



В.Н. Сердюк

СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН ЛИЗОСОМ СЕТЧАТКИ И ЗРИТЕЛЬНОГО НЕРВА ПРИ РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЛАУКОМЫ

Областная клиническая офтальмологическая больница, г. Днепропетровск

Ключові слова: глаукома, кисла фосфатаза, лізосоми.

Ключевые слова: глаукома, кислая фосфатаза, лизосомы.

Key words: glaucoma, acid phosphatase, lysosomas.

Роботу виконано на кролях з модельованою глаукомою. Визначали активність різних форм маркерного лізосомального ферменту (кислої фосфатази) в тканинах ока в динаміці розвитку глаукомного процесу. Отримані результати свідчать про зниження активності цих ферментів у порівнянні з нормою у всі строки спостереження.

Работа выполнена на кроликах с моделированной глаукомой. Определяли активность различных форм маркерного лизосомального фермента (кислой фосфатазы) в тканях глаза в динамике развития глаукомного процесса. Полученные результаты свидетельствуют о снижении их активности по сравнению с нормой во все сроки контроля.

Adult rabbits with experimental glaucoma were used in this study. We studied different forms of the marker lysosomal enzyme (acid phosphatase) activity in the eye tissue during glaucoma process. Results suggest decrease activity of all ferments, compared to normal ranges on all terms of control.

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

Актуальность и сложность проблемы глаукомы состоит в том, что, с одной стороны, современная офтальмология имеет в своем арсенале большой выбор лекарственных препаратов, методик консервативного и хирургического лечения, а с другой – не всегда эти лечебные мероприятия оказываются эффективными. Это объясняется сложностью патогенетических механизмов развития заболевания и симптоматическим, а не патогенетическим подходом к его лечению и профилактике [2,6,9].

Существует более 60 различных форм глаукомы, среди которых есть формы с четко установленными причинами развития (врожденная глаукома, фактопическая, фактоморфическая и т. д.). В то же время, первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) – это полиэтиологическое заболевание с пороговым эффектом, в патогенезе которого играют роль множество факторов риска (наследственность, возраст, сахарный диабет, уровень внутриглазного давления) и патогенные факторы. Развитие ПОУГ обуславливается микроструктурными изменениями на клеточном уровне вследствие нарушения многих процессов: инволютивных, биомеханических, механизмов кровообращения и сосудистой ауторегуляции, ускорением апоптоза нервных клеток и снижением уровня естественной нейропротекции [12,14,18]. В патогенезе заболевания играют роль изменения иммунных факторов, эластотонических свойств склеры, возраст, расовая принадлежность, сосудистая дисрегуляция, артериосклероз и т. д. [5,7,11,22].

Ограниченные возможности медикаментозной терапии и недостаточная эффективность хирургического лечения ПОУГ обусловили необходимость поиска новых патогенетических подходов к лечению и профилактике больных с глаукомой, что и определило цель и задачи исследования [14,15,19,21].

По всей вероятности, патофизиологические и метаболи-

ческие изменения приводят к серьезным повреждениям в сетчатке и зрительном нерве, в первую очередь, в результате образования свободных радикалов и активации нейротрансммиттера глутамата [10,13,16,17].

Участие процессов свободно-радикального окисления в патогенезе глаукомы принято рассматривать в двух направлениях. Во-первых, это патологические изменения, происходящие с участием активных форм кислорода и их метаболитов. Во-вторых, это цитотоксическое действие свободных радикалов на сетчатку и зрительный нерв [7,14].

Доказано, что при ишемии, вызванной повышенным внутриглазным давлением (ВГД), в сетчатке увеличивается количество радикалов.

Снижение поступления в нейроны молекулярного кислорода и повышение уровня восстановленности компонентов дыхательной цепи стимулирует восстановление кислорода по одноэлектронному пути с образованием свободных радикалов. Высокореакционные радикалы кислорода вызывают окисление биомолекул, а также инициируют цепные процессы перекисного окисления в мембранных липидах, прямое повреждение нуклеиновых кислот и белков [20,21].

Значит, основная стратегия лечения этого заболевания должна быть направлена на предотвращение гибели нейронов и обозначается как нейропротекция.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработка эффективных способов нейропротекторного лечения с учетом воздействия на указанные патогенетические механизмы глаукоматозной оптической нейропатии (ГОН).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИСЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент проводили на 32 кроликах (массой 2,0–3,2 кг).

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

Показатели активности различных форм маркерного лизосомального фермента – кислой фосфатазы в сетчатке и зрительном нерве – в динамике развития экспериментальной глаукомы

	Стат. показателя	Норма			1 срок			2 срок			3 срок		
		С	Н/С	О	С	Н/С	О	С	Н/С	О	С	Н/С	О
Кислая фосфатаза	М	40,3	70,9	111,2	35,4	78,8	112,9	30,4	81,4	111,9	25,8	90,4	116,1
	m	1,72	2,31	3,02	1,07	2,76	1,94	1,39	2,56	2,48	1,24	2,04	1,04
	p	–	–	–	>0,01	>0,001	<0,05	>0,001	>0,01	<0,05	>0,0001	>0,0001	<0,05
	%	100	175,9	275,9	87,8	195,5	280,1	75,4	201,9	277,7	64,0	224,3	288,1

Примечание: p – уровень значимости различий по отношению к норме.

Экспериментальные кролики поделены на 4 группы: контроль, 1 срок (3 недели), 2 срок (6 недель) и 3 срок (10 недель) исследования. В контрольной группе находились 9 животных, над которыми не производили какие-либо эксперименты. В трех экспериментальных группах было по 8, 7 и 8 кроликов соответственно.

Всех животных исследовали посредством биомикроскопии на щелевой лампе как при отборе экспериментальных животных (исключая аномалии), так и для наблюдений в процессе эксперимента.

Животных подвергали 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.

Всех животных перед и в ходе эксперимента подвергали измерению внутриглазного давления.

В переднюю камеру глаза все животные получали инъекции раствора гиалуроната, перед этим иглой в районе лимба отбирали 0,15 мл камерной влаги, которую использовали для биохимических исследований. Инъекции производили в правый глаз, а в левый, служивший контролем, вводили эквивалентное количество растворителя (сбалансированный солевой раствор), на котором готовился раствор гиалуроната. Немедленно после инъекции кроликов проверяли путем биомикроскопии для оценки травмы, возможно, вызываемой в процессе инъекции. Тонometriю производили 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).

Сетчатку немедленно удаляли и помещали в свежеприготовленную среду выделения лизосом. Сетчатки с двух глаз каждого животного объединяли и суспензировали в буфере, содержащем 20 мМ НЕРЕС-КОН (pH = 7,5), 1,5 М MgCl₂, 0,5 мМ сахарозы, содержащей поливинилпирролидон.

Сетчатку аккуратно гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым настилом. Полученный гомогенат центрифугировали при 750g в течение 10 минут при 4°C для удаления ядер и неразрушенных клеток. Супернатант затем центрифугировали при 6 000 g в течение 15 минут.

Полученный осадок лизосом ресуспензировали и использовали для биохимических анализов: определения белка и активности лизосомальных ферментов. Активность различных форм маркерного лизосомального фермента – кислой фосфатазы в сетчатке и зрительном нерве – определяли с

помощью методов спектрофотометрического анализа.

Данные обрабатывали с помощью соответствующих методов статистического анализа [1,3,4,8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные биохимических исследований активности различных форм маркерного лизосомального фермента – кислой фосфатазы в сетчатке и зрительном нерве экспериментальных животных – в различные периоды развития глаукоматозных процессов представлены в таблице 1, а также в виде диаграмм (рис. 1).

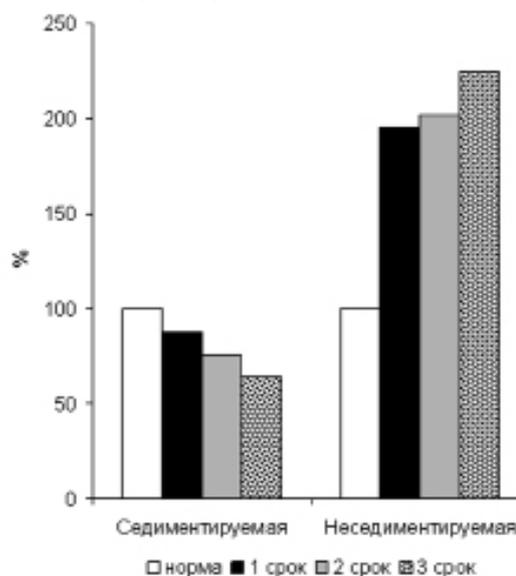


Рис. 1. Соотношение величин активности различных форм маркерного лизосомального фермента – кислой фосфатазы в сетчатке и зрительном нерве экспериментальных животных – в различные периоды развития экспериментальной глаукомы.

Начиная с 1 срока наблюдения активность кислой фосфатазы седиментируемой формы снижается на 12,2 %, т. е. составляет 35,4±1,07 по сравнению с нормой (40,3±1,72). Во второй и третий срок наблюдается похожая картина в снижении активности фермента на 24,6%, что составило 30,4±1,39 и 36% (25,8±1,24) соответственно.

Что касается неседиментируемой формы, то во все сроки наблюдения отмечается повышение активности маркерного лизосомального фермента – кислой фосфатазы по сравнению с нормой. Так, в 1 срок активность была выше нормы (70,9±2,31) и составила 78,8±2,76 (на 95,5%), во второй – 81,4±2,56 (на 101,9%), в третий – 90,4±2,04 (на 124,3%).



ВЫВОДЫ

При развитии экспериментальной глаукомы отмечается нарушение стабильности лизосомальных мембран сетчатки зрительного нерва. Эти изменения нарастают по мере развития глаукоматозного процесса.

В начальной стадии отмечается достоверное снижение уровня седиментируемой активности кислой фосфатазы – маркерного лизосомального фермента, солюбилизация которого возрастает при нарушении структуры внутриклеточных мембран. В конце периода наблюдения уровень этой формы фермента снижается более чем на 30%.

Обнаруженные нарушения стабильности лизосомальных мембран сетчатки и зрительного нерва при моделировании экспериментальной глаукомы можно рассматривать как следствие оксидативного стресса, развивающегося при данном патологическом состоянии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лакин Г.Ф. Биометрия / Ларкин Г.Ф. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
2. Луценко Н.С. Гормонально-метаболические нарушения при первичной открыто-угольной глаукоме и патогенетическое обоснование их коррекции в комплексном лечении: автореф. дис. ... канд.мед.наук: спец. 14.01.18 «Офтальмология» / Н.С. Луценко – Запорожжя, 2007. – 18 с.
3. Наследов А. SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках. / Наследов А. – СПб.: Питер, 2005. – 416 с.
4. Новые методы биохимического анализа – СПб.: Изд. Ленинградского универ., 1991. – 395 с.
5. Agar A. Retinal ganglion cell line apoptosis induced by hydrostatic pressure / Agar A., Li S. // Brain Res. – 2006. – V. 1086. – P. 191–200.
6. Benozzi J. Effect of hyaluronic acid on intraocular pressure in rats / Benozzi J., Nahum L.P., Campanelli J.L. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2002. – V. 43. – P. 2196–2200.
7. Bergamini C.M. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage / Bergamini C.M., Gambetti S., Dondi A. // Cur.Pharm. Design. – 2004. – Vol. 10 (14). – P. 1611–1626.
8. Bergmeyer H.U. Methoden der enzymatischen analyse / Bergmeyer H.U. – Berlin: Akademi-Verlag, 1970. – P. 1667–1670.
9. Boland M.V. Risk factors and open-angle glaucoma: classification and application / Boland M.V., Quigley H.A. // J Glaucoma. – 2007. – V. 16, №4. – P. 406–418.
10. Carter-Dawson L. Vitreal glutamate concentration in monkeys with experimental glaucoma / Carter-Dawson L., Crawford M.L., Harwerth R.S. // J Glaucoma. – 2002. – V. 43. – P. 2633–2637.
11. Chergel D. Systemic reduction in glutathione levels occurs in patients with primary open angle glaucoma / Chergel D., Griffiths H.R., Hilton E.J. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2005. – V. 46. – P. 877–883.
12. Chidlow G. Pharmacological neuroprotection for glaucoma / Chidlow G., Wood J. P. M., Casson R. J. // Drugs. – 2007. – V. 67, №5. – P. 725–759.
13. Dun Y. Expression of the cysteine-glutamate exchanger in retinal ganglion cells and regulation by nitric oxide and oxidative stress / Dun Y., Mysona B. // Cell Tissue Res. – 2006. – P. 1–14.
14. Kumar D.M. Oxidative stress in glaucoma: a burden of evidence / Kumar D.M., Agarwal N. // J Glaucoma. – 2007. – V. 16. – P. 334–343.
15. Lipton S.A. Pathologically activated therapeutics for neuroprotection / Lipton S.A. // Nature Reviews Neurosci. – 2007. – V. 8. – P. 803–808.
16. Madl J.E. Depletion of taurine and glutamate from damaged photoreceptors in the retina of dogs with primary glaucoma / Madl J.E., McIlroy T.R. // Am J Vet. Res. – 2005. – V. 66. – P. 791–799.
17. Martin K.R. Retinal glutamate transporter changes in experimental glaucoma and after optic nerve transection in therat / Martin K.R., Levkovitch-Verbin H., Valenta D. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2002. – V. 43. – P. 2236–2243.
18. Mates J. Pathways from glutamine to apoptosis / Mates J., Segura J., Alonso F. // Front. In Bioscience. – 2006. – V. 11. – P. 3164–3180.
19. Moreno M.C. Effect of glaucoma on the retinal glutamate/glutamine cycle activity / Moreno M.C., Sande P., Marcos H.A. // FASEB J. – 2005. – V. 19, №9. – P. 1161–1162.
20. Moreno M.C. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injection of hyaluronic acid / Moreno M.C., Marcos H.A.A // Exp. Eye Res. – 2005. – №81 (1). – P. 71–80.
21. Moreno M.C. Retinal oxidative stress induced by high intraocular pressure / Moreno M.C., Campanelli J.L., Sande P. // Free Radic. Biol. Med. – 2004. – V. 37. – P. 803–812.
22. 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, S. Viswanathan // J Physiol. – 2008. – V. 18. – P. 4393–4400.

Сведения об авторе:

Сердюк В.Н., к. мед. н., директор областной клинической офтальмологической больницы, г. Днепрпетровск.

Поступила в редакцию 05.06.2012 г.