

## Катехоламініндуковані морфофункціональні порушення і окисний стрес у сітківці ока щурів

С.О. Риков<sup>1</sup>, І.В. Шаргородська<sup>1</sup>, К.В. Розова<sup>2</sup>, Ю.П. Коркач<sup>2</sup>, Ю.В. Гошовська<sup>2</sup>, В.В. Санін<sup>3</sup>, А.І. Яковець<sup>3</sup>, В.А. Дуфинець<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика, Київ;

<sup>2</sup> Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАНУ, Київ;

<sup>3</sup> Київська міська клінічна офтальмологічна лікарня «Центр мікрохірургії ока»;

<sup>4</sup> Офтальмологічний центр «Vizis exclusive», Мукачеве; e-mail:ishargorodskamd@gmail.com

*Вивчали вплив адреналіну (40 діб; 0,1–0,15 мг/кг) на внутрішньоочний тиск (ВОТ), ультраструктуру і маркери окисного стресу в сітківці ока 10-місячних щурів лінії Вістар. Виявили, що значення ВОТ достовірно зростали на 21% з тривалим стійким ефектом навіть через 42 доби після припинення введення препарату. Дія адреналіну викликала деструктивні зміни нейронів сітківки та мітохондрій клітин усіх її шарів: збільшення середньої кількості структурно пошкоджених мітохондрій в 7,6 раза і збільшення їх середнього діаметра на 78,4%. Спостерігали набрякові явища в ультраструктурі сітківки ока, потовщення ендотелію і гістогематичного бар'єра, що утруднює доступ кисню і може бути передумовою виникнення тканинної гіпоксії, яка сприяє розвитку глаукоми. Крім того, збільшувалася продукція активних форм кисню і продуктів перекисного окиснення ліпідів у тканинах ока, що вказує на розвиток окисного стресу. Таким чином, виявлено морфологічні і біохімічні зміни в сітківці ока, що можуть пояснити підвищений ВОТ за тривалої дії адреналіну, корекція якого потребує застосування комплексу антигіпоксантів та антиоксидантів широкого спектра дії, мітохондрій- та ендотелійпротекторних препаратів, а також мембраностабілізаторів для усунення різноманітних проявів набряку клітин.*

*Ключові слова: сітківка; адреналін; внутрішньоочний тиск; окисний стрес; мітохондрії; глаукома.*

### ВСТУП

Багато життєвих ситуацій супроводжуються активацією симпатичної нервової системи та підвищенням вмісту катехоламінів у крові і різних тканинах організму, зокрема серцево-судинної системи. Довготривала стимуляція β-адренергічних рецепторів катехоламінами викликає розвиток серцево-судинних уражень, що включають порушення кровопостачання тканин і загибель клітин серця та мозку. Для вивчення механізмів уражень тканин з високим рівнем обміну речовин і пошуку шляхів попередження цих порушень уже довгий час використовується модель введенням тваринам великих доз катехоламінів. Зокрема, широкоживаною є модель інфаркту міокарда, яка передбачає введення 55–100 мг/

кг ізопротеренолу і є класичною для пошуку кардіопротективних засобів [1]. Показано, що хронічна стимуляція β-адренорецепторів супроводжується перевантаженням клітин кальцієм, розвитком окисного стресу та пригніченням антиоксидантної системи, активацією міокардіального запалення зі збільшенням експресії прозапальних цитокінів, а також апоптотичною і некротичною загибеллю клітин міокарда [2]. Однак як при природній, так і при експериментальній гіперкатехолемії її небезпечний вплив на життєздатність клітин не обмежується тканинами серця. Так, підтвердженням негативного впливу введення великих доз катехоламінів на орган зору є довготривале підвищення внутрішньоочного тиску (ВОТ), яке спостерігається при глаукомі [3]. В цій ситуації в тканинах ока

© С.О. Риков, І.В. Шаргородська, К.В. Розова, Ю.П. Коркач, Ю.В. Гошовська, В.В. Санін, А.І. Яковець, В.А. Дуфинець

основною мішенню пошкоджуючої дії стає сітківка, ураження якої саме і призводить до втрати зору [4]. Водночас механізми змін при таких впливах залишаються не до кінця з'ясованими.

Метою нашої роботи було оцінити вплив великих доз катехоламінів, зокрема адреналіну, на ВОТ, морфологію і показники окисного метаболізму у тканинах сітківки ока щурів.

## МЕТОДИКА

Дослідження проводили на самцях щурів лінії Вістар масою 330–350 г, віком 10 міс, яких утримували на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України з вільним доступом до води. Тварин рандомно розділили на дві групи: контрольну і дослідну. Для моделювання гіперкатехолемії тваринам дослідної групи здійснювали внутрішньоочеревинне введення препарату адреналіну (діюча речовина епінефрину гідротартрат, «Дарниця», Україна) протягом 40 днів один раз у два дні [3]: перших 5 ін'єкцій з розрахунку 0,1 мг/кг, поступово збільшуючи дозу до 0,15 мг/кг. У правому і лівому очах вимірювали ВОТ на різних етапах спостереження за допомогою апланаційного тонометра Топо Vet. ВОТ реєстрували у вихідному стані, через 40 діб після початку введення адреналіну, а також через 42 доби після відміни препарату. Далі здійснювали забір тканин ока для дослідження ультраструктури або для біохімічних показників.

У морфологічних і морфометричних дослідженнях використовували сітківку ока контрольних і дослідних тварин. Препарати для електронномікроскопічних досліджень виготовляли за загальноприйнятою методикою [5]. Фіксували біологічний матеріал миттєво, вносячи зразки в забуферений (рН 7,4) 2,5%-й розчин глютарового альдегіду; дофіксацію здійснювали за допомогою реактиву Колфілда (на основі 2% OsO<sub>4</sub>; рН 7,4; «Sigma», США); матеріал зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації, абсолют-

ному спирті та ацетоні з заливкою в епон («Fluka», Швейцарія). Ультратонкі зрізи товщиною 40–60 нм контрастували 1%-ми розчинами ураніацетату та цитрату свинцю відповідно до методики Рейнольдса [6]. Препарати досліджували за допомогою електронного мікроскопа «ПЕМ-125К» (Україна).

Такі морфометричні характеристики мітохондрій, як середня загальна кількість, середня кількість структурно змінених та середній діаметр визначали за допомогою комп'ютерної програми ImageTool (США) у 130–150 полях зору для кожної серії досліджень.

На електронних мікрофотографіях проводили також морфометричну оцінку середньої арифметичної товщини гістогематичного бар'єра (ГГБ) сітківки та його окремих шарів, за якою досліджують масу тканини, що знаходиться між одиницями площі зовнішньої і внутрішньої поверхонь біологічних тканинних бар'єрів, за принципом випадкового відбору зразків (по 80 при кожному впливі) [7].

Для біохімічних досліджень зразки тканин ока подрібнювали та негайно заморожували у рідкому азоті. Інтенсивність окисативного метаболізму вивчали за зміною швидкості генерації нестабільних вільних радикалів кисню – супероксидного аніон-радикала ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), гідроксильного радикала ( $\cdot\text{OH}$ ) і кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) – малонового діальдегіду (МДА), дієнових кон'югатів (ДК), а також ейкозаноїда лейкотрієну C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>).

Швидкість генерації  $\cdot\text{O}_2^-$  в гомогенатах тканин визначали за окисненням цитохрому c у тріс-НСІ-буфері (10 ммоль/л; рН 7,4), фіксуючи зміни екстинції ( $\lambda = 550$  нм) після інкубації проби при 37°C, протягом 30 хв. Вміст супероксиду, генерованого пробами під час інкубації, визначали за коефіцієнтом молярної екстинції  $\lambda = 21000$  моль<sup>-1</sup> · см<sup>-1</sup> [8]. Для визначення швидкості генерації гідроксильного радикала готували інкубаційну суміш у складі (ммоль/л): дезоксирибоза – 20; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – 1; натрій-фосфатний буфер – 20; рН 7,4.

Пробу інкубували при 37°C протягом 60 хв, додавали 0,5 мл 1%-го розчину тіобарбітурової кислоти (ТБК) у розчині NaOH (50 ммоль/л) і 0,5 мл 2,8%-го розчину трихлороцтової кислоти (ТХК). Отриману суміш витримували на водяній бані 20 хв, охолоджували та реєстрували величину екстинції при  $\lambda = 532$  нм. Вміст  $\cdot$ ОН-радикала, що генерувався при цьому, виражали в умовних одиницях  $\Delta E \cdot 102$  за 60 хв на 1 мг білка проби [9]. Вміст МДА визначали так: до аліквот проб додавали 0,5 мл 1%-го розчину ТБК у 50 ммоль/л NaOH і 0,5 мл 2,8%-го розчину ТХК. Отриману суміш витримували 20 хв на водяній бані. В цей час формувався триметиновий комплекс як похідне червоного забарвлення, охолоджували і вимірювали екстинцію при  $\lambda = 532$  нм. Вміст МДА розраховували з використанням коефіцієнта молярної екстинції  $15600 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [10]. Вміст LTC<sub>4</sub> визначали в спиртових екстрактах із заморожених у рідкому азоті та розтертих у порошок пробах за допомогою радіоімунного методу, користуючись стандартними добірками реактивів «Amersham» (Велика Британія). Радіоактивність проб вимірювали на лічильнику фірми «Bachman» (Німеччина). Методика визначення вмісту ДК включала екстракцію ліпідів із зразків за допомогою органічних розчинників (гептан/ізопропанол 1:1) і вимірювання екстинції при  $\lambda = 232$  нм [11]. Для перерахунку використовували коефіцієнт молярної екстинції  $21000 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ . Вміст загального білка в пробах визначали за методом Лоурі [12].

Експериментальні результати перевіряли на нормальність розподілу за допомогою критерію Шапіро–Уїлка. Наводити їх у вигляді  $M \pm m$ , вірогідність відмінностей між показниками дослідної і контрольної груп оцінювали за критерієм  $t$  Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У інтактних тварин 10-місячного віку значення ВОТ становили  $8,54 \pm 0,28$  і  $8,36 \pm 0,38$  мм рт. ст. у правому і лівому оці відповідно. Вве-

дення щурам препарату адреналіну протягом 40 діб супроводжувалося його збільшенням ( $10,1 \pm 0,69$  і  $10,3 \pm 0,61$  мм рт. ст. у правому і лівому оці відповідно;  $P < 0,03$  порівняно з фоновим для обох значень). Варто зазначити, що підвищений ВОТ у дослідній групі спостерігався і через 42 дні після останнього введення адреналіну і становив  $11,2 \pm 0,9$  і  $9,7 \pm 0,36$  мм рт. ст. у правому і лівому оці відповідно, що було вище порівняно з фоновим ( $P < 0,04$  для обох значень). Таким чином, наші результати вказують на зростання ВОТ при дії адреналіну в обох очах в середньому на 21%, з тривалим стійким ефектом навіть після припинення його введення, що збігається з даними отриманими раніше [3, 4].

У морфологічному та морфометричному дослідженні ми зосереджували увагу на тканинних, клітинних особливостях та відмінностях ультраструктури окремих органел при підвищенні ВОТ, викликаного дією адреналіну. Головна відмінність ультраструктурної організації сітківки ока у тварин дослідної групи полягала у різноманітних і виражених проявах тотального та локального набряку структур, що входять до її складу. Така особливість частково пояснюється саме підвищенням загального ВОТ, оскільки для розвитку гідростатичних набряків головну роль відіграє підвищення тиску в капілярах (наразі – у капілярах сітківки). Проте не можна також нехтувати такими механізмами, як зниження колоїдно-осмотичного (онкотичного) тиску плазми крові з виходом рідини з судинного русла в тканини та мембраногенного механізму, зумовленого підвищенням проникності цитоплазматичних мембран та мембран окремих органел, наприклад внаслідок розвитку тканинної гіпоксії [13]. Останній механізм у досліджуваному випадку може відігравати досить суттєву роль.

Виявлено, що в сітківці відбуваються деструктивні зміни нейронів з утворенням великих вакуолей та розривів, тотальним просочуванням тканини плазмою крові (рис. 1).

Через це матрикс був представлений у



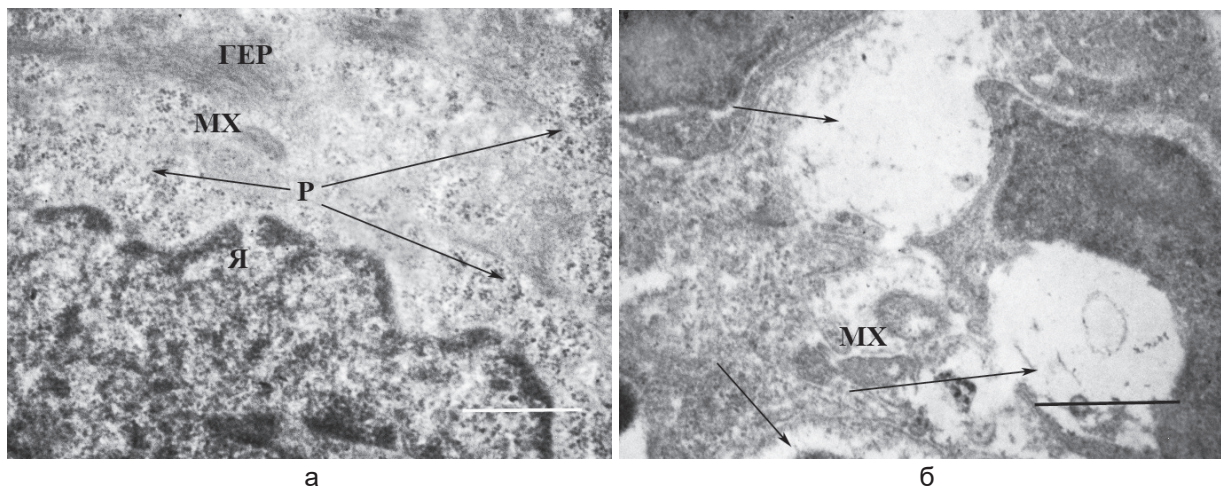


Рис. 1. Ультраструктура сітківки ока у контрольних (а) і дослідних (б) тварин після тривалого введення адреналіну. ГЕР – гладкий ендоплазматичний ретикулум, МХ – мітохондрії, Р – рибосоми, Я – ядро нейрона. На рис. 1, б стрілками позначені вакуолі та розриви цитоплазми. Масштаб 1 мкм

вигляді слабкої електроннощільної аморфної погано структурованої речовини з вираженими проявами деструкції. Мітохондрії також зазнавали деструктивних змін, були частково або повністю вакуолізованими (рис. 2, а). У мітохондріальному апараті подекуди зберігалися динамічні процеси з їх поділом та так званім «брунькуванням». Паралельно спостерігали компенсаторне перенапруження органел, свідченням чого було утворення мітохондрій з везикулярними кристами (див. рис. 2, б), котрі є показником високої

їх активності в плані синтезу АТФ у режимі перенавантаження [14].

Для підтвердження отриманих результатів щодо змін, які відбуваються в мітохондріальному апараті клітин сітківки, було проведено морфометричне його вивчення (табл. 1). Середня загальна (у різних шарах сітківки) кількість мітохондрій достовірно не змінювалася. Однак різко збільшувалася середня кількість структурно пошкоджених органел (в 7,6 раза). За таких умов нормальний енергетичний метаболізм у сітківці не може бути

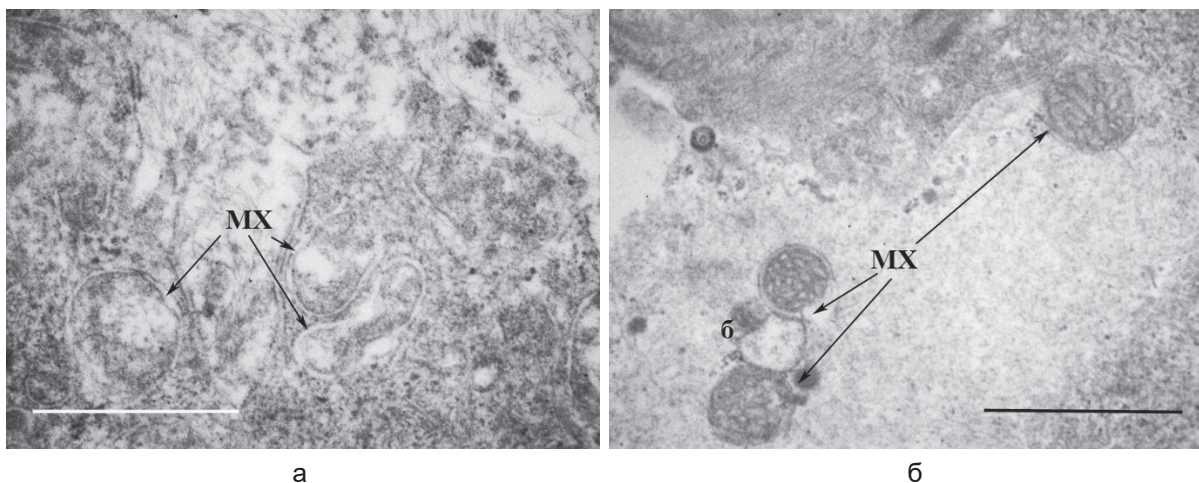


Рис. 2. Ультраструктура мітохондрій (МХ) у сітківці ока контрольних (а) та дослідних (б) тварин після тривалого введення адреналіну. б – «брунькування» мітохондрій. Масштаб 1 мкм

Таблиця 1. Морфометричні характеристики мітохондріального апарату сітківки ока щурів ( $M \pm m$ )

Група тварин	Середня загальна кількість мітохондрій, од./10 мкм <sup>2</sup>	Середня кількість структурно змінених мітохондрій, %	Середній діаметр мітохондрій, мкм
Контроль	15,8 ± 1,6	6,1 ± 0,6	0,57 ± 0,02
Введення адреналіну	17,3 ± 2,1	46,2 ± 8,4**	1,02 ± 0,12*

Примітка тут і в табл. 2 і 3: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  відносно контролю

забезпеченим. Тим більше, що одним з проявів ультраструктурних змін мітохондрій було значне зростання їх середнього діаметра – на 78,4%. Водночас збільшення об'єму мітохондрій понад 25–30% свідчить про процеси, пов'язані з порушенням синтезу макроергів, істотне їх набухання, що призводить до утворення так званих мегамітохондрій. Такі органели зазвичай незворотно пошкоджені, і наступним етапом їх структурних перетворень є загибель за некротичним типом [15].

Вважають, що подібні зміни можуть призводити до запуску процесів нейродегенерації у зоровому аналізаторі, однак подібні пошкодження, принаймні, у людей, є ознакою термінальної стадії глаукоми і зрештою супроводжуються апоптотичною загибеллю клітин [15]. Проте виявлені порушення ультраструктури сітківки та клітинних органел більше нагадують некротичні, ніж апоптотичні зміни.

Ще одним свідченням розвитку набрякових процесів у досліджуваній тканині слід

вважати виявлену гіпергідратацію ГГБ (рис. 3). Здебільшого це стосується ендотеліальної устілки капілярів, однак у потовщення бар'єра свій внесок робить і перикапілярний простір, котрий поглинає та зв'язує зайву рідину, тим самим певною мірою локалізуючи набряк тканини в цілому.

Потовщення ГГБ та окремих його шарів, що здебільшого (характерно і для інших біологічних бар'єрів) супроводжується значним підвищенням проникності цитоплазматичних мембран, зокрема мембран ендотелію. При цьому спостерігається і активація піноцитозу в ендотеліальних клітинах. Це є ознакою активних обмінних і транспортних процесів [17]. Така особливість структурних перебудов робить свій внесок у зростання середньої арифметичної ( $\tau$ ) товщини ГГБ (табл. 2). Загальна товщина ГГБ зростала у 2,7 раза, ендотеліальної устілки – втричі, а перикапілярних просторів – у 2,6 раза. Отже, значно посилювалася дифузія кисню від капіляра

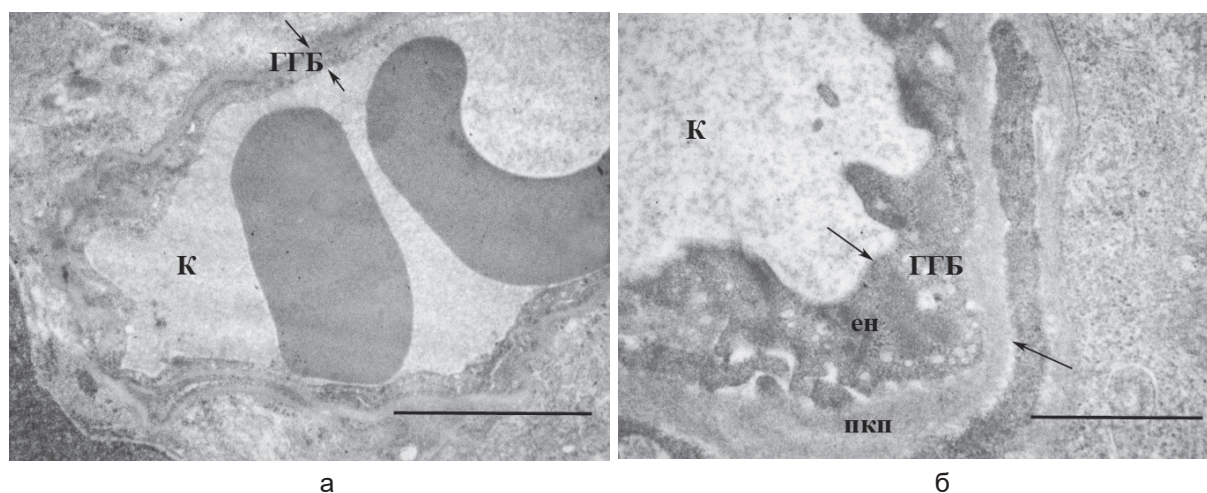


Рис. 3. Гістогематичний бар'єр у контрольних (а) і дослідних (б) тварин після тривалого введення адреналіну. К – капіляр, ГГБ – гістогематичний бар'єр, ен – ендотелій, пкп – перикапілярний простір. Масштаб 0,5 мкм



Таблиця 2. Зміни середньої арифметичної товщини (нм) гістогематичного бар'єра та його шарів у сітківці ока щурів ( $M \pm m$ )

Група тварин	Товщина		
	гістогематичного бар'єра	ендотелію	перикапілярних просторів
Контроль	248 ± 17	131 ± 25	104 ± 19
Введення адреналіну	670 ± 38*	393 ± 41*	277 ± 28*

до структур, котрі його споживають, тобто до мітохондрій, що водночас зі зменшенням їх здатності адекватного забезпечення енергопродукції (через руйнування та ультраструктурні зміни) має призводити до розвитку вторинної тканинної гіпоксії. Остання в свою чергу може посилювати нейродегенерацію та погіршувати функцію сітківки.

Слід звернути увагу на ще одну складову патологічного процесу. В сітківці ока дослідних тварин пласкі синапси інколи з синаптичними стрічками, частіше асиметричні (останні, як правило, є глутаматергічними) за своєю електронною щільністю стають практично прозорими, що ймовірно не може не позначитися на їх функції (рис. 4, б).

Глутамат ідентифікується як один з найважливіших елементів патогенезу глаукоми. Ексайтотоксичність, яка спостерігається вже у перші години, впливає на гангліозні клітини сітківки і може бути здійснена в ре-

зультаті блокування відповідних рецепторів. Показано, що підвищення вмісту глутамату – нейротоксичної збудливої амінокислоти разом зі зниженням активності у відповідних структурах ока гальмівних амінокислот – ГАМК і гліцину, може індукувати загибель гангліозних клітин у результаті некрозу та/або апоптозу як в умовах *in vivo*, так і *in vitro* [18, 19]. Звичайно отримані електронно-мікроскопічні результати не дають відповідь на питання, яким чином змінюється концентрація глутамату в сітківці в умовах експерименту, проте особливості ультраструктури синапсів, до певної міри свідчать про зміни функціонування глутаматергічної системи.

Більшість дослідників та клініцистів вважають глаукому (як патологічний стан, так і модельні дослідження) мітохондріальною патологією [20], котра, як зазначалося вище, повинна супроводжуватися вторинною тканинною гіпоксією, що в свою чергу акти-

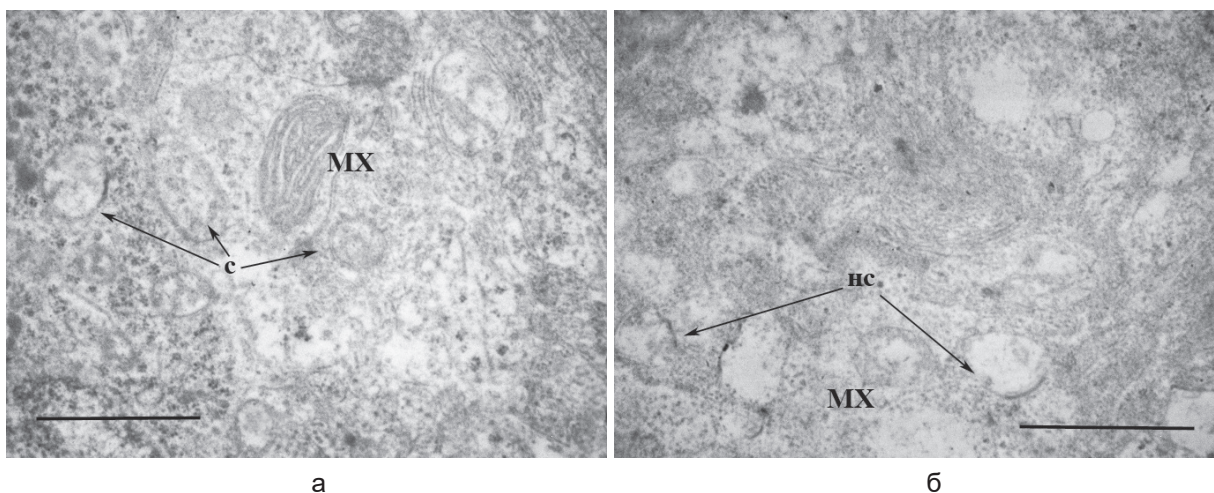


Рис. 4. Електронна щільність синапсів у контрольних (а) та дослідних (б) тварин після тривалого введення адреналіну. с – синапси, нс – асиметричні синапси, MX – мітохондрії. Масштаб 1 мкм

уватиме нейродегенерацію [21]. В умовах експериментального дослідження причин глутаматної ексайтотоксичності показано, що вхід  $\text{Ca}^{2+}$  через NMDA-підтип глутаматних каналів і подальше його накопичення в мітохондріях є основними фактором, що призводить до загибелі органел та клітин, зокрема при глаукомі [22]. З огляду на отримані результати та відомості з літератури [23], описані нами порушення в мітохондріальному апараті клітин сітківки ще раз доводять, що застосована модель є адекватною для вивчення процесів, які відбуваються при підвищенні ВОТ.

Для встановлення можливих біохімічних механізмів, що призводять до виявлених нами змін ВОТ і морфологічних змін у тканинах ока внаслідок тривалого введення адреналіну, були проведені біохімічні дослідження визначення ступеня оксидативного стресу. Майже всі досліджувані нами показники були вищими у тварин, яким вводили адреналін (табл. 3). Достовірно збільшувалася швидкість генерації  $\cdot\text{O}_2^-$  в 2,7 і 8 разів у правому і лівому очах відповідно, а швидкість утворення  $\cdot\text{OH}$ -радикала в 2,2 раза збільшувалась у правому оці без достовірної зміни у лівому оці порівняно зі значеннями у інтактних тварин.

Як наслідок підвищення швидкості утворення АФК спостерігали активацію ПОЛ мембран, а саме на 88 і 36% збільшувався вміст кінцевого продукту ПОЛ МДА ( $P < 0,05$ ), вміст ДК зріс

на 6,8 і 47,8% ( $P < 0,05$ ), а вміст  $\text{LTC}_4$  – на 45% ( $P < 0,05$ ) і 6,4% у правому і лівому очах відповідно порівняно з контролем. Останній вказує на активацію ліпоксигеназного шляху розщеплення арахідонової кислоти – одного з джерел вільних радикалів. Цікаво, що відбувся своєрідний перехресний розподіл у збільшенні маркерів окисного стресу між правими і лівими очима у тварин, яким ми ввели адреналін. Можна припустити, що в цій ситуації спрацював певний компенсаторний механізм, котрий потребує подальшого з'ясування. Однак, незважаючи на збільшення різних маркерів окисного стресу в правому і лівому очах, ми спостерігали однаковий ступінь зростання ВОТ, що вказує на значну чутливість зорового аналізатора до підвищення концентрації катехоламінів в організмі.

Відомо, що катехоламіни мають здатність посилювати продукцію АФК, що відбувається найімовірніше через активацію  $\beta_2$ -адренорецепторів [24]. Також адреналін може піддаватись аутоокисненню з утворенням хінону і семіхінону, які вступають в окисно-відновний цикл з утворенням великої кількості АФК і індукцією окисного стресу [25]. Крім того, *in vitro* було показано, що він впливає не лише через свої рецептори, але й має здатність посилювати ПОЛ мембран безпосередньо мітохондрій, і зменшувати мембранний потенціал [26], що, ймовірно, призводить до зміни їх об'єму і корелює із морфологічними

**Таблиця 3. Збільшення маркерів окисного стресу в тканинах сітківки щурів за дії препарату адреналіну протягом 40 діб ( $M \pm m$ ;  $n = 6$ )**

Показник	Око	Контроль	Введення адреналіну
Супероксидний аніон-радикал, нмоль $\cdot\text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	Праве	2,3 $\pm$ 0,23	6,3 $\pm$ 0,06*
	Ліве	1,8 $\pm$ 0,12	14,4 $\pm$ 0,08*
Гідроксильний радикал, нмоль $\cdot\text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	Праве	0,53 $\pm$ 0,09	1,21 $\pm$ 0,02*
	Ліве	0,89 $\pm$ 0,05	0,97 $\pm$ 0,03
Малоновий діальдегід, нмоль/мг білка	Праве	22,37 $\pm$ 1,41	40,10 $\pm$ 0,39*
	Ліве	34,03 $\pm$ 1,63	46,48 $\pm$ 0,19*
Дієнові кон'югати, нмоль/мг білка	Праве	11,7 $\pm$ 0,13	12,5 $\pm$ 0,09*
	Ліве	11,7 $\pm$ 0,10	17,51 $\pm$ 0,08*
Лейкотрієн $\text{C}_4$ , пмоль/мг білка	Праве	18,36 $\pm$ 1,22	26,6 $\pm$ 0,02*
	Ліве	21,82 $\pm$ 0,91	23,17 $\pm$ 0,13

порушеннями цілісності останніх, які ми виявили в нашому дослідженні. Здатність адреналіну знижувати вміст глутатіону в мітохондріях [26] очевидно також робить внесок у послаблення антиоксидантних властивостей і розвиток окисного стресу в тканинах ока, про що свідчать підвищення маркерів ПОЛ у нашому експерименті.

Основне джерело  $\cdot\text{O}_2^-$  в клітині – дихальний ланцюг мітохондрій, а також деякі ензими такі, як ксантинооксидаза, NO-синтаза, НАДН-оксидази тощо. Шляхом генерації  $\cdot\text{OH}$ -радикала є не лише традиційний – утворення з  $\text{H}_2\text{O}_2$  у реакції Фентона за наявності іонів металів ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ), але й за рахунок розпаду пероксинітриту [27], який може утворитися при одночасній інтенсивній генерації супероксиду і NO у разі неспряження NO-синтаз. Очевидно, при тривалому введенні адреналіну так само відбувається неспряження NO-синтаз у тканинах сітківки, на що вказує збільшений ВОТ навіть після припинення введення препарату.  $\cdot\text{OH}$ -радикал може пошкоджувати мітохондріальні мембрани, спричиняти зниження продукції АТФ. Таким чином, збільшення продукції АФК під дією адреналіну впливає на енергопродукуючу функцію мітохондрій, що призводить до розвитку патологічного процесу і може бути передумовою розвитку глаукоми.

Отже, результати нашого дослідження свідчать, що при підвищенні ВОТ, викликаному дією адреналіну, для корекції патологічного стану існують першочергові завдання, до яких, окрім зниження тиску, належить застосування комплексу антигіпоксантів та антиоксидантів широкого спектра дії для нівелювання окисного стресу, мітохондрій- та ендотелійспрямованих препаратів, а також мембраностабілізаторів для усунення виражених та різноманітних проявів набряку клітин, біологічних бар'єрів та клітинних органел.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated*

*with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.*

**С.О. Рыков, И.В. Шаргородская, К.В. Розовая, Ю.П. Коркач, Ю.В. Гошовская, В.В. Санин, А.И. Яковец, В.А. Дуфинец**

### **КАТЕХОЛАМИНИНДУЦИРОВАННЫЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В СЕТЧАТКЕ ГЛАЗ КРЫС**

Изучали влияние адреналина (40 дней; 0,1–0,15 мг/кг) на внутриглазное давление (ВГД), ультраструктуру и маркеры окислительного стресса в сетчатке глаза 10-месячных крыс линии Вистар. Обнаружили, что значение ВГД достоверно увеличилось на 21% с длительным устойчивым эффектом даже через 42 сут после прекращения введения препарата. Действие адреналина вызывало деструктивные изменения нейронов сетчатки и митохондрий в клетках: увеличение среднего количества структурно поврежденных митохондрий в 7,6 раза и среднего их диаметра на 78,4%. Наблюдали отечные явления в ультраструктуре сетчатки глаза, утолщение эндотелия и гистогематического барьера. Это затрудняет доступ кислорода и может быть предпосылкой к возникновению тканевой гипоксии, которая способствует развитию глаукомы. Кроме того, увеличивалась продукция активных форм кислорода и продуктов перекисного окисления липидов в тканях глаза, что есть причиной развития окислительного стресса. Таким образом, выявлены морфологические и биохимические изменения в сетчатке глаза могут быть причиной повышенного ВГД при длительном воздействии адреналина. Коррекция таких нарушений требует применения комплекса антигипоксантов и антиоксидантов широкого спектра действия, митохондриаль- и эндотелийпротекторных препаратов, а также мембраностабилизаторов для устранения различных проявлений отека клеток. Ключевые слова: сетчатка; адреналин; внутриглазное давление; окислительный стресс; митохондрии.

**S.O. Rykov<sup>1</sup>, I.V. Shargorodska<sup>1</sup>, K.V. Rozova<sup>2</sup>, Yu.P. Korkach<sup>2</sup>, Yu.V. Goshovska<sup>2</sup>, V.V. Sanin<sup>3</sup>, A.I. Yakovets<sup>3</sup>, V.A. Dufynets<sup>4</sup>**

### **CATECHOLAMINE-INDUCED MORPHOFUNCTIONAL DISORDERS AND OXIDATIVE STRESS IN RAT RETINA**

The effects of adrenaline administration for 40 days (0.1–0.15 mg/kg i/p ones in two days) on intraocular pressure (IOP), ultrastructure and markers of oxidative stress in the retina of



10 months old Wistar rats were studied. The IOP values were found to increase significantly after adrenaline administration by 21% ( $P < 0.03$ ) with a sustained long-term effect even 42 days after the last injection. Adrenaline caused destructive changes of retinal neurons and cell mitochondria of all layers: the average number of structurally damaged mitochondria increased in 7.6 times, and the average diameter of mitochondria increased by 78.4%. Swelling in the retinal ultrastructure, endothelium and histogemetic barrierthickening were observed which extend the distance of oxygen diffusion and may be a prerequisite for tissue hypoxia and glaucoma. In addition, adrenaline caused an increase in the production of reactive oxygen species and lipid peroxidation in the tissues of the eye which indicates the development of oxidative stress during long-term adrenaline administration. Thus, morphological and biochemical changes in the retina have been identified which may explain the elevated IOP during prolonged action of adrenaline. The correction of adrenaline-induced disturbances in the retina should include the use of antioxidants, mitochondrial and endothelial membrane protective drugs.

**Key words:** retina; adrenaline; intraocular pressure; oxidative stress; mitochondria.

<sup>1</sup>National Medical Academy of Postgraduate Education named after PL Shupyk, Kyiv;

<sup>2</sup>Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv;

<sup>3</sup>Kyiv City Clinical Ophthalmic Hospital Center for Eye Microsurgery;

<sup>4</sup>Vizis exclusive Ophthalmic Center, Mukachevo, Ukraine; e-mail: ishargorodskamd@gmail.com

## REFERENCES

- Garg M, Khanna D. Exploration of pharmacological interventions to prevent isoproterenol-induced myocardial infarction in experimental models. *Therap Adv Cardiovasc Dis.* 2014; 8(4):155-69.
- Wang W, Zhang H, Gao H, Kubo H, Berretta RM, Chen X, Houser SR.  $\beta$ 1-Adrenergic receptor activation induces mouse cardiac myocyte death through both L-type calcium channel-dependent and -independent pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010; 299(2):322-31.
- Mikheyteva IM. Protective effect of melatonin on experimental glaucoma in rats. *Fiziol Zh.* 2013;59(1):78-83. [Ukrainian].
- Samusenko IA, Alekseev VN, Abuzayed VN. Morphological manifestations of therapeutic pathomorphosis of glaucoma optical neuropathy in experimental glaucoma. *Glaucoma.* 2003;4:3-9. [Russian].
- Wickley B. *Electron microscopy for beginners.* M: World. 1975.
- Karupu VYa. *Electron microscopy.* K: Vish school. 1984.
- Weibel ER. Lung morphometry: the link between structure and function. *Cell Tissue Res.* 2017;367(3):413-26.
- Kuthan H, Ullrich V, Estabrook RW. A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems. *Biochem J.* 1982;203(3):551-8.
- Humphries KM, Yoo Y, Szweda LI. Inhibition of NADH-linked mitochondrial respiration by 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry.* 1998;37(2):552-7.
- Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 1978;86(1):271-8.
- Gavrilov VB, Gavrilova AR, Khmara NF. Measurement of dieneconjugates in blood plasma using the UV absorption of heptane and isopropanol extracts. *Lab Delo.* 1988;(2):60-4. [Russian].
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
- Plotnikov VA. *Edema: causes and consequences. A modern look at treatment and prophylaxis.* M: Lit Res. 2009. [Russian].
- Sudakova YV, Bakeyeva LY, Tsiplenkova V.G. Energozavisimye izmeneniy aul'trastrukturny mitokhondriy kardiomitsitov cheloveka pri alkogol'nom porazhenii serdtsa. *Arkhiv Patologii.* 1999;2:15-20. [Russian].
- Rozova EV, Trepatskaya TV. Ultrastructural features of the destruction and morphogenesis of mitochondria in body tissues during hypoxia of various genesis. *Works Crim Med Univ.* 2006;142(3):126-9. [Russian].
- Alekseev VN, Gazizova IR. Neurodegenerative changes in patients with primary open angle glaucoma. *Ophthalmology.* 2012;1:154-6. [Russian].
- Rozova EV. Influence of normo- and hypobaric hypoxia on ultrastructure of lung tissue and myocardium. *Fiziol Zh.* 2008;54(2):63-8. [Ukrainian].
- Honkanen RA, Baruah S, Zimmerman MB, Khanna CL, Weaver YK, Narkiewicz J, Waziri R, Gehrs KM, Weingeist TA, Boldt HC, Folk JC, Russell SR, Kwon YH. Vitreous amino acid concentrations in patients with glaucoma undergoing vitrectomy. *Arch Ophthalmol.* 2003;121(2):183-8.
- Mihaytseva IN. The imbalance of neurotransmitters of the rat eye retinal network in experimental glaucoma neuropathy. *Neurophysiology.* 2011;43(5):457-9. [Ukrainian].
- Mukesh BN, McCarty CA, Rait JL, Taylor HR. Five-year incidence of open-angle glaucoma: the visual impairment project. *Ophthalmology.* 2002;109(6):1047-51.
- Nucci C, Martucci A, Martorana A, Sancesario GM, Cerulli L. Glaucoma progression associated with altered cerebral spinal fluid levels of amyloid beta and tau proteins. *Clin Exp Ophthalmol.* 2011;39(3):279-81.
- Bolshakov AP. Investigation of the mechanisms of mitochondrial depolarization and calcium dysregulation induced by an exciting mediator glutamate in the neurons of the brain. *Autoref dis Cand Phys-Math Sciences.* M: 2007. [Russian].
- Mihaytseva IN. Glaucoma models, advantages and disadvantages. Adrenaline-induced glaucoma as adequate model of the human glaucoma process. *Ophthalmology.* 2011;3:89-92. [Russian].
- Sun F, Ding XP, An SM, Tang YB, Yang XJ, Teng L, Zhang

- C, Shen Y, Chen HZ, Zhu L. Adrenergic DNA damage of embryonic pluripotent cells via  $\beta$ 2 receptor signalling. *Sci Rep.* 2015;30(5):15950.
25. Bindoli A, Deeble DJ, Rigobello MP, Galzigna L. Direct and respiratory chain-mediated redox cycling of adrenochrome. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1016(3):349-56.
26. Mishra S, Chattopadhyay A, Naaz S, Ghosh AK, Das AR, Bandyopadhyay D. Oleic acid ameliorates adrenaline induced dysfunction of rat heart mitochondria by binding with adrenaline: An isothermal titration calorimetry study. *Life Sci.* 2019;218:96-111.
27. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Phys.* 1995;268(5):699-722.

*Матеріал надійшов до  
редакції 08.01.2020*