

ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЯ ПРОДУКТОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ БЕЛКОВ И ЛИПИДОВ В СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ И КАМЕРНОЙ ВЛАГЕ У БОЛЬНЫХ ПОУГ

В.Н. Сердюк

Областная клиническая офтальмологическая больница (Днепропетровск)

Введение

Глаукома является широко распространенным заболеванием особенно в развитых странах, нередко приводящим к неустраняемой слепоте и инвалидности, а поэтому представляющим собой важную медико-социальную проблему государства и общества [3].

Актуальность и сложность проблемы глаукомы состоит в том, что, с одной стороны, современная офтальмология имеет в своем арсенале большой выбор лекарственных препаратов, методик консервативного и хирургического лечения, а с другой – не всегда эти лечебные мероприятия оказываются эффективными. Это объясняется сложностью патогенетических механизмов развития заболевания и симптоматическим, а не патогенетическим подходом к его лечению и профилактике [4, 15, 17, 23].

В свете современных воззрений глаукома рассматривается как нейродегенеративное заболевание органа зрения – глаукоматозная оптическая нейропатия [19].

В развитии ПОУГ непосредственно отмечаются микроструктурные изменения на разных уровнях вследствие нарушения многих процессов: инволюционных, биомеханических, механизмов кровообращения и сосудистой ауторегуляции, ускорением апоптоза нервных клеток и снижением уровня естественной нейропротекции. В патогенезе заболевания могут играть важную роль также изменения иммунного характера, эластотонических свойств склеры, возраст, расовая принадлежность, сосудистая дисрегуляция, артериосклероз и прочие [13, 16].

В настоящее время также показано значение свободно-радикальных процессов и, в частности, активных форм кислорода в патогенезе нейродегенеративных заболеваний [5, 6, 14].

Согласно существующей на сегодня метаболической концепции патогенеза глаукоматозной оптической нейропатии, особую роль при глаукоме играют окислительный стресс и эксайтотоксическое повреждение третьего нейрона сетчатки. Важная роль также отводится патологическим процессам при участии активированной нейроглии, которая в условиях гипоксии, продуцирует избыточное количество токсических метаболитов, оказывающих повреждающее действие на нейроны сетчатки и аксоны зрительного нерва [22, 24, 25].

Следует подчеркнуть, что начальные повреждения всех или большинства ганглиозных клеток при глаукоме начинается с повреждения их аксонов в области головки ДЗН и что индивидуальная скорость смерти ганглионарных клеток в значительной степени будет определяться метаболическим состоянием самих клеток и их дендритов. Таким образом, аксоны гибнущих ганглионарных клеток при глаукоме находятся в более зашедшей стадии отмирания, чем тела их клеток. Это можно сравнить со смертью ганглионарных клеток при ретинальной ишемии, при которой тела ганглионарных клеток находятся в более сильном повреждении, чем их аксоны. Необходимо указать, что процессы, которые ведут к смерти ганглионарных клеток при глаукоме, происходят очень медленно с переменной скоростью в зависимости от степени гипоксического повреждения в области головки зрительного нерва. Повреждение происходит постепенно непрерывно или периодически на протяжении многих лет [15, 20, 21].

Большинство исследователей полагают, что в основе процесса повреждения клеточных мембран лежит процесс ПОЛ, участвующий в регуляции клеточного деления, биосинтезе простагландинов, нуклеиновых кислот, лейкотриенов, реакции окислительного фосфорилирования, регуляцию проницаемости мембран [1, 18].

Активация процесса перекисидации ведет к снижению ненасыщенных жирных кислот, что способствует увеличению вязкости липидного биослоя клеточных мембран. Продукты перекисидации липидов (альдегиды, кетоны, свободные радикалы, перекиси) инактивируют тиоловые группы – ферментов, подавляют окислительное фосфорилирование, вызывают деструкцию эластичных волокон и деполимеризацию мукополисахаридов. При этом нарушаются белково-липидные и липидо-липидные связи, уменьшается активность мембранно-связанных ферментов. Все

это вызывает повреждение биомембран и нарушает транспортные процессы и избирательную проницаемость для ионов. В следствие этого происходит накопление в клетке ионов кальция, натрия, что приводит к гибели клетки. Тем не менее, к настоящему моменту фактов, для того чтобы рассматривать перекисное окисление липидов в качестве первичного пускового механизма развития глаукоматозного процесса недостаточно [2].

В предыдущих исследованиях нами было выявлено, что в условиях моделирования глаукоматозного процесса отмечается резкое повышение продуктов перекисного окисления липидов в сетчатке и зрительном нерве. Так, концентрация малонового диальдегида в конечный срок наблюдения повысилась на 110,7%, а диеновых конъюгатов – на 54,9% [11].

Также было показано, что при моделировании экспериментальной глаукомы, интенсивность процессов гашения свободнорадикальной формы кислорода – супероксида в тканях сетчатки и зрительного нерва существенно снижается: показатели активности супероксиддисмутазы составляют – 79,9% и 69,9% во второй и третий срок стабильной гипертензии.

Было выявлено снижение уровня тиоловых групп белков сетчатки и зрительного нерва при моделировании глаукоматозного процесса в конечный срок наблюдения (на 25%), при этом в этот же период значительно возрастала концентрация дисульфидных групп (на 45%) [9].

В условиях развития глаукоматозного процесса в сетчатке и зрительном нерве экспериментальных животных, отмечалось прогрессирующее снижение уровня восстановленной и окисленной формы глутатиона – 42% и 17% в конце 3 срока наблюдения соответственно. Снижался также уровень глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы на 18,7% и 23,7% соответственно [10].

Таким образом экспериментальное изучение этой патологии, вследствие которой отмечаются серьезные нарушения зрительных функций, и приводят к развитию осложнений, определяет направленность поиска способов патогенетической терапии и профилактики прогрессирования процесса, снижающих количество осложнений этого заболевания и проведение клинико-биохимических исследований у больных ПОУГ.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании уровня продуктов окислительного повреждения белков и липидов в слезной жидкости и камерной влаге у больных ПОУГ.

Материалы и методы исследований

Исследования по изучению патохимических показателей в камерной влаге были проведены на 44 пациентах.

Из них 24 пациента – контрольная группа, 20 пациентов – группа больных глаукомой.

Исследования по биохимическому изучению слезной жидкости были проведены на 90 пациентах.

Из них 24 пациента – контрольная группа, 66 пациентов – группа больных глаукомой.

В слезной жидкости и камерной влаге больных производили определение карбонильных групп белков, а также содержания малонового диальдегида и диеновых конъюгатов с помощью спектрофотометрических методов.

Принцип метода определения содержания малонового диальдегида состоит в том, что при температуре 100°C в кислой среде малоновый диальдегид реагирует с 2-тиобарбитуровой кислотой, образуя окрашенный триметиновый комплекс с максимумом поглощения при длине волны 532 нм.

К исследуемому гомогенату объемом 0,1 мл приливали 3 мл 1 % ортофосфорной кислоты (рН 2,0), 1 мл 0,6 % раствора тиобарбитуровой кислоты и 0,1 мл 0,28 % раствора сернокислого железа. Пробирки помещали в кипящую водяную баню на 60 мин. Затем пробирки охлаждали в холодной воде при 0°C - 2°C и добавляли 4 мл бутанола, тщательно перемешивали и центрифугировали 10 мин при 3 тыс. об/мин. Измеряли оптическую плотность верхней фазы на спектроколориметре «Spescol – 210» при длине волны 535 нм против бутанола. Расчет содержания продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, проводили с учетом коэффициента молярной экстинкции малонового диальдегида – $1,56 \cdot 10^5$ моль⁻¹ см⁻¹ и выражали в мкмоль/г ткани. Коэффициент вариации методики – 5,2 % [12].

Принцип метода определения диеновых конъюгатов состоит в том, что при перекисном окислении на стадии образования свободных радикалов в молекулах полиненасыщенных высших жирных кислот возникает система сопряженных двойных связей, что сопровождается появлением нового максимума в спектре поглощения 233 нм.

К 0,5 мл исследуемого гомогената добавляли 4,5 мл экстрагирующей смеси гептана с изопропиловым спиртом в соотношении 1:1 (V:V). После экстракции к смеси добавляли 0,5 мл дистиллированной воды и отбирали из верхней (гептановой) фазы расслоившейся пробы 0,5 мл и смешивали с 2,5 мл абсолютного этилового спирта. Оптическую плотность испытуемого раствора измеряли на спектрофотометре СФ-26 при 233 нм против этилового спирта. Содержание диеновых конъюгатов рассчитывали с учетом молярного коэффициента экстинкции $2,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ и выражали в мкмоль/г ткани [12].

Полученные данные подвергали статистической обработке с помощью пакета SPSS 11.0 [7].

Полученные результаты и их обсуждение

Данные о содержании продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных групп белков в камерной влаге больных при глаукоме представлены в таблице 1 и на диаграмме (рис. 1).

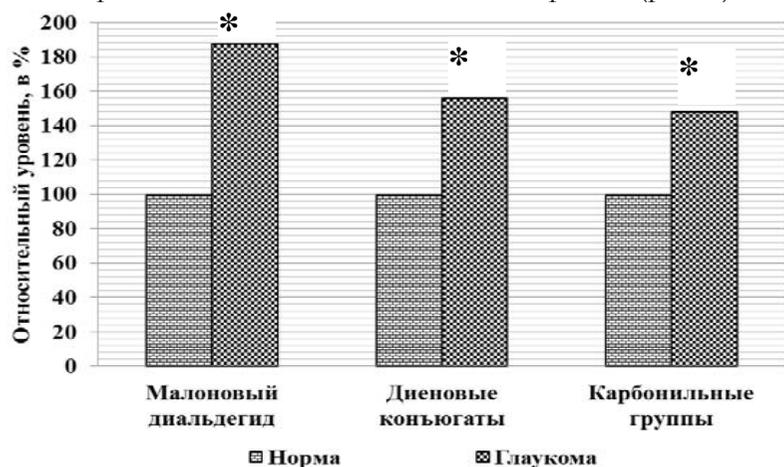


Рис. 1. Относительный уровень продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных групп белков в камерной влаге больных при глаукоме (* - уровень значимости различия данных по отношению к норме ($p < 0,05$)).

Как видно из представленных данных уровень малонового диальдегида в камерной влаге у больных с глаукомой был повышен до $(94,3 \pm 6,5)$ мкмоль/мл, что составило 187,8% по сравнению с нормой $(50,2 \pm 3,3)$ мкмоль/мл. Содержание диеновых конъюгатов в камерной влаге в группе больных глаукомой повысилось до $(33,4 \pm 2,3)$

мкмоль/мл, составляя 156,1% по отношению к норме $(21,4 \pm 1,5)$ мкмоль/мл. Изучая данные о содержании карбонильных групп, можно отметить, что их уровень в камерной влаге больных глаукомой был повышен до $(77,4 \pm 5,2)$ нмоль/г, что составило — 148% по сравнению с нормой $(52,3 \pm 3,2)$ нмоль/г.

Таблица 1

Содержание продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных групп белков в камерной влаге больных при глаукоме

Биохимические показатели	Статистические показатели	Норма	Больные глаукомой
Малоновый диальдегид, мкмоль/мл	n	24	20
	M	50,2	94,3
	m	3,3	6,5
	p	-	<0,001
	%	100	187,8
Диеновые конъюгаты, мкмоль/мл	n	24	20
	M	21,4	33,4
	m	1,5	2,3
	p	-	<0,001
	%	100	156,1
Карбонильные группы, нмоль/г белка	n	24	20
	M	52,3	77,4
	m	3,2	5,2
	p	-	<0,001
	%	100	148,0

Примечание: в табл. 1-2 p- уровень значимости различия данных по отношению к норме.

Данные о содержании продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных групп белков в слезной жидкости больных при глаукоме представлены в таблице 2 и на диаграмме (рис. 2).

Уровень малонового диальдегида в слезной жидкости больных глаукомой был повышен до $(12,4 \pm 0,8)$ мкмоль/мл, составляя 238,5% по отношению к норме $(5,2 \pm 0,4)$ мкмоль/мл. В слезной жидкости больных содержание диеновых конъюгатов повысилось до $(0,88 \pm 0,06)$ мкмоль/мл, что составило — 183,3% по сравнению с нормой $(0,48 \pm 0,04)$ мкмоль/мл. Рассматривая полученные данные о содержании карбонильных групп, можно отметить, что в группе больных глаукомой их уровень в слезной жидкости был повышен до $(143,3 \pm 9,5)$ нмоль/г, что по сравнению с нормой $(85,2 \pm 6,4)$ нмоль/г составило 168,2%.

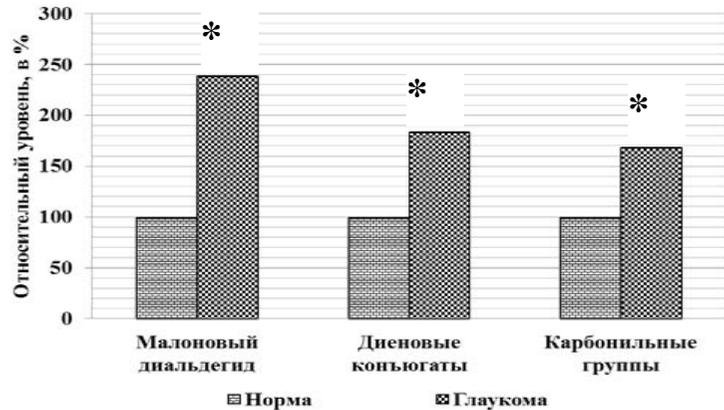


Рис. 2. Относительный уровень продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных групп белков в слезной жидкости больных при глаукоме (* - уровень значимости различия данных по отношению к норме ($p < 0,05$)).

Таблица 2

Содержание продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных групп белков в слезной жидкости больных при глаукоме

Биохимические показатели	Статистические показатели	Норма	Больные глаукомой
Малоновый диальдегид, мкмоль/мл	n	24	66
	M	5,2	12,4
	m	0,4	0,8
	p	-	<0,001
	%	100	238,5
Диеновые конъюгаты, мкмоль/мл	n	24	66
	M	0,48	0,88
	m	0,04	0,06
	p	-	<0,001
	%	100	183,3
Карбонильные группы, нмоль/г белка	n	24	66
	M	85,2	143,3
	m	6,4	9,5
	p	-	<0,001
	%	100	168,2

Обобщая результаты исследований можно отметить, что у больных глаукомой повышается содержание малонового диальдегида на 87,8% - в камерной влаге и на 138,5% - в слезной жидкости,

содержание диеновых конъюгатов на 56,1% - в камерной влаге и на 83,3% - в слезной жидкости, уровень карбонильных групп был повышен на 48% - в камерной влаге и на 68,2% - в слезной жидкости.

Общий анализ результатов биохимических исследований слезной жидкости и камерной влаги свидетельствует, что патохимические нарушения, выявленные нами в экспериментах в тканях глаза при моделировании гипертензии, нашли свое подтверждение в изменениях показателей оксидативного повреждения белков и липидов в слезной жидкости и камерной влаге.

Выводы

1. При глаукоматозном процессе выявлены значительные повышения скорости оксидативного повреждения белков и липидов, что особенно выражено в слезной жидкости больных (содержание малонового диальдегида повысилось на 138,5%, диеновых конъюгатов — на 83,3%, карбонильных групп — на 68,2% по сравнению с нормой).

2. Перспективой дальнейших исследований является коррекция выявленных метаболических изменений при глаукоме.

Литература

1. Алексеев В.Н. Роль перекисного окисления в патогенезе первичной открытоугольной глаукомы / В.Н. Алексеев, Е.Б. Мартынова, В.И. Садков // Офтальмол. журн. - 2000. - № 1. - С. 12-17.
2. Бунин А. Я. Об участии процессов перекисного окисления липидов в деструкции дренажной системы глаза при открытоугольной глаукоме / А.Я. Бунин, М.Н. Бабижаев, А.В. Супрун // Офтальмол. журн. - 1985. - № 2. - С. 13-16.
3. Бунин А.Я. Глаукома / А.Я. Бунин. - М., 1994. - 218 с.
4. Жабоедов Г.Д. Современные аспекты патогенеза, диагностики, клиники и лечения открытоугольной глаукомы / Г.Д. Жабоедов // Фармакологічний Вісник. - 1999. - № 1-2. - С. 2-7.
5. Кравчук Е.А. Роль свободно-радикального окисления в патогенезе заболеваний глаз / Е.А. Кравчук // Вест. офтальмол. - 2004. - № 5. - С. 48-51.
6. Курьшева Н.И. Роль свободнорадикальных реакций камерной влаги в развитии первичной открытоугольной глаукомы / Н.И. Курьшева, М.И. Винецкая, В.П. Еричев // Вестн. офтальмол. - 1996. - № 4. - С. 3-5.
7. Наследов А. SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках / А.Наследов. - СПб.: Питер, 2005. - 416 с.
8. Новые методы биохимического анализа. - Изд-во Ленинградского ун-та, 1991. - 395 с.
9. Сердюк В.Н. Состояние тиол-дисульфидной системы белков сетчатки и зрительного нерва при развитии экспериментальной глаукомы /

В.Н. Сердюк // Проблемы экологической та медичної генетики і клінічної імунології: зб.наук.праць. - Київ; Луганськ, 2011. - Вип. 6 (108). - С. 239-245.

10. Сердюк В.Н. Изучение восстановительного потенциала глутатиона в сетчатке и зрительном нерве при моделировании открытоугольной глаукомы у кроликов / В.Н. Сердюк // Таврический медико-биол. вестник. - 2011. - Т.14, № 1. - С. 142-145.

11. Сердюк В.Н. Исследование уровня продуктов перекисного окисления липидов в сетчатке и зрительном нерве при экспериментальной глаукоме / В.Н. Сердюк // Харківська хірургічна школа. - 2011. - № 6. - С. 80-83.

12. Bergmeyer H.U. Methoden der enzymatischen analyse / Herausgegeben von H. U. Bergmeyer. - Berlin, 1986. - S. 2254 - 2265.

13. Boland M.V. Risk factors and open-angle glaucoma: classifications and application / M.V. Boland, H.A. Quigley // J. Glaucoma. - 2007. - Vol. 16, № 4. - P. 406-418.

14. Cai J. Oxidative damage and protection of the RPE (Review) / J. Cai, K.C. Nelson, M. Wu [et al.] // Progress in retinal and eye research. - 2000. - Vol. 19 (2). - P. 205-221.

15. Chen J. A new clue to glaucoma pathogenesis / J. Chen, F. Kadlubar // Am. J. Med. - 2003. - Vol. 114. - P. 697-698.

16. de Gregorio F. Analysis of different risk factors in primary open angle glaucoma / F. De Gregorio, G. Stecchi, E. Ubaldo // Abstracts 4th I.G.S. - 2003. - P. 64.

16. Gulati V. Monitoring glaucoma in the developing world / V. Gulati, H. Agarwal, R. Sihota // Asian J. Ophthalmol. - 2002. - Vol. 4, № 1. - P. 3-8.

17. Kumar D. M. Oxidative stress in glaucoma: a burden of evidence / D.M. Kumar, N. Agarwal // J Glaucoma. - 2007. - Vol. 16. - P. 334-343.

18. Lagreze W.A. Neuroprotection in ischemia of the retina an animal model / W.A. Lagreze, T. Otto, T.J. Feuerstein // Ophthalmologe. - 1999. - Vol. 96, № 6. - P. 370-374.

19. Pache M. A sick eye in a sick body? Systemic findings in patients with primary open-angle glaucoma / M. Pache, J. Flammer // Surv. Ophthalmol. - 2006. - Vol. 51, № 3. - P. 179-212.

20. Quigley H.A. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020 / H.A. Quigley, A.T. Broman // Br. J. Ophthalmol. - 2006. - Vol. 90. - P. 262-267.

21. Ritch R. The Glaucomas / R. Ritch, M. Shields, T. Krupin. - St. Luis: CV Mosby, 1996. - 432 p.

22. Reduction of intraocular pressure in a glaucoma patient undergoing hormone replacement therapy / M.O. Sator, J. Akramian, B. Joura [et al.] // Maturitas. - 1998. - Vol. 29. - P. 93-95.

23. Tezel G. The role of glia, mitochondria, and the immune system in glaucoma / G. Tezel // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. - 2009. - Vol. 50, № 3. - P. 1001-1012.

24. Weber A.J. Effects of optic nerve injury, glaucoma, and neuroprotection on the survival, structure, and function of ganglion cells in the mammalian retina / A.J. Weber, C.D. Harman // J. Physiol. - 2008. - Vol. 586. - P. 4393-4400.

Резюме

Сердюк В.Н. Исследование уровня продуктов окислительного повреждения белков и липидов в слезной жидкости и камерной влаге у больных ПОУГ.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании уровня продуктов окислительного повреждения белков и липидов в слезной жидкости и камерной влаге у больных ПОУГ. При глаукоматозном процессе выявлены значительные повышения скорости окислительного повреждения белков и липидов, что особенно выражено в слезной жидкости больных (содержание малонового диальдегида повысилось на 138,5%, диеновых конъюгатов — на 83,3%, карбонильных групп — на 68,2% по сравнению с нормой).

Ключевые слова: глаукома, белки, липиды, нейропатия, перекисное окисление.

Резюме

Сердюк В.Н. Дослідження рівня продуктів окисного окислювального пошкодження білків і ліпідів в слізній рідині і камерній волозі у хворих на ПВКГ.

Мета цієї роботи полягала в дослідженні рівня продуктів окисного пошкодження білків і ліпідів у слізній рідині та камерній волозі у хворих на ПВКГ. При глаукоматозному процесі виявлені значні підвищення швидкості окислительного пошкодження білків і ліпідів, що особливо виражено в слізній рідині хворих (вміст малонового діальдегіду підвищився на 138,5%, дієнових кон'югатів — на 83,3%, карбонільних груп — на 68,2% порівняно з нормою).

Ключові слова: глаукома, білки, ліпіди, нейропатія, перекисне окислення.

Summary

Serdyuk V.N. Investigation of the level of products of proteins' and lipids' oxidative damage in the tear fluid and chamber moisture in POAG patients.

Studying the level of products of oxidative damage to proteins and lipids in the tear fluid and moisture chamber in patients with POAG. In glaucomatous process revealed significant increase rate of oxidative damage of proteins and lipids, which is especially pronounced in the tear fluid of patients (malondialdehyde content increased to 138.5% of diene conjugates — 83.3% carbonyl groups — 68.2% compared the norm).

Key words: glaucoma, proteins, lipids, neuropathy, lipoperoxidation.

Рецензент: д.мед.н., проф. А.М. Петруня