

УДК 617.7:616.379–008.64+617.7–007.681–07+577.11(092.9)

Влияние офтальмогипертензии на уровень продуктов гликирования в тканях угла передней камеры глаза животных со стрептозотоциновым диабетом

В. Р. Юревич, канд. мед. наук

Львовский национальный медицинский университет им. Д. Галицкого; Львов (Украина)

E-mail: yurevych@yahoo.com

Введение. Глаукома является существенной причиной необратимой слепоты во всем мире. Первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) считается наиболее распространенным типом. Пожилой возраст, миопия, центральная толщина роговицы и глазная гипертензия являются факторами риска для ПОУГ [5].

В некоторых исследованиях обнаружили, что наличие сахарного диабета является еще одним возможным фактором риска для возникновения ПОУГ. Тем не менее, механизм влияния сахарного диабета на развитие первичной открытоугольной глаукомы изучен не достаточно [1].

По некоторым данным, одной из причин повышения внутриглазного давления и развития первичной глаукомы у больных сахарным диабетом являются морфологические изменения в тканях дренажной системы глаза, связанные с нарушением белкового и липидного обменов. Эти изменения, по мнению исследователей, являются непосредственной причиной расстройства гидродинамики глаза вследствие затруднения оттока внутриглазной жидкости у больных сахарным диабетом [3, 7].

В исследованиях последних лет было показано, что как при глаукоме, так и при стрептозотоциновом диабете отмечаются значительные нарушения в уровне высокорепреактивных соединений в сетчатке, таких как метилглиоксаль и ацетоацетат [9, 11, 12, 14, 15, 16].

По нашему мнению, особый интерес представляет изучение процессов, вызывающих изменения в уровне токсичных продуктов гликозилирования при глаукоме на фоне сахарного диабета.

Цель работы: определить концентрацию продуктов гликирования в тканях угла передней камеры глаза при моделировании офтальмогипертензии у животных со стрептозотоциновым диабетом.

Материал и методы исследования

Экспериментальные исследования проводились на 32 кроликах (самцы) породы Шиншилла (массой 2,5–3,2 кг).

Работа с животными проводилась с учетом Международных руководящих принципов для биомедицинских исследований с участием животных, предложенных на Совете международных медицинских научных организаций (2012 г.).

Подопытные животные были разделены на четыре группы: первая группа — контроль (10 кроликов), вторая — опытная группа, животные с диабетом в условиях офтальмогипертензии (8 кроликов), третья — опытная группа, животные с диабетом (7 кроликов), четвертая — опытная группа, животные с офтальмогипертензией (7 кроликов). Все группы были подразделены на две подгруппы по срокам наблюдения I — 3 недели, II — 6 недель.

Диабет вызывали путем инъекции стрептозотоцина (65 мг на 1 кг веса тела, внутривенно) [17].

На вторые сутки после введения стрептозотоцина у животных 2-й и 4-й групп вызывали офтальмогипертензию инъекцией в переднюю камеру глаза 0,2 % раствора метилцеллюлозы. Немедленно после инъекции кролики проверялись путем биомикроскопии для оценки травмы, возможной в процессе инъекции [18].

Перед моделированием офтальмогипертензии животные подвергались общей анестезии путем введения кетамина 50 мг/кг, местно применяли глазные капли 0,5 % раствор прокаиона гидрохлорида.

Все животные перед и в ходе эксперимента подвергались офтальмологическому обследованию и измерению внутриглазного давления. Тонometriю производили через каждые несколько часов.

Животные подвергались эвтаназии с помощью летальной дозы пентобарбитола натрия (100 мг на кг), вводимого в маргинальную ушную вену.

В тканях угла передней камеры определяли содержания метилглиоксала, ацетоацетата и карбонильных групп белков.

Методика определения метилглиоксала основана на спектрофотометрическом измерении продукта реакции метилглиоксала с глутатионом — S-лактоилглутатиона, имеющего максимум поглощения при длине волны 240 нм. Коэффициент вариации метода — 5,1 % [8].

Принцип метода определения ацетоацетата заключается в спектрофотометрическом измерении снижения концентрации восстановленной формы НАД, расходуемого в реакции восстановления ацетоацетата ферментом 3-гидроксибутиратдегидрогеназы. Коэффициент вариации метода — 6 % [8].

Принцип метода определения карбонильных групп основан на спектрофотометрическом измерении хромогенного продукта взаимодействия карбонильных групп белков с 2,4-динитрофенилгидразином. Коэффициент вариации метода — 4,7 % [10, 13].

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета SPSS 11.0 [4].

Результаты и их обсуждение

Данные о влиянии офтальмогипертензии на содержание метилглиоксаля и ацетоацетата в тканях угла передней камеры при экспериментальном диабете у кроликов представлены в таблице 1.

Как видно из представленных данных, содержание метилглиоксаля в тканях угла передней камеры у животных с диабетом и офтальмогипертензией спустя 1–3 недели возрастало до 145,8 %, т.е. $(0,070 \pm 0,004)$ нмоль/г ($p < 0,001$), а через 6 недель — до 197,9 %, что составило $(0,095 \pm 0,006)$ нмоль/г по отношению к контролю $(0,048 \pm 0,003)$ нмоль/г ($p < 0,001$).

Исследование содержания метилглиоксаля в тканях угла передней камеры животных с офтальмогипертензией через 1–3 недели выявило повышение его до 114,9 %, т.е. $(0,054 \pm 0,003)$ нмоль/г, во второй период наблюдения — через 6 недель —

до 123,4 %, что составило $(0,058 \pm 0,004)$ нмоль/г относительно контроля $(0,047 \pm 0,003)$ нмоль/г ($p < 0,05$).

Сравнивая данные этих групп, можно заметить, что содержание метилглиоксаля в тканях угла передней камеры у животных с диабетом и офтальмогипертензией повышалось в большей степени по сравнению с тем, когда гипертензию вызывали у животных без диабета. Так, в первый срок наблюдения разница составила 29,6 % ($p < 0,01$), во второй — 63,8 %, при $p < 0,001$.

Необходимо отметить, что уровень метилглиоксаля в тканях угла передней камеры у животных с диабетом повысился до 126,0 %, что составило $(0,063 \pm 0,004)$ нмоль/г — в 1 срок ($p < 0,05$) и до 154,0 %, т.е. $(0,077 \pm 0,005)$ нмоль/г — во 2 период наблюдения сравнительно с контролем $(0,050 \pm 0,004)$ нмоль/г ($p < 0,01$).

Таблица 1. Влияние офтальмогипертензии на содержание метилглиоксаля и ацетоацетата в тканях угла передней камеры при экспериментальном диабете у кроликов

Исследуемый показатель	Статистич. показатели	Сроки наблюдения		
		Контроль	1–3 недели (8 глаз)	6 недель (6–8 глаз)
Метилглиоксаль (нмоль/г ткани)	Диабет + офтальмогипертензия			
	M±m	0,048±0,003	0,070±0,004	0,095±0,006
	p	–	<0,001	<0,001
	%	100,0	145,8	197,9
	p1		>0,05	<0,05
	%1		111,1	123,4
	p2		<0,01	<0,001
	%2		129,6	163,8
	Диабет			
	M±m	0,050±0,004	0,063±0,004	0,077±0,005
	p	–	<0,05	<0,01
	%	100,0	126,0	154,0
Офтальмогипертензия				
M±m	0,047±0,003	0,054±0,003	0,058±0,004	
p	–	>0,05	<0,05	
%	100,0	114,9	123,4	
Ацетоацетат (мкмоль/г)	Диабет + офтальмогипертензия			
	M±m	0,087±0,006	0,117±0,008	0,161±0,010
	p	–	<0,01	<0,001
	%	100,0	134,5	185,1
	p1		>0,05	<0,05
	%1		107,3	121,1
	p2		<0,05	<0,001
	%2		124,5	156,3
	Диабет			
	M±m	0,090±0,006	0,109±0,006	0,133±0,008
	p	–	<0,05	<0,01
	%	100,0	121,1	147,8
Офтальмогипертензия				
M±m	0,085±0,005	0,094±0,007	0,103±0,006	
p	–	>0,05	<0,05	
%	100,0	110,6	121,2	

Примечание: Примечание: p — уровень значимости различий данных по отношению к группе «Контроль»; p1 — уровень значимости различий данных по отношению к группе «Диабет»; p2 — уровень значимости различий данных по отношению к группе «Офтальмогипертензия».

При этом данный показатель у животных с диабетом и офтальмогипертензией превосходил его значение у животных с диабетом без офтальмогипертензии. Так, в первый срок его увеличение составило 11,1 %, во второй срок — 23,4 %, при $p < 0,05$.

Как показано в таблице 1, содержание ацетоацетата в тканях угла передней камеры у экспериментальных животных с диабетом и офтальмогипертензией было повышено, составляя через 1–3 недели 134,5 %, т.е. $(0,117 \pm 0,008)$ мкмоль/г ($p < 0,01$), а спустя 6 недель повышение его уровня составило 185,1 % — $(0,161 \pm 0,010)$ мкмоль/г по отношению к $(0,087 \pm 0,006)$ мкмоль/г в контрольной группе ($p < 0,001$).

В условиях моделирования офтальмогипертензии содержание ацетоацетата в тканях угла передней камеры через 1–3 недели было повышено на 110,6 %, т.е. $(0,094 \pm 0,007)$ мкмоль/г, и через 6 недель этот показатель повысился до 121,2 %, что составило $(0,103 \pm 0,006)$ мкмоль/г, относительно контроля $(0,085 \pm 0,005)$ мкмоль/г ($p < 0,05$).

Следует указать, что во все сроки исследования у животных с диабетом в условиях развития офтальмогипертензии отмечается возрастание уровня ацетоацетата в тканях угла передней камеры, по сравнению с группой животных с офтальмогипертензией без диабета. Так, в первый срок увеличение составляет — 24,5 % ($p < 0,05$), во второй срок — 56,3 % ($p < 0,001$).

Уровень ацетоацетата в тканях угла передней камеры у животных с диабетом возрастал до 121,1 %, составляя $(0,109 \pm 0,006)$ мкмоль/г — в 1 срок ($p < 0,05$), и до 147,8 % — $(0,133 \pm 0,008)$ мкмоль/г —

во 2 период относительно контроля $(0,090 \pm 0,006)$ мкмоль/г ($p < 0,01$).

Необходимо подчеркнуть, что у животных с диабетом в условиях развития офтальмогипертензии отмечается увеличение содержания ацетоацетата в тканях угла передней камеры превышает таковое у животных с диабетом без офтальмогипертензии. Так, спустя 1–3 недели это превышение составляет 7,3 %, а через 6 недель — 21,1 %.

Данные о влиянии офтальмогипертензии на содержание карбонильных групп в тканях угла передней камеры при экспериментальном диабете у кроликов представлены в таблице 2.

Уровень карбонильных групп в тканях угла передней камеры у животных с диабетом и офтальмогипертензией спустя 1–3 недели был повышен до 125,5 %, т.е. $(6,70 \pm 0,47)$ нмоль/г ($p < 0,05$), во 2 срок (через 6 недель) исследуемый показатель повысился до $(9,41 \pm 0,60)$ нмоль/г, что составило 176,2 % по отношению к контролю $(5,34 \pm 0,30)$ нмоль/г ($p < 0,001$).

Содержание карбонильных групп в тканях угла передней камеры животных с офтальмогипертензией в первый срок возросло до $(5,46 \pm 0,32)$ нмоль/г, т.е. 105,6 %, во второй срок — до $(5,94 \pm 0,34)$ нмоль/г, составив 114,9 % относительно контроля $(5,17 \pm 0,36)$ нмоль/г.

При этом уровень карбонильных групп у животных с диабетом и офтальмогипертензией повышался в большей степени, чем в случаях, когда гипертензию вызывали у животных без диабета. Так, спустя 1–3 недели это превышение составило 22,7 % ($p < 0,05$), а через 6 недель — 58,4 % ($p < 0,001$).

Таблица 2. Влияние офтальмогипертензии на содержание карбонильных групп в тканях угла передней камеры при экспериментальном диабете у кроликов

Исследуемый показатель	Статистич. показатели	Сроки наблюдения		
		Контроль	1 срок (8 глаз)	2 срок (6–8 глаз)
Карбонильные группы (нмоль/г)	Диабет + офтальмогипертензия			
	M±m	5,34±0,30	6,70±0,47	9,41±0,60
	p	–	<0,05	<0,001
	%	100,0	125,5	176,2
	p1		>0,05	<0,05
	%1		102,4	120,9
	p2		<0,05	<0,001
	%2		122,7	158,4
	Диабет			
	M±m	5,51±0,30	6,54±0,36	7,78±0,45
	p	–	<0,05	<0,01
	%	100,0	118,7	141,2
	Офтальмогипертензия			
M±m	5,17±0,36	5,46±0,32	5,94±0,34	
p	–	>0,05	>0,05	
%	100,0	105,6	114,9	

Примечание: p — уровень значимости различий данных по отношению к группе «Контроль»; p1 — уровень значимости различий данных по отношению к группе «Диабет»; p2 — уровень значимости различий данных по отношению к группе «Офтальмогипертензия».

В группе животных с диабетом уровень карбонильных групп в тканях угла передней камеры возростал до 118,7 %, составляя $(6,54 \pm 0,36)$ нмоль/г — в первый срок ($p < 0,05$) и до 141,2 %, что составило $(7,78 \pm 0,45)$ нмоль/г — во второй сравнительно с контролем $(5,51 \pm 0,30)$ нмоль/г ($p < 0,01$).

Заметим, что на всем протяжении эксперимента у животных с диабетом в условиях развития офтальмогипертензии увеличение содержания карбонильных групп, превышало показатели у животных с диабетом без офтальмогипертензии. Так, через 1–3 недели возрастание составило 2,4 %, а через 6 недель — 20,9 % ($p < 0,05$).

Таким образом, анализируя результаты данного исследования необходимо отметить, что развитие офтальмогипертензии у животных со стрептозотоциновым диабетом приводит к возрастанию уровня метилглиоксаля и ацетоацетата, а также содержания карбонильных групп белков в тканях угла передней камеры.

В механизме выявленного нами повышения интенсивности процессов гликирования (гликозилирования) в тканях угла передней камеры при офтальмогипертензии, которое особенно резко выражено у животных со стрептозотоциновым диабетом, первоочередная роль, по нашему мнению,

принадлежит состоянию оксидативного стресса в переднем отделе глаза при повышении внутриглазного давления. Это предположение подтверждается результатами изучения процессов пероксидации в камерной влаге, слезной жидкости и тканях угла передней камеры при глаукоме [2, 3, 5, 6].

В целом, представленные в настоящей работе данные позволяют глубже понять особенности патогенетических механизмов, лежащих в основе развития глаукоматозного процесса у больных сахарным диабетом.

Выводы

1. Офтальмогипертензия у животных с диабетом приводит к резкому подъему уровня токсических оксоальдегидов в тканях угла передней камеры. Концентрация метилглиоксаля в этих условиях значительно превышает содержание этих соединений у животных при раздельном моделировании офтальмогипертензии и диабета.

2. Выявлено значительное повышение уровня карбонильных групп при офтальмогипертензии у животных с диабетом, что свидетельствует о более высокой степени повреждения белковых структур дренажного аппарата глаза при сочетанной патологии.

Литература

1. Астахов Ю. С. Является ли сахарный диабет фактором риска развития первичной открытоугольной глаукомы / Ю. С. Астахов, И. С. Крылова, Ф. Е. Шадрин // Русский мед. журн. — 2005. — Т. 3. — № 2. — С. 56–59.
2. Кашинцева Л. Т. Роль обменных нарушений в патогенезе глаукомы при расстройстве инсулярного аппарата / Л. Т. Кашинцева // Офтальмол. журн. — 1970. — № 7. — С. 531–536.
3. Кашинцева Л. Т. Патогенетическая роль изменений дренажного аппарата глаза в развитии глаукомного процесса у больных сахарным диабетом / Л. Т. Кашинцева // Офтальмол. журн. — 1971. — № 5. — С. 381–386.
4. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва — М.: Медиа Сфера, 2002. — С. 312.
5. Сердюк В. Н. Исследование уровня продуктов окислительного повреждения белков и липидов в слезной жидкости и камерной влаге у больных ПОУГ / В. Н. Сердюк // Проблеми екологічної та медичної генетики та клінічної імунології — 2011. — № 6 (51). — С. 168–177.
6. Юревич В. Р. Влияние офтальмогипертензии на уровень продуктов перекисного окисления липидов в тканях переднего отдела глаза при экспериментальном диабете / В. Р. Юревич // Офтальмол. журн. — 2015. — № 4. — С. 34–37.
7. Adeoti C. O. The anterior segment of the eye in diabetes / C. O. Adeoti, M. A. Isawumi, A. O. Ashaye // Clinical Ophthalmology. — 2012. — Vol. 6. — P. 667–671.
8. Bergmeyer H. V. Methoden der enzymatischen Analyse / Herausgegeben von H. U. Bergmeyer. — Berlin. 1986, — 2220 p.
9. Bierhaus A. Methylglyoxal modification of Nav1.8 facilitates nociceptive neuron firing and causes hyperalgesia in diabetic neuropathy / A. Bierhaus, T. Fleming, S. Stoyanov // Nat. Med. — 2012. — Vol. 18. — P. 926–933.
10. Davanand C. D. Protein carbonyl content as a stable oxidative stress marker in type II diabetes / C. D. Davanand, P. K. Vegi // Int. J. Biol. Med. Res. — 2012. — Vol. 3. — P. 2362–2365.
11. Duran-Jimenez B. Advanced glycation end products in extracellular matrix proteins contribute to the failure of sensory nerve regeneration in diabetes / B. Duran-Jimenez, D. Dobler, S. Moffatt // Diabetes. — 2009. — Vol. 58. — P. 2893–2903.
12. Matafome P. Methylglyoxal, obesity, and diabetes / P. Matafome, C. Sena // Endocrine. — 2013. — Vol. 43(3). — P. 472–484.
13. Odetti P. Levels of carbonyl groups in plasma proteins of type 2 diabetes mellitus subjects / P. Odetti, S. Garibaldi, G. Noberasco // Acta Diabetol. — 1999. — Vol. 36(4). — P. 179–183.
14. Rabbani N. Critical role of methylglyoxal and glyoxalase 1 in diabetic nephropathy / N. Rabbani // Diabetes. — 2014. — Vol. 63. — P. 50–52.
15. Riboulet-Chavey A. Methylglyoxal impairs the insulin signaling pathways independently of the formation of intracellular reactive oxygen species / A. Riboulet-Chavey, A. Pierron, I. Durand // Diabetes. — 2006. — Vol. 5. — P. 1289–1299.

16. **Sienkiewicz A. E.** Aberrant glycosylation in the human trabecular meshwork / A. E. Sienkiewicz, B. N. Rosenberg, G. Edwards // *Proteomics Clin. Appl.* — 2014. — Vol. 8(3–4). — P. 130–142.
17. **Wang J.** Creating a long-term diabetic rabbit model / J. Wang, R. Wan, Y. Mo // *Exp. Diabetes Res.* — 2010. — Vol. 6. — P. 1–10.
18. **Zhu M. D.** Development of experimental chronic intraocular hypertension in the rabbit / M. D. Zhu, F. Y. Cai // *Australian and New Zealand J. Ophthalmol.* — 1992. — Vol. 20. — P. 225–234.

Поступила 06.10.2015