

УРОВЕНЬ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В СЕТЧАТКЕ И ЗРИТЕЛЬНОМ НЕРВЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЛАУКОМЕ

В. Н. Сердюк, канд. мед. наук, директор областной клинической офтальмологической больницы, **В. В. Семенко**, зав. отделением микрохирургии глаза областной клинической офтальмологической больницы, г. Днепрпетровск

При моделюванні глаукоматозного процесу у кроликів визначали концентрацію продуктів окислення ліпідів в зоровому нерві та сітківці. Встановлено різке підвищення концентрації кінцевого продукта — малонового діальдегіда і суттєве збільшення рівня проміжного продукта — дієнових кон'югатів в досліджуваних тканинах ока. Одержані результати свідчать про безпосередню участь процесів вільно-радикального окислювання ліпідів у патогенезі оптичної глаукоматозної нейродегенерації.

Ключевые слова: экспериментальная глаукома, перекисное окисление липидов

Ключові слова: експериментальна глаукома, перекисне окислення ліпідів

Введение. В структуре глазных заболеваний, ведущих к слепоте, а также инвалидизации, нарушающей качество жизни, главенствующая роль принадлежит первичной глаукоме. За последние 20 лет инвалидность по глаукоме увеличилась с 6,2 до 40,2 %, что обуславливает не только медицинскую, но и социальную актуальность проблемы [1, 3, 4, 11, 14].

Увеличение продолжительности жизни населения на современном этапе способствует значительному росту количества инволютивных заболеваний, ведущих к инвалидности, в том числе, и к глаукоме [7, 8, 15].

Актуальность и сложность проблемы глаукомы состоит в том, что с одной стороны, современная офтальмология имеет в своем арсенале значительный выбор лекарственных препаратов, методик консервативного и хирургического лечения, а с другой — не всегда данные лечебные мероприятия оказываются эффективными. Это объясняется сложностью патогенетических механизмов развития заболевания и, как правило, симптоматическим, а не патогенетическим подходом к его лечению и профилактике [12, 17, 19, 20].

В ряде исследований механизмы развития глаукомной атрофии зрительного нерва рассматривают в сравнении с другими нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера, Паркинсона. Роль половых гормонов в развитии многих заболеваний, связанных со старением, не вызывает сомнения, поэтому особую актуальность приобретает изучение их роли и в патогенезе развития ПОУГ [6, 13, 18, 20].

В последние годы показано значение свободно-радикальных процессов и, в частности, активных форм кислорода в патогенезе нейродегенеративных заболеваний. По всей вероятности, роль свободно-радикальных соединений кислорода особо значима при глаукоматозном поражении тканей глаза. Одна-

ко до последнего времени основное внимание при изучении патогенеза ПОУГ уделялось продуктам перекисного окисления липидов в камерной влаге и дренажной системе. Так, в ряде экспериментальных и клинических исследований показано изменение содержания продуктов липопероксидации и антиокислительных ферментов в трабекулярном аппарате и крови больных ПОУГ [5, 16, 18].

В то же время основными пусковыми факторами развития реакций пероксидации являются активные формы кислорода, которые способны вызывать повреждение не только липидов, но и всех компонентов клетки (белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов, мембран), что может играть важную роль в патогенезе ПОУГ [2, 16, 18].

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

Цель работы: изучение концентрации продуктов перекисного окисления липидов в сетчатке и зрительном нерве при моделировании глаукомы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ. Экспериментальные исследования проводились на 32 кроликах (массой 2,5–3,2 кг) на базе Днепрпетровской центральной научно-исследовательской лаборатории.

При проведении эксперимента соблюдались все правила, касающиеся исследований на животных, принятые международным сообществом при изучении органа зрения.

Все животные исследовались посредством биомикроскопии на щелевой лампе как при отборе экспериментальных животных (исключая аномалии), так и для наблюдений в процессе эксперимента. Перед экспериментом и в ходе эксперимента все животные подвергались измерению внутриглазного давления после общей анестезии путем введения кетамина 50 мг/кг; местно применяли глазные кап-

ли — 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 степени 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 концентрации малонового диальдегида и диеновых конъюгатов. Принцип метода определения содержания малонового диальдегида состоит в том, что при температуре 100°C в кислой среде малоновый диальдегид реагирует с 2-тиобарбитуровой кислотой, образуя окрашенный триметиновый комплекс с максимумом поглощения при длине волны 532 нм.

К исследуемой жидкости объемом 0,1 мл добавляли 3 мл 1 % ортофосфорной кислоты (рН 2,0), 1 мл 0,6 % раствора тиобарбитуровой кислоты и 0,1 мл 0,28 % раствора сернокислого железа. Пробирки помещали в кипящую водяную баню на 60 минут. Затем пробирки охлаждали в холодной воде при 0°С — 2°С и добавляли 4 мл бутанола, тщательно перемешивали и центрифугировали 10 мин при 3 тыс. об/мин.

Измеряли оптическую плотность верхней фазы на спектроколориметре «Specol — 210» при длине волны 535 нм против бутанола.

Расчет содержания продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, проводили с учетом коэффициента молярной экстинкции малонового диальдегида — $1,56 \cdot 10^5$ моль⁻¹·см⁻¹ и выражали в мкмоль/мл исследуемой жидкости или мкмоль/г ткани. Коэффициент вариации — 5,2 %.

Принцип метода определения диеновых конъюгатов состоит в том, что при перекисном окислении на стадии образования свободных радикалов в молекулах полиненасыщенных высших жирных кислот возникает система сопряженных двойных связей, что сопровождается появлением нового максимума в спектре поглощения 233 нм.

К 0,5 мл исследуемой жидкости добавляли 4,5 мл экстрагирующей смеси гептана с изопропиловым спиртом в соотношении 1:1 (V:V). После экстракции к смеси добавляли 0,5 мл дистиллированной воды и отбирали из верхней (гептановой) фазы расслоившейся пробы 0,5 мл и смешивали с 2,5 мл этилового спирта.

Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-26 при 233 нм против этилового спирта.

Содержание диеновых конъюгатов рассчитывали с учетом молярного коэффициента экстинкции $2,2 \cdot 10^5$ М⁻¹·см⁻¹ и выражали в мкмоль/мл исследуемой жидкости или мкмоль/г ткани.

Полученные при экспериментальных исследованиях количественные данные были подвергнуты статистическому анализу. Для выявления достоверности различий между средними арифметическими величинами использовали критерий Стьюдента и различия считали достоверными, если уровень значимости не превышал 5 %, т. е. при вероятности различий не менее 95 % [9, 10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Определение уровня малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в сетчатке и зрительном нерве при развитии экспериментальной глаукомы у животных с диабетом выявили существенное повышение их содержания (табл. 1, рис. 1).

Таблица 1

Содержание малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в сетчатке и зрительном нерве при развитии экспериментальной глаукомы

Исследуемый показатель	Статистич. показатель	Норма	Условия эксперимента		
			3 недели	6 недель	10 недель
Малоновый диальдегид (мкмоль/г ткани)	n	9	8	7	8
	M	911,11	1186,25	1504,29	1920,00
	m	20,51	39,46	58,91	59,22
	p	-	<0,0001	0,000001	<0,000001
	%	100,0	130,2	165,1	210,7
Диеновые конъюгаты (мкмоль/г ткани)	n	9	8	7	8
	M	180,00	215,71	242,86	278,75
	m	5,65	8,96	9,18	13,02
	P	-	<0,01	<0,0001	<0,00001
	%	100,0	119,8	134,9	154,9

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

Так, спустя три недели концентрация малонового диальдегида возрастала до 130,2 % (1186,25±39,46), по сравнению с нормой (911,11±20,51), при этом степень достоверности различий довольно высокая — p<0,0001. По мере развития экспериментальной глаукомы содер-

жание продуктов перекисного окисления липидов ещё больше возрастало: через 6 недель — до 165,1 % (1504,29±58,91), спустя 10 недель — 210,7 % (1920,00±59,22).

Столь высокая чувствительность липидов сетчатки к свободно-радикальному окислению объ-

ясняется, прежде всего, тем, что в них содержится значительное количество полиненасыщенных жирных кислот. Кроме того, сетчатка постоянно подвергается сочетанному воздействию света и кислорода, которые способствуют повышенной генерации свободных радикалов.

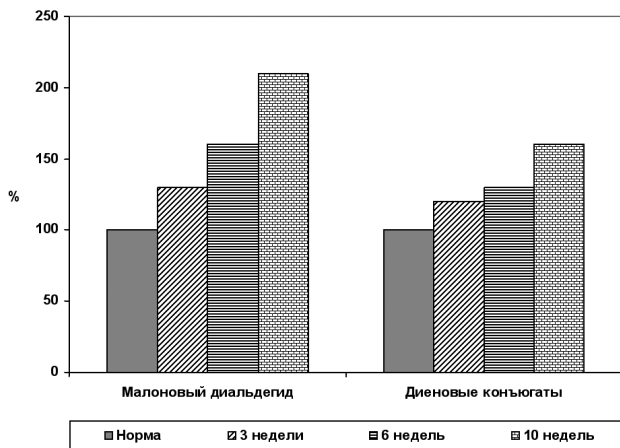


Рис. 1. Относительный уровень малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в сетчатке и зрительном нерве при развитии экспериментальной глаукомы (в % по отношению к норме)

При определении диеновых конъюгатов в сетчатке и зрительном нерве в ходе развития экспериментальной глаукомы также отмечается достоверное значительное повышение их уровня (уровень значимости составляет $p < 0,01$).

Через 3 недели уровень диеновых конъюгатов составил $215,71 \pm 8,96$, что на 19,8 % выше нормы ($180,0 \pm 5,65$), через 6 недель — $242,86 \pm 9,18$ (134,9 %), через 10 недель — $278,75 \pm 13,02$ (154,9 %).

В целом полученные нами результаты экспериментальных исследований выявили значительное повышение уровня продуктов ПОЛ в сетчатке и зрительном нерве при моделировании ПОУГ. При этом в конечные сроки наблюдений (10 недель) обнаружено резкое возрастание как промежуточных продуктов диеновых конъюгатов более чем в 1,5 раза, так и конечных — МДА более, чем в 2 раза.

Несомненно, накопление в сетчатке и зрительном нерве продуктов ПОЛ, имеющих выраженное нейротоксическое действие, является существенным звеном патогенеза глаукоматозной нейропатии.

ВЫВОДЫ:

При моделировании глаукоматозного процесса в сетчатке и зрительном нерве уже спустя 3 недели отчетливо возрастает концентрация МДА (на 30 %).

По мере развития экспериментальной глаукомы уровень продуктов ПОЛ в сетчатке и зрительном нерве возрастает непропорционально. Так, в конечный срок наблюдения (10 недель), содержа-

ние конечного компонента ПОЛ — МДА возрастает более чем вдвое (210,7 %), концентрация ДК повышается на 54,9 %.

Высокий уровень продуктов ПОЛ в исследуемых тканях глаза при экспериментальной глаукоме свидетельствует о дисбалансе между скоростью окислительных процессов и потенциалом антиоксидантной системы. Этот фактор можно рассматривать как важное звено в патогенезе глаукоматозной оптической нейропатии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев В. Н., Малеванная О. А. Исследование качества жизни больных первичной открытоугольной глаукомой // Глаукома: проблемы и решения: Сб. науч. ст. Всерос. науч. — практ. конф. — М., 2004. — С. 389–393.
2. 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.
3. Бачалдин И. Л., Егоров В. В., Смолякова Г. П. Коррекция гемореологических нарушений как метод лечения больных прогрессирующей открытоугольной глаукомой с нормализованным внутриглазным давлением // Современные технологии лечения глаукомы: Сб. науч. ст. науч. — практ. конф. — М., 2003. — С. 210–214.
4. Егоров В. В., Сорокин Е. Л., Смолякова Г. П. Клинико-патогенетические особенности прогрессирования первичной открытоугольной глаукомы с нормализованным внутриглазным давлением при различных конституциональных типах метаболического статуса организма // Лазерная рефракционная и интраокулярная хирургия: Сб. материалов Рос. науч. конф — СПб., 2002. — С. 92–93.
5. Жабоедов Г. Д., Петренко О. Б. Роль оксида азота в патогенезе глаукомы и перспективы разработки новых способов лечения глаукоматозной оптической нейропатии // Международный мед. журн. — 2004. — № 2. — С. 59–64.
6. Кашинцева Л. Т. Аднергетические 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.
7. Либман Е. С. Инвалидность вследствие глаукомы в России / Е. С. Либман, Е. В. Шахов, Е. А. Чумаева, ЯЗ. Елькина // Глаукома: 10 проблемы и решения: Всерос. науч. — практ. конф — М., 2004. — С. 430–433.
8. 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.
9. Наследов А. SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках. // СПб.: Питер, 2005. — 416 с.
10. Новые методы биохимического анализа. // Изд. Ленинградского универ. — 1991. — 395 с.

11. Allingham R. R., de Kater A. W., Ethier C. R. Schlemm's canal and primary open angle glaucoma: correlation between Schlemm's canal dimension and outflow facility // *Exp. Eye Res.* — 1996. — Vol. 62. — P. 101–109.
12. Greve E. L. The Editor's selection // *Glaucoma abstracts.* — 1996. — Vol. 7, № 1. — P. 7–25.
13. Hitchings R. Neurological associations with glaucoma // *International glaucoma Review Supplement.* — 2006. — Vol. 8, N3. — P. 25–26.
14. 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.
15. Mansouri K., Shaarawy T. Will improvement of knowledge lead to improvement of compliance with glaucoma medication? / *Acta Ophthalmologica.* — 2009. — P. 468.
16. Nathanson J. A., McKee M. The changes of nitric oxide synthase in the man eye in glaucoma // *Invest, ophthalmol. Vis. Sci.* — 1995. — Vol. 36. — P. 1765–1773.
17. 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.
18. Tezel G. Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences / *Prog. Retin. Eye Res.* — 2006. — Vol. 25. — № 5. — P. 490–513.
19. Weber A. J. Harman C D. Effects of optic nerve injury, glaucoma, and neuroprotection on the survival, structure, and function of ganglion cells in the mammalian retina / *J. Physiol.* — 2008. — Vol. 586. — P. 4393–4400.
20. Yucel Y. The evidence for glaucoma as a neurodegenerative disease // *International Glaucoma Review Supplement.* — 2006. — Vol. 8, N3. — P. 27–29.

LEVEL OF THE PRODUCTS OF PEROXIDE OXIDATION OF LIPIDS IN THE RETINA AND VISUAL NERVE IN EXPERIMENTAL GLAUCOMA

V. N. Serdyuk, V. V. Semenko
Dnepropetrovsk, Ukraine

The concentration of products of peroxide oxidization of lipids was determined in the retina and visual nerve in rabbits during modeling of the glaucomatous process. There was established a sharp increase of the final product concentration — malonic dialdehyde and substantial increase of the level of the intermediate product — diene conjugates in the eye tissues under study. The results obtained are evidence of the direct participation of the processes of free-radical oxidization of lipids in pathogenesis of the optical glaucomatous neurodegeneration.

