

УДК 617.7:616.379-008.64-092.9+617.7-007.681-07+577.11

## Стабильность мембран лизосом структур сетчатки и зрительного нерва при моделировании глаукомы на фоне экспериментального диабета у кроликов

В. Р. Юревич, канд. мед. наук

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

E-mail: filatovbiochem@ukr.net

**Актуальность.** Патогенетические механизмы глаукомы остаются во многом неизученными. Ряд авторов считают диабет серьезным фактором риска глаукоматозного поражения. Состояние мембран лизосом сетчатки и зрительного нерва при первичной глаукоме, сопровождающейся сахарным диабетом, является актуальной задачей для установления особенностей патогенеза этой сочетанной патологии.

**Цель** изучить структурно-функциональное состояние стабильности лизосом при моделировании экспериментальной глаукомы (офтальмогипертензии) в условиях стрептозотоцинового диабета у кроликов.

**Материал и методы.** Экспериментальные исследования проводились на 34 взрослых кроликах, которым моделировали стрептозотоциновый диабет, глаукому (офтальмогипертензию) и сочетанно диабет и глаукому. В ткани сетчатки и зрительного нерва определяли маркерный фермент мембран лизосом – кислую фосфатазу.

**Результаты.** При моделировании глаукомы (глазной гипертензии) на фоне экспериментального диабета происходит резкое снижение стабильности мембран лизосом в нейрональных тканях глаза. Активность маркерного фермента лизосом – кислой фосфатазы – в сетчатке и зрительном нерве кроликов при сочетанном моделировании офтальмогипертензии и стрептозотоцинового диабета была изменена более выражено, чем при раздельном моделировании этих заболеваний.

**Выводы.** Лизосомальная дисфункция является одним из патогенетических звеньев глаукомного процесса, который сопровождается сахарным диабетом.

### Ключевые слова:

глаукома, диабет, нервная ткань глаза,  
лизосомальная дисфункция, кролики

**Актуальность.** Первичная глаукома до настоящего времени является одной из главных проблем офтальмологии. При этом большую роль играет медико-социальная значимость этого заболевания. Глаукома является причиной необратимой слепоты и слабовидения, оставаясь на ведущих местах списка инвалидизирующих заболеваний органа зрения [6, 4, 14].

Трудности в лечении глаукомы состоят в том, что, с одной стороны, современная офтальмология имеет в своем арсенале большой выбор лекарственных препаратов, методик консервативного и хирургического лечения, а с другой – во многом данные мероприятия оказываются недостаточно эффективными. Это объясняется сложностью и недостаточной изученностью патогенетических механизмов развития заболевания, а также зачастую симптоматическим, а не патогенетическим подходом к его лечению и профилактике.

При сахарном диабете развитие глаукомы происходит значительно чаще, чем в отсутствие этого заболевания. Ряд авторов считают диабет серьезным фактором риска глаукоматозного поражения, приводя сведения о достоверной корреляции этого системного заболевания с риском развития глаукомы [2, 9].

При первичной глаукоме и сосудистых осложнениях сахарного диабета имеются общие звенья патогенеза, а учитывая высокую распространенность сахарного диабета у больных с глаукомой, их патогенетическое лечение представляет большой научно-практический интерес.

Вероятнее всего, именно патофизиологические и метаболические изменения при глаукоме, а особенно сопровождающейся сахарным диабетом, приводят к серьезным повреждениям в сетчатке и зрительном нерве, в первую очередь, в результате образования свободных радикалов.

При активации процессов свободно-радикального окисления активные формы кислорода и их метаболиты оказывают как при глаукоме, так и при диабетической ретинопатии цитотоксическое действие на сетчатку и зрительный нерв. Свободные радикалы вызывают окисление биомолекул, что в свою очередь запускает каскад цепных реакций перекисного окисления липидов в мембранах, а также оказывает повреждение нуклеиновых кислот и белков.

Экспериментальные исследования показали [7], что моделирование глаукомы у кроликов вызывает нарушение стабильности лизосомальных мембран сетчатки зрительного нерва. Эти изменения нарастают по мере развития глаукоматозного процесса. Как показали авторы, уже в начальной стадии процесса отмечалось достоверное снижение активности кислой фосфатазы – маркерного лизосомального фермента, солубилизация которого возрастает при нарушении структуры внутриклеточных мембран. В конце периода наблюдения уровень этой формы фермента снижался на треть. Обнаруженные нарушения стабильности лизосомальных мембран сетчатки и зрительного нерва при моделировании экспериментальной глаукомы можно рассматривать как следствие оксидативного стресса, развивающегося при данном патологическом состоянии.

К настоящему времени хорошо известна роль свободно-окислительных процессов в патогенезе диабетической ретинопатии [1,10]. В механизме нарушения ультраструктурной организации пигментного эпителия при диабете существенную роль играет резко возрастающее свободно-радикальное окисление липидов вследствие нарушения баланса между интенсивностью образования свободных радикалов и мощностью антиоксидантных систем сетчатой оболочки. В экспериментальном исследовании было показано, что при развитии стрептозотоцинового диабета происходит лабильзация лизосомальных мембран пигментного эпителия [3].

Таким образом, наше внимание привлекла проблема состояния мембран лизосом сетчатки и зрительного нерва при первичной открытоугольной глаукоме, сопровождающейся сахарным диабетом.

**Цель работы:** изучить структурно-функциональное состояние стабильности лизосом при моделировании экспериментальной глаукомы (офтальмогипертензии) в условиях стрептозотоцинового диабета у кроликов.

#### Материал и методы

Экспериментальные исследования проводились на 34 взрослых кроликах породы шиншилла (массой около 3 кг). Работа с животными проводилась с учетом «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей» (Страсбург, 1986), «Правил выполнения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных приказом МЗ Украины и законом Украины «О защите животных от жестокого обращения» (№ 1759-VI от 15.12.2009).

Кролики были разделены на четыре группы: первая – контрольная группа интактных животных (n=8), вторая – опытная группа с моделью глаукомы (офтальмогипертензии) и экспериментальным диабетом (n=10), третья – опытная группа с диабетом (n=8), четвертая – опытная группа с моделью глаукомы (n=8). 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 массы тела, внутривенно) [12]. Через неделю после моделирования диабета у животных на фоне устойчивого уровня глюкозы в крови вызывали офтальмогипертензию. Для моделирования глаукомы в переднюю камеру глаз вводили 0,25 мл 2% раствора метилцеллюлозы [15]. При этом во время моделирования глазной гипертензии 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.

Всем животным перед экспериментом и в динамике эксперимента измеряли уровень внутриглазного давления с использованием пневмотонометра TOPCON СТ-80 под местной анестезией.

В конце эксперимента (через 3 и 6 недель после моделирования гипертензии) все кролики были забиты с помощью летальной дозы пентобарбитола натрия (100 мг на кг, вводимого в маргинальную ушную вену).

Сетчатка и зрительный нерв немедленно удалялись и помещались в свежеприготовленную среду для выделения лизосом. Ткань суспендировали в буфере, содержащем 20 мМ HEPES-KOH (pH=7,5), 1,5 М MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ EGTA и 250 мМ сахарозы, содержащей поливинилпирролидон.

Гомогенат ткани готовили в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в соотношении 1:10 (вес ткани: объем среды для гомогенизации). Полученный гомогенат центрифугировался при 750 g в течение 10 минут при 4° С для удаления ядер и неразрушенных клеток. Супернатант затем был центрифугирован при 6000 g в течение 15 минут. Полученный осадок, содержащий лизосомы, был ресуспендирован и использовался для определения активности лизосомального фермента кислой фосфатазы (связанная форма). В супернатанте определяли цитоплазматическую (свободную) форму кислой фосфатазы.

Принцип метода определения активности кислой фосфатазы основан на определении концентрации свободного органического компонента субстрата – паранитрофенилфосфата, образующегося в результате действия фермента [5, 13]. Для определения активности кислой фосфатазы в пробирках последовательно смешивали 0,1 мл экстракта исследуемой ткани и 1,0 мл субстратно-буферного раствора (0,127 % раствор паранитрофенилфосфата в ацетатном буфере, pH 5,0). Пробирки с реакционным раствором инкубировали точно 30 мин при (37,0±0,5)° С. Реакцию останавливали добавлением 1,0 мл охлажденного до 0°С 1 Н раствора гидроксида натрия. Измерения оптической плотности исследуемых растворов проводили на спектрофотометре «Specol – 210» в 1- см кювете и длине волны 410 нм. Рассчитывали активность кислой фосфатазы с использованием молярного коэффициента экстинкции, найденного путем экстраполяции по предварительно

построенному калибровочному графику, и выражали в нкат/г ткани. Коэффициент вариации – 7,8 %.

Статистическую достоверность различий определяли по критерию Стьюдента с помощью пакета SPSS 11.0.

### Результаты и их обсуждение

Мы оценивали состояние стабильности мембран лизосом нервной ткани глаза (сетчатка+зрительный нерв) по изучению активности двух форм фермента кислой фосфатазы (КФ) – свободной и связанной. Для оценки активности фермента в лизосомах была выделена лизосомальная фракция из гомогената ткани и в ней проведена реакция. Эти данные отражают активность связанной формы КФ. Не содержащий лизосом супернатант, в котором определяли активность фермента, отражал активность свободной формы КФ.

Данные о влиянии глаукомы (офтальмогипертензии) на активность кислой фосфатазы в сетчатке и зрительном нерве при экспериментальном диабете у кроликов представлены в таблице 1.

Из данных видно, что активность свободной формы кислой фосфатазы в сетчатке и зрительном нерве животных 2-й группы с диабетом и глаукомой повысилась через 3 недели эксперимента до 135,3%, т.е. до (158,41±6,37) нкат/г ( $p<0,01$ ). Через 6 недель исследуемый показатель был увеличен до 141,3%, что составило (165,47±10,05) нкат/г по отношению к норме (117,08±8,02) нкат/г ( $p<0,01$ ).

Обнаружено, что в сетчатке и зрительном нерве активность свободной формы кислой фосфатазы у животных 3-й группы с диабетом была повышена в первый период наблюдения до (147,98±6,85) нкат/г, что составило 127,6% ( $p<0,01$ ), во второй срок активность фермента возросла до (156,97±9,01) нкат/г, что составило 135,4% относительно нормы (115,93±6,31) нкат/г.

Активность свободной формы кислой фосфатазы в сетчатке и зрительном нерве в 4-й группе животных с гипертензией повышалась до 116,0%, составляя при этом (137,58±8,72) нкат/г – в 1 срок, до 127,4%, т.е. (151,17±9,09) нкат/г – во 2 период наблюдения сравнительно с нормой (118,65±8,49) нкат/г ( $p<0,05$ ).

**Таблица 1.** Влияние глазной гипертензии на активность кислой фосфатазы (нкат/г ткани) в сетчатке и зрительном нерве при экспериментальном диабете у кроликов (n=8-10)

| Биохимические показатели | Группы животных     | Стат. показатели | Условия эксперимента |             |              |
|--------------------------|---------------------|------------------|----------------------|-------------|--------------|
|                          |                     |                  | Норма                | 1 срок      | 2 срок       |
| Свободная форма          | Диабет+ гипертензия | M±m              | 117,08±8,02          | 158,41±6,37 | 165,47±10,05 |
|                          |                     | p                | -                    | <0,01       | <0,01        |
|                          |                     | %                | 100,0                | 135,3       | 141,3        |
|                          |                     | p1               | >0,05                | >0,05       | >0,05        |
|                          |                     | %1               | 101,6                | 107,0       | 105,4        |
|                          |                     | p2               | >0,05                | >0,05       | >0,05        |
|                          |                     | %2               | 98,7                 | 115,1       | 109,5        |
|                          | Диабет              | M±m              | 115,93±6,31          | 147,98±6,85 | 156,97±9,01  |
|                          |                     | p                | -                    | <0,01       | <0,051       |
| %                        |                     | 100,0            | 127,6                | 135,4       |              |
| Гипертензия              | M±m                 | 118,65±8,49      | 137,58±8,72          | 151,17±9,09 |              |
|                          | p                   | -                | >0,05                | <0,05       |              |
|                          | %                   | 100,0            | 116,0                | 127,4       |              |
| Связанная форма          | Диабет+ гипертензия | M±m              | 46,08±3,85           | 26,55±2,02  | 22,99±2,15   |
|                          |                     | p                | -                    | <0,001      | <0,001       |
|                          |                     | %                | 100,0                | 57,6        | 49,9         |
|                          |                     | p1               | >0,05                | <0,05       | <0,05        |
|                          |                     | %1               | 96,5                 | 74,9        | 72,5         |
|                          |                     | p2               | >0,05                | <0,01       | <0,01        |
|                          |                     | %2               | 94,7                 | 63,7        | 63,9         |
|                          | Диабет              | M±m              | 47,74±3,38           | 35,47±2,70  | 31,73±3,11   |
|                          |                     | p                | -                    | <0,05       | <0,01        |
| %                        |                     | 100,0            | 74,3                 | 66,5        |              |
| Гипертензия              | M±m                 | 48,65±2,51       | 41,65±3,84           | 35,95±3,41  |              |
|                          | p                   | -                | >0,05                | <0,05       |              |
|                          | %                   | 100,0            | 85,6                 | 73,9        |              |

**Примечание:** p – уровень значимости различий данных по отношению к группе "Норма"; p1 – уровень значимости различий данных по отношению к группе "Диабет"; p2 – уровень значимости различий данных по отношению к группе "Гипертензия".

Сравнивая результаты в экспериментальных группах, мы не отметили статистически значимой разницы между этими данными. Но можно отметить, что во все сроки исследования наблюдается тенденция к возрастанию активности свободной формы кислой фосфатазы в сетчатке и зрительном нерве у животных 2-й группы (с диабетом и глаукомой) по сравнению с группой животных с глаукомой без диабета.

Активность связанной формы кислой фосфатазы в сетчатке и зрительном нерве животных с диабетом и гипертензией снижалась в 1 срок (3 недели эксперимента) до 57,6%, т.е.  $(26,55 \pm 2,02)$  нкат/г ( $p < 0,001$ ). Во 2 срок (6 недель) исследуемый показатель понизился до 49,9%, что составило  $(22,99 \pm 2,15)$  нкат/г по сравнению с нормой  $(46,08 \pm 3,85)$  нкат/г ( $p < 0,001$ ).

По мере развития диабетического процесса активность связанной формы кислой фосфатазы в сетчатке и зрительном нерве кроликов 3-й группы также снижалась и в 1 срок достигла значений  $(35,47 \pm 2,70)$  нкат/г, что составило 74,3% ( $p < 0,05$ ), во 2 срок –  $(31,73 \pm 3,11)$  нкат/г, т.е. уменьшилась до 66,5% по отношению к норме  $(47,74 \pm 3,38)$  нкат/г ( $p < 0,01$ ).

Сравнение полученных данных показало, что активность связанной формы кислой фосфатазы в исследуемой ткани у кроликов с диабетом и глаукомой понижается более значительно, чем у животных с диабетом без глаукомы. Так, в 1 срок уменьшение составляет – 25,1%, во второй срок – 27,5% ( $p < 0,05$ ).

Активность связанной формы кислой фосфатазы в сетчатке и зрительном нерве животных 4-й группы с глаукомой была снижена до 85,6%, составляя при этом  $(41,65 \pm 3,84)$  нкат/г – в 1 срок, до 73,9%, т.е.  $(35,95 \pm 3,41)$  нкат/г – во 2 период наблюдения сравнительно с нормой  $(48,65 \pm 2,51)$  нкат/г ( $p < 0,05$ ).

Сравнение результатов активности связанной формы кислой фосфатазы в сетчатке и зрительном нерве кроликов 2-й и 4-й групп (с диабетом и глаукомой и глаукомой без диабета) выявило более низкие ее показатели (на 36%,  $p < 0,01$ ) во 2-й группе в оба срока.

Таким образом, анализируя полученные результаты, во всех группах животных можно отметить снижение активности фермента кислой фосфатазы в лизосомальной фракции нейрональной ткани глаза, т.е. внутри лизосом сетчатки и зрительного нерва. Об этом свидетельствует активность связанной формы КФ. Обратная картина наблюдалась относительно активности КФ вне лизосомальной фракции нервной ткани глаза. Свободная форма кислой фосфатазы здесь существенно увеличивалась во всех экспериментальных группах при моделировании диабета и глаукомы. Наибольшие изменения в соотношении активности этих форм фермента отмечались при сочетанном моделировании этих заболеваний.

Лизосомы являются органеллами клетки со специфической и очень стабильной мембраной вследствие особенностей их функции. Кислая фосфатаза – одна из многих гидролаз, специфических ферментов

лизосом. Присутствие этого фермента вне лизосом свидетельствует о дестабилизации лизосомальной мембраны. Таким образом, кислая фосфатаза является признанным маркером лабильности мембран лизосом. Учитывая значительную прочность этой мембраны, разрушить ее могут лишь определенные агенты. Цитотоксические свободные радикалы, а также продукты ПОЛ относятся именно к таким агентам. В этой связи полагаем, что именно оксидативный стресс, имеющий место при глаукоме и сахарном диабете, может являться индуктором повреждения мембран лизосом, о чем свидетельствуют наши экспериментальные данные о нарушении баланса лизосомальной и цитоплазматической (связанной и свободной) форм кислой фосфатазы.

Исследование, проведенное на культуре клеток [11], показало, что хроническое пребывание клеток трабекулярной сети в условиях оксидативного стресса приводит к снижению лизосомальной активности. Авторы предположили, что такие изменения способствуют прогрессированию глаукомы. Ранее нами в эксперименте на кроликах было также показано, что при повышенном внутриглазном давлении гипергликемия оказывает негативное мембранотропное воздействие на ультраструктуру угла передней камеры и резко снижает стабильность лизосомальных мембран в этих тканях [8]. Настоящее исследование, проведенное в аналогичных условиях, доказывает присутствие этого же механизма дестабилизации лизосомальных мембран и в тканях нервного аппарата глаза.

## Выводы

При моделировании глаукомы (глазной гипертензии) на фоне экспериментального диабета происходит резкое снижение стабильности мембран лизосом в тканях нервного аппарата глаза. Активность маркерного фермента лизосом – кислой фосфатазы – в сетчатке и зрительном нерве кроликов при сочетанном моделировании офтальмогипертензии и стрептозотоцинового диабета была изменена более выражено, чем при раздельном моделировании этих заболеваний. Полагаем, что лизосомальная дисфункция является одним из патогенетических звеньев глаукомного процесса на фоне сахарного диабета.

## Литература

1. Алексеев И. Б., Кочергин С. А., Воробьева И. В., Михалева Л. Г. О некоторых звеньях патогенеза диабетической ретинопатии при сахарном диабете 2-го типа и роли антиоксидантов // Вестник офтальмол. – 2013. – Т.129, №3. – С. 89-93.
2. Астахов Ю. С., Крылова И. С., Шандричев Ф. Е. Является ли сахарный диабет фактором риска развития открытоугольной глаукомы // Клини. офтальмол. – 2006. – №3. – С.91-98.
3. Гладуш Т. И., Байдан Е. И. Стабильность лизосомальных мембран сетчатки белых крыс при стрептозотоциновом диабете в условиях медикаментозного воздействия ацетилцистеином, флавоноидом и таурином // Офтальмол. журн. – 2010. – № 4. – С. 60-64.

4. **Егоров Е. А., Алексеев В. Н., Мартынова Е. Б. и др.** Патогенетические аспекты лечения первичной открытоугольной глаукомы. – М., 2001. – 118 с.
5. Лабораторные методы исследования в клинике // Под ред. проф. В. В. Меньшикова. – М. Медицина, 1987. – 368 с.
6. **Нестеров А. П.** Первичная открытоугольная глаукома: патогенез и принципы лечения // Клин. офтальмология. – 2000. – Т.1, № 1. – С. 4-5.
7. **Сердюк В. Н.** Состояние мембран лизосом сетчатки и зрительного нерва при развитии экспериментальной глаукомы / В. Н. Сердюк // Запорожский медицинский журнал. – №5 (74). – 2012. – С. 57-59.
8. **Юревич В. Р.** Мембранотропное влияние гипергликемии на ткань угла передней камеры при офтальмогипертензии // Офтальмол. журн. – 2016. – №2. – С.41-44.
9. **Vonovas S., Peponis V., Filioussi K.** Diabetes mellitus as a risk factor for primary open-angle glaucoma: a meta-analysis // Diabetic Medicine. – 2004. – №6. – P.609-14.
10. **Calderon G. D., Juarez O. H., Hernandez G. E. et al.** Oxidative stress and diabetic retinopathy: development and treatment // Eye. – 2017. – Vol.31(8). –P.1122-1130.
11. **Liton P. B., Lin Y., Gonzales P., Epstein D.** Potential role of lysosomal dysfunction in the pathogenesis of primary open angle glaucoma // Autophagy. – 2009. – Vol. 5(1). – P. 122-126.
12. **Masood Saleem Mir, Mohammad Maqbool Darzi, Omer Khalil Baba et al.** Streptozotocin Induced Acute Clinical Effects in Rabbits // Iranian J. Pathology 2015. – V.10, №3. – P.206-213
13. Methoden der enzymatischen Analyse/Herausgegeben von H. U. Bergmeyer. – Berlin: Akademie-Verlag, 1970. – В. I. – S.457-458.
14. **Quigley H. A.** Number of people with glaucoma worldwide // Brit. J. Ophthalmol. – 1996. – N5. – P. 389-393
15. **Zhu M. D., Cai F. Y.** Development of experimental chronic intraocular hypertension in the rabbit // Australian and New Zeland J Ophthalmol. – 1992. – Vol.20. – P. 225-234

Поступила 01.02.2018

## Стабільність мембран лізосом структур сітківки і зорового нерва очей при моделюванні глаукоми на тлі експериментального діабету у кроликів

Юревич В. Р.

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького; Львів (Україна)

**Актуальність.** Патогенетичні механізми глаукоми залишаються багато в чому невивченими. Ряд авторів вважають діабет серйозним фактором ризику глаукоматозного ураження. Стан мембран лізосом сітківки та зорового нерва при первинній глаукомі, що супроводжується цукровим діабетом, є актуальним завданням для встановлення особливостей патогенезу цієї поєднаної патології.

**Мета:** вивчити структурно-функціональний стан стабільності лізосом при моделюванні експериментальної глаукоми (офтальмогіпертензії) в умовах стрептозотоцинового діабету у кроликів.

**Матеріал та методи.** Експериментальні дослідження проводилися на 34 дорослих кроликах, яким моделювали стрептозотоциновий діабет, глаукому (офтальмогіпертензію) і поєднано діабет і глаукому. У тканинах сітківки та зорового нерва визначали

маркерний фермент мембран лізосом – кислу фосфатазу.

**Результати.** При моделюванні глаукоми (очної гіпертензії) на тлі експериментального діабету відбувається різке зниження стабільності мембран лізосом в нервових тканинах ока. Активність маркерного ферменту лізосом – кислої фосфатази – в сітківці і зоровому нерві кроликів при одночасному моделюванні офтальмогіпертензії і стрептозотоцинового діабету була змінена більш виражено, ніж при роздільному моделюванні цих захворювань. Вважаємо, що лізосомальна дисфункція є однією з патогенетичних ланок глаукомного процесу, який супроводжується цукровим діабетом.

**Висновок.** Лізосомальна дисфункція є одним з патогенетичних ланок глаукомного процесу, який супроводжується цукровим діабетом.

**Ключові слова:** глаукома, діабет, нервова тканина ока, лізосомальна дисфункція, кролики