].

Считается, что основными патогенетическими звеньями первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ) считаются следующие:

- повышение внутриглазного давления, в основе которого могут лежать такие факторы как: генетические изменения наследственного характера, первичные местные функциональные и дистрофические изменения в системе оттока камерной влаги, нарушения гидростатики и гидродинамики глаза;
- вторичные сосудистые и дистрофические изменения в тканях глаза и зрительном нерве;
- глаукомная атрофия зрительного нерва.

Генетические факторы в патогенезе первичной открытоугольной глаукомы несомненно играют важную, но не определяющую роль в возникновении и прогрессировании заболевания. Молекулярно-генетические исследования в частности выявили наличие генов, ответственных за возникновение заболевания [1, 3, 4, 8, 10, 15, 18].

В литературе указывается, что при воспалительных заболеваниях глазного яблока отмечается повышенная генерация свободнорадикальных соединений кислорода, оксида азота и других соединений. Имеются данные, до-

казывающие роль свободнорадикальных процессов в патогенезе ПОУГ и в частности, в нарушении путей оттока камерной влаги – трабекулярного аппарата в углу передней камеры глаза [11, 12, 19].

Значительный интерес в лечении заболевания глаз представляют мема и нейродар.

Мема (действующее вещество – мемантин) является нейротропным препаратом, применяется при неврологических заболеваниях, обладает противопаркинсоническим и психостимулирующим действием, является производным адамантана. Блокирует NMDA-рецепторы, уменьшает поступление ионизированного кальция в нейроны. Улучшает ослабленную память, повышает способность к концентрации внимания, уменьшает утомляемость и симптомы депрессии, уменьшает спастичность скелетных мышц, вызванное заболеваниями или повреждениями мозга [13, 20].

Нейродар – ноотропный препарат, действующим веществом которого является цитиколин. Цитиколин обладает широким спектром действия: способствует восстановлению поврежденных свободных радикалов, ингибирует действие фосфолипазы, препятствуя образованию свободных радикалов, также предотвращает гибель клеток, действуя на механизм апоптоза. Нейродар является источником холина, увеличивает синтез ацетилхолина и стимулирует биосинтез структурных фосфолипидов в мембране нейронов.

Целью нашей работы было изучение корректирующего влияния нейротропных препаратов на состояние процессов детоксикации и обезвреживания гидропероксидов сетчатки и зрительного нерва при развитии экспериментальной глаукомы.



Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования проводились на 55 кроликах (массой 2,5–3,2 кг).

Экспериментальные животные были разделены на 3 группы: 1 группа — интактные (контрольные) животные, 2 группа — опытная (с экспериментальной глаукомой), 3 группа — опытная (с экспериментальной глаукомой и применением препаратов). Наблюдения проводились в три срока: 1-й — 3 недели, 2-й — 5–6 недель, 3-й — 10 недель.

Препараты применялись из расчета: мема — 5 мг/кг веса в день, нейродар — 100 мг/кг веса в день ежедневно на протяжении всего срока эксперимента.

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

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 с помощью тонометра Маклакова.

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 (результаты будут опубликованы позднее). 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. Тонметрия производилась через каждые несколько часов.

В конце эксперимента все кролики были забиты с помощью летальной дозы пентобарбитола натрия (100 мг/кг вводимого в маргинальную ушную вену).

В тканях изолированной сетчатки и зрительного нерва производили определение активности ферментов глутатион-S-трансферазы и глутатионпероксидазы [9].

Определение активности глутатион-S-трансферазы. Принцип метода определения активности глутатион-S-трансферазы осно-

ван на регистрации оптической плотности раствора, зависящей от количества образующего 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.

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 односантиметровые термостатируемые кюветы (37 °С) на приборе «Спекол-210» при длине волны 360 нм, каждые 60 сек в течение 10-15 минут.

Коэффициент вариаций 5 %.

Активность фермента выражали в нкат/г ткани.

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 минуты инкубации при 25 °С вносили 0,01 мл 40 мМ гидроперекиси трет-бутила. Спустя 5 минут в реакционную смесь добавляли 3,84 мл 0,5 М трис-НС1 буфера (pH 7,7) с 1 мМ ЭДТА. Сразу после этого вносили в кювету 2 мл полученного раствора 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 минуты на спектрофотометре «Спекол-210».

Коэффициент вариации 1,8 %.

Активность фермента выражали в мкат/г ткани.

Полученные при экспериментальных исследованиях количественные данные были подвергнуты статистическому анализу [6].

Результаты исследований и их обсуждение

Данные о влиянии нейротропных препаратов на активность ферментов тиолового обмена и детоксикации в сетчатке глаз кроликов при развитии экспериментальной глаукомы представлены в таблице.

Таблица

Влияние нейротропных препаратов 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)	Без препарата				
	n	9	8	7	8
	M	521,11	490,00	465,71	423,75
	m	6,61	6,27	6,18	3,55
	p	-	<0,01	<0,01	<0,00001
	%	100	94,0	89,4	81,3
	p1	-	-	-	-
	%1	-	100	100	100
	Нейротропные препараты				
	n	9	8	7	8
	M	521,11	625,35	547,20	495,35
	m	6,61	7,20	8,44	5,40
	p	-	<0,0001	<0,05	<0,01
	%	100	120,0	105,0	95,1
p1	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
%1	-	127,6	117,5	116,9	
Глутатион-S-трансфераза (нкат/г ткани)	Без препарата				
	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
	p1	-	-	-	-
	%1	-	100	100	100
	Нейротропные препараты				
	n	9	8	7	8
	M	524,44	498,20	472,32	445,80
	m	7,75	8,45	7,50	9,34
	p	-	<0,05	<0,001	<0,0001
	%	100	95,0	90,1	85,0
p1	-	>0,05	<0,001	<0,01	
%1	-	102,7	110,6	111,5	

Примечание: p – уровень значимости различий данных по отношению к норме, рассчитанный с помощью t-теста для независимых выборок; p1 – уровень значимости различий данных по отношению к группе «без препарата», рассчитанный с помощью t-теста для независимых выборок.

Исследуя активность глутатионпероксидазы, можно отметить ее понижение при развитии глаукоматозного процесса. В 1-й срок активность фермента снизилась до 490,0±6,27 мккат/г (94 %), во 2-й срок показатели активности снизились до 465,71±6,18 мккат/г (89,4 %). В последний срок развития экспе-

риментальной глаукомы (3 срок) активность изучаемого фермента уменьшилась до 423,75±3,55 мккат/г (81,3 %), по сравнению с нормой (521,11±6,61) мккат/г.

С применением нейротропных препаратов активность глутатионпероксидазы в сетчатке и зрительном нерве в 1-й срок составила — 625,35±7,20 мккат/г (120,0 %), во 2-й срок — 547,20±8,44 мккат/г (105,0 %), в 3-й срок — 495,35±5,40 мккат/г (95,1 %), по сравнению с нормой.

При сравнении показателей активности фермента глутатионпероксидазы этой группы с группой без применения препаратов, их величины были значительно выше и составили в 1-й срок — 127,6 %, во 2-й срок — 117,5%, в 3-й срок — 116,9 %.

Активность глутатион-S-трансферазы в сетчатке и зрительном нерве при развитии экспериментальной глаукомы также снижалась во все сроки наблюдения.

Так в 1-й срок развития экспериментальной глаукомы показатели активности фермента снизились до 485,0±6,88 нкат/г, что составило 92,5 %, во 2-й — до 427,14±5,85 нкат/г (81,4 %), в 3-й — до 400,0±7,68 нкат/г (76,3%), по сравнению с нормой (524,44±7,75) нкат/г.

При применении нейротропных препаратов активность глутатион-S-трансферазы в сетчатке и зрительном нерве в 1-й срок развития экспериментальной глаукомы составила — 498,20±8,45 нкат/г, что составило 95,0 %, во 2-й — 472,32±7,50 нкат/г (90,1%), в 3-й — (445,80±9,34) нкат/г (85,0 %), по сравнению с нормой.

Сравнивая показатели активности данного фермента группы с применением препаратов и группы без применения препаратов, мы обнаружили, что их величины начиная со второго срока были существенно выше и составили — 110,6 % (во 2 срок) и 111,5 % (в 3 срок).

В целом, анализ проведенных нами экспериментальных исследований по развитию экспериментального глаукоматозного процесса свидетельствует о снижении активности ферментов системы детоксикации глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы.

Полученные данные о применении нейротропных препаратов при развитии экспериментальной глаукомы можно рассматривать как одно из звеньев механизма их антиоксидантного действия на нейронные компоненты органа зрения.

Выводы

1. Развитие экспериментальной глаукомы приводит к отчетливому снижению активности ферментов системы детоксикации (глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы).



Применение препаратов — нейропротекторов оказывает стабилизирующее влияние на функцию глутатион-S-трансферазы и активирует глутатионпероксидазу (на 27,6 %) в начальный период глаукоматозного процесса. В конечный период наблюдения изучаемые препараты существенно уменьшают степень снижения активности глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы, показатели актив-

ности составили — 95 и 85 % по отношению к норме, тогда как без препаратов активность снизилась до 81 и 76 % соответственно.

2. Выявленное нами стабилизирующее влияние нейропротекторных препаратов на ферменты дезинтоксикации, можно рассматривать как одно из звеньев механизма их антиоксидантного действия на нейронные компоненты органа зрения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алябьева Ж. Ю. Сосудистые факторы риска в развитии глаукомы с нормальным давлением / Ж. Ю. Алябьева // Клинич. офтальмол. — 2001. — Т. 2, № 2. — С. 6-8.
2. Аникина А. Ю. Неинвазивные методы определения риска прогрессирования глаукомной оптической нейропатии: автореф. дисс. ... канд. мед. наук: 14.00.08 «Институт повышения квалификации Федерального медико-биологического агентства» / А. Ю. Аникина. — М. 2006, — 19 с.
3. Бунин А. Я. Метаболические факторы патогенеза первичной открыто-угольной глаукомы / А. Я. Бунин // Глаукома: итоги и перспективы на рубеже тысячелетий: Матер. науч.-практич. конф. — М., 1999. — С. 9-12.
4. Вургафт М.Б. О патогенезе и классификации открытоугольной глаукомы. Экспериментально-лабораторные исследования / М.Б. Вургафт // Офтальмол. журн. — 1993. — № 3. — С. 172-175.
5. Егоров Е. А. Гипотензивное лечение глаукомы. / Е.А. Егоров // Клиническая офтальмология. — 2000. — № 1. — С. 6-11.
6. Наследов А. SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках / А. Наследов. — СПб.: Питер, 2005. — 416 с.
7. Araie M. Comparison of visual field defects between normal-tension and primary open-angle glaucoma in the late stage of the disease / M. Araie, J. Hori, N. Koseki // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. — 1995. — Vol. 233, № 10. — P. 610-616.
8. Atanassov M. Visual field changes in primary open-angle and normal tension glaucoma / M. Atanassov, M. Konareva-Kostianeva // Abstracts 4th I.G.S. — 2003. — P. 71.
9. Bergmeyer H.V. Methoden der enzymatischen Analyse / H.V. Bergmeyer / Herausgegeben von H. U. Bergmeyer. — Berlin. — 1986. — S. 1605 — 1609.
10. Boland M.V. Risk factors and open-angle glaucoma: classifications and application / M. V. Boland, H.A. Quigley // J Glaucoma. — 2007. — Vol. 16, — № 4. — P. 406-418.
11. Gupta N. Human glaucoma and neural degeneration in intracranial optic nerve, lateral geniculate nucleus, and visual cortex / N. Gupta, L. C. Ang, L. Noel de Tilly // Br. J. Ophthalmol. — 2006. — Vol. 90. — P. 674-678.
12. Kortuem K. Differential susceptibility of retinal ganglion cells to reactive oxygen species / K. Kortuem, L. Geiger, L. Levin // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2000. — Vol. 41. — P. 3176-3182.
13. Kusari J. Effect of memantine on neuroretinal function and retinal vascular changes of streptozotocin-induced diabetic rats / J. Kusari, S. Zhou, E. Padillo // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2007. — Vol. 48. — P. 5152-5159.
14. Lagreze W. A. Neuroprotection in ischemia of the retina an animal model / W.A. Lagreze, T. Otto, T.J. Feuerstein // Ophthalmologie. — 1999. — Vol. 96, № 6. — P. 370-374.
15. Lee A. J. Female reproductive factors and open angle glaucoma: the Blue Mountains eye study / A. J. Lee, P. Mitchell, E. Rochtchina, P. R. Healey // British Journal of Ophthalmology. — 2003. — Vol. 87. — P. 1324-1328.
16. Neufeld A. New conceptual approaches for pharmacological neuroprotection in glaucomatous neuronal degeneration / A. Neufeld // J. Glaucoma. — 1998. — Vol. 7, № 6. — P. 434-438.
17. Quigley H. A. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020 / H. A. Quigley, A. T. Broman // Br. J. Ophthalmol. — 2006. — Vol. 90. — P. 262-267.
18. Ritch R. The Glaucomas. — St. Luis: /R. Ritch, M. Shields, T. Krupin. CV Mosby — 1996. — 432 p.
19. Schempt H. Free radicals in the pathogenesis of ocular diseases. In, Haefliger I. O., Flammer J. (eds.): Nitric oxide and Endothelin in pathogenesis of glaucoma / H. Schempt, E. Elstner // Philadelphia: Lippincott-Raven. — 1998. — P. 112-135.
20. Schroder A. Einsatz von memantine bei glaucoma fere absolutum / A. Schroder, C. Erb // Klin. Monatsbl. Augenheilkd. — 2002. — Vol. 219. — P. 533-536.



КОРИГУЮЧИЙ ВЛИВ
НЕЙРОТРОПНИХ
ПРЕПАРАТІВ НА СТАН
ПРОЦЕСІВ ДЕТОКСИКАЦІЇ
ТА ЗНЕШКОДЖЕННЯ
ГІДРОПЕРОКСИДІВ
СІТКІВКИ ТА ЗОРОВОГО
НЕРВУ ПРИ РОЗВИТКУ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ
ГЛАУКОМИ

*В. М. Сердюк, В. В. Семенко,
Н. О. Мала*

Резюме. Робота була виконана на кролях з модельованою глаукомою. Визначали активність ферментів глутатіонпероксидази і глутатіон-S-трансферази в тканинах сітківки та зорового нерву в динаміці розвитку глаукомного процесу. Отримані результати свідчать про зниження активності цих ферментів у порівнянні з нормою у всі строки спостереження і також про значне зменшення цього явища при застосуванні нейропротекторних препаратів.

Ключові слова: *глаукома, глутатіонпероксидаза, глутатіон-S-трансфераза, мемантин, цитіколін*

NEUROTROPIC DRUGS
CORRECTIVE INFLUENCE
ON THE DETOXICATION
AND NEUTRALIZATION
PROCESSES IN RETINA
AND OPTIC NERVE
IN EXPERIMENTAL
GLAUCOMA.

*V. N. Serdyk, V. V. Semenko,
N. O. Mala*

Summary. Adult rabbits with experimental glaucoma were used in this study. We studied glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase activity in the eye tissue during glaucoma process. Results suggest decrease activity of both ferments, compared to normal ranges. This influence was significantly prevented using neuroprotective drugs.

Key words: *glaucoma, glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, memantine, citicoline*