

СОСТОЯНИЕ ТИОЛ-ДИСУЛЬФИДНОЙ СИСТЕМЫ БЕЛКОВ СЕТЧАТКИ И ЗРИТЕЛЬНОГО НЕРВА ПРИ РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЛАУКОМЫ В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ НЕЙРОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ

В.Н. Сердюк, В.В. Семенко

Областная клиническая офтальмологическая больница (Днепропетровск)

Введение

Увеличение продолжительности жизни населения на современном этапе, способствует значительному росту инволютивных заболеваний, ведущих к инвалидности, в том числе, и к глаукоме [5, 10].

В структуре глазных заболеваний, ведущих к слепоте, 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 [3, 6, 11, 20].

В настоящее время в ряде исследований показано, что при воспалительных заболеваниях глазного яблока отмечается повышенная генерация свободно-радикальных соединений кислорода, оксида азота и других соединений. Имеются данные, доказывающие роль свободнорадикальных процессов в патогенезе ПОУГ и в частности, в нарушении путей оттока камерной влаги – трабекулярного аппарата в углу передней камеры глаза [4, 7, 8, 12, 15, 17].

Вследствие анатомо-физиологических особенностей глаза нарушение процесса перекисного окисления липидов является важным патогенетическим фактором развития ПОУГ, так как было показано, что водянистая влага, обеспечивающая трофику и обмен веществ аваскулярной дренажной системы глаза, содержит свободные радикалы и продукты перекисного окисления липидов, что может оказывать цитотоксическое действие, особенно если имеется дефицит компонентов антиокислительной системы [1, 14].

Было выявлено, что количество первичных, вторичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов в тканях дренажной системы глаза больных глаукомой увеличивается по

мере развития заболевания. Было высказано также предположение об участии процесса ПОЛ в развитии дистрофических изменений в тканях дренажной системы глаза у больных с первичной открытоугольной глаукомой. Тем не менее, к настоящему моменту фактов, для того чтобы рассматривать нарушение перекисного окисления липидов в качестве первичного пускового механизма развития глаукомы недостаточно [2, 19].

Таким образом изучение этой патологии, вследствие которой отмечаются серьезные нарушения зрительных функций, и приводят к развитию осложнений, обуславливает разработку способов патогенетической терапии и профилактики прогрессирования процесса, снижающих количество осложнений этого грозного заболевания.

Значительный интерес в лечении глаукомы представляют мема и нейродар. 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, вызванную заболеваниями или повреждениями мозга [16, 18].

Нейродар - ноотропный препарат, действующим веществом которого является цитиколин. Цитиколин обладает широким спектром действия: способствует восстановлению поврежденных свободных радикалов, ингибирует действие 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 настоящей работы заключалась в изучении влияния нейротропных препаратов на состояние тиол-дисульфидной системы белков сетчатки и зрительного нерва при развитии экспериментальной глаукомы.

Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования проводились на 55 кроликах (массой 2,5–3,2 кг). Экспериментальные животные были разделены на 3 группы: 1 группа - интактные (контрольные) животные, 2 груп-

па - 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: мема - 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 внутриглазного давления с помощью тонометра Маклакова. 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 (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. 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 [13].

Принцип метода определения содержания сульфгидрильных групп состоит в определении количества тионитрофенильного аниона, освободившегося в результате взаимодействия 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной) кислоты (реактив Элмана) со свободными SH-группами белков. Количество образовавшегося тионитрофе-

нильного аниона прямо пропорционально количеству свободных SH-групп белков, участвующих в реакции. Дисульфидный комплекс, образовавшийся в результате реакции с реактивом Элмана в присутствии дитиотреитола, также диссоциирует с образованием тионитрофенильного аниона. Сопоставляя содержание свободного тионитрофенильного аниона до и после добавления дитиотреитола (или доведения pH до 10,5), определяют количество дисульфидных групп в белке. Оптическую плотность растворов измеряли при длине волны 412 нм на спектроколориметре «Spectol-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 [9].

Полученные результаты и их обсуждение

Данные о влиянии нейротропных препаратов на содержание дисульфидных групп в сетчатке и зрительном нерве при развитии экспериментальной глаукомы представлены в таблице 1.

В 1 срок содержание тиоловых групп в сетчатке и зрительном нерве снизилось до $1,34 \pm 0,05$ ммоль/г, что составило - 97,1%, во 2 срок также наблюдается недостоверное снижение содержания тиоловых групп и составило - $1,24 \pm 0,04$ ммоль/г (89,9%), в 3 срок развития глаукоматозного процесса отмечается дальнейшее уменьшение содержания тиоловых групп - до $1,04 \pm 0,05$ ммоль/г (75,4%) по сравнению с нормой ($1,38 \pm 0,07$) ммоль/г. В условиях применения нейротропных препаратов содержание тиоловых групп белков в 1 срок эксперимента составило - $1,31 \pm 0,06$ ммоль/г (94,9%), во 2 срок - $1,25 \pm 0,05$ ммоль/г (90,6%), в 3 срок - $1,10 \pm 0,07$ ммоль/г 79,7%, по сравнению с нормой. Содержание тиоловых групп белков в сетчатке и зрительном нерве при развитии глаукоматозного процесса в условиях применения нейротропных препаратов по сравнению с группой без применения препаратов составило в 1 срок - 97,8%, во 2 срок - 100,8%, в 3 срок - 105,8%.

Согласно полученным экспериментальным данным, содержание дисульфидных групп повышается во все сроки наблюдения.

В 1 срок содержание дисульфидных групп повышается и составляет - $0,75 \pm 0,04$ ммоль/г (111,9%), во 2 и 3 сроки наблюдения повышение уровня дисульфидных групп статистически значимы и составляют - $0,83 \pm 0,04$ ммоль/г (123,9%), в 3 срок - $0,97 \pm 0,04$ ммоль/г (144,8%), по сравнению с нормой ($0,67 \pm 0,04$) ммоль/л.

Влияние нейротропных препаратов на 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/ ткани)	Без препарата				
	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
	p1	-	-	-	-
	%1	-	100	100	100
	Нейротропные препараты				
	n	9	8	7	8
	M	1,38	1,31	1,25	1,10
	m	0,07	0,06	0,05	0,07
	p	-	>0,05	>0,05	<0,05
	%	100	94,9	90,6	79,7
p1	-	>0,05	>0,05	>0,05	
%1	-	97,8	100,8	105,8	
Дисульфидные группы (ммоль/ ткани)	Без препарата				
	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
	p1	-	-	-	-
	%1	-	100	100	100
	Нейротропные препараты				
	n	9	8	7	8
	M	0,67	0,81	0,77	0,87
	m	0,04	0,05	0,05	0,06
	p	-	<0,05	>0,05	<0,05
	%	100	120,1	114,9	129,9
p1	-	>0,05	>0,05	>0,05	
%1	-	108,0	92,8	89,7	

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.

Применение нейротропных препаратов достоверно снижает содержание дисульфидных групп в сетчатке и зрительном нерве при развитии экспериментальной глаукомы по сравнению с нормой.

Так в 1 срок содержание дисульфидных групп составило - $0,81 \pm 0,05$ ммоль/г (120,1%), во 2 срок - $0,77 \pm 0,05$ ммоль/г (114,9%), в 3 срок - $0,87 \pm 0,06$ ммоль/г (129,9%).

При сравнении содержания дисульфидных групп этой группы и группы без применения препаратов, их величины начиная со второго срока развития экспериментальной глаукомы были значительно ниже и составили - 92,8% (во 2 срок) и 89,7% (в 3 срок).

Общий анализ результатов по изучению состояния тиол-дисульфидной системы белков при моделировании глаукоматозного процесса свидетельствует о выраженном оксидативном повреждении функциональных групп белков в последнем периоде наблюдения. Применение нейротропных препаратов оказывает заметное антиокислительное действие на тиолы только во втором периоде наблюдения.

Выводы

1. Выявлено снижение уровня тиоловых групп белков сетчатки и зрительного нерва при моделировании глаукоматозного процесса в конечный срок наблюдения (на 25%), при этом в этот же период значительно возрастала концентрация дисульфидных групп (на 45%).

2. В условиях применения нейротропных препаратов во второй период наблюдения, содержание дисульфидных групп белков статистически не отличались от нормы, тогда как в группе без препаратов, уровень окисленных тиоловых групп был статистически значимо выше нормы (на 24%).

Литература

1. Алексеев В.Н. Роль перекисного окисления в патогенезе первичной открытоугольной глаукомы / В.Н. Алексеев, Е.Б. Мартынова, В.И. Садков // *Офтальмол. журн.* - 2000. - № 1. - С. 12-17.
2. Бунин А. Я. Об участии процессов перекисного окисления липидов в деградации дренажной системы глаза при открытоугольной глаукоме / А.Я. Бунин, М.Н. Бабижаев, А.В. Супрун // *Офтальмол. журн.* - 1985. - № 2. - С. 13-16.
3. Бунин А.Я. Глаукома / А.Я. Бунин. - М., 1994. - 218 с.
4. Бунин А.Я. Метаболические факторы патогенеза первичной открытоугольной глаукомы / А.Я. Бунин // *Глаукома: итоги и перспективы на рубеже тысячелетий: матер. науч.-практич. конф.* - М., 1999. - С. 9-12.

5. Вургафт М.Б. О патогенезе и классификации открытоугольной глаукомы. Экспериментально-лабораторные исследования / М.Б. Вургафт // Офтальмол. журн. – 1993. – № 3. – С. 172–175.

6. Жабоедов Г.Д. Современные аспекты патогенеза, диагностики, клиники и лечения открытоугольной глаукомы / Г.Д. Жабоедов // Фармакологический вестник. – 1999. – № 1-2. – С. 2–7.

7. Кравчук Е.А. Роль свободно-радикального окисления в патогенезе заболеваний глаз / Е.А. Кравчук // Вест. офтальмол. – 2004. – № 5. – С. 48–51.

8. Курышева Н.И. Роль свободнорадикальных реакций камерной влаги в развитии первичной открытоугольной глаукомы / Н.И. Курышева, М.И. Вицецкая, В.П. Еричев // Вестн. офтальмол. – 1996. – № 4. – С. 3–5.

9. Наследов А. SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках / А. Наследов. – СПб.: Питер, 2005. – 416 с.

10. Althin R. Estimated incidence of open-angle glaucoma in the United Kingdom / R. Althin, Z. Zhou, R. Dhawan // 14th Congress of the European Society of Ophthalmology. – Madrid, 2003. – P. 177.

11. Atanassov M. Visual field changes in primary open-angle and normal tension glaucoma / M. Atanassov, M. Konareva-Kostianeva // Abstracts 4th I.G.S. – 2003. – P. 71.

12. 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.

13. Bergmeyer H.U. Methoden der enzymatischen analyse / Herausgegeben von H. U. Bergmeyer. – Berlin, 1986. – S. 2254–2265.

14. Chen J. A new clue to glaucoma pathogenesis / J. Chen, F. Kadlubar // Am. J. Med. – 2003. – Vol. 114. – P. 697–698.

15. Kumar D.M. Oxidative stress in glaucoma: a burden of evidence / D.M. Kumar, N. Agarwal // J. Glaucoma. – 2007. – Vol. 16. – P. 334–343.

16. Kusari J. Effect of mementhine 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.

17. Lieven C.J. The effect of oxidative stress on mitochondrial transmembrane potential in retinal ganglion cells / C.J. Lieven, J.P. Vrabc, L.A. Levin // Antioxid. Redox. Signal. – 2003. – Vol. 5, № 5. – P. 641–646.

18. Schroder A. Einsatz von mementhine bei glaucoma fere absolutum / A. Schroder, C. Erb // Klin. Monatsbl. Augenheilkd. – 2002. – Vol. 219. – P. 533–536.

19. Sommer A. Intraocular pressure and glaucoma / A. Sommer // Am. J. Ophthalmol. – 1989. – Vol. 107, № 2. – P. 186–188.

20. Tezel G. Clinical factors associated with progression of glaucomatous optic disc damage in treated patients / G. Tezel, K.D. Siegmund, K. Trinkaus // Arch. Ophthalmol. – 2001. – Vol. 119. – P. 813–818.

Резюме

Сердюк В.М., Семенко В.В. Стан тиол-дисульфидної системи білків сітківки та зорового нерву при розвитку експериментальної глаукоми в умовах застосування нейропротекторних препаратів.

Робота була виконана на кролях з модельованою глаукомою. Визначали вміст білкових тиолових і дисульфідних груп в тканинах сітківки і зорового нерву в динаміці розвитку глаукомного процесу. Отримані результати свідчать про зниження вмісту тиолових та збільшення дисульфідних у порівнянні з нормою в останній строк спостереження, а також про попередження цих явищ при застосуванні нейропротекторних препаратів.

Ключові слова: глаукома, тиолові групи, дисульфідні групи, мемантин, цитиколін.

Резюме

Сердюк В.Н., Семенко В.В. Состояние тиол-дисульфидной системы белков сетчатки и зрительного нерва при развитии экспериментальной глаукомы в условиях применения нейропротекторных препаратов.

Работа выполнена на кроликах с моделированной глаукомой. Определялись содержание белковых тиоловых и дисульфидных групп в тканях сетчатки и зрительного нерва, в динамике развития глаукомного процесса. Полученные результаты свидетельствуют о снижении содержания тиоловых и увеличении дисульфидных групп по сравнению с нормой в конечный срок наблюдения, а также о предотвращении этих явлений при применении нейропротекторных перпаратив.

Ключевые слова: глаукома, тиоловые группы, дисульфидные группы, мемантин, цитиколлин.

Summary

Serdyk V.N., Semenکو V.V. Retinal and optic nerve disulfide and thiol protein system condition in experimental glaucoma with using neurotropic drugs.

Adult rabbits with experimental glaucoma were used in this study. We studied disulfide and thiol protein groups content in the eye tissue during glaucoma process. Results suggest decrease of experimental glaucoma protein groups and increase of disulfide protein groups, compared to normal ranges in the last experimental term. This effect was significantly prevented using neuroprotective drugs.

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

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