

# КЛІНІЧНА ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

© В. Н. Сердюк, В. В. Семенко

УДК 617.7-007.681:577.19-07

**В. Н. Сердюк, В. В. Семенко**

## ІЗУЧЕННЯ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ПОТЕНЦІАЛА ГЛУТАТИОНА В СЕТЧАТКЕ И ЗРИТЕЛЬНОМ НЕРВЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ НЕЙРОТРОПНИХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ МОДЕЛИРОВАННІ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМЫ У КРОЛИКОВ

**Областная клиническая офтальмологическая больница (г. Днепропетровск)**

Работа согласована с НИР кафедры неврологии и офтальмологии ДГМА на базе КЗ «ДОКОЛ».

**Вступление.** Актуальность проблемы первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ) остается в центре внимания офтальмологов, и до сегодняшнего дня в литературе нет единого мнения о первопричине данного заболевания..

Длительное время офтальмологи определяли первичную открытоугольную глаукому как состояние повышенного внутриглазного давления (ВГД), связанное со снижением скорости оттока и приводящее к специфической глаукомной атрофии диска зрительного нерва с экскавацией и изменениями в полях зрения [4,5,16].

В настоящее время повышение ВГД рассматривают лишь как один из факторов риска развития ПОУГ, а в качестве отдельной формы заболевания выделили также ПОУГ с нормальным внутриглазным давлением. ПОУГ с нормальным ВГД – это первичная открытоугольная глаукома с глаукоматозной экскавацией зрительного нерва и глаукоматозными дефектами в полях зрения и уровнем ВГД, не превышающим среднестатистических границ нормы [2,6,11,13].

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 [1,14].

Перекисное окисление липидов постоянно протекает в физиологических условиях и является составной частью процесса обновления липидного состава клеточных и внутриклеточных мембран, влияет на их проницаемость и активность мембранны-связанных ферментов. Интенсивность процессов ПОЛ значительно возрастает при определенных патологических состояниях вследствие увеличения образования активных форм кислорода – свободных радикалов (супероксид, перекись водорода, гидроксильный радикал, синглетный кислород). Важнейшей точкой приложения повреждающего действия свободных радикалов кислорода в клетке являются биологические мембранны. В свою очередь, процесс повреждения биомембран

неразрывно связан с образованием свободных радикалов и стимуляцией процессов ПОЛ [1,3,7,15].

Лечение глаукомы, несмотря на огромный арсенал медикаментозных препаратов и методов хирургии, по-прежнему остается актуальной, т.к. далеко не всегда эти лечебные мероприятия оказываются эффективными. Для разработки новых и совершенствования существующих способов лечения, необходимы дальнейшие исследования патогенетических механизмов, и в частности, выяснения факторов, способствующих возникновению и развитию глаукоматозного процесса. Особый интерес в этом аспекте представляют мема и нейродар [8,17,19].

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 [12,18].

Нейродар — ноотропный препарат, действующим веществом которого является цитиколин. Цитиколин обладает широким спектром действия: способствует восстановлению поврежденных свободных радикалов, ингибитор действий 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.

**Цель работы** заключалась в исследовании восстановительного потенциала глутатиона в сетчатке и зрительном нерве при развитии экспериментальной глаукомы в условиях применения нейротропных препаратов.

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

## КЛІНІЧНА ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

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: мемантин — 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 внутрглазного давления с помощью тонометра Маклакова.

Животные подвергались общей анестезии путем введения кетамина 50 мг/кг, местно применяли глазные капли 0,5 % раствор прокaina гидрохлорида, инстилируемые 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. Тонометрия производилась через каждые несколько часов.

Содержание животных и эксперименты проводились согласно положений «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

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 [10].

Принцип метода определения содержания восстановленного глутатиона: в результате реакции между глутатионом и метилглиоксалем в присутствии фермента глиоксилазы происходит образование

коньюгата 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 спектрофотометрически 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 [9].

### Результаты исследований и их обсуждение.

Данные о влиянии нейротропных препаратов на содержание восстановленного и окисленного глутатиона в сетчатке и зрительном нерве при развитии экспериментальной глаукомы представлены в таблице 1 и 2.

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

При применении нейротропных препаратов концентрация восстановленного глутатиона в 1 срок составила –  $2,23 \pm 0,06$  мкмоль/г (95,3%), во 2 срок –  $1,98 \pm 0,08$  мкмоль/г (84,6%), в 3 срок –  $1,64 \pm 0,08$  мкмоль/г (70,1%), по сравнению с нормой.

Сравнивая показатели содержания восстановленного глутатиона группы с применением нейротропных препаратов и группы без препаратов, можно отметить, что их величины в 1 срок составили – 118,6%, во 2 срок – 124,5%, в 3 срок – 120,6%.

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  $0,44 \pm 0,02$  мкмоль/г (84,6%), во 2 срок развития экспериментальной глаукомы содержание окисленного глутатиона понизилось до  $0,41 \pm 0,02$  мкмоль/г (78,8%), в последний период наблюдения (в 3 срок) можно отметить дальнейшее снижение концентрации окисленного глутатиона до  $0,38 \pm 0,02$  мкмоль/г (73,1%), по сравнению с нормой ( $0,52 \pm 0,02$ ) мкмоль/г.

# КЛІНІЧНА ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

Таблица 1

## Влияние нейротропных препаратов на содержание восстановленного и окисленного глутатиона в сетчатке и зрительном нерве при развитии экспериментальной глаукомы

Исследуемый показатель	Статистич. показатель	Норма	Условия эксперимента		
			1 срок	2 срок	3 срок
Без препарата					
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
	p1	-	-	- 1	- 1
	%1	-	100	00	00
	Нейротропные препараты				
	n	9	8	7	8
	M	2,34	2,23	1,98	1,64
Глутатион окисленный (мкмоль/г ткани)	m	0,06	0,06	0,08	0,08
	p	-	>0,05	<0,01	<0,000
	%	100	95,3	84,6	70,1
	p1	-	<0,01	<0,01	<0,05
	%1	-	118,6	124,5	120,6
	Без препарата				
	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
Глутатион окисленный (мкмоль/г ткани)	%	100	84,6	78,8	73,1
	p1	-	-	-	-
	%1	-	100	100	100
	Нейротропные препараты				
	n	9	8	7	8
	M	0,52	0,47	0,44	0,47
	m	0,02	0,03	0,03	0,04
	p	-	<0,05	<0,01	<0,001
	%	100	90,4	84,6	90,4
	p1	-	>0,05	>0,05	>0,05
	%1	-	106,8	107,3	123,7

**Примечание:** р - 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.

При применении нейротропных препаратов содержание окисленного глутатиона в 1 срок составило  $0,47 \pm 0,03$  мкмоль/г (90,4%), во 2 срок —  $0,44 \pm 0,03$  мкмоль/г (84,6%), в 3 срок —  $0,47 \pm 0,04$  мкмоль/г (90,4%), по сравнению с нормой.

При сравнении показателей содержания окисленного глутатиона в данной группе с группой без применений препаратов, их величины были существенно выше и составляли в 1 срок — 106,8%, во 2 срок — 107,3%, в 3 срок — 123,7%.

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  $2,32 \pm 0,09$  мкмоль/г (81,1%), во 2 срок наблюдения — до  $1,99 \pm 0,04$  мкмоль/г (69,6%), в последний период развития экспериментальной глаукомы (в 3 срок) — до  $1,74 \pm 0,07$  мкмоль/г (60,8%), по сравнению с нормой ( $2,86 \pm 0,04$ ) мкмоль/г.

Применение нейротропных препаратов повышает концентрацию общего уровня глутатиона. Так в 1 срок эксперимента концентрация составила  $2,70 \pm 0,04$  мкмоль/г (94,4%), во 2 срок —  $2,43 \pm 0,05$  мкмоль/г (85,0%), в 3 срок —  $1,88 \pm 0,19$  мкмоль/г (65,7%) , по сравнению с нормой.

При сравнении содержания общего глутатиона в сетчатке и зрительном нерве при развитии экспериментальной глаукомы данной группы и группы без препарата можно отметить, что в 1 срок их величины составили — 116,4%, во 2 срок — 122,1%, в 3 срок — 108,0%.

Общий анализ полученных нами данных свидетельствует, что при развитии экспериментальной глаукомы в сетчатке и зрительном нерве экспериментальных животных наблюдается значительное снижение уровня глутатиона, а применение нейротропных препаратов в значительной мере уменьшают степень патохимических нарушений в системе глутатиона.

# КЛІНІЧНА ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

Таблица 2

## Влияние нейротропных препаратов на содержание общего глутатиона в сетчатке и зрительном нерве при развитии экспериментальной глаукомы

Исследуемый показатель	Статистич. показатель	Норма	Условия эксперимента		
			1 срок	2 срок	3 срок
Без препарата					
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
	p1	-	-	-	-
	%1	-	100	100	100
Нейротропные препараты					
	n	9	8	7	8
	M	2,86	2,70	2,43	1,88
	m	0,04	0,04	0,05	0,19
	p	-	<0,05	<0,0001	<0,00001
	%	100	94,4	85,0	65,7
	p1	-	<0,01	<0,001	>0,05
	%1	-	116,4	122,1	108,0

**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.

### Выводы.

1. Установлено, что при развитии глаукоматозного процесса в сетчатке и зрительном нерве экспериментальных животных, отмечается прогрессирующее снижение уровня восстановленной формы глутатиона — на 20%, 32% и 42% в конце 1, 2 и 3 срока наблюдения соответственно. Применение нейропротекторных препаратов существенно ограничивает степень понижения содержания глутатиона в исследуемых тканях. При сравнении экспериментальных групп с препаратами и без таковых, его уровень составляет — 118,6%, 124,5% и 120,6% в процессе развития глаукомы

2. Уровень окисленного глутатиона при моделировании глаукомы заметно снижается (на 15%, 21%, 17% в 1, 2 и 3 периоды наблюдения). Нейротропные препараты значимого влияния на

изменение содержания окисленного глутатиона при экспериментальной глаукоме не оказывают.

3. Общее содержание глутатиона в тканях сетчатки и зрительного нерва при моделировании глаукомы снижается во все периоды развития патологического процесса (на 19%, 30% и 39% в 1, 2 и 3 сроки наблюдения соответственно). Нейротропные препараты в значительной мере уменьшают степень патохимических нарушений в системе глутатиона, что особенно четко выражено в 1 и 2 периоды наблюдений: относительное повышение общего уровня глутатиона составляет при этом — 17% и 22% соответственно.

**Перспективы дальнейших исследований.** В дальнейшем планируется исследование влияния других фармакологических препаратов на развитие глаукоматозного процесса.

### Список литературы

1. Алексеев В.Н. Роль перекисного окисления липидов в патогенезе первичной открытоугольной глаукомы / В.Н. Алексеев, Е.Б. Мартынова, В.И. Садков // Офтальмол. журн. - 2000. - №1. - С. 12-17.
2. Бачалдин И.Л. Коррекция гемореологических нарушений как метод лечения больных прогрессирующей открытоугольной глаукомой с нормализованным внутриглазным давлением / И.Л. Бачалдин, В.В. Егоров, Г.П. Смолякова // Современные технологии лечения глаукомы: Сб. науч. ст. науч.-практ. конф. - М., 2003. - С. 210-214.
3. Бунин А. Я. Об участии процессов перекисного окисления липидов в деструкции дренажной системы глаза при открытоугольной глаукоме / А.Я. Бунин, М.Н. Бабижаев, А.В. Супрун // Офтальмол. журн. – 1985. – № 2. – С. 13 – 16.
4. Бунин А.Я. Глаукома / А.Я. Бунин. – М. : Мед., 1994. – 218 с.
5. 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.
6. Егоров В.В. Клинико-патогенетические особенности прогрессирования первичной открытоугольной глаукомы с нормализованным внутриглазным давлением при различных конституциональных типах метаболического статуса организма / В.В. Егоров, Е.Л. Сорокин, Г.П. Смолякова // Лазерная рефракционная и интраокулярная хирургия: Сб. материалов Рос. науч. конф - СПб., 2002. - С. 92-93.
7. Кащинцева Л. Т. Адренергические и кальциевые механизмы развития глаукомного процесса и перспективы патогенетического лечения больных открытоугольной глаукомой / Л.Т. Кащинцева, Г.Н. Крыжановский, Е.М. Липовецкая, О.П. Копп // Офтальмол. журн. - 1995. - № 3. - С. 133-137.

## КЛІНІЧНА ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

8. Линник Л.Ф. Комплексный подход к лечению глаукоматозной оптической нейропатии / Л.Ф. Линник, О.К. Оглезнева, Т.В. Соколовская // 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 / А. Наследов // Спб. : Питер, 2005. – 416 с.
10. Bergmeyer H. U. Methoden der enzymatischen Analyse / H. U. Bergmeyer // Herausgegeben von H. U. Bergmeyer. – Berlin, 1986. – S. 2254 – 2265.
11. Hitchings R. Neurological associations with glaucoma / R. Hitchings // International glaucoma Review Supplement. - 2006. - Vol.8, №3. - P. 25-26.
12. 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.
13. 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.
14. Mansouri K. Will improvement of knowledge lead to improvement of compliance with glaucoma medication? / K. Mansouri, T. Shaarawy // Acta Ophthalmologica. – 2009. – P. 468.
15. Moreno M. C. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injection of hyaluronic acid / M.C. Moreno, H.A. Marcos // Exp. Eye Res. – 2005.
16. Ritch R. The Glaucomas / R. Ritch, M. Shields, T. Krupin. – St. Luis : CV Mosby, 1996. - 432 p.
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. Schroder A. Einsatz von memantine bei glaucoma fere absolutum / A. Schroder, C. Erb // Klin. Monatsbl. Augenheilkd. - 2002. - Vol. 219. - P. 533-536.
19. Weber A.J. Effects of optic nerve injury, glaucoma, and neuroprotection on the survival, structure, and function of ganglion cells in the mammalian retina / A.J.Weber, C.D. Harman // J. Physiol. – 2008. – Vol. 586. – P. 4393-4400.

**УДК** 617.7-007.681:577.19-07

### ІЗУЧЕННЯ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ПОТЕНЦІАЛА ГЛУТАТИОНА В СЕТЧАТКЕ И ЗРІТЕЛЬНОМ НЕРВЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ НЕЙРОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМЫ У КРОЛИКОВ

**Сердюк В.Н., Семенко В.В.**

**Резюме.** Работа выполнена на кроликах с моделированной глаукомой. Определялись активность восстановленной и окисленной форм глутатиона в тканях сетчатки и зрительного нерва, в динамике развития глаукомного процесса. Полученные результаты свидетельствуют о снижении активности окисленной, восстановленной форм глутатиона, а также его общего содержания по сравнению с нормой во все сроки наблюдения. Применение нейропротекторных препаратов существенно уменьшало эти патологические изменения.

**Ключевые слова:** глаукома, глутатион окисленный, глутатион восстановленный, мемантин, цитиколин/

**УДК** 617.7-007.681:577.19-07

### ВИВЧЕННЯ ВІДНОВЛЮВАЛЬНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ГЛУТАТИОНУ В СІТКІВЦІ І ЗОРОВОМУ НЕРВІ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ НЕЙРОТРОПНИХ ПРЕПАРАТІВ ПРИ МОДЕЛЮВАННЯ ВІДКРИТОКУТОВОЇ ГЛАУКОМИ У КРОЛІВ

**Сердюк В.М., Семенко В.В.**

**Резюме.** Робота була виконана на кролях з моделюваною глаукомою. Визначали активність відновленої та окисленої форм глутатіону в тканинах сітківки і зорового нерву в динаміці розвитку глаукомного процесу. Отримані результати свідчать про зниження активності окисленої, відновленої форм глутатіону, а також його загального вмісту у порівнянні з нормою у всі строки спостереження. Застосування нейропротекторних препаратів значно зменшувало ці патологічні зміни.

**Ключові слова:** глаукома, глутатіон окислений, глутатіон відновлений, мемантин, цитіколін.

**UDC** 617.7-007.681:577.19-07

### Glutathione Reduction Potential In Retina And Optic Nerve Study, Using Neurotropic Drugs In Experimental Open-Angle Glaucoma

**Serdyk V.N., Semenko V.V.**

**Summary.** Adult rabbits with experimental glaucoma were used in this study. We studied reduced and oxidized glutathione activity in the eye tissue during glaucoma process. Results suggest decrease of both reduced and oxidized glutathione activity, as well as it's general content compared to normal ranges in all experimental terms. This effect was significantly decreased using neuroprotective drugs.

**Key words:** glaucoma, oxidized glutathione, reduced glutathione, memantine, citicoline.

Стаття надійшла 28.05.2012 р.

Рецензент – проф. Воскресенська Л.К.