

**СОСТОЯНИЕ ТИОЛ-ДИСУЛЬФИДНОЙ СИСТЕМЫ
БЕЛКОВ СЕТЧАТКИ И ЗРИТЕЛЬНОГО НЕРВА
ПРИ РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ГЛАУКОМЫ****В. Н. Сердюк***Областная клиническая офтальмологическая больница
(Днепропетровск)***Введение**

Одно из первых мест среди причин слепоты занимает глаукома, главный признак которой - повышение глазного давления, а также постепенное ухудшение зрения [1,4,11,14]. Увеличение продолжительности жизни населения на современном этапе, способствует значительному росту инволютивных заболеваний, ведущих к инвалидности, в том числе, и к глаукоме [1,4]. Поэтому изучение патологии, серьезно нарушающей зрительные функции, и, следовательно, физическую и социальную адаптацию, внедрение технологий, проводить прогнозировать течение заболевания, развитие осложнений и проводить патогенетическую терапию и профилактику заболеваия является одной из актуальных проблем современной офтальмологии [2,3,8,11,17,18]. 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 изменения иммунных факторов, эластотонических свойств склеры, возраст, расовая принадлежность, сосудистая дисрегуляция, артериосклероз и т.д. [10,11,13,15,18].

В ряде исследований было установлено увеличение количества первичных, вторичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов в тканях дренажной системы глаз больных глаукомой по мере развития заболевания. Было высказа-

но также предположение об участии процесса ПОЛ в развитии дистрофических изменений в тканях дренажной системы глаз больных открытоугольной глаукомой. Тем не менее, к настоящему моменту фактов, для того, чтобы рассматривать перекисное окисление липидов в качестве первичного пускового механизма развития глаукомы недостаточно [7,9,12,16].

Согласно существующей на сегодня метаболической концепции патогенеза ГОН, особую роль при глаукоме играют окислительный стресс и эксайтотоксическое повреждение третьего нейрона сетчатки. Важная роль также отводится патологическим процессам при участии активированной нейроглии, которая в условиях гипоксии, продуцирует избыточное количество токсических метаболитов, оказывающих повреждающее действие на нейроны сетчатки и аксоны зрительного нерва [11,13,15].

Целью настоящей работы было изучение состояния тиолдисульфидной системы белков 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 процессе эксперимента. 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 пентобарбитала натрия (100 мг на кг, вводимого в маргинальную ушную вену).

В центрифуге из белков сетчатки и зрительного нерва производили количественное определение тиоловых (сульфгидрильных) и дисульфидных (окисленных тиоловых) групп.

Принцип метода определения содержания сульфгидрильных групп состоит в определении количества тионитрофенильного аниона, освободившегося в результате взаимодействия 5,5'-дителиобис (2-нитробензойной) кислоты (реактив Элмана) со свободными SH-группами белков. Количество образовавшегося тионитрофенильного аниона прямо пропорционально количеству свободных SH-групп белков, участвующих в реакции. Дисульфидный комплекс, образовавшийся в результате реакции с реактивом Элмана в присутствии дитиотрейтола, также диссоциирует с образованием тионитрофенильного аниона. Сопоставляя содержание свободного тионитрофенильного аниона до и после добавления дитиотрейтола (или доведения pH до 10,5), определяют количество дисульфидных групп в белке.

Оптическую плотность растворов измеряли при длине волны 412 нм на спектроколориметре "Specol-210" фирмы "Карл Цейс" (Германия). Среднее значение коэффициента вариации - 1,02 %. Содержание сульфгидрильных и дисульфидных групп выражали в мкмоль/г исследуемой ткани.

Данные обрабатывались с помощью соответствующих методов статистического анализа [5,6].

Полученные результаты и их обсуждение

Данные о содержании белковых тиоловых и дисульфидных групп в сетчатке и зрительном нерве при развитии экспериментальной глаукомы представлены в таблице 1 и на диаграмме (рис. 1).

Таблица 1

Содержание белковых тиоловых и дисульфидных групп в сетчатке и зрительном нерве при развитии экспериментальной глаукомы

Исследуемый показатель	Статистич. показатель	Норма	Условия эксперимента		
			1 срок	2 срок	3 срок
Тиоловые группы (ммоль/ твани)	n	9	8	7	8
	M	1,38	1,34	1,24	1,04
	m	0,07	0,05	0,04	0,05
	p	-	>0,05	>0,05	<0,01
	%	100	97,1	89,9	75,4
Дисульфидные группы (ммоль/ твани)	n	9	8	7	8
	M	0,67	0,75	0,83	0,97
	m	0,04	0,04	0,04	0,04
	p	-	>0,05	<0,02	<0,001
	%	100	111,9	123,9	144,8

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

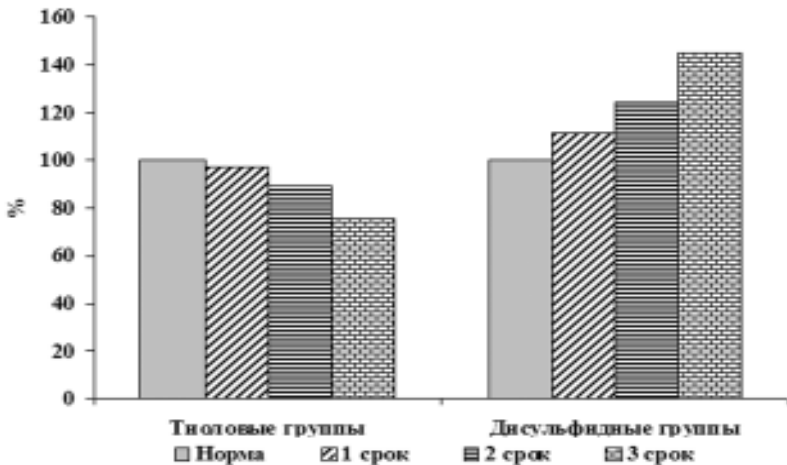


Рис. 1. Относительный уровень белковых тиоловых и дисульфидных групп в сетчатке и зрительном нерве при развитии экспериментальной глаукомы (в % по отношению к норме).

Рассматривая данные, полученные при определении в белках сетчатки и зрительного нерва тиоловых групп, можно отметить, что при развитии экспериментальной глаукомы наблюдается снижение их содержания во все сроки исследования.

В 1 срок содержание тиоловых групп в сетчатке и зрительном нерве снизилось до 97,1%, что составило $1,34 \pm 0,05$ по сравнению с нормой ($1,38 \pm 0,07$, однако эти различия статистически не достоверны ($p > 0,05$)). Во 2 срок также наблюдается недостоверное снижение содержания тиоловых групп и составило - $1,24 \pm 0,04$ (89,9%). В 3 срок развития глаукоматозного процесса отмечается дальнейшее уменьшение содержания тиоловых групп - $1,04 \pm 0,05$ (75,4%). Согласно полученным экспериментальным данным, содержание дисульфидных групп повышается во все сроки наблюдения. В 1 срок содержание дисульфидных групп повышается и составляет 111,9% ($0,75 \pm 0,04$), по сравнению с нормой ($0,67 \pm 0,04$), эти данные статистически не достоверны ($p > 0,05$), во 2 и 3 сроки наблюдения повышение уровня дисульфидных групп статистически значимы и составляют - 123,9% ($0,83 \pm 0,04$), в 3 срок - 144,8% ($0,97 \pm 0,04$) соответственно.

Выводы

Необходимо отметить важность выявленного ускоренного окисления SH групп в нервной ткани в патогенезе нейродегенеративного процесса при ПОУГ, т.к. потеря белковыми структурами этих функциональных групп значительно нарушает их свойства и как правило приводит к снижению или полной утрате их ферментативной активности.

Литература

1. Алексеев В.Н. Исследование качества жизни больных первичной открытоугольной глаукомой / В.Н.Алексеев, О.А.Малеванная // Глаукома: проблемы и решения: сб. науч. ст. Всерос. науч. - практ. конф. - М., 2004. - С. 389-393.

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. Егорова Т. Е. Простагландины в лечении глаукомы / Т. Е. Егорова // Клиническая офтальмология. - 2004. - Т. 5, №3. - С. 127-132.
4. Инвалидность вследствие глаукомы в России / Е.С. Либман, Е.В. Шахов, Е.А. Чумаева, Я.Э. Елькина // Глаукома: проблемы и решения: сб. Всерос. науч.-практ. конф. - М., 2004. - С. 430-433.
5. Наследов А. SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках / А.Наследов. - СПб.: Питер, 2005. - 416 с.
6. Новые методы биохимического анализа / Л.: изд.-во Ленинградского универ. - 1991. - 395 с.
7. 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.
8. 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.
9. Cai J. Oxidative damage and protection of the RPE. (Review) / J. Cai, K.C. Nelson, M. Wu [et al.] // Progress in Retinal and Eye Research. - 2000. - Vol. 19 (2). - P. 205 - 221.
10. Govindarajan B. Neuroprotection in glaucoma using calpain-1 inhibitors: regional differences in calpain-1 activity in the trabecular meshwork, optic nerve and implications for therapeutics / B. Govindarrajan, J. Laird, R. Sherman // Neurol Disord Drug Target. - 2008. - Vol. 7, № 3. - P. 295-304.
11. Hitchings R. Neurological associations with glaucoma / R.Hitchings // International glaucoma Review Supplement. - 2006. - Vol.8, № 3. - P.25-26.
12. Kumar D. M. Oxidative stress in glaucoma: a burden of evidence / D. M.Kumar, N.Agarwal // J. Glaucoma. - 2007. - Vol. 16. - P. 334-343.
13. Moraczewski A. L. Outcomes of treatment of neovascular glaucoma with intravitreal bevacizumab / A. L.Moraczewski, R. K.Lee, P. F. Palmberg [et al.] // Br. J. Ophthalmol. - 2009. - Vol. 93. - P. 589-593.
14. 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. - Vol. 38. - P. 145-149.

15. Neufeld A. H. *Pharmacologic neuroprotection with an inhibitor of nitric oxide synthase for the treatment of glaucoma* / A. H. Neufeld // *Brain res. Bull.* - 2004. - Vol. 62. - P. 455-459.

16. Roh Y. *Glutathione depletion induces differential apoptosis in cells of mouse retina, in vivo* / Y. Roh, C. Moon, S. Kim // *Neuroscience Let.* - 2007. - Vol. 417 (3). - P. 266 - 270.

17. Schober M. S. *Bioenergetic-based neuroprotection and glaucoma* / M. S. Schober, G. C. Childlow [et al.] // *Clin. & Exp. Ophthalmol.* - 2008. - Vol. 36, № 4. - P. 377-385

18. 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. - Vol. 18. - P. 4393-4400.

Резюме

Сердюк В.Н. *Состояние тиол-дисульфидной системы белков сетчатки и зрительного нерва при развитии экспериментальной глаукомы.*

Работа выполнена на кроликах с моделированной глаукомой. Определялись уровень белковых тиоловых и дисульфидных групп в тканях сетчатки и зрительного нерва, в динамике развития глаукомного процесса. Полученные результаты свидетельствуют об уменьшении количества тиоловых и увеличении количества дисульфидных групп в тканях сетчатки и зрительного нерва глаза.

Ключевые слова: глаукома, тиоловые группы, дисульфидные группы.

Резюме

Сердюк В.М. *Стан тиол-дисульфідної системи білків сітківки і зорового нерву при розвитку експериментальної глаукоми.*

Робота була виконана на кролях з модельованою глаукомою. Визначали рівень білкових тиолових та дисульфідних груп в тканинах сітківки і зорового нерва в динаміці розвитку глаукомного процесу. Отримані результати свідчать про зменшення кількості тиолових та збільшення кількості дисульфідних груп в тканинах сітківки та зорового нерва ока.

Ключові слова: глаукома, тиолові групи, дисульфідні групи.

Summary

Serdyuk V.N. *State of thiol- disulfide protein system of the retina and optic nerve with the development of the experimental glaucoma.*

The work was on the rabbits which one has been modulated glaucoma. We estimated the level of protein group in the eye tissue and dynamics of glaucoma process. The results turned out are indicated of decline in numero of thiol-group and increase in numero of disulfide group in the retina and optic nerve tissue.

Key words: glaucoma, disulfide protein groups, thiol protein groups.

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