



<sup>1</sup> ГБОУ ВПО «РНИМУ  
им. Н.И. Пирогова»  
МЗ РФ

<sup>2</sup> ФГБУ «МУНКЦ  
им. П.В. Мандрыка»  
МО РФ

<sup>3</sup> ФГБУН «ИБР  
им. Н.К. Кольцова»  
РАН

<sup>4</sup> ФГБУ «МНИОИ  
им. П.А. Герцена»  
МЗ и СР РФ

# Метаболические нарушения в клетках трабекулярной сети у пациентов с продвинутыми стадиями первичной открытоугольной глаукомы\*

В.Ю. ОГОРОДНИКОВА<sup>1</sup>, д.м.н., проф. Е.А. ЕГОРОВ<sup>1</sup>,  
д.м.н., проф. А.В. КУРОЕДОВ<sup>2</sup>, к.б.н. Ю.В. МАРКИТАНТОВА<sup>3</sup>,  
к.м.н. А.Н. ПЕТРОВ<sup>4</sup>

*С помощью метода иммунохимического анализа проведена оценка степени выраженности апоптоза клеток дренажной зоны у 20 пациентов с различными стадиями первичной открытоугольной глаукомы. Обнаружена умеренная положительная корреляция возраста пациентов и количества апоптозных клеток на развитой стадии заболевания, а также степени апоптоза клеток и длительности анамнеза заболевания – на далеко зашедшей стадии глаукомы. Статистической разницы в количестве апоптозных клеток дренажной зоны при развитой и далеко зашедшей стадиях не обнаружено. Показано, что иммунохимический метод исследования апоптоза клеток дренажной зоны перспективен для дальнейшего изучения механизмов развития глаукомного процесса.*

## Введение

Одним из перспективных путей диагностики и последующего лечения нейродегенеративных заболеваний, в частности глаукомы, является выявление клеточных источников регенерации и способов их стимулирования. В последние годы в литературе появляется значительное количество данных, посвященных изучению нейродегенеративных процессов в патогенезе глаукомы. Известно, что значитель-

ную роль в развитии глаукомной оптической нейропатии играет механизм апоптоза в ганглионарных клетках сетчатки [1–3]. Проведение таких исследований является непростой задачей. Для выявления и изучения клеток, находящихся в состоянии апоптоза, было разработано множество разнообразных методов и их модификаций. Большинство работ в офтальмологии было ориентировано на измерение размеров и плотности кле-

ток. Меньшая часть исследований была посвящена изучению состава наружной мембраны клеток. Следует отметить, что до настоящего времени никогда не исследовались фрагментация ядерной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и изменения содержания молекулярных маркеров в клетках. Активность исследователей ограничена тем, что изучение процессов в тканях глаза возможно реализовать только в энуклеированных глазах или экспериментальных условиях. Клинические исследования «живых» глаз могут проводиться на образцах дренажной зоны, полученных в ходе проведения хирургических антиглаукомных вмешательств. Так, Р.А. Симаковой и соавт. (1974) было обнаружено, что наличие глаукомы в анамнезе и развитие заболевания от стадии к стадии усугубляют дистрофию дренажной зоны [4]. Нами ранее было проведено электронно-микроскопическое исследование трабекулярной сети пациентов с продвинутыми стадиями глаукомы, где было обнаружено значительное число дегенеративно-измененных органелл в клетках с разной

\* Статья предоставлена Российским глаукомным обществом (МОО «Глаукомное общество»).



Таблица 1. Характеристики исследуемых групп пациентов\*

Стадия заболевания	Средний возраст, лет	Установленный анамнез, лет	Уровень ВГД, Ро, мм рт. ст.
ПОУГ II стадии	66,8 ± 9,2	7,4 ± 7,4	24,4 ± 4,5
ПОУГ III стадии	71,0 ± 7,3	4,42 ± 4,7	24,4 ± 4,3

\* Общее число пациентов – 20.

ВГД – внутриглазное давление, ПОУГ – первичная открытоугольная глаукома.

степенью апоптоза [5]. Однако существенным недостатком световой и электронной микроскопии является отсутствие возможности объективной оценки полученных данных. Помимо этого, следует учитывать, что апоптоз реализуется двумя путями: либо при участии рецепторов клеточной поверхности, либо вследствие повреждения внутриклеточных структур (чаще всего митохондрий). Большинство отечественных ученых указывают лишь на последний (митохондриальный) путь гибели клеток [6–10]. Однако в зарубежной литературе мы встретили работы по оценке выраженности апоптоза в норме, при открытоугольной и закрытоугольной глаукоме с использованием иммунохимических методик [3, 11]. При этом авторы не приводят данных, касающихся характеристик апоптоза при прогрессировании глаукомного процесса, полученных с использованием вышеуказанного метода лабораторной диагностики. В отечественной литературе нами не обнаружено работ, авторы которых проводили бы иммунохимические исследования склерально-трабекулярного комплекса. Это позволило определить цель настоящего исследования: оценить степень выраженности апоптоза клеток дренажной зоны пациентов с различными стадиями первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ).

### Материалы и методы исследования

Исследование проводилось на клинической базе офтальмологического отделения ФГБУ «Медицинский учебно-научный клинический центр им. П.В. Мандрыка» МО РФ в период с января по май 2012 г. В итоговый протокол были

включены данные 20 пациентов (20 глаз) с ПОУГ, длительно получавших местную гипотензивную терапию (бета-блокаторы, аналоги простагландинов и ингибиторы карбоангидразы) при максимально переносимом режиме инстилляций и поступивших на оперативное лечение в связи с отсутствием компенсации офтальмотонуса и стабилизации зрительных функций. Средний возраст пациентов составил  $69,3 \pm 8,0$  лет (минимальный – 51, максимальный – 80), а документально установленный анамнез заболевания –  $5,7 \pm 5,9$  лет (минимальный – впервые выявленная; максимальный – 19 лет). Исследуемые больные были сгруппированы согласно стадиям заболевания (табл. 1). Во всех случаях диагнозы глаукомы были подтверждены данными объективного и дополнительных обследований. Большинство пациентов имели далеко зашедшую стадию глаукомы (55%), пациентов мужского пола было больше (60%). Всем пациентам были выполнены антиглаукомные операции проникающего типа. В ходе оперативного вмешательства был удален склерально-трабекулярный комплекс, который затем был подвергнут иммунохимическому анализу. Для исследования образцы фиксировали в 4%-ном нейтральном растворе формалина, приготовленном на 0,1 М натрий-фосфатном буфере (PBS) (рН 7,4) с 5%-ным раствором сахарозы. Подготовка препаратов проводилась по стандартной методике. С помощью криостата Leica M1900 (Германия) были получены поперечные срезы толщиной 10 мкм. Ядра клеток были окрашены ядерным красителем Hoechst 33342. Иммунофлуоресценцию анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа

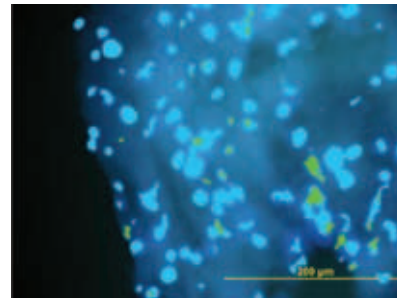


Рис. 1. Иммунохимический препарат после математической обработки с изображением ядер клеток, окрашенных красителем Hoechst 33342 (темный), и ядер клеток, обработанных методом TUNEL (светлый)

Leica DM RXA2 (Германия), оснащенного набором светофильтров, компьютерной приставкой и программой Leica for Windows (Германия). Для выявления апоптозных клеток по разрывам их ДНК применяли метод TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling), который маркирует клетки с ДНК, деградирующей в результате активации Ca/Mg-зависимой эндонуклеазы. В анализе использовался набор реагентов фирмы Promega – DeadEnd Fluorometric TUNEL System (США). Оценка и анализ полученных изображений производились с помощью специально адаптированных программ Adobe Photoshop CS3 Extendet и Corel Draw X3 на персональном компьютере под управлением операционной системы Windows XP с лицензионным программным обеспечением MS Office XP Professional (рис. 1).

Все результаты подвергались последующей статистической обработке с использованием программы Statistica, версия 6.0, компания StatSoft, Inc. (Австралия – США), также с использованием лицензионного программного обеспечения.

Таблица 2. Морфологические характеристики дренажной зоны,  $M \pm \sigma$

Группа пациентов (n = 20)	Общее количество клеток, абс.*	Количество апоптозных клеток, абс.*	Количество апоптозных клеток, %*
ПОУГ II стадии	197,20 ± 143,41	59,80 ± 62,83	23,95 ± 12,30 <sup>#</sup>
ПОУГ III стадии	143,42 ± 76,22	34,57 ± 15,46	25,34 ± 7,70 <sup>#</sup>
Усредненные значения между группами	165,83 ± 106,84	45,08 ± 41,45	24,76 ± 9,37

\* Среднее значение.

<sup>#</sup>  $p > 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

После обработки изображений и подсчета клеток было вычислено процентное отношение апоптозных клеток к общему числу клеток. В таблице 2 представлены средние данные для пациентов с развитой и далеко зашедшей стадиями заболевания.

Из таблицы 2 видно, что различия в относительном количестве апоптозных клеток у пациентов с развитой и далеко зашедшей стадиями глаукомы статистически недостоверны ( $23,95 \pm 12,30$  и  $25,34 \pm 7,70$ ;  $p > 0,05$ ). Эти данные противоречат опубликованным ранее результатам исследований, проведенным с помощью световой и электронной микроскопии [4, 12]. Однако недостатком этих методов исследования является отсутствие возможности объективной оценки результатов: при анализе данных, полученных с электронного микроскопа, можно отталкиваться только от субъективного мнения исследователя, который просматривает изображения. Иммунохимическая методика вкуче с компьютерным анализом изображений позволяют получить числовые значения исследуемых

параметров для последующей статистической обработки. Кроме того, нам не удалось обнаружить в проведенных ранее исследованиях данных сравнения степени выраженности апоптоза клеток дренажной зоны при прогрессировании глаукомного процесса, полученных при помощи других объективных методик.

На рисунке 2 (А, Б) представлен иммунохимический препарат образца склерально-трабекулярного комплекса пациента с развитой стадией ПОУГ.

Рисунок 3 (А, Б) является примером иммунохимического препарата образца склерально-трабекулярного комплекса, взятого у пациента с далеко зашедшей стадией глаукомы.

Для оценки взаимосвязи между иммунохимическими параметрами дренажной зоны и анамнестическими данными пациентов был использован параметрический корреляционный анализ. Для детализации полученные данные разделены согласно стадиям заболевания. Результаты приведены в таблицах 3 и 4.

В результате исследования выявлена умеренная положительная

корреляция возраста пациентов с количеством апоптозных клеток ( $r = 0,57$ ), то есть чем старше пациент, тем выше выраженность апоптоза в дренажной зоне. Апоптоз является нормальным механизмом в процессе развития, инволюции, клеточного гомеостаза, атрофии и других физиологических состояний [13]. J. Alvarado и соавт. (1981) оценили возрастные изменения количества клеток трабекулярной сети в норме и обнаружили, что потеря клеток трабекулярного аппарата имеет линейную зависимость от возраста и составляет около 0,58% в год [14]. Считается также, что глаукомный процесс связан с нарушением программы апоптоза, которое может инициироваться рядом патологических факторов [3]. Далее прогрессирование заболевания запускает порочный круг процессов, в том числе усугубление дистрофических изменений в структурах глаза. Тенденцию усиления дистрофии дренажной зоны при прогрессировании глаукомного процесса отметили Р.А. Симакова и соавт. (1974) [4]. Согласно полученным нами данным, для развитой стадии заболевания характерна та же возрастная зависимость развития дистрофии, что и в норме. При далеко зашедшей стадии мы не установили подобной зависимости.

Данные исследования свидетельствуют о наличии умеренной положительной корреляции количества апоптозных клеток с длительностью глаукомного анамнеза ( $r = 0,55$ ;  $p < 0,05$ ), то есть отмечено: чем дольше пациент болен глаукомой, тем более выражен процесс апоптоза его дренажной зоны. Такая зависимость может быть свидетельством того, что запуск и развитие апоптоза

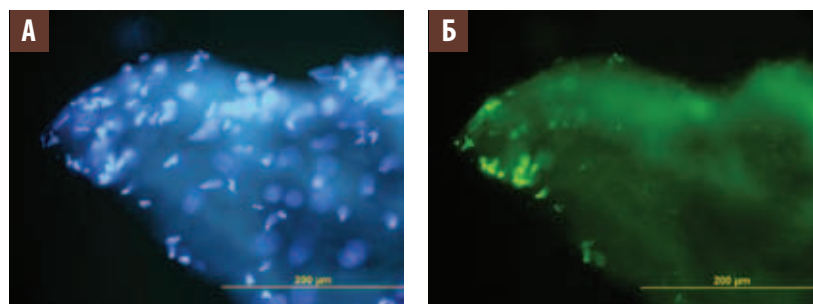


Рис. 2. Комплекс «склера – трабекула» пациента К., 66 лет, диагноз «первичная открытоугольная Пв нестабилизированная глаукома правого глаза», документально установленный глаукомный анамнез – 10 лет (А – окраска ядер клеток красителем Hoechst 33342, Б – тот же комплекс после обработки методом TUNEL (окрашивание ядер апоптозных клеток))



Таблица 3. Корреляционные характеристики исследуемых параметров дренажной зоны пациентов с развитой стадией глаукомы

Параметры заболевания (n=9)	Возраст пациента	Длительность анамнеза	Уровень ВГД	Количество апоптозных клеток, %
Возраст пациента	–	0,07	0,18	0,57*
Длительность анамнеза	0,07	–	-0,94*	0,17
Уровень ВГД	0,18	-0,94*	–	-0,22
Количество апоптозных клеток, %	0,57*	0,17	-0,22	–

\* p &lt; 0,05.

ВГД – внутриглазное давление.

Таблица 4. Результаты корреляционного анализа параметров дренажной зоны пациентов с далеко зашедшей стадией глаукомы

Параметры заболевания (n=11)	Возраст пациента	Длительность анамнеза	Уровень ВГД	Количество апоптозных клеток, %
Возраст пациента	–	-0,07	0,56	0,08
Длительность анамнеза	-0,07	–	-0,46	0,55*
Уровень ВГД	0,56	-0,46	–	-0,35
Количество апоптозных клеток, %	0,08	0,55*	-0,35	–

\* p &lt; 0,05.

ВГД – внутриглазное давление.

имеют мультифакторную природу. Окислительный стресс, нарушение кальциевого обмена, длительное применение местных гипотензивных препаратов могут влиять на процесс апоптоза, усиливая дистрофические изменения. При прогрессировании глаукомы возникают условия для усиления апоптоза и образуется порочный круг патологических реакций патогенеза глаукомы.

Вместе с тем суммарный анализ параметров обеих стадий заболевания установил положительную взаимосвязь развития апоптоза с возрастом пациента и длительностью анамнеза ( $r=0,36$  и  $r=0,28$ ;  $p<0,05$ ).

### Заключение

Изучение процесса апоптоза является актуальным и сложным вопросом глаукоматологии. Изучение механизмов этого процесса может дать новое, более целостное концептуальное представление о патогенезе ПОУГ, что позволит разработать и внедрить более эффективные методы прогнозирования, мониторинга и лечения. На современном этапе трудности в основном связаны с получением достаточного количества материала для клинических исследований,

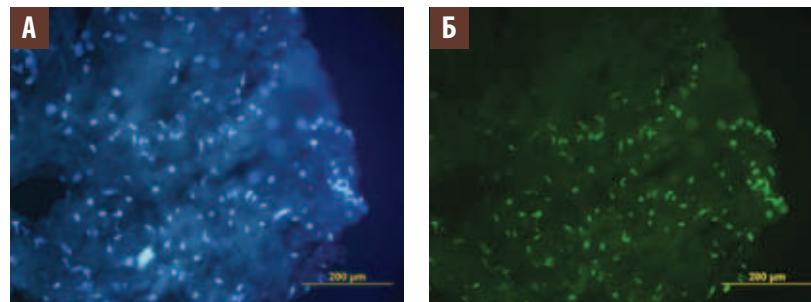


Рис. 3. Комплекс «склера – трабекула» пациента В., 69 лет, диагноз «первичная открытоугольная ШВ нестабилизированная глаукома левого глаза», документально установленный глаукомный анамнез – 13 лет (А – окраска ядер клеток красителем Hoechst 33342, Б – тот же препарат после обработки методом TUNEL (окрашивание ядер апоптозных клеток))

объективной оценкой полученных результатов и стоимостью методики. Методика иммунохимического анализа позволяет произвести подсчет и статистическую обработку параметров исследуемого объекта. Преимуществом данного подхода является количественная оценка как живых клеток, так и клеток, погибших вследствие апоптоза.

В результате проведенного исследования не было обнаружено статистически достоверных различий в степени выраженности апоптоза в клетках дренажной зоны при развитой и далеко зашедшей стадиях ПОУГ. Для развитой стадии глаукомы было установлено увеличение апоптоза с возрастом пациентов.

При далеко зашедшей стадии заболевания прогрессирование апоптоза зависит от длительности анамнеза. Установлена потенциальная взаимосвязь уровня офтальмотонуса и апоптоза. Учитывая небольшой объем исследованного материала и актуальность вопроса, представляется необходимым дальнейшее продолжение работы в выбранном направлении. Принято считать, что стойкое повышение внутриглазного давления приводит к усилению развития апоптоза [15]. Однако исследования, указывающие на это, проводились лишь с изучением ганглионарных клеток сетчатки и не касались исследованного апоптоза в дренажной зоне. ●

Литература  
→ С. 54–55