

## АКТИВНОСТЬ ЭНЗИМАТИЧЕСКИХ СИСТЕМ ГАШЕНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА СЕТЧАТКИ И ЗРИТЕЛЬНОГО НЕРВА ПРИ РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЛАУКОМЫ

В. Н. Сердюк

*Областная клиническая офтальмологическая больница  
(Днепропетровск)*

### Введение

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 [2,6,8,10]. Известно 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. В патогенезе заболевания играют роль также изменения иммунных факторов, эластотонических свойств склеры, возраст, расовая принадлежность, сосудистая дисрегуляция, артериосклероз и т.д. [7,13,15,17,18].

В последние годы появились доказательства роли свободно-радикальных процессов и, в частности, перекисного окис-

Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології

ления липидов в при развитии глаукомы. Однако эти данные касаются только механизмов нарушения путей оттока камерной влаги и в частности повреждения структуры и функции трабекулярного аппарата [9,11,12,16]. 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 ценные процессы перекисного окисления в мембранных липидах, прямое повреждение нуклеиновых кислот и белков в нервных клетках сетчатки и зрительного нерва [14,19,20].

Основная задача исследований в области разработки новых методов лечения ПОУГ заключается в селекции тех патогенетических факторов, воздействие на которые позволит достичь благоприятного клинического эффекта. Весьма важным аспектом проблемы является разработка эффективных способов нейропротекторного лечения с учетом воздействия на указанные патогенетические механизмы глаукоматозной оптической нейропатии [13,15].

В этой связи **целью** настоящей работы явилось изучение активности энзиматических систем обезвреживания активных форм кислорода сетчатки и зрительного нерва при развитии экспериментальной глаукомы.

### Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования проводились на 32 кроликах (массой 2,5 - 3,2 кг). При проведении эксперимента 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 эксперименте.

Актуальні проблеми екологічної та клінічної біохімії

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 ферментов супероксиддисмутазы и каталазы.

СОД и каталаза являются важными компонентами антиоксидантной системы. СОД катализирует дисмутацию супероксидных радикалов и тем самым предотвращает патогенное действие активных форм кислорода. Каталаза разлагает перекись водорода, образующуюся в супероксидной реакции.

*Определение активности супероксиддисмутазы (СОД).* Принцип метода состоит в определении степени торможения определяемой СОД реакции восстановления нитросинего тетразолия супероксидными радикалами [3]. Для определения активности СОД 0,02 мл сыворотки крови или тканевого экстракта вводили в 3 мл инкубационной среды, содержащей 0,41 мМ нитросинего тетразолия, 0,33 мМ ЭДТА, 0,01 мМ N-метилфеназония метилсульфата. Измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 540 нм, затем добавляли в кювету спектрофотометра 0,1 мл 0,8 мМ НАД-Н, перемешивали и оставляли в темноте на 10 мин, после чего повторно измеряли оптическую плотность.

О реакции судили по разнице между первым и вторым показаниями спектрофотометра. За единицу активности принимали 50 % торможения реакции восстановления нитросинего тетразолия. Коэффициент вариации 6,2%. Активность фермента выражали в условных единицах на г ткани.

*Определение каталазы.* Принцип метода основан на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс [1].

*Ход определения.* Реакцию запускали добавлением 0,1 мл материала для исследований гомогената, приготовленного на 0,05M трис-НСI-буфере (рН 7,8) к 2 мл 0,03 % раствора перекиси водорода. В холостую пробу вместо материала вносили 0,1 мл дистиллированной воды. Реакцию останавливали через 10 мин добавлением 1 мл 4% молибдата аммония. Интенсивность развившейся окраски измеряли на спектрофотометре "Спекол-210" при длине волны 410 нм против контрольной пробы, в которую вместо перекиси водорода вносили 2 мл воды. Активность каталазы сыворотки выражали в мкат/г ткани. Коэффициент вариации 8,7%.

Данные обрабатывались с помощью соответствующих методов статистического анализа [4,5].

#### **Полученные результаты и их обсуждение**

Данные, полученные при изучении активности супероксиддисмутазы и каталазы в сетчатке и зрительном нерве при развитии экспериментальной глаукомы представлены в таблице 1 и на диаграмме (рис. 1).

Изучая активность супероксиддисмутазы, можно отметить снижение ее активности во все сроки наблюдения по сравнению с нормой ( $37,56 \pm 1,81$ ). Так в 1 срок показатели активности фермента составили -  $33,88 \pm 1,33$  (90,2%). Однако в этот период развития глаукоматозного процесса снижению скорости дисмутации супероксидных радикалов.

В дальнейшем по мере развития патологического процесса в органе зрения скорость дисмутации активной формы кислорода продолжает уменьшаться. Во 2 срок наблюдения активность СОД падает до  $30,00 \pm 1,31$ , что составляет 79,9%, по отношению к норме, при этом степень достоверности различий довольно высокая -  $p < 0,01$ . В заключительный период

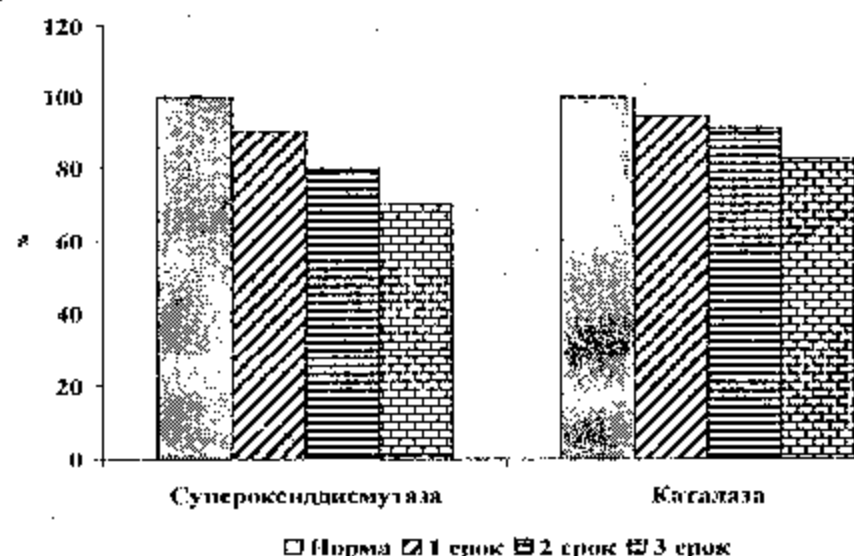
наблюдения (3 срок) отмечается дальнейшее снижение активности фермента до  $26,25 \pm 0,75$  (69,9%).

Таблица 1

**Активность супероксиддисмутазы и каталазы в сетчатке и зрительном нерве при развитии экспериментальной глаукомы**

Исследуемый показатель	Статистич. показатель	Норма	Условия эксперимента		
			1 срок	2 срок	3 срок
Супероксиддисмутаза (усл. ед./г ткани)	n	9	8	7	8
	M	37,56	33,88	30,00	26,25
	m	1,81	1,33	1,31	0,75
	p	-	>0,05	<0,01	<0,0001
	%	100	90,2	79,9	69,9
Каталаза (мккат/г ткани)	n	9	8	7	8
	M	510,56	483,75	467,14	422,50
	m	6,43	10,68	9,93	11,46
	p	-	<0,05	<0,01	<0,00001
	%	100	94,7	91,5	82,8

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



**Рис. 1.** Относительная активность супероксиддисмутазы и каталазы в сетчатке и зрительном нерве при развитии экспериментальной глаукомы.

Исследование активности каталазы выявили понижение ее активности в сетчатке и зрительном нерве при развитии экспериментальной глаукомы. Так в 1 срок наблюдения активность фермента уменьшилась до  $483,75 \pm 10,68$ , что составило 94,7% по сравнению с нормой -  $510,56 \pm 6,43$ , во 2 срок наблюдения активность каталазы снижается до  $467,14 \pm 9,93$  (91,5%). В 3 срок развития экспериментальной глаукомы от-

мечается дальнейшее снижение активности фермента до  $422,50 \pm 11,46$ , что составило 82,8%.

Обобщая результаты исследований активности ферментов антиоксидантной системы СОД и каталазы в сетчатке и зрительном нерве при развитии экспериментальной ПОУГ необходимо отметить следующее.

### Выводы

1. Выявленные изменения в активности изученных ферментов свидетельствуют о существенном снижении процессов обезвреживания активных форм кислорода за счет реакций дисмутации супероксидного радикала и разложения перекиси водорода. Все это создает условия для повышения концентрации активных форм кислорода в сетчатке и зрительном нерве при развитии экспериментальной ПОУГ.

2. Принимая во внимание возможность повышения повреждающего действия активных форм кислорода в этих условиях на молекулярные и мембранные структуры нервных клеток, выявленные нами нарушения в энзиматической системе антирадикальной защиты можно рассматривать как существенное звено нейродегенеративного процесса развивающегося при ПОУГ.

### Литература

1. Королук М. А. Метод определения активности каталазы / М.А.Королук, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // *Лабораторное дело*. - 1988. - № 1. - С. 16-18.
2. Луценко Н. С. Гормонально-метаболические нарушения при первичной открыто-угольной глаукоме и патогенетическое обоснование их коррекции в комплексном лечении: автореф. дис. на соиск. ученой степени канд. мед. наук : спец. 14.01.18 "Глазные болезни" / Н.С.Луценко. - Запорожье, 2007. - 18 с.
3. Макаренко Е.В. Комплексное определение активности супероксиддисмутазы и глутатионредуктазы в эритроцитах у больных с хроническими заболеваниями печени / Е.В.Макаренко // *Лабораторное дело*. - 1988. - № 11. - С. 48-50.
4. Наследов А. SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках / А.Наследов. - СПб. : Питер, 2005. - 416 с.

5. Новые методы биохимического анализа. - Изд. Ленинградского универ., 1991. - 395 с.
6. Agar A. Retinal ganglion cell line apoptosis induced by hydrostatic pressure / A. Agar, S. Li // *Brain Res.* - 2006. - V. 1086. - P. 191-200.
7. Glutathione transferases catalyse the detoxication of oxidized metabolites of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes / S. Baez, J. Segular, M. Widersten, A.-S. Johansson // *Biochem. J.* - 1997. - Vol. 324. - P. 25-28.
8. Benozzi J. Effect of hyaluronic acid on intraocular pressure in rats / J. Benozzi, L. P. Nahum, J. L. Campanelli // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 2002. - V. 43. - P. 2196-2200.
9. Bergamini C. M. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage / C. M. Bergamini, S. Gambetti, A. Dondi // *Cur. Pharm. Design.* - 2004. - Vol. 10 (14). - P. 1611 - 1626.
10. Boland M. V. Risk factors and open-angle glaucoma: classifications and application / M. V. Boland; H. A. Quigley // *J. Glaucoma.* - 2007. - V. 16, № 4. - P. 406-418.
11. Oxidative damage and protection of the RPE / J. Cai, K. C. Nelson, M. Wu [et al.] // *Progress in Retinal and Eye Research.* - 2000. - Vol. 19 (2). - P. 205 - 221.
12. Chorghel D. Systemic reduction in glutathione levels occurs in patients with primary open angle glaucoma / D. Chorghel, H. R. Griffiths, E. J. Hilton // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 2005. - V. 46. - P. 877-883.
13. Chidlow G. Pharmacological neuroprotection for glaucoma / G. Chidlow, J. P. M. Wood, R. J. Casson // *Drugs.* - 2007. - V. 67, № 5. - P. 725-759.
14. Kumar D. M. Oxidative stress in glaucoma: a burden of evidence / D. M. Kumar, N. Agarwal // *J. Glaucoma.* - 2007. - V. 16. - P. 334-343.
15. Lipton S. A. Pathologically activated therapeutics for neuroprotection / S. A. Lipton // *Nature Reviews Neurosci.* - 2007. - V. 8. - P. 803-808.
16. Maber P. The molecular basis of oxidative stress-induced cell death in an immortalized retinal ganglion cell line / P. Maber, A. Hanneken // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 2005. - V. 46. - P. 749-757.

17. Moreno M. C. Effect of glaucoma on the retinal glutamate / glutamine cycle activity / M. C. Moreno, P. Sande, H. A. Marcos // *FASEB J.* - 2005. - V. 19, № 9. - P. 1161-1162.
18. 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.
19. Moreno M. C. Retinal oxidative stress induced by high intraocular pressure / M. C. Moreno, J. Campanelli, P. Sande // *Free. Radic. Biol. Med.* - 2004. - Vol. 37, № 6. - P. 803-812.
20. 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.

**Резюме**

**Сердюк В.Н.** Активність ензиматических систем гашення активних форм кислорода сітчатки і зрительного нерва при розвитку експериментальної глаукоми.

Робота виконана на кроликах з моделюваною глаукомою. Определяли активність ферментів супероксиддисмутази і каталази в тканинах сітчатки і зрительного нерва в динаміці розвитку глаукомного процесу. Отримані результати свідчать про зниженні активності цих ферментів в тканинах сітчатки і зрительного нерва ока.

**Ключевые слова:** глаукома, супероксиддисмутаза, каталаза, кролики.

**Резюме**

**Сердюк В. Н.** Активність ензиматических систем гашення активних форм кисню сітківки і зорового нерва при розвитку експериментальної глаукоми.

Робота була виконана на кролях з модельованою глаукомою. Визначали активність ферментів супероксиддисмутази та каталази в тканинах сітківки і зорового нерва в динаміці розвитку глаукомного процесу. Отримані результати свідчать про зниження активності цих ферментів в тканинах сітківки та зорового нерва ока.

**Ключові слова:** глаукома, супероксиддисмутаза, каталаза, кролі.

**Summary**

**Serdyuk V. N.** Activity enzymatic systems of extinguishing of active forms of oxygen in the retina and optic nerve at development of experimental glaucoma.

The work was on the rabbits which one has been modelated glaucoma. We estimated the activity of ferments in the eye tissue and dynamics of glaucoma proses. The results turned out are indicatived of decline in activity of these enzymes in the retina and optic nerve tissue.

**Key words:** glaucoma, superoxyddismutasa, katalasa, rabbits.

**Рецензент:** д.мед.н., проф. А.М.Петруня