

Сравнительное исследование антиоксидантной активности комбинированных препаратов для местного гипотензивного лечения глаукомы

Н.И. Курышева¹, О.А. Азизова², А.П. Пирязев²

¹ Центр офтальмологии ФМБА России

² НИИ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

Цель работы — сравнить антиоксидантную активность (АОА) комбинированных препаратов для местного лечения глаукомы. В модельной системе (индуцированный окислительным стрессом гемолиз эритроцитов) исследована АОА фиксированных комбинаций: дорзоламид/тимолол, бринзоламид/тимолол, латанопрост/тимолол, биматопрост/тимолол, травопрост/тимолол и бримонидин/тимолол. Показано, что АОА 30 мкл фиксированных комбинаций уменьшается в ряду дорзоламид/тимолол — бринзоламид/тимолол — латанопрост/тимолол — бримонидин/тимолол — биматопрост/тимолол — травопрост/тимолол и составляет соответственно 20-16-13-9-6-3%. АОА всех фиксированных комбинаций повышалась по мере увеличения добавляемого в модельную систему объема каждого из препаратов, за исключением комбинации биматопрост/тимолол. Высокая АОА фиксированных комбинаций ингибиторов карбоангидразы с тимололом указывает на их потенциальные преимущества в лечении глаукомы перед другими фиксированными комбинациями в связи с их возможным нейропротекторным эффектом.

Ключевые слова: окислительный стресс, глаукома, фиксированные комбинации, ингибиторы карбоангидразы.

Российский офтальмологический журнал 2013; 2:8–10

Неэффективность монотерапии у пациентов с глаукомой в достижении целевого уровня ВГД после 2 лет лечения составляет 40–75% [5]. Если принять во внимание тот факт, что при применении нескольких препаратов, как правило, соблюдение режима терапии ухудшается, то становится понятным, как важно назначать больному как можно меньшее количество закапываний в течение суток. В этом плане является актуальным назначение препаратов, относящихся к фиксированным комбинациям. Однако следует учесть, что требования, предъявляемые к антиглаукомным препаратам, не ограничиваются их гипотензивным действием. Способность лекарства, закапываемого в глаз, улучшать глазной кровоток и оказывать протекторное действие в отношении нейронов сетчатки и их аксонов является не менее

важным свойством. Поэтому не случайно в последние годы усилилась тенденция сравнивать антиглаукомные препараты (в том числе и фиксированные комбинации) не только по их гипотензивному действию. В одном из недавних исследований продемонстрировано, например, что комбинация дорзоламида с тимололом превосходит по сосудистым эффектам комбинацию тимолола с латанопростом у больных с впервые выявленной глаукомой, в то время как гипотензивная активность обоих препаратов в данном исследовании оказалась одинаковой [10]. Особого внимания заслуживает сравнительная оценка способности препаратов нейтрализовать последствия окислительного стресса, который, как известно, играет весьма важную роль в поражении трабекулярного эндотелия и нейронов сетчатки при

глаукоме [9, 14, 16]. Однако работ, посвященных данной проблеме, в литературе мы не нашли.

ЦЕЛЬЮ работы — изучение антиоксидантной активности комбинированных препаратов для местного лечения глаукомы в сравнительном аспекте.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Принцип метода определения антиокислительной активности. Метод основан на индуцированном гемолизе эритроцитов. При добавлении растворов трет-бутила (ТБ) и клотримазола (КТ) к суспензии отмытых от плазмы крови эритроцитов наблюдается их гемолиз. Соединения, обладающие антиокислительной активностью (АОА), ингибируют гемолиз, вызванный свободными радикалами, а именно радикалами ТБ. КТ, являясь фунгицидом, усиливает интенсивность гемолиза. По степени ингибирования свободнорадикального гемолиза можно судить об АОА исследуемого соединения. Степень гемолиза определяется по изменению концентрации гемоглобина в среде инкубации.

Методика исследования. Использованы клотримазол — 1% раствор для наружного применения (Гленмарк) и 70% раствор Tret-Butyl hydroperoxide (ALDRICH). 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. Таким образом, получали суспензию эритроцитов в 0,9% растворе NaCl приблизительно с 50% гематокритом.

Для приготовления рабочих растворов к 0,1 мл 1% раствора КТ добавляли 2,9 мл ф.р., а к 0,1 мл 70% раствора ТБ — 7,67 мл физиологического раствора (ф.р.). 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 ч 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 применяли метод, описанный выше, т.е. использовали 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 АОА дистиллированную воду заменяли исследуемым препаратом и получали опытные пробы. Далее реакцию проводили, как описано выше. В результате получали значения оптической плотности для контрольных (Ек) и опытных проб (Еоп). Ек принимали как значение оптической плотности, соответствующее 100% гемолизу. В случае добавления исследуемого препарата процент гемолиза определялся по формуле $E_k/E_{op} \times 100\%$. Гемолиз выше 100%, означал его активацию. Снижение гемолиза ниже 100% свидетельствовало о его ингибировании. Поскольку данный вид гемолиза вызывается свободными радикалами трет-бутила, делали вывод, что исследуемое соединение обладает как антирадикальной, так и антиоксидантной активностью.

В работе исследовались следующие фиксированные комбинации антиглаукомных препаратов: дорзоламид/тимолол (Dorzolamide hydrochloride 2% + Timolol maleate 0,5%, S.C. Rompharm Company S.R.L.), бринзоламид/тимолол (Brinzolamid 1% + Timolol maleate 0,5%, Alcon), латанопрост/тимолол (Latanoprost 0,005% + Timolol maleate 0,5%, Pfizer), травопрост/тимолол (Travoprost 0.004% + Timolol maleate 0,5%, Alcon), (Bimatoprost 0,03% + Timolol maleate 0,5%, Allergan) и бримонидин/тимолол (0,2% Brimonidin tartrato + Timolol maleate 0,5%, Allergan).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Наиболее высокая АОА зарегистрирована у комбинации дорзоламид/тимолол (см. таблицу). Она превосходила АОА других фиксированных комбинаций при анализе 30 мкл исследуемых препаратов и последовательно уменьшалась в ряду дорзоламид/тимолол — бринзоламид/тимолол — латанопрост/тимолол — бримонидин/тимолол — биматопрост/тимолол — травопрост/тимолол. Примечательно, что АОА всех фиксированных комбинаций, за исключением комбинации биматопрост/тимолол, возрастала по мере увеличения объема добавляемого в модельную систему препарата, что было особенно выражено у комбинации бринзоламид/тимолол. В объемах 60 мкл и 90 мкл указанная фиксированная комбинация лидировала среди прочих по своей АОА (см. таблицу).

Таблица. Антиоксидантная активность фиксированных комбинаций для местного гипотензивного лечения глаукомы

Препарат	Процент ингибирования гемолиза при добавлении препарата в модельную систему «эритроциты — раствор трет-бутила и клотримазола»		
	количество добавленного препарата (мкл)		
	30 мкл	60 мкл	90 мкл
Дорзоламид/тимолол	20±2,5	26±3,1	40±3,5
Бринзоламид/тимолол	16±3,8	42±2,4	54±3,2
Латанопрост/тимолол	13±1,9	28±3,1	26±2,5
Бримонидин/тимолол	9±4,3	10±1,4	18±1,9
Биматопрост/тимолол	6±1,5	6±0,8	4±0,25
Травопрост/тимолол	3±2,7	3±0,2	32±3,7

ОБСУЖДЕНИЕ

Проблема АОА препаратов для местного лечения глаукомы, которой посвящена данная работа, представляется актуальной в силу нескольких причин. Главная из них состоит в том, что на клеточном уровне в основе поражения как трабекулярного эндотелия, так ганглиозных клеток сетчатки и их аксонов при глаукоме лежит окислительный стресс, повреждающий ДНК митохондрий указанных структур [6, 17]. Полагают, что одной из причин избыточного образования свободных радикалов кислорода при глаукоме является рецидивирующая реперфузия в результате колебаний офтальмотонуса и перфузионного давления. Так называемые конечные гликозилированные продукты — маркеры окислительного стресса, характерные для нейродегенеративной патологии, недавно были обнаружены у больных глаукомой [16]. Таким образом, снижение уровня образования свободных радикалов в тканях глаза, особенно в сетчатке и зрительном нерве, а также улучшение микроциркуляции в указанных структурах являются важным направлением лечения глаукомы.

Другая причина, объясняющая важность исследования АОА антиглаукомных препаратов, объясняется сложным метаболизмом и до конца не изученным их аккумулярованием в тканях глаза.

Фармакокинетика лекарственных препаратов в глазу — весьма сложный процесс, на него оказывают влияние разные факторы. Одни препараты в основном абсорбируются тканями переднего отрезка глаза, в частности, содержащими пигмент (бримонидин), другие аккумуляруются в эритроцитах, связываясь с белками (дорзоламид). Фармакокинетика антиглаукомных препаратов исследовалась на лабораторных животных. В частности, установлено, что латанопрост накапливается в максимальной концентрации во влаге передней камеры через 2–3 ч и попадает в кровяное русло. Максимальный гипотензивный эффект применения латанопроста наступает через 2 нед и сохраняется в среднем в течение 6 мес на фоне непрерывного лечения. Однако распределение латанопроста в тканях глаза человека в разные периоды лечения не известно. Это утверждение верно и в отношении других исследуемых препаратов. Так или иначе все антиглаукомные препараты попадают в кровяное русло, но с разной скоростью и имеют разные сроки выведения из организма, а некоторые — определяются также в парном глазу, в который инстилляции не осуществлялись [12]. Не так давно было показано, что при закапывании в глаз препараты способны попадать даже в спинномозговую жидкость и головной мозг [8]. Это заставляет задуматься о том, что аккумуляция активного вещества может происходить в разных тканях и в разной концентрации на протяжении лечения. И хотя полученные в данном исследовании результаты нельзя полностью экстраполировать на ситуацию в глазу, тем не менее их следует принимать во внимание.

В данной работе исследована АОА (т.е. способность препаратов к обезвреживанию продуктов

ROS—активных форм кислорода) препаратов в том виде, в каком они используются в клинической практике, т.е. в виде растворов. На первый взгляд, полученное различие АОА можно было бы объяснить присутствием в растворах консерванта — бензалкония хлорида. Однако его количество в 1 мл указанных растворов примерно одинаково: от 0,0075 до 0,02%. Следовательно, полученные результаты отражают свойства активных составляющих содержимого флакона с глазными каплями.

Результаты настоящей работы продемонстрировали наличие АОА у всех исследованных препаратов. Следует подчеркнуть, что в состав каждой исследуемой фиксированной комбинации входит тимолол. Высокая антирадикальная активность тимолола была установлена нами впервые более 10 лет назад, эти результаты мы подтверждали неоднократно, используя другие модельные системы [1–3]. Не так давно мы выявили высокую антирадикальную активность ингибиторов карбоангидразы [3]. Следует, однако, отметить, что проведенные исследования давали лишь косвенное представление о нейропротекторных свойствах изучаемых лекарств, поскольку выполнялись *in vitro*. Кроме того, мы учитывали тот факт, что при ингибировании свободных форм кислорода могут образовываться весьма токсичные для живых клеток субстанции. Хорошо известен в этом плане пример взаимодействия супероксид анион радикала с другим свободным радикалом — оксидом азота, в результате чего образуется токсичное соединение — пероксинитрит, вызывающий апоптоз ганглиозных клеток сетчатки. Поэтому закономерно вставал вопрос об определении не только антирадикальных, но и антиоксидантных свойств тестируемых препаратов.

Использование модельных систем с живыми клетками дает максимально приближенную к *in vivo* информацию. Применение в настоящем исследовании модельной системы с эритроцитами, гемолиз которых был вызван окислительным стрессом, позволил нам судить об АОА фиксированных комбинаций для лечения глаукомы.

Результаты показали, что наиболее высокая АОА характерна для фиксированной комбинации ингибитора карбоангидразы (ИКА) дорзоламида с тимололом в объеме 30 мкл она превосходила АОА остальных фиксированных комбинаций, включая тимолол с простагландинами. Это полностью совпало с данными о высокой АОА дорзоламида, полученными нами недавно, и подтвердило наши предыдущие наблюдения, согласно которым АОА слезы повышалась в 4 раза через 30 мин после закапывания дорзоламида [3]. Высокая АОА была выявлена также у другого ИКА, входящего в состав фиксированной комбинации с тимололом — бринзоламида. Полученные данные подтверждают установленную нами недавно высокую АОА указанного ИКА.

Как было отмечено выше, одним из пусковых звеньев глаукомного поражения является митохон-

дриопатия в клетках трабекулярного эндотелия. Митохондрии осуществляют чрезвычайно важную функцию по снабжению клеток энергией, для чего в нормальных физиологических условиях расходуется 90% всего поступающего к митохондриям кислорода, и лишь 1–5% его перерабатывается митохондриями в свободные формы кислорода. С возрастом эта функция митохондрий существенно снижается. То же происходит в случаях различных форм митохондриопатий. Поврежденные митохондрии становятся источником свободных радикалов. Не так давно было установлено, что при ПОУГ имеется дисфункция митохондрий, обусловленная генетически, причем это относится как к митохондриям клеток трабекулярного эндотелия, так и аксонов зрительного нерва [4].

Недавние исследования показали, что дорзоламид и тимолол способны защитить ДНК митохондрий клеток трабекулярного эндотелия от окислительного стресса [7, 11, 14], а при комбинации указанных препаратов происходило усиление антиоксидантного эффекта, что предохраняло трабекулу от повреждающего действия перекиси водорода [13]. Заслуживают также внимания недавно полученные данные о способности фиксированной комбинации дорзоламида с тимололом усиливать перфузию капилляров сетчатки и ДЗН, причем подобный эффект, по мнению авторов, нарастает на фоне длительного применения препарата [15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в свете полученных результатов об антиоксидантной активности фиксированных комбинаций ингибиторов карбоангидразы дорзоламида и бринзоламида с тимололом, данных литературы об антиоксидантном действии дорзоламида и тимолола, направленном на защиту трабекулярного эндотелия, а также о способности ИКА улучшать глазную гемоперфузию, можно заключить, что указанные комбинации имеют потенциальные преимущества перед антиглаукомными препаратами других групп.

Литература

1. Курьешева Н.И., Азизова О.А. Сравнительное исследование антиокислительной активности препаратов для местного гипотензивного лечения глаукомы // X Всерос. школа офтальмолога: сб. ст. М., 2011. С. 75–79.
2. Курьешева Н.И., Деева И.Б., Еричев В.П. Сравнительное изучение антирадикального действия некоторых антиглаукоматозных препаратов // Вестн. офтальмол. 1998. № 2. С. 6–9.
3. Курьешева Н.И., Царегородцева М.А., Азизова О.А., Пирязев А.П. Нейропротекторное действие ингибиторов карбоангидразы для местного лечения глаукомы в свете их антирадикальной активности // IX Всерос. школа офтальмолога: сб. ст. М., 2010. С. 89–93.
4. Abu-Amero K.K., Morales J., Bosley T.M. Mitochondrial abnormalities in patients with primary open-angle glaucoma // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2006. V. 47. N 10. P. 2533–2541.
5. EGS guidelines, 3rd ed. 2008. 138 P.
6. Izzotti A., Saccà S. Sensitivity of ocular anterior chamber tissues to oxidative damage and its relevance to the pathogenesis of glaucoma // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2009. V. 50. N 11. P. 5251–5258.
7. 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. V. 22. N 3. P. 445–453.
8. Koevary S. Pharmacokinetics of topical ocular drug delivery: potential uses for the treatment of diseases of the posterior segment and beyond // Current Drug Metab. 2003. V. 4. N 3. P. 213–222.
9. Kumar DM, Agarwal N. Oxidative stress in glaucoma: a burden of evidence // J. Glaucoma. 2007. V. 16. N 3. P. 334–343.
10. Martinez A., Sanchez M. Retrobulbar haemodynamic effects of the latanoprost/timolol and the dorzolamide/timolol fixed combinations in newly diagnosed glaucoma patients // Intern. J. of Clinical Practice. 2007. V. 61. N 5. P. 815–825.
11. 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. V. 50. N 5. P. 2777–2784.
12. 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. V. 71. N 5. P. 671–676.
13. Sacca S., La Maestra S., Micale R., Larghero P. Ability of Dorzolamide Hydrochloride and Timolol Maleate to target mitochondria in glaucoma therapy // Arch Ophthalmol. 2011. V. 129. N 1. P. 48–55.
14. Sacca S.C., Pasco A. et al. Oxidative DNA damage in the human trabecular meshwork: clinical correlation in patients with primary open-angle glaucoma // Arch. Ophthalmol. 2005. V. 123. N 4. P. 458–463.
15. Siesky B., Harris A., Kagemann L. Ocular blood flow and oxygen delivery to the retina in primary open-angle glaucoma patients: the addition of dorzolamide to timolol monotherapy // Acta Ophthalmol. 2010. V. 88. N 1. P. 141–149.
16. Tezel G. Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences // Prog Retin Eye Res. 2006. V. 25. N 5. P. 490–513.
17. Zanon-Moreno V., Marco-Ventura P., Lleo-Perez A., Pons-Vazquez S. Oxidative stress in primary open-angle glaucoma // J. Glaucoma. 2008. V. 17. N 3. P. 263–268.