

І.М. Михейцева

Протекторна дія мелатоніну за експериментальної глаукоми у щурів

Вивчали вплив мелатоніну на вміст амінокислотних нейротрансмітерів сітківки при глаукомній нейропатії у щурів. Глаукому викликали тривалим системним введенням адреналіну. У експерименті брали участь три групи щурів: інтактні; з моделлю глаукоми; з моделлю глаукоми, яких лікували мелатоніном. Мелатонін щурам на тлі розвинутої моделі вводили упродовж 1 міс у дозі 0,1 мг/кг. У склоподібному тілі, як місці накопичення медіаторів сітківки, визначали вміст вільних амінокислот методом іонообмінної хроматографії. Встановлено, що при глаукомній нейропатії, викликаній хронічним адреналіновим стресом, змінювався нейромедіаторний профіль сітківки, а саме, збільшувався вміст збудливих амінокислот глутамату і аспартату і знижувався гальмівних ГАМК і гліцину, призводячи до підвищення індексу збудження на 55 %. Дисбаланс амінокислотних медіаторів значною мірою нормалізувався тривалим введенням мелатоніну. Зниження під впливом останнього вмісту збудливих амінокислот і підвищення гальмівних призвело до зниження індексу збудження на 27 % порівняно з нелікованою групою. Таким чином, зменшення збудливих посилення у сітківці під впливом мелатоніну може визначати його нейропротекторну активність при глаукомній нейропатії.

Ключові слова: мелатонін, амінокислотні медіатори, сітківка, глаукомна нейропатія.

ВСТУП

Вивчення нейрохімічної активності в сітківці є одним з ключових завдань як у цілому при дослідженні зору, так і конкретно для розуміння патогенезу глаукомної нейропатії. Участь механізму ексайтотоксичності в апоптотичній загибелі нейронів сітківки при цьому захворюванні широко обговорюється у світовій літературі [7, 14]. Нами вперше було встановлено на моделі хронічної стресіндукованої глаукоми у щурів не лише збільшення вмісту нейротоксичних збудливих амінокислот – глутамату і аспартату, але й зниження концентрації у відповідних структурах ока гальмівних амінокислот – ГАМК і гліцину [3].

Порушення процесів нейротрансмісії в сітківці при глаукомній нейропатії потребує патогенетичної корекції. Мелатонін, як нейрогормон – антистресор, може становити значний інтерес у розробці такого напряму нейропротекції при глаукомі. Його анти-

стресова дія виявляється впливом, в першу чергу, на гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозну систему і імункомпетентні клітини [1]. При хронічному стресі, передусім, розузгоджуються біологічні ритми, а також порушується секреція деяких біологічно активних речовин. Мелатонін здатний обмежувати ці збої біологічного годинника. Було експериментально доведено, що у відповідь на дію стресорів епіфіз відповідає різким підвищенням синтезу мелатоніну незалежно від освітлення [2].

Рецептори мелатоніну широко представлені в периферичних тканинах ссавців. Для тканин ока – сітківки, ціліарного тіла, хороїда, кришталика, склери – характерна наявність MT_3 -рецепторів [6].

Нейропротекторні властивості мелатоніну багато в чому пов'язані з його дією на нейрональні медіатори. Він здатен знижувати глутаматну нейротоксичність, забезпечуючи нейропротекторну активність при таких

нейродегенеративних захворюваннях, як хвороба Альцгеймера і паркінсонізм [12]. У низці експериментальних робіт на різних видах тварин, птахів і риб, доведена здатність мелатоніну підвищувати виживання нервових клітин, у тому числі нейронів сітківки, за рахунок обмеження глутаматної ексайтотоксичності. Діючи через MT_3 -рецептори в сітківці очей коропа, мелатонін модулював глутаматні рецептори і міняв глутаматергічну трансмісію [9]. У нейронах сітківки курей він демонстрував нейропротекторний ефект щодо глутаматвикликаного ексайтотоксичності [10].

У щурів, яким викликали ішемічно-реперфузійне ушкодження нейронів сітківки різкими підвищеннями внутрішньоочного тиску, застосування 0,5%-го розчину мелатоніну, введеного в передню камеру, збільшувало кількість гангліозних клітин сітківки в порівнянні з нелікованими очима. Автори також спостерігали збільшення їх виживання і відновлення ушкодження нейронів сітківки [13].

Нейропротекторні властивості мелатоніну можуть бути пов'язані зі впливом на головний гальмівний медіатор нервової системи – ГАМК. Близько 30 років тому було показано, що цей гормон здатний підвищувати вміст ГАМК у мозку [8]. Він також спроможний диференціально модулювати функцію А-рецепторів ГАМК [11]. Вважають, що деякі ефекти екзогенного мелатоніну у людей – седативний, анальгезуючий, антиконвульсивний – можуть бути пов'язані з ГАМК-системою.

Метою нашого дослідження було вивчення впливу мелатоніну, що тривало вводився, на вміст амінокислотних нейротрансмітерів сітківки при стресіндукованій глаукомній нейропатії у щурів.

МЕТОДИКА

Експерименти проведені на 25 щурах, розділених на 3 групи. До I контрольної групи

ввійшло 5 інтактних щурів (10 очей); до II і III – по 10 тварин (20 очей) з моделлю глаукоми. Глаукому моделювали внутрішньоочеревинним введенням адреналіну (15 мкг/100 г) упродовж 6 тиж [4]. Тваринам III групи на фоні глаукомної нейропатії вводили рег ос мелатонін в дозі 0,1 мг/кг протягом одного місяця. Амінокислотний профіль вивчали в склоподібному тілі ока, проби якого відбирали на холоді відразу після декапітації. Зразки поміщали в рідкий азот. До проведення тесту їх зберігали в холодильній камері при $-70^{\circ}C$. Вміст вільних амінокислот визначали методом іонообмінної хроматографії на автоматичному амінокислотному аналізаторі “Hitachi L – 8800”.

Окрім абсолютного вмісту амінокислот проводили аналіз розрахункового «індексу збудливості» (ІЗ), який визначали як відношення суми концентрацій збудливих амінокислот глутамату і аспартату до суми концентрацій гальмівних – гліцину і ГАМК.

Внутрішньоочний тиск (ВОТ) вимірювали за допомогою апланатичного тонометра масою 2 г, вимір відбитків у лінійних одиницях проводили за допомогою окуляр-лінзи зі вбудованою лінійкою (МПБ-2). Перерахунок на одиниці ртутного стовпа проводили за формулою Головіна.

Статистичну обробку отриманих результатів дослідження здійснювали з використанням пакету програм Statistica.7 методом дисперсійного аналізу, парні порівняння – з використанням критерію множинного порівняння Ньюмана-Кейлса. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймався рівним 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Хронічний симпато-адреналовий стрес викликав у експериментальних тварин стійке підвищення ВОТ і морфологічно підтверджену зміну нервового апарату ока, що характеризується загибеллю гангліозних нейронів сітківки і їх аксонів, тобто вираженою

картиною глаукомної нейропатії. Лікування мелатоніном призвело до зниження ВОТ у тварин с моделлю стресіндукованої глаукоми на 28 % ($P < 0,001$; рис. 3,б) і певного нейропротекторного впливу на структури нервового апарату ока [5].

Ці функціональні і структурні зміни в очах експериментальних тварин супроводжувалися патохімічними зрушеннями нейротрансмітерного профілю сітківки. Як об'єкт вивчення нами було використано склоподібне тіло – міжклітинний матрикс ока. Наш вибір зумовлений тим фактом, що саме в ньому накопичуються медіатори сітківки у разі їх надмірного виділення в постсинаптичних терміналях. Проведений дисперсійний аналіз результатів хроматографічного визначення вмісту медіаторних амінокислот склоподібного тіла в трьох групах щурів показав помітну різницю при моделюванні глаукоми (рис. 1, 2).

Вміст досліджуваних амінокислот у II групі тварин статистично значимо відрізнявся від контрольних значень. При експериментальній глаукомі, що індукується хронічним симпато-адреналовим стресом, в екстрацелюлярному просторі ока, який безпосередньо прилягає до сітківки, розвився амінокислотний дисбаланс у бік переважання кислот збудливої дії. У тварин цієї групи була збільшена концентрація глутамату на 17,6 % і аспартату – на 24 % порів-

няно з очима контрольних тварин ($P < 0,001$; див. рис. 1). Відмічено також зниження концентрації гальмівних медіаторів: ГАМК на 25 % і гліцину – на 22,6 % ($P < 0,001$; див. рис. 2).

У щурів III групи з моделлю глаукоми, яких лікували мелатоніном, вміст глутамату і аспартату в склоподібному тілі був практично на рівні контрольних значень (див. рис. 1), вміст гліцину був нижчим на 10 % ($P < 0,001$), а вміст ГАМК перевищував контрольний рівень на 14,5 % ($P < 0,001$; див. рис. 2). Порівняно зі значеннями у тварин II групи вміст ГАМК був вищим на 52,8 % ($P < 0,001$), а гліцину на 15,8 % ($P < 0,001$; див. рис. 2). Вміст глутамату знижувався під впливом мелатоніну на 12 % ($P < 0,001$), а аспартату, сягнувши контрольних значень, був нижчий, ніж при глаукомі без лікування на 19,4 % ($P < 0,001$; див. рис. 1).

Враховуючи, що при вивченні дії антагоністичних регуляторів у організмі найбільш важливо знати їх баланс, а амінокислоти, що вивчали, є медіаторами з антагоністичною дією, окрім оцінки абсолютних значень концентрації цих нейроактивних медіаторів було вираховано їх співвідношення – ІЗ. При глаукомній нейропатії останній був статистично значимо підвищеним на 55,4 % ($P < 0,001$) у порівнянні з контролем. Мелатонін знижував значення цього індексу на 27 % ($P < 0,001$; див. рис. 3,а).

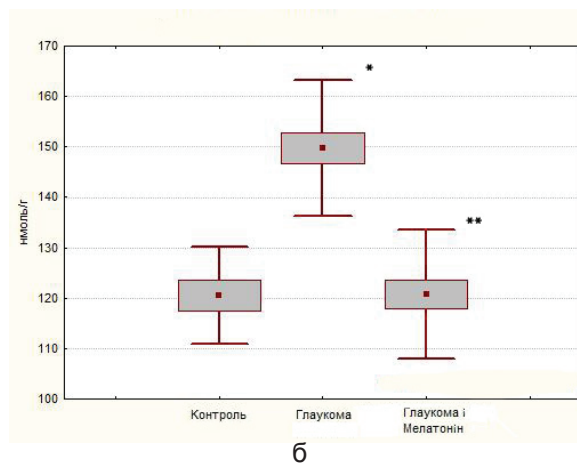
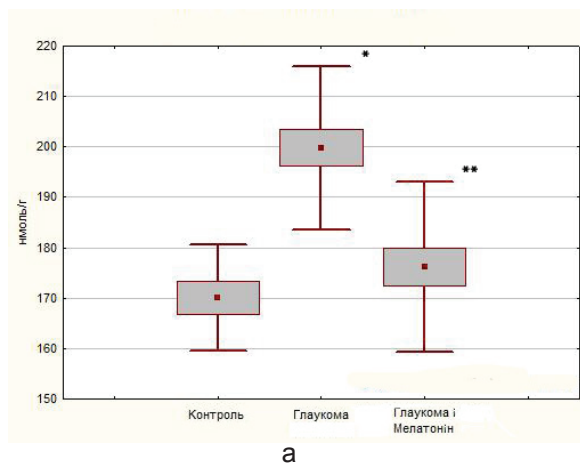


Рис. 1. Вміст збудливих амінокислот глутамату (а) та аспартату (б) у склоподібному тілі очей щурів. * різниця достовірна відносно значення у контрольних тварин, ** різниця достовірна до значення у тварин з глаукомою

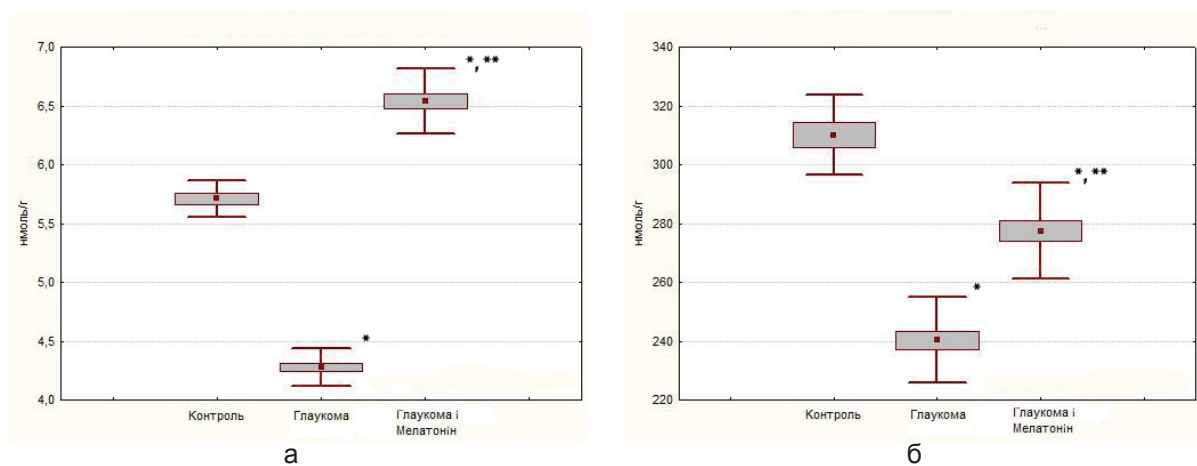


Рис. 2. Вміст гальмієвих амінокислот ГАМК (а) та гліцину (б) в склоподібному тілі очей щурів. * різниця достовірна відносно значення у контрольних тварин, ** різниця достовірна до значення у тварин з глаукомою

Кореляційний аналіз виявив сильний зв'язок офтальмотонусу і ІЗ сітківки в І групі щурів ($r=0,8586$, $P<0,05$). Для II групи щурів з моделлю глаукоми кореляційний зв'язок ВОТ і ІЗ був середньої сили ($r=0,6914$, $P<0,05$). Для III групи щурів з моделлю глаукоми, яких лікували мелатоніном, сила зв'язку була статистично значущою, але низькою ($r=0,2278$, $P<0,05$). Отже, у тварин з моделлю захворювання паралельно зі змінами функціональної ознаки глаукоми, а саме підвищенням ВОТ, змінювався склад медіаторів терміналей сітківки. Порушення балансу гальмієвих і збудливих амінокислот і збільшення ІЗ могло

бути пов'язано з підвищенням ВОТ. Грунтуючись на отриманих результатах, ми можемо говорити, що при стресіндукованій глаукомі з високим офтальмотонусом нейрональні структури ока знаходяться в середовищі зі значно підвищеним збудливим посиленням, зумовленим як підвищеним вмістом збудливих амінокислот глутамату і аспартату, так і зниженням гальмієвих – гліцину і ГАМК. Введення мелатоніну значною мірою знижувало напруженість збудження, в якому перебувають нейрони сітківки, нормалізуючи баланс амінокислотних медіаторів. Стрес-протекторний вплив мелатоніну проявлявся

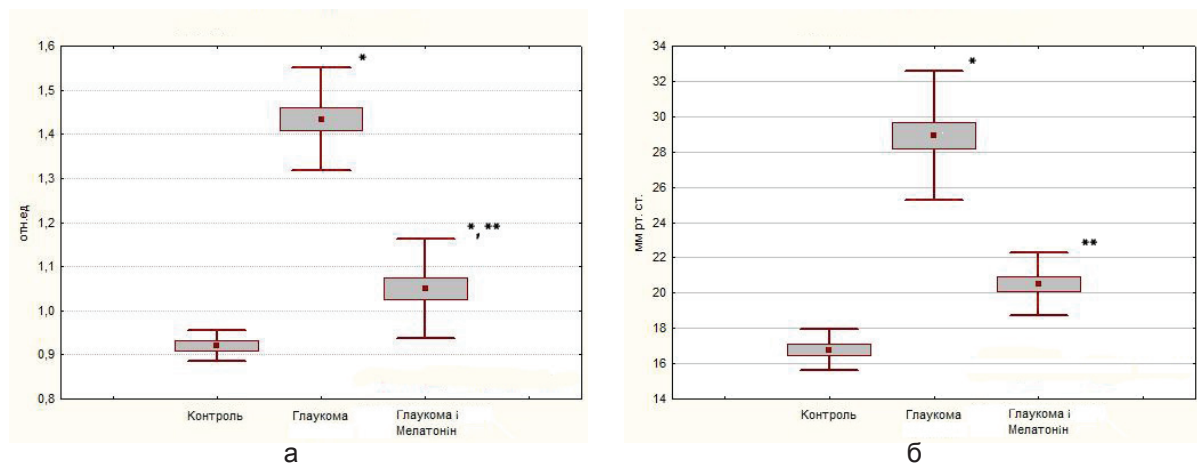


Рис. 3. Індекс збудження для сітківки (а) та внутрішньоочний тиск (б) щурів. * різниця достовірна відносно значення у контрольних тварин, ** різниця достовірна до значення у тварин з глаукомою

в зниженні накопичування в середовищі, яке прилегає до сітківки, збудливого глутамату і аспартату та підвищенні гальмівних ГАМК і гліцину. Зниження у результаті цього впливу ІЗ створює більш фізіологічні умови функціонування нейронів сітківки, забезпечуючи захист нейрооптичного апарату ока при глаукомній нейропатії.

ВИСНОВКИ

1. При експериментальній глаукомній нейропатії, що індукується хронічним симпатoadреналовим стресом, в екстрацелюлярному просторі ока, яке безпосередньо прилягає до сітківки, розвивається амінокислотний дисбаланс у бік переважання кислот збудливої дії. У тварин з моделлю глаукоми була збільшена концентрація збудливих медіаторів глутамату (на 17,6 %) і аспартату (на 24 %) та одночасно понижена концентрація гальмівних медіаторів ГАМК (на 25 %) і гліцину (на 22,6 %). Ці зміни супроводжувалися зростанням ІЗ сітківки (на 55,4 %) і підвищенням ВОТ (на 69 %).

2. Застосування тваринам з експериментальною глаукомою впродовж 1 міс мелатоніну в дозі 0,1 мг/кг значною мірою нормалізувало амінокислотний медіаторний профіль. Вміст збудливих амінокислот глутамату і аспартату в склоподібному тілі у цих шурів був практично на рівні контрольних значень, а вміст гальмівних амінокислотних медіаторів сітківки підвищувався – ГАМК на 52,8 % і гліцину на 15,8 %. ІЗ знижувався на 27 %. Ці зміни зумовлювали нейропротекторну дію мелатоніну стосовно нейронів сітківки при експериментальній глаукомі, яка супроводжувалась зниженням ВОТ на 28 %.

И.Н. Михейцева

ПРОТЕКТОРНОЕ ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЛАУКОМЕ У КРЫС

Изучали влияние мелатонина на содержание аминокис-

лотных нейротрансмиттеров сетчатки при глаукомной нейропатии у крыс. Глаукому вызывали длительным системным введением адреналина. В эксперименте участвовало три группы крыс: интактные; с моделью глаукомы; с моделью глаукомы, леченных мелатонином, который вводили на протяжении 1 мес в дозе 0,1 мг/кг. В стекловидном теле, как месте накопления медиаторов сетчатки, определяли свободные аминокислоты методом ионообменной хроматографии. Установлено, что при глаукомной нейропатии, вызванной хроническим адреналиновым стрессом, изменялся нейромедиаторный профиль сетчатки, а именно, увеличивалось содержание возбуждающих аминокислот глутамата и аспартата и снижалось содержание тормозных ГАМК и глицина, приводя к повышению индекса возбуждения на 55 %. Дисбаланс аминокислотных медиаторов в значительной мере нормализовался длительным введением мелатонина. Снижение под его влиянием содержания возбуждающих и повышение тормозных аминокислот привело к снижению индекса возбуждения на 27 % в сравнении с нелеченной группой. Таким образом, уменьшение возбуждающих посылов в сетчатке под влиянием мелатонина может определять его нейропротекторную активность при глаукомной нейропатии.

Ключевые слова: мелатонин, аминокислотные медиаторы, сетчатка, глаукомная нейропатия.

I.N. Mikheytsava

PROTECTIVE ACTION OF MELATONINE IN EXPERIMENTAL GLAUCOMA IN RATS

We explored the melatonin influence on the level of amino acid neurotransmitters of the retina in glaucoma neuropathy in rats. Glaucoma was caused by the prolong systemic introduction of adrenalin. In the study 3 groups were participated: control animals; the model of glaucoma; the model of glaucoma treated with melatonin (M) in the dose 0,1 mg/ kg during 1 month. In a vitreous body, as place of retina neuromediator accumulation, free amino acids (AA) were determined with the method of ion-exchange chromatography. It was revealed that in adrenalin-induced glaucoma neuropathy the retina mediator profile was changed, namely, exciting glutamate and aspartate levels were increased and inhibit GABA and glycine levels were decreased, resulting in a rise of excitatory index (EI) by 55 %. The disbalance of AA neuromediators to a great extent was normalized by prolonged M introduction. A decrease under M influence of excitatory AA gutamate and aspartate and an increase of inhibitory AA resulted in the decline of EI by 27 % when compared to the untreated group. Thus, reduction of excitatory impuls in retina under influence of M can determine its neuroprotective activity in glaucoma neuropathy.

Key words: melatonin, amino acid mediators, retina, glaucoma neuropathy.

Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy, Odessa

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Анисимов В.Н. Мелатонин. Роль в организме, применение в клинике. – СПб: Система, 2007. – 40 с.
2. Арушанян Э.Б., Арушанян Л.Г. Модуляторные свойства эпифизарного мелатонина // Пробл. эндокринологии. – 1991. – 37, №3. – С.65–68.
3. Михейцева И.Н. Дисбаланс нейротрансмиттеров сетчатки глаз крыс при экспериментальной глаукомной нейропатии // Нейрофизиология. – 2011. – вып.43, №5. – С.457–459
4. Михейцева І.М. “Спосіб моделювання хронічного підвищеного внутрішньоочного тиску у шурів”, Патент на корисну модель №38446, 2009. – Бюл. №1.
5. Михейцева И.Н. Молекулярные механизмы нейродегенерации в патогенезе первичной глаукомы, ретино-нейропротекция при воздействии на них мелатонина // Тавр. медико-биол. вестник. – 2012. – 15, №3. – ч.1(59). – С.231–234.
6. Alarma-Estrany P., Pintor J. Melatonin receptor in the eye: location, second messengers and role in ocular physiology // Pharm. Ther. – 2007. – 113, №3 – P.507–522.
7. Carter-Dawson L., Crawford M.L., Harwerth R.S. Vitreal glutamate concentration in monkeys with experimental glaucoma // Invest Ophthalmol. Vis. Sci. – 2002. – 43, №8 – P.2633–2640.
8. Datta P.C., King M.G. Melatonin: effects on brain and behavior // Neurosci. Biobehav. Rev. – 1980. – №4. – P.451–458.
9. Hai Huang, Shu-Chen Lee, Xiong-Li Yang Modulation by melatonin of glutamatergic synaptic transmission in the carp retina // J. Physiol. – 2005. – 569, №3. – P.857–871.
10. Lima A.C., Louzada P.R., De Mello F.G., Ferreira S.T. Neuroprotection against Abeta and glutamate toxicity by melatonin: are GABA receptor involved? // Neurotox Res. – 2003. – №5. – P.323–327.
11. Simonneaux V., Ribelayga Ch. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides and other pineal transmitters // Pharmacol. Rev. – 2003. – 55, №2. – P.325–395.
12. Srinivasan V., Pandi-Perumal S.R., Cardinali D.P. Melatonin in Alzheimer’s disease and other neurodegenerative disorders // Behav. Brain Funct. – 2006. – 2.
13. Tang Q., Hu Y., Ca O.Y. Neuroprotective effect of melatonin on retinal ganglion cells in rats // J. Huazhong Univ. Sci. and Technol. – 2006. – 26, №2. – P.235-237
14. Wamsley S., Gabelt T., Dahl D. Vitreous glutamate concentration and axon loss in monkeys with experimental glaucoma // Arch. Ophthalmol. – 2005. – 123, №1. – P.64–70.

*ДУ “Ін-т очних хвороб і тканинної терапії
ім. В.П. Філатова” НАМН України
E-mail: mda@soborka.net*

*Матеріал надійшов до
редакції 23.10.2012*