

пропиленгликоля (П-1601Б, П-3502) на 30-е сутки перорального воздействия в сыворотке крови крыс повышают содержание алифатических кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального и основного характера, диеновых конъюгатов, ТБК-активных продуктов и шиффовых оснований. Наиболее выраженные изменения наблюдаются при действии 1/10 LD₅₀. Выявленные нарушения необходимо учитывать при составлении прогноза неблагоприятного влияния на здоровье населения.

Ключевые слова: полиолы, теплокровные животные, окислительная модификация белков, перекисное окисление липидов.
Стаття надійшла 12.04.2012 р.

rat blood serum levels of aliphatic ketodinitrophenylhydrozones of neutral and alkaline characters, dienic conjugates, TBA-active products and Schiff's bases on the 30th day of the compound peroral action. The most pronounced alteration were observed in 1/10 LD₅₀. The displayed impairments must be considered when elaborating the prognosis of unfavorable influence of the substances on the population health.

Key words: polyols, warm-blooded animals, oxidative modification of proteins, lipid peroxidation.

УДК 617.7-007.681:577.19-07

В. И. Сердюк

Областная клиническая офтальмологическая больница, г. Днепропетровск

СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН ЛИЗОСОМ СЕТЧАТКИ И ЗРИТЕЛЬНОГО НЕРВА ПРИ РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЛАУКОМЫ

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 об снижении их активности по сравнению с нормой во все сроки контроля.

Ключевые слова: глаукома, кислая фосфатаза, лизосомы.

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, факотопическая, факоморфическая 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 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].

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]. По всей вероятности патофизиологические и метаболические изменения приводят к серьезным повреждениям в сетчатке и зрительном нерве в первую очередь в результате образования свободных радикалов и активации нейротрансмиттера 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 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. Высокорекрационные радикалы кислорода вызывают окисление биомолекул, а также инициируют цепные процессы перекисного окисления в мембранных липидах, прямое повреждение нуклеиновых кислот и белков [20,21,]. В этой связи основная стратегия лечения этого заболевания должна быть направлена на предотвращение гибели нейронов и обозначается как нейропротекция.

Целью работы была разработка эффективных способов нейропротекторного лечения с учетом воздействия на указанные патогенетические механизмы глаукоматозной оптической нейропатии (ГОН).

Материал и методы исследования. Эксперимент проводился на 32 кроликах (массой 2,0 – 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. 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. Все животные перед экспериментом и в ходе эксперимента подвергались измерению внутриглазного давления с помощью тонометра Маклакова.

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 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. Тонметрия производилась через каждые несколько часов. В конце эксперимента эвтаназию провели с помощью летальной дозы пентобарбитола натрия (100 мг на кг, вводимого в маргинальную ушную вену).

Сетчатка немедленно удалялась и помещалась в свежеприготовленную среду выделения лизосом. Сетчатки с двух глаз каждого животного объединялись и суспензировались в буфере, содержащем 20 мМ HEPES-KOH (pH = 7,5), 1,5 М MgCl₂, 0,5 мМ сахарозы, содержащей поливинилпиролон.

Сетчатка аккуратно гомогенизировалась в стеклянном гомогенизаторе с тифлоновым настилом. Полученный гомогенат центрифугировался при 750g в течении 10 минут при 4 °C для удаления ядер и неразрушенных клеток. Супернатант затем был центрифугирован при 6 000 g в течение 15 минут. Полученный осадок лизосом был ресуспензирован и использовался для биохимических анализов – определения белка и активности лизосомальных ферментов. Активность различных форм маркерного лизосомального фермента – кислой фосфатазы в сетчатке и зрительном нерве определялась с помощью методов спектрофотометрического анализа.

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

Результаты исследования 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).

Таблица 1

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

	Показатели	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.

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.

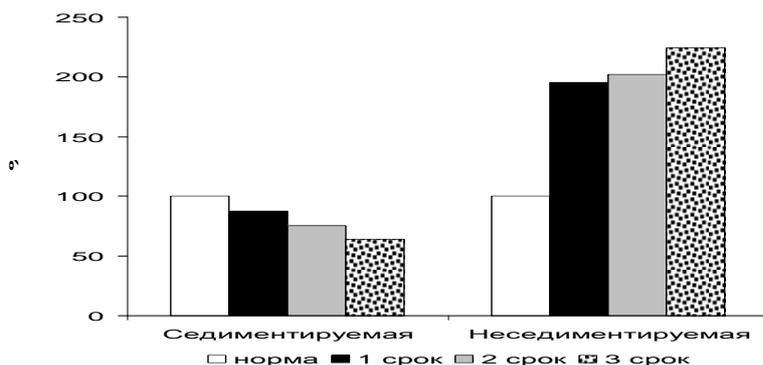


Рис. 1. Соотношение величин активности различных форм маркерного лизосомального фермента – кислой фосфатазы в сетчатке и зрительном нерве экспериментальных животных в различные периоды развития экспериментальной глаукомы.

Так в 1 срок активность была выше нормы ($70,9 \pm 2,31$) и составила $78,8 \pm 2,76$ (на 95,5 %), во второй срок – $81,4 \pm 2,56$ (на 101,9 %), в третий срок – $90,4 \pm 2,04$ (на 124,3 %).

Выводы

1. При развитии экспериментальной глаукомы отмечается отчетливое нарушение стабильности лизосомальных мембран сетчатки зрительного нерва. Эти изменения нарастают по мере развития глаукоматозного процесса.
2. 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%.
3. Обнаруженные нарушения стабильности лизосомальных мембран сетчатки и зрительного нерва при моделировании экспериментальной глаукомы можно рассматривать как следствие оксидативного стресса, развивающегося при данном патологическом состоянии.

Литература

1. Лакин Г. Ф. Биометрия. – 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 : 14.01.18. – Запорожье. – 2007. – 18 с.
3. Наследов А. SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках. // Спб.: Питер, 2005. – 416 с
4. Новые методы биохимического анализа. // Изд. Ленинградского универ. – 1991. – 395 с.
5. Agar A., Li S. Retinal ganglion cell line apoptosis induced by hydrostatic pressure / Brain Res. – 2006. – V. 1086. – P. 191-200.
6. Benozzi J., Nahum L. P., Campanelli J. L. Effect of hyaluronic acid on intraocular pressure in rats / Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2002. – V. 43. – P. 2196-2200.
7. Bergamini C. M., Gambetti S., Dondi A. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. // Cur.Pharm. Design. – 2004. – Vol. 10 (14). – P. 1611 – 1626.
8. Bergmeyer H. U. Methoden der enzymatischen analyse. – Akademi-Verlag, Berlin. – 1970. – P. 1667 - 1670.
9. Boland M. V., Quigley H. A. Risk factors and open-angle glaucoma: classifications and application / J Glaucoma. – 2007. – V. 16. – P. 406-418.
10. Carter-Dawson L., Crawford M. L., Harwerth R. S. Vitreal glutamate concentration in monkeys with experimental glaucoma. – 2002. – V. 43. – P. 2633-2637.
11. Chergheh D., Griffiths H. R., Hilton E. J. Systemic reduction in glutathione levels occurs in patients with primary open angle glaucoma / Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2005. – V. 46. – P. 877-883.
12. Chidlow G., Wood J. P. M., Casson R. J. Pharmacological neuroprotection for glaucoma / Drugs. – 2007. – V. 67. – P. 725-759.
13. Dun Y., Mysona B. Expression of the cysteine-glutamate exchanger in retinal ganglion cells and regulation by nitric oxide and oxidative stress / Cell Tissue Res. – 2006. – P. 1-14.
14. Kumar D. M., Agarwal N. Oxidative stress in glaucoma: a burden of evidence / J Glaucoma. – 2007. – V. 16. – P. 334-343.
15. Lipton S. A. Pathologically activated therapeutics for neuroprotection / Nature Reviews Neurosci. – 2007. – V. 8. – P. 803-808.
16. Madl J. E. McIlroy T. R. Depletion of taurine and glutamate from damaged photoreceptors in the retina of dogs with primary glaucoma / Am J Vet. Res. – 2005. – V. 66. – P. 791-799.
17. Martin K. R., Levkovitch-Verbin H., Valenta D. Retinal glutamate transporter changes in experimental glaucoma and after optic nerve transection in therat / Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2002. – V. 43. – P. 2236-2243.
18. Mates J., Segura J., Alonso F. Pathways from glutamine to apoptosis / Front. In Bioscience. – 2006. – V. 11. – P. 3164 – 3180.
19. Moreno M. C., Sande P., Marcos H. A. Effect of glaucoma on the retinal glutamate/glutamine cycle activity / FASEB J. – 2005. – V. 19. – P. 1161-2.
20. Moreno M. C., Marcos H. A. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injection of hyaluronic acid / Exp. Eye Res. – 2005.
21. Moreno M. C., Campanelli J. L., Sande P. Retinal oxidative stress induced by high intraocular pressure / Free Radic. Biol. Med. – 2004. – V. 37. – P. 803-812.
22. Weber A. J., C. D. Harman, S. Viswanathan. Effects of optic nerve injury, glaucoma, and neuroprotection on the survival, structure, and function of ganglion cells in the mammalian retina / J Physiol. – 2008. – V. 18. – P. 4393-4400.

Реферати

СТАН МЕМБРАН ЛІЗОСОМ СІТКІВКИ І ЗОРОВОГО НЕРВА ПРИ РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ГЛАУКОМИ

Сердюк В. Н.

Робота виконана на кролях з модельованого глаукомою. Визначали активність різних форм маркерного лизосомального ферменту – кислій 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.

Ключові слова: глаукома, кисла фосфатаза, лизосоми.
Стаття надійшла 25.03.2012 р.

STATE OF LYSOSOMAL' MEMBRANES OF RETINA AND VISUAL NERVE IS AT DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL GLAUCOMA

Serlyuk V. N.

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

Key words: glaucoma, acid phosphatase, lysosomas.