

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ АНАЛОГОВ ПРОСТАГЛАНДИНОВ ДЛЯ МЕСТНОГО ЛЕЧЕНИЯ ГЛАУКОМЫ

КУРЫШЕВА Н.И., д.м.н., профессор, руководитель консультативно-диагностического отдела¹;
АЗИЗОВА О.А., д.м.н., профессор, руководитель лаборатории базовых основ патологии²;
ПИРЯЗЕВ А.П., научный сотрудник лаборатории базовых основ патологии².

¹Центр офтальмологии ФМБА России, Клиническая больница №86, 123098, Российская Федерация, Москва, ул. Гамалеи, 15;

²НИИ физико-химической медицины ФМБА России, 119435, Российская Федерация, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а.

Авторы не получали финансирования при проведении исследования и написании статьи.
Конфликт интересов: отсутствует.

Резюме

ЦЕЛЬ. Снижение внутриглазного давления (ВГД) не во всех случаях обеспечивает сохранение зрительных функций при глаукоме. В литературе накоплено немало данных о том, что нейродегенерация при глаукоме происходит в результате окислительного стресса, повреждающего ганглиозные клетки сетчатки. Антиоксидантное лечение является основным при оксидативной патологии, включая глаукому. Аналоги простагландинов относятся к препаратам выбора при глаукоме благодаря своей выраженной гипотензивной активности и малому количеству побочных действий. Есть сведения о том, что аналоги простагландинов, подобно другим антиглаукомным препаратам, помимо гипотензивного эффекта обладают нейропротекторными свойствами. Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение антиоксидантной активности (АОА) аналогов простагландинов, наиболее широко применяемых для местного гипотензивного лечения глаукомы.

МЕТОДЫ. В модельной системе (индуцированный окислительным стрессом гемолиз эритроцитов) была исследована антиоксидантная активность следующих аналогов простагландинов: латанопроста (Latanoprost 0,005%, "Pfizer"), травопроста (Travoprost 0,004%, "Alcon") и биматопроста (Bimatoprost ophthalmic solution 0,03%,

"Allergan"). В том случае, если препараты обладали антиоксидантной активностью, они ингибировали гемолиз, степень которого оценивалась по концентрации гемоглобина в среде инкубации.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Наиболее высокую АОА имеет травопрост (17%). Однако его АОА снижалась по мере увеличения объема исследуемого препарата. Напротив, АОА биматопроста при этом повышалась и достигала максимума (38%) при исследуемом объеме 120 мкл. АОА латанопроста была наиболее слабой, а при добавлении 120 мкл в модельную систему латанопрост вел себя как оксидант, что проявлялось в усилении гемолиза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Полученные результаты подчеркивают важные дополнительные (наряду с гипотензивной активностью) свойства препаратов, поскольку способность лекарства, закапываемого в глаз, обладать протекторным действием в отношении нейронов сетчатки и их аксонов является не менее важным свойством, чем гипотензивный эффект. Аналоги простагландинов имеют различную АОА, что важно учитывать с позиций их прямого нейропротекторного действия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: окислительный стресс, глаукома, аналоги простагландинов.

Для контактов:

Курышева Наталья Ивановна, e-mail: e-natalia@list.ru

ENGLISH

COMPARISON OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PROSTAGLANDIN ANALOGUES FOR TOPICAL GLAUCOMA TREATMENT

KURYSHEVA N.I., Med.Sc.D., Professor, Head of the Diagnostic Department¹;

AZIZOVA O.A., Med.Sc.D., Professor, Head of the Laboratory of Basic Physical Pathology²;

PIRYAZEV A.P., research associate².

¹The Ophthalmological Center of the Federal Medical and Biological Agency, Clinical Hospital No. 86, 15 Gamalei st., Moscow, Russian Federation, 123098;

²The Research Institute of Physical and Chemical Medicine of Medical and Biological Agency of Russian Federation, 1a Malaya Pirogovskaya str., Moscow, Russian Federation, 119435.

Conflicts of Interest and Source of Funding: none declared.

Abstract

PURPOSE: Intraocular pressure (IOP) lowering generally slows the progression of glaucoma, but does not necessarily stop the continuing vision loss. Growing evidence supports the idea that retinal ganglion cells in glaucomatous eyes are under oxidative stress that is associated with pathogenic mechanisms leading to glaucomatous neurodegeneration. Antioxidant protection plays a key role in the conditions of oxidative stress. Therefore, the antioxidative therapy might be of help in preventing glaucomatous neuron degeneration.

Prostaglandin (PG) analogues are currently the treatment of choice for glaucoma, because maximum intraocular pressure reduction is derived by once daily application without any systemic side effect in all types of glaucoma. PG analogues, as well as other ocular hypotensive drugs, have been expected to have an additional effect to protect neurons independently of IOP reduction. Purpose of this study was to compare the antioxidant activity (AOA) of the most widely used prostaglandin analogues.

METHODS: The model of oxidation-induced haemolysis was used to study AOA of Latanoprost 0.005% ("Pfizer"), Travoprost 0.004% ("Alcon"), and Bimatoprost ophthalmic solution 0.03% ("Allergan"). Compounds with antioxidant activity inhibit hemolysis caused by free radicals. The degree of hemolysis was determined by the change in hemoglobin concentration in the incubation medium.

RESULTS: Travoprost was found to have the highest AOA (17%). However it decreased upon adding larger quantities of the drug into the model system. In contrast to this, bimatoprost showed an increase in AOA when investigated in larger quantities. Its AOA peaked at 38% in 120 mcl of bimatoprost. AOA in latanoprost was the lowest. Upon reaching 120 mcl, latanoprost exhibited oxidative properties.

CONCLUSION: Antioxidant activity in PG analogues differs which must be taken into consideration when choosing them as the agents with IOP independent neuroprotective properties.

KEY WORDS: oxidative stress, glaucoma, prostaglandin analogues.

Ключевым звеном патогенеза глаукомной оптической нейропатии (ГОН) является окислительный стресс. Самые ранние патологические процессы развиваются в митохондриях аксонов и в клетках трабекулярного эндотелия. Механизмы ГОН заключаются в структурном повреждении свободными радикалами кислорода ДНК митохондрий, проникновении ионов кальция внутрь ганглиозных клеток (ГКС), активации энзимов и апоптозе ГКС [1-4]. Инициатором указанных событий является повышение уровня таких свободных радикалов кислорода (reactive oxygen species, или ROS), как супероксид анион (O_2^-), гидроксильный радикал ($OH^\cdot$) и некоторые другие [5]. Конечные гликозилированные продукты (AGEs) — маркеры окислительного стресса, характерные для нейродегенеративной патологии, — недавно были

обнаружены у больных глаукомой [6]. Таким образом, снижение уровня образования свободных радикалов в тканях глаза следует отнести к приоритетному направлению лечения ГОН. Препаратами первого выбора в лечении глаукомы в настоящее время являются аналоги простагландинов. Однако антиоксидантная активность препаратов этой группы в сравнительном аспекте ранее не изучалась.

Цель настоящей работы — сравнительное изучение антиоксидантной активности аналогов простагландинов для местного лечения глаукомы.

Материалы и методы

Антиоксидантную активность (АОА) определяли методом, основанным на индуцированном гемолизе эритроцитов, который вызывали путем

добавления растворов трет-бутила (ТБ) и клотримазола к суспензии отмытых от плазмы крови эритроцитов. Соединения, обладающие антиокислительной активностью (АО), ингибируют гемолиз, вызванный свободными радикалами, а именно — радикалами ТБ. Клотримазол (КТ) обладает способностью усиливать интенсивность гемолиза. По степени ингибирования свободнорадикального гемолиза можно судить об АО активности исследуемого соединения. Степень гемолиза определяли по изменению концентрации гемоглобина в среде инкубации.

Методика исследования заключалась в следующем. Забор крови производили из локтевой вены с 3,8% раствором цитрата натрия в качестве антикоагулянта. Соотношение крови и цитрата натрия 9:1. Для получения суспензии эритроцитов кровь центрифугировали 10 мин. при 1500 об/мин. Плазму удаляли, а эритроциты отмывали центрифугированием в физиологическом растворе (2 раза по 10 мин. при 1500 об/мин.). К осадку отмытых эритроцитов добавляли физиологический раствор (ф.р.) в объеме, равном объему эритроцитов.

Для приготовления рабочих растворов к 2,9 мл ф.р. добавляли 0,1 мл 1% раствора КТ, а к 0,1 мл 70% раствора трет-бутила (ТБ) — 7,67 мл ф.р. Использовали 1% раствор клотримазола для наружного применения (“Glenmark”, Tert-Butyl hydroperoxide solution Aldrich). Для регистрации кинетики свободнорадикального гемолиза к 1,8 мл ф.р. добавляли 0,2 мл суспензии эритроцитов, а также 20 мкл рабочего раствора КТ и 40 мкл рабочего раствора ТБ. Полученную суспензию инкубировали 3 часа при 37°C.

После инкубации пробирки с раствором центрифугировали 15 мин. при 2500 об/мин. К 1 мл надосадочной жидкости добавляли 2 мл стандартного трансформирующего раствора для определения гемоглобина (раствор Драпкина). Через 30 мин. определяли оптическую плотность данного раствора при длине волны 540 нм.

Для определения АОА препаратов применяли метод, описанный выше, т.е. 1,8 мл ф.р. + 0,2 мл суспензии эритроцитов + 20 мкл КТ + 40 мкл ТБ. При этом от 1,8 мл ф.р. отбирали разные объемы ф.р. (в настоящем исследовании — 30, 60, 90 и 120 мкл). Данные объемы замещали соответствующими объемами дистиллированной воды. Таким образом, общий объем ф.р. оставался равным 1,8 мл — контрольные пробы. При определении АО активности дистиллированную воду заменяли исследуемым препаратом и получали опытные пробы. Далее реакцию проводили, как описано выше. В результате получали значения оптической плотности для контрольных проб (Ек) и опытных проб (Еоп). Ек принимали как значение оптической плотности, соответствующее 100% гемолизу. В случае добавления исследуемого препарата (Еоп) процент гемолиза определялся по формуле $E_k/E_{op} \times 100\%$.

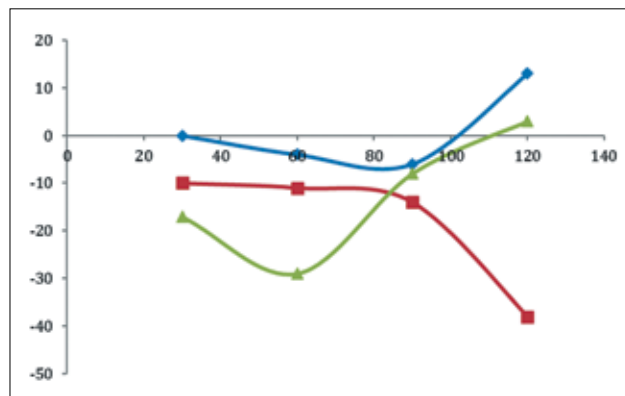


Рис. 1. Сравнительная характеристика антиоксидантной активности аналогов простагландинов для местного гипотензивного лечения глаукомы.

Примечание: по оси абсцисс — объем добавляемого в модельную систему препарата (мкл), по оси ординат — процент ингибирования гемолиза при добавлении препарата в модельную систему эритроциты-раствор трет-бутила и клотримазола.

Если процент гемолиза превышал 100%, происходила его (гемолиза) активация. Снижение гемолиза ниже 100% свидетельствовало о его ингибировании. Поскольку данный вид гемолиза вызывается свободными радикалами трет-бутила, делали вывод о том, что исследуемое соединение обладает как антирадикальной, так и антиоксидантной активностью.

В работе исследовалась антиоксидантная активность следующих аналогов простагландинов: латанопроста (latanoprost 0,005%, “Pfizer”), травопроста (travoprost 0,004%, “Alcon”) и биматопроста (bimatoprost ophthalmic solution 0,03%, “Allergan”). Молярная концентрация указанных препаратов выражалась в мкМ и вычислялась, исходя из их молекулярных масс: 420,6 (latanoprost), 500 (travoprost) и 415,58 (bimatoprost ophthalmic solution).

Результаты

Наиболее высокая антиоксидантная активность получена у травопроста. Примечательно, что в дозе 30 мкл другие исследуемые аналоги простагландинов (латанопрост и биматопрост) вообще не проявили антиоксидантной активности. Она появлялась лишь по мере увеличения добавляемого объема биматопроста, достигая максимума при объеме препарата 120 мкл. Латанопрост проявил низкую антиоксидантную активность в объемах 60 и 90 мкл, а добавление в модельную систему 120 мкл латанопроста вызывало существенное усиление гемолиза: при увеличении дозы добавляемого препарата в 2 раза гемолиз усиливался более чем в 3 раза (рис. 1). Напротив, двукратное увеличение объема биматопроста, добавляемого в модельную систему, снижало гемолиз более чем в три раза.

Синим цветом изображена кривая, обозначающая антиоксидантную активность латанопроста, красным — биматопроста, зеленым — травопроста. Заметно, что при минимальном из исследуемых объемов препаратов наиболее высокая АОА отмечена у травопроста, при максимальном объеме — у биматопроста. В объеме выше 100 мкл для латанопроста и выше 110 мкл для травопроста указанные препараты приводили к усилению гемолиза эритроцитов.

Обсуждение

Аналоги простагландинов являются наиболее эффективными лекарственными средствами, снижающими офтальмотонус у больных глаукомой. Возможность их применения один раз в сутки относится к дополнительным важным преимуществам указанной группы препаратов по сравнению с другими. Наиболее широко назначаемые аналоги простагландинов — латанопрост, травопрост и биматопрост — неоднократно сравнивались между собой по их гипотензивному действию. Было замечено, что травопрост и биматопрост имеют преимущества перед латанопростом по их способности контролировать ВГД в вечерние часы [7]. Кроме того, травопрост и биматопрост по сравнению с латанопростом обеспечивают более низкий уровень флуктуаций офтальмотонуса, что имеет важное значение при глаукоме [8, 9]. Многоцентровые исследования продемонстрировали наиболее высокую гипотензивную активность у биматопроста по сравнению с другими простагландинами [7]. В настоящем исследовании мы впервые сравнили указанные препараты по их антиоксидантной активности. Результаты показали, что наиболее высокая АОА при минимальной из исследуемых доз препаратов характерна для травопроста. Эта активность повышалась и достигала наиболее высоких значений в дозе 60 мкл травопроста, а далее по мере увеличения добавляемого объема препарата его АОА снижалась. Иная картина наблюдалась относительно латанопроста. Этот аналог простагландинов проявил минимальную антиоксидантную активность, причем при тестируемом объеме 120 мкл препарат вел себя как прооксидант, усиливая гемолиз эритроцитов. Из всех тестируемых аналогов простагландинов только биматопрост проявил прямой дозозависимый характер антиоксидантной активности: АОА препарата повышалась по мере увеличения его исследуемого объема.

Полученные результаты подчеркивают важные дополнительные (наряду с гипотензивной активностью) свойства препаратов. Известно, что способность лекарства, закапываемого в глаз, обладать протекторным действием в отношении нейронов сетчатки и их аксонов является не менее важным свойством, чем гипотензивный эффект. Особенно

актуально прямое нейропротекторное действие, направленное на защиту и сохранение нейронов сетчатки.

Попытки исследования нейропротекторных свойств аналогов простагландинов неоднократно предпринимались разными авторами. Было установлено, например, что данные препараты стимулируют выработку эндогенных простагландинов, которые в свою очередь защищают нейроны от эксайтотоксического поражения. Ингибирование каспазы-3, индуцирующей апоптоз, аналогами простагландинов, особенно в условиях ишемии, можно также отнести к их нейропротекторному действию [10].

Экспериментальные исследования по определению количества выживших в условиях действия глутамата ганглиозных клеток сетчатки показали, что латанопрост защищает нейроны от проникновения в них ионов кальция и усиливает митоген-активированный сигнальный путь, что также указывает на прямое нейропротекторное влияние данного препарата [11]. Недавние исследования N. Osborne показали антиоксидантное действие латанопроста: было установлено, что препарат способствует выработке эндогенного антиоксиданта глутатиона [12].

Иммуногистохимическими исследованиями была установлена высокая концентрация FP-рецепторов в сетчатке, включая ганглиозные клетки [10]. С этой точки зрения было высказано предположение о возможном нейропротекторном действии аналогов простагландинов путем стимуляции FP-рецепторов в ганглиозных клетках сетчатки. Тем не менее точный механизм нейропротекторного действия аналогов простагландинов остается непонятным [13].

Активизация сигнального пути, регулирующего рост аксонов (PI3K-Akt-mTOR) под действием аналогов простагландинов, полученная в эксперименте J. Zheng, указывает на новые, ранее не известные свойства данных препаратов [14].

Исследования, выполненные R. Yamagishi et al. в 2011 г., убедительно показали прямое нейропротекторное действие всех современных аналогов простагландинов (тафлупроста, латанопроста, травопроста, биматопроста и унопростона) [15]. Способность указанных препаратов снижать апоптоз ГКС была продемонстрирована в двух экспериментальных моделях с применением новой технологии прижизненной оценки апоптоза нейронов сетчатки, позволяющей наиболее точно регистрировать апоптоз ганглиозных клеток сетчатки: в одной модельной системе воспроизводился эксайтотоксический феномен с участием глутамата, в другой — гипоксия. Все исследуемые аналоги простагландинов повышали выживаемость ганглиозных клеток, причем в концентрациях, которые, по мнению авторов, создаются в стекловидном теле при местном

употреблении данных препаратов в клинике. Важно подчеркнуть, что полученное действие аналогов простагландинов не было связано с их гипотензивной активностью. В данной работе авторы также не смогли дать объяснения нейропротекторному действию изучаемых препаратов. Было высказано предположение, что стимуляция простагландиновых и особенно простаноидных рецепторов может нести нейропротекторный эффект, но в разной степени у разных рецепторов, а действие аналогов простагландинов на указанные рецепторы может быть перекрестным [16]. Кроме того, циклооксигеназа 2, концентрация которой нарастает при стимуляции простагландиновых рецепторов, обладает выраженной нейропротекторной активностью [17].

Способность аналогов простагландинов к защите нейронов сетчатки от ишемии и окислительного стресса может быть связана также с их влиянием на глазную гемодинамику. Так, было замечено, что травопрост и биматопрост повышают скорость кровотока в глазной артерии [18], а снижение индекса резистентности в ней под действием антиглаукомных препаратов коррелирует с периметрическими индексами, обеспечивая сохранение зрительных функций при глаукоме [19]. Однако, по данным разных авторов, только травопрост способен усиливать кровотоки в центральной артерии сетчатки и задних коротких цилиарных артериях, главным образом за счет снижения индекса резистентности [18]. Преимущества травопроста перед другими аналогами простагландинов с точки зрения влияния на глазную гемодинамику были выявлены также в работе О. Koz et al. [20]. Исследуя все три аналога простагландинов (латанопрост, травопрост и биматопрост) в течение 6 мес., авторы отметили, что только травопрост снижал индекс резистентности в центральной артерии сетчатки, в то время как биматопрост вообще не влиял на глазную гемодинамику, а действие латанопроста на ретробульбарный кровоток ограничивалось лишь глазной артерией.

Данные литературы о влиянии латанопроста на глазную гемодинамику носят противоречивый характер. Так, А. Martinez, С. Akarsu и О. Zeitz не обнаружили какого-либо действия латанопроста на кровоток в ретробульбарных сосудах [19, 21, 22], в то время как I. Inan продемонстрировал способность данного аналога простагландина снижать индекс резистентности в глазной артерии после трехмесячного применения латанопроста [23].

В целом вопрос о влиянии аналогов простагландинов на глазную гемодинамику остается нерешенным. В литературе высказывается предположение о возможности их прямого влияния на сосудистую стенку, а также — путем опосредованного действия за счет усиления выработки эндогенных аналогов простагландинов. Наконец, вазодилатирующее действие указанных препаратов может быть вызвано усилением продукции оксида азота [24, 25].

В ходе настоящего исследования впервые аналогии простагландинов сравнивались с позиций их антиоксидантной активности, которая относится к нейропротекторным свойствам препаратов. Известно, что одним из пусковых звеньев глаукомного поражения является митохондриопатия в клетках трабекулярного эндотелия [26, 27]. Митохондрии — это основной клеточный элемент в поддержании жизнеспособности клетки, который обеспечивает ее энергией через окислительное фосфорилирование, а также регулирует такие ключевые моменты, как апоптоз, синтез свободных радикалов, кальциевый гомеостаз и рост клеток. ДНК митохондрий наименее защищена от окислительного стресса, а потому митохондрии наиболее подвержены действию свободных радикалов. С возрастом эти процессы нарушаются, ДНК митохондрий подвергается мутациям, а сами митохондрии становятся источником свободных радикалов кислорода. Происходит снижение фосфорилирования, уменьшается масса митохондрий и наступает энергетический дефицит. Благодаря тому, что ганглиозные клетки — наиболее энергетически затратные структуры сетчатки, именно эти нейроны становятся особенно незащищенными в патологических условиях. В аксонах, не покрытых миелином, содержится особенно большое количество митохондрий. Именно они наиболее подвержены мутациям. Роль митохондриальной дисфункции в развитии ГОН в результате их мутаций была показана в ряде работ [27-29].

Патологическое действие мутированных митохондрий сказывается через активацию процессов свободнорадикального окисления. Активные формы кислорода, или ROS, непосредственно атакуют ганглиозные клетки, или активируют глию. Возможно также их действие через эксайтотоксический процесс. Митохондриопатия не только «убивает» ганглиозные клетки благодаря повышению количества ROS, но и вследствие уменьшения энергетических запасов самих нейронов. Последние становятся более восприимчивыми к повреждающим факторам. При этом внутри самих митохондрий повышается концентрация ионов Ca^{2+} , происходит деполяризация мембран митохондрий, они также становятся источником ROS. Следствием является повышенный синтез проапоптотических белков, таких как цитохром С и активатор каспазы 3.

Не так давно было установлено, что при ПОУГ имеющаяся дисфункция митохондрий обусловлена генетическими предпосылками, причем это относится как к митохондриям клеток трабекулярного эндотелия, так и аксонов зрительного нерва [30].

Генерация свободных радикалов кислорода в глазу вызывает каскад реакций, называемых окислительным стрессом. Можно утверждать, что ни один из механизмов глаукомного поражения, будь то ремоделирование коллагена склеры, активация

глии, матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов, глутамат-кальциевого каскада и самих ферментов, запускающих апоптоз нейронов (каспаз), не развивается без участия окислительного стресса. Снижение мембранного потенциала митохондрий и повышение проницаемости их мембран считают главной причиной апоптоза ганглиозных клеток сетчатки при глаукоме [29, 30].

С этих позиций развитие глаукомной оптико-нейропатии имеет много общего с патогенезом других нейродегенеративных заболеваний, например таких, как болезнь Альцгеймера. Из-за высокой скорости метаболизма и сниженной способности к клеточной регенерации по сравнению с другими органами мозг и сетчатка глаза особо чувствительны к повреждающим эффектам ROS. В случаях болезни Альцгеймера и Паркинсона сообщалось о разных уровнях повреждений в отдельных областях мозга, подвергшихся нейродегенерации. Интерес представляет тот факт, что некоторые из этих окислительных событий имеют специфические мишени и приводят к развитию соответствующей нейродегенеративной патологии. К примеру, нитрация остатков тирозина в α -synuclein белке аккумулируется в тельцах Леви при болезни Паркинсона и в tau-белке при болезни Альцгеймера. Таким образом, окислительный стресс постоянно сопутствует этим заболеваниям [31].

В клетках имеются защитные и репарационные механизмы для борьбы с окислительным стрессом и окислительными повреждениями. Вероятно, при этих патологиях активность антиоксидантных защитных молекул, в норме противодействующих вредным эффектам ROS, снижена. Например, антиоксидантные ферменты супероксиддисмутаза (SOD), каталаза, глутатионпероксидаза (GSHPx) и глутатионредутаза (GSHRd) имеют сниженную активность в пораженных областях мозга при болезни Альцгеймера и в сетчатке глаза при глаукоме. Значительные окислительные изменения таких белков, как β -амилоид, при болезни Альцгеймера и глаукоме могут вести к увеличению мисфолдинга (misfold) белков и их деградации. Это в свою очередь может вызвать накопление токсических агрегатов в мозге и в сетчатке, что способствует нейродегенерации. Тот факт, что глаукомная оптико-нейропатия отождествляется с «глазной формой болезни Альцгеймера», давно обсуждается в литературе, и в основе этой связи лежит окислительный стресс [32]. С возрастом происходит усиление окислительного стресса в нервной ткани, в результате которого могут повреждаться нейроны, поскольку они находятся в постмитотическом состоянии. Способность клеток реагировать на окислительные белковые повреждения также снижается с возрастом, что способствует увеличению количества окислительно поврежденных белков.

Считают, что пусковым звеном к избыточному образованию ROS при глаукоме является также реперфузия в результате сосудистой дисрегуляции [33].

В итоге снижается образование АТФ, усиливается митохондриальная дисфункция и активация каспаз, приводящая к апоптозу ганглиозных клеток сетчатки [34]. Следствием являются перекисное окисление липидов (ПОЛ) и белков, а также активация мюллеровых клеток, которые сами в свою очередь запускают процесс образования ROS [5]. Усиление процессов ПОЛ трабекулярной ткани при глаукоме впервые было показано А.Я. Буниным в 1984 г. [35]. Позднее мы обнаружили снижение антиоксидантной защиты водянистой влаги при глаукоме [36].

Полагают, что источником ROS в сетчатке являются также полиморфонуклеарные лейкоциты. Приток этих клеток происходит в ранние стадии реперфузии. Их блокада может защитить сетчатку от последствий ишемии [37]. Однако более эффективным способом нейтрализации последствий окислительного стресса считается применение антиоксидантов.

С этих позиций становится очевидным, что антиоксидантная терапия глаукомы должна рассматриваться как одно из приоритетных направлений, а антиоксидантное действие местных гипотензивных препаратов может быть отнесено к одному из наиболее важных их терапевтических эффектов.

Тем не менее это действие антиглаукомных препаратов практически не изучено. В литературе встречаются единичные работы, посвященные указанной проблеме. Недавние исследования показали, что дорзоламид и тимолол способны защитить ДНК митохондрий клеток трабекулярного эндотелия от окислительного стресса [38], а при комбинации названных препаратов отмечалось усиление антиоксидантного эффекта, что предохраняло трабекулу от повреждающего действия перекиси водорода. Следует подчеркнуть, что выраженные антиоксидантные свойства дорзоламида были отмечены особенно в отношении неповрежденных митохондрий трабекулярного эндотелия, когда трабекулярная ткань по крайней мере частично функционировала. Это обосновывает раннее назначение указанного препарата, который может быть наиболее эффективен в начальной стадии глаукомы. Клинические наблюдения V. Zanon-Moreno et al. о высокой антиоксидантной активности дорзоламида подтверждают данный вывод [39].

Еще одна найденная нами работа по исследованию антиоксидантных свойств антиглаукомного препарата посвящена бримонидину. G. Ozdemir в эксперименте на животных показал, что бримонидин при его местном применении снижает уровень малонового диальдегида в сетчатке и повышает уровень глутатиона и каталазы — основных

эндогенных антиоксидантов. Этот эффект бримонидина авторы объяснили стимуляцией α_2 -адренорецепторов [40].

Ранее мы неоднократно предпринимали попытки исследовать антирадикальные и антиоксидантные свойства антиглаукомных препаратов. Так, впервые антирадикальная активность тимолола была продемонстрирована нами более десяти лет назад в одном из наших первых исследований, посвященных этой проблеме [41]. Десять лет спустя к аналогичному выводу пришли другие авторы [42].

Позднее мы получили данные о высокой антирадикальной и антиоксидантной активности ингибиторов карбоангидразы [43]. Следует отметить, что антиоксидантная активность препаратов дает более полное представление о нейропротекторных свойствах изучаемых лекарств, поскольку предполагает использование модельных систем с живыми клетками и дает максимально приближенную к *in vivo* информацию. Применение в настоящем исследовании модельной системы с эритроцитами, гемолиз которых был вызван окислительным стрессом, позволил нам с определенной вероятностью судить об антиоксидантной активности тестируемых аналогов простагландинов.

Важно отметить, что только один из исследуемых препаратов этой группы, а именно биматопрост, продемонстрировал дозозависимый антиоксидантный эффект. Двукратное увеличение объема биматопроста, добавляемого в модельную систему, снижало гемолиз эритроцитов более чем в три раза. Примечательно, что недавние исследования, проведенные N. Takano et al. *in vitro* (на модели окислительного стресса при участии глутамата), а также *in vivo* (при введении в стекловидное тело лабораторных животных N-methyl-D-aspartate) продемонстрировали прямое нейропротекторное действие биматопроста, которое проявилось в повышении выживаемости ганглиозных клеток сетчатки, причем это действие носило дозозависимый характер: чем большая концентрация биматопроста добавлялась в модельную систему, в которой воспроизводились реакции свободнорадикального окисления, тем больше наблюдалось сохранившихся ганглиозных клеток сетчатки [44]. Эти результаты, полученные на живых нейронах, совпадают с теми, что мы обнаружили в модельной системе *in vitro*, где окислительный стресс приводил к гемолизу эритроцитов, а биматопрост ингибировал этот гемолиз дозозависимым образом.

Биматопрост относится к агонистам простаминовых рецепторов, однако в тканях глаза (в роговице, радужке, склере и цилиарном теле) он довольно быстро гидролизует в аналог простагландина: 17-фенил-простагландин F2 α метаболит. По мнению исследователей, это способствует не только выраженному гипотензивному действию бимато-

проста, но также способности препарата усиливать регенерацию аксонов и дифференциацию ганглиозных клеток сетчатки [16].

Ограничением настоящей работы является то, что аналоги простагландинов были исследованы не в живом организме, а в модельной системе. Фармакокинетика лекарственных препаратов в глазу — весьма сложный процесс, и на него оказывают влияние различные факторы. Одни препараты наиболее абсорбируются тканями переднего отрезка глаза, в частности содержащими пигмент, другие аккумулируют в эритроцитах, связываясь с белками. Фармакокинетика антиглаукомных препаратов исследовалась на лабораторных животных. Например, было установлено, что латанопрост накапливается в максимальной концентрации во влаге передней камеры через 2-3 часа и попадает в кровяное русло, причем в плазме препарат определяется в течение не более одного часа, метаболизируясь в печени и выходясь через почки. Вместе с тем известно, что максимальный гипотензивный эффект от применения латанопроста наступает через 2 недели и удерживается в среднем в течение 6 мес. на фоне лечения [45]. Однако распределение латанопроста в тканях глаза человека в различные периоды лечения неизвестно. Это утверждение верно и в отношении других исследуемых препаратов.

Предполагают, что другой представитель этой группы — синтетический простагмид биматопрост — умеренно распределяется в тканях, но преимущественно находится в плазме крови. Связь биматопроста с белками плазмы крови составляет приблизительно 88%. Так или иначе все антиглаукомные препараты попадают в кровяное русло, но с разной скоростью и различными сроками выведения из организма, а некоторые определяются также в парном глазу, в который инстилляций не осуществлялись [46]. Не так давно было показано, что при закапывании в глаз препараты способны попадать даже в спинномозговую жидкость и головной мозг [47]. Эта заставляет задуматься о том, что аккумуляция активного вещества может происходить в разных тканях и в разной концентрации на протяжении лечения. В этой связи, учитывая тот факт, что полученные в настоящем исследовании результаты нельзя полностью экстраполировать на ситуацию в глазу, их тем не менее следует принимать во внимание.

Еще одним ограничением данной работы является то, что аналоги простагландинов исследовались в том виде, в каком они используются в клинической практике, т.е. в виде растворов, в состав которых наряду с активным веществом входит консервант — бензалкония хлорид (БХ). Его количество в 1 мл указанных растворов несколько отличалось между собой и колебалось от 0,005% (биматопрост) до 0,015% (травопрост) и 0,02% (латанопрост). Известно, что при таком содержании консерванта в каждом из исследуемых флаконов простагландинов

его суточная доза составляет 7,1 мг для латанопроста, 4,3 мг для травопроста и 1,4 мг для биматопроста [48]. Поскольку БХ является сильным оксидантом, то можно предположить, что он оказывает влияние на АОА исследованных простагландинов.

Таким образом, проведенное исследование продемонстрировало, что применяемые в настоящее время аналоги простагландинов обладают различной антиоксидантной активностью, и выявило преимущества травопроста и биматопроста перед латанопростом. Полученные данные позволяют иначе взглянуть на применяемые в качестве основных антиглаукомные препараты с позиций их прямого нейтропротекторного действия.

Литература/References

- Kumar D.M., Agarwal N. Oxidative stress in glaucoma: a burden of evidence. *J Glaucoma* 2007; 16(3):334–343.
- Sacca S.C., Pascotto A., Camicione P., Capris P., Izzotti A. Oxidative DNA damage in the human trabecular meshwork: clinical correlation in patients with primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2005; 123(4):458–463.
- Tezel G. Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences. *Prog Retin Eye Res* 2006; 25(5):490–513.
- Zanon-Moreno V., Marco-Ventura P., Lleo-Perez A., Pons-Vazquez S. Oxidative stress in primary open-angle glaucoma. *J Glaucoma* 2008; 17(3):263–268.
- Lieven C.J., Vrabec J.P., Levin L.A. The effects of oxidative stress on mitochondrial transmembrane potential in retinal ganglion cells. *Antioxid Redox Signal* 2003; 5(3):641–646.
- Tezel G., Luo C., Yang X. Accelerated aging in glaucoma: immunohistochemical assessment of advanced glycation end products in human retina and optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(3):1201–1211.
- Aptel F., Cucherat M., Denis P. Efficacy and tolerability of prostaglandin analogs: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Glaucoma* 2008; 17(7):667–673.
- Gandolfi S., Simmons S., Sturm R. Three-month comparison of bimatoprost and latanoprost in patients with glaucoma and ocular hypertension. *Adv Ther* 2001; 18(2):110–121.
- Konstas A., Hollo G., Irkek M., Melamed S. Diurnal IOP control with bimatoprost versus latanoprost in exfoliative glaucoma: a crossover, observer-masked, three-centre study. *Br J Ophthalmol* 2007; 91(6):757–760.
- McCullough L., et al. Neuroprotective function of the PGE2 EP2 receptor in cerebral ischemia. *J Neurosci* 2004; 24: 257–268.
- Odani N., Seike H., Kurashima H. Protective effect of latanoprost on glutamate-induced cytotoxicity. World Glaucoma Congress. Singapore. Abstract Book 2007; 184–185.
- Osborne N.N., Ji D., Abdul Majid A.S., Fawcett R.J., Sparatore A., Del Soldato P. ACS67, a hydrogen sulfide-releasing derivative of latanoprost acid, 106 attenuates retinal ischemia and oxidative stress to RGC-5 cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 51: 284–294.
- Drago F., Valzelli S., Emmi I., Marino A., Scalia C., Marino V. Latanoprost exerts neuroprotective activity in vitro and in vivo. *Exp Eye Res* 2001; 72(4):479–486.
- Zheng J., Feng X., Hou L., Cui Y., Zhu L., Ma J. Latanoprost promotes neurite outgrowth in differentiated RGC-5 cells via the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway. *Cell Mol Neurobiol* 2011; 31(4):597–604.
- Yamagishi R., Aihara M., Araie M. Neuroprotective effects of prostaglandin analogues on retinal ganglion cell death independent of intraocular pressure reduction. *Exp Eye Res* 2011; 93:265–270.
- Hutchinson A.J., Chou C.L., Israel D.D., Xu W., Regan J.W. Activation of EP2 prostanoid receptors in human glial cell lines stimulates the secretion of BDNF. *Neurochem Int* 2009; 54:439–446.
- Choi S.H., Aid S., Bosetti F. The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: implications for translational research. *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30:174–181.
- Inan Ü., Ermis S., Orman A., Onrat E., Yucel A. The comparative cardiovascular, pulmonary, ocular blood flow, and ocular hypotensive effects of topical travoprost, bimatoprost, brimonidine, and betaxolol. *J Ocular Pharmacol Ther* 2004; 20(4):293–310.
- Martinez A., Sanchez M. Predictive value of colour Doppler imaging in a prospective study of visual field progression in primary open-angle glaucoma. *Acta Ophthalmol Scand* 2005; 83:716–722.
- Koz O., Ozsoy A., Yarangumeli A., Kose S., Kural G. Comparison of the effects of travoprost, latanoprost and bimatoprost on ocular circulation: a 6-month clinical trial. *Acta Ophthalmol Scand* 2007; 85:838–843.
- Akarsu C., Bilgili Y.K., Taner P., Unal B., Ergin A. Short-term effect of latanoprost on ocular circulation in ocular hypertension. *Clin Exp Ophthalmol* 2004; 32:373–377.
- Zeitl O., Matthiessen E.T., Reuss J., Wiermann A., Wagenfeld L., Galambos P., Richard G., Klemm M. Effects of glaucoma drugs on ocular haemodynamics in normal tension glaucoma: a randomized trial comparing bimatoprost and latanoprost with dorzolamide. *BMC Ophthalmol* 2005; 5:6.
- Inan U.U., Ermis S.S., Yucel A., Ozturk F. The effects of latanoprost and brimonidine on blood flow velocity of the retrobulbar vessels: a 3-month clinical trial. *Acta Ophthalmol Scand* 2003; 81:155–160.
- Astin M., Stjernschantz J., Selen G. Role of nitric oxide in PGF2-a-induced ocular hyperaemia. *Exp Eye Res* 1994; 59:401–407.
- Ishii K., Tomidokoro A., Nagahara M., Tamaki Y., Kanno M., Fukaya Y. et al. Effects of topical latanoprost on optic nerve head circulation in rabbits, monkeys, and humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:2957–2963.
- Izzotti A., Sacca S.C., Longobardi M., Cartiglia C. Sensitivity of ocular anterior chamber tissues to oxidative damage and its relevance to the pathogenesis of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(11):5251–5258.
- Алексеев В.Н., Мартынова Е.Б. и др. Значение митохондриальной патологии в медицине и в офтальмологии (обзор). Российская глаукомная школа. Глаукома: теория и практика: Сб. научн. труд. СПб., 2011; 5–11. [Aleksseev V.N., Martynova E.B., et al. The value of mitochondrial abnormality in medicine and ophthalmology (review). Russian glaucoma school. Glaucoma: theory and practice: Sat. nauchn. work. SPb., 2011; 5–11. (In Russ.)].
- Mittag T.W., Danias J., Pohorenc G., Yuan H.M., Burakgazi E., Chalmers-Redman R. et al. Retinal damage after 3 to 4 months of elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:3451–3459.
- Tezel G., Yang X. Caspase-independent component of retinal ganglion cell death, in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:4049–4059.
- Abu-Amro K., Morales J., Bosley T. Mitochondrial abnormalities in patients with primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(10):2533–2541.

31. Giasson B.I., et al. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective -synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* 2000; 29:985–989.
32. McKinnon S.J., Glaucoma: ocular Alzheimer's disease? *Frontiers in Bioscience* 2003; 8(1):140–156.
33. Flammer J., Haefliger I.O., Orgul S., Resink T. Vascular dysregulation: a principal risk factor for glaucomatous damage? *J Glaucoma* 1999; 8:212–219.
34. Murphy M.P. Nitric oxide and cell death. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1411:401–414.
35. Бунин А.Я., Бабиджаев М.А., Супрун А.В. Об участии перекисного окисления липидов в деструкции дренажной системы глаз при открытоугольной глаукоме. *Вестн. офтальмол.* 1984; 2:13–16. [Bunin A.Ya., Babidzhaev M.A., Suprun A.V. On participation of lipid peroxidation in the destruction of the drainage system in eyes with open-angle glaucoma. *Vestn Oftalmol* 1984; 2:13–16. (In Russ.)].
36. Курышева Н.И., Винецкая М.И., Еричев В.П., Демчук М.Л. Роль свободно-радикальных реакций камерной влаги в развитии первичной открытоугольной глаукомы. *Вестн. офтальмол.* 1996; 4:3–5. [Kuryшева N.I., Vinetskaya M.I., Erichev V.P., Demchuk M.L. The role of intraocular fluid free-radical reactions in the development of primary open-angle glaucoma. *Vestn Oftalmol* 1996; 4:3–5. (In Russ.)].
37. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 1999; 79:1431–1568.
38. Izzotti A., Saccà S.C., Di Marco B., et al. Antioxidant activity of timolol on endothelial cells and its relevance for glaucoma course. *Eye (Lond)* 2008; 22(3):445–453.
39. Zanon-Moreno V., Garcia-Medina J.J., Gallego-Pinazo R., Vinuesa-Silva I. Antioxidant status modifications by topical administration of dorzolamide in primary open-angle glaucoma. *Eur J Ophthalmol* 2009; 19(4):565–571.
40. Ozdemir G., Ozdemir G., Tolun F., Gul M., Imrek S. Retinal oxidative stress induced by intraocular hypertension in rats may be ameliorated by brimonidine treatment and N-acetyl cysteine supplementation. *J Glaucoma* 2009; 18:662–665.
41. Курышева Н.И., Деева И.Б., Еричев В.П. Сравнительное изучение антирадикального действия некоторых антиглаукоматозных препаратов. *Вестник офтальмологии* 1998; 2:6–9. [Kuryшева N.I., Deeva I.B., Erichev V.P. Comparative study of antiradical activity of some antiglaucoma drugs. *Vestn Oftalmol* 1998; 2:6–9. (In Russ.)].
42. Miyamoto N., Izumi H., Miyamoto R., et al. Nipradilol and timolol induce Foxo3a and peroxiredoxin 2 expression and protect trabecular meshwork cells from oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(6):2777–2784.
43. Курышева Н.И., Азизова О.А., Пирязев А.П. Антирадикальная и антиоксидантная активность ингибиторов карбоангидразы для местного лечения глаукомы. *Российский офтальмологический журнал* 2011; 4(3):55–61. [Kuryшева N.I., Azizova O.A., Piryazev A.P. Antiradical and antioxidant activity of carbonic anhydrase inhibitors for treatment of glaucoma. *Russian Ophthalmological Journal* 2011; 4(3): 55–61. (In Russ.)].
44. Takano N., Tsuruma K., Ohno Y., Shimazawa M., Hara H. Bimatoprost protects retinal neuronal damage via Akt pathway. *European J Pharmacol* 2013; 702(1–3):56–61.
45. Watson P., Stjernschantz J. A six-month, randomized, double-masked study comparing latanoprost with timolol in open-angle glaucoma and ocular hypertension. *The Latanoprost Study Group Ophthalmology* 1996; 103(1):126–137.
46. Saary K., Ali-Melkkila T., Vuory M., Iisalo E. Absorption of ocular timolol: drug concentrations and beta-receptor binding activity in the aqueous humour of the treated and contralateral eye. *Acta Ophthalmol Copenh* 1993; 71(5):671–676.
47. Koevary S. Pharmacokinetics of topical ocular drug delivery: potential uses for the treatment of diseases of the posterior segment and beyond. *Curr Drug Metabolism* 2003; 4(3): 213–222.
48. Noecker R. The management of glaucoma and intraocular hypertension: current approaches and recent advances. *Ther Clin Risk Manag* 2006; 2(2):193–206.

Поступила 28.04.2014