

Исследование молекулярных механизмов регуляции апоптоза ганглиозных клеток сетчатки при первичной открытоугольной глаукоме

**Т.Г. Каменских, Н.Б. Захарова, И.О. Колбенеv,
И.Д. Каменских, В.С. Сидельникова**

Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского

Резюме

Цель: исследование молекулярных механизмов регуляции апоптоза ганглиозных клеток сетчатки у больных первичной открытоугольной глаукомой.

Методы: в исследование включали пациентов с диагнозом первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) I, II, III стадий. Контрольную группу составили пациенты без значимой офтальмологической патологии и заболеваний ЦНС той же возрастной группы. Всем пациентам проводили комплексное обследование, включающее визометрию, кинетическую периметрию, биомикроофтальмоскопию, тонометрию (по Маклакову), гониоскопию, конфокальную томографию диска зрительного нерва, исследование зрительных вызванных потенциалов. Также проводили определение белка S-100, BDNF (нейротрофического фактора головного мозга), CNTF (цилиарного нейротрофического фактора роста), белка NF-200, концентрацию маркеров активности аутоиммунного воспалительного процесса.

Результаты и заключение: всего было включено 64 пациента (64 глаза) с ПОУГ. Контрольную группу составили 32 пациента. Имеются значимые отличия концентраций нейротрофических факторов, маркеров нейродегенерации и аутоиммунного процесса у больных с быстро- и медленно прогрессирующей глаукомой. Активация продукции нейротрофических факторов является компенсаторной реакцией организма, противостоящей ускорению апоптоза ганглиозных клеток сетчатки. Повышение концентраций S-100 и антител к ОБМ на поздних стадиях глаукомы является показателем общего процесса нейродегенерации в ЦНС, сопутствующего дегенерации ганглиозных клеток и зрительных нервных волокон.

Ключевые слова: первичная открытоугольная глаукома, апоптоз, нейротрофические факторы, нейродегенерация.

Abstract

Study of molecular mechanisms of regulation of retinal ganglion cells apoptosis in primary open-angle glaucoma

**T.G. Kamenskikh, N.B. Zakharova, I.O. Kolbenev,
I.D. Kamenskikh, V.S. Sidelnikova**

Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky

Purpose: Study of molecular mechanisms of regulation of retinal ganglion cells apoptosis in primary open-angle glaucoma.

Methods: Patients with POAG of I-III stages were included into the study. The control group consisted of patients without significant ophthalmologic pathology. In all patients complex examination including visometry, kinetic perimetry, biomicrophthalmoscopy, tonometry (Maklakov), gonioscopy, OCT of an optic nerve, testing of visually evoked potentials was performed. It was also evaluation of protein S100, BDNF, CNTF, protein NF-200 and markers of autoimmune inflammatory process which was undertaken.

Results and conclusion: 64 patients (64 eyes) with POAG were included. 32 patients were enrolled into the control one. There were significant differences between patients with rapidly and slowly progressing glaucoma in concentration of neurotrophic factors, autoimmune markers and markers of neurodegeneration. Activation of neurotrophic factors production is a compensatory reaction of the organism against the speeding up process of ganglia cells apoptosis. Increase of the concentration of S-100 and antibodies to the myelin protein in the last stages of POAG could be an indicator of general degeneration process of central nervous system.

Keywords: apoptosis, primary open-angle glaucoma, neurotrophic factors, neurodegeneration.

При первичной открытоугольной глаукоме (ПОУГ) дегенеративный процесс захватывает не только сетчатку и зрительный нерв, но и весь зрительный путь. Имеются сведения, что эта патология аналогична другим нейродегенеративным заболеваниям (болезнь Альцгеймера или Паркинсона) [1, 2, 6, 7]. По мнению ряда авторов, сдавление аксонов ганглиозных клеток искривленными ламинарными перегородками при повышении внутриглазного давления (ВГД) снижает аксоплазматический ток и вызывает снижение ретроградного аксонального транспорта. Это приводит к уменьшению доставки к телу ганглиозной клетки сетчатки нейротрофических факторов. Таким образом, в ускорении апоптоза ганглиозных клеток сетчатки большое значение имеет недостаточность трофического обеспечения, уровень которого определяет выбор между генетическими программами апоптоза и антиапоптозной защиты.

Нейропротекторные факторы стимулируют выживание ганглиозных клеток сетчатки человека в культурах ткани, что было доказано в работах *in vitro* [4, 8, 9]. Наиболее изучено действие нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), он стимулирует рост нервной ткани, влияет на метаболизм и внутреннюю структуру нейронов. У пациентов с ПОУГ было выявлено снижение уровня BDNF в сыворотке крови и слезной жидкости, усугубляющееся по мере прогрессирования заболевания [2–4, 10].

Цилиарный нейротрофический фактор (CNTF) относится к семейству нейропоэтических цитокинов. CNTF рассматривается как ключевой фактор дифференцировки для развивающихся нейронов и глиальных клеток. Он обеспечивает трофику и участвует в защите поврежденных или аксонотомированных нейронов [9].

О выраженности нейродегенеративных процессов в центральной нервной системе (ЦНС) можно судить по

уровню маркеров повреждения нервной ткани. Белок NF-200 является специфическим белком аксонов, дегенерация нервных волокон сопровождается ростом антител к данному белку.

Белок S-100 – специфический белок астроцитарной глии, увеличение его концентраций в плазме и спинномозговой жидкости свидетельствует о повреждении головного мозга. Раннее определение и контроль уровня S-100 позволяют выявить и подтвердить наличие повреждений мозга на ранней стадии, когда возможно наиболее успешное лечение.

Промежуточные филаменты в астроглии и клетках глиального происхождения образует глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP). Он высвобождается в кровь при ишемии, гипоксии.

Антитела к общему белку миелина (ОБМ) – маркер деструкции миелина. ОБМ является специфическим белком миелиновых оболочек аксонов; рост антител к нему сопровождает процессы патологических изменений в нервных волокнах, в т.ч. при демиелинизирующих процессах. Уровень ОБМ повышается в течение нескольких дней после инсульта и отражает деструкцию интактных миелиновых оболочек.

Факторами, провоцирующими апоптоз ганглиозных клеток, являются ишемия и гипоксия, связанные с нарушением кровообращения, обусловленным атеросклерозом, нарушениями вегетативной нервной регуляции, офтальмогипертензией. Ишемия сетчатки вызывает выработку вазопротрофинового фактора или нарушает баланс между стимуляторами и ингибиторами ангиогенеза. Под действием ангиогенных факторов, стимулирующих миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток, происходит рост и развитие новообразованных сосудов в сетчатке, радужной оболочке, трабекулярной сети.

Так как VEGF-фактор вырабатывается клетками сетчатки и является фактически маркером ишемии, мы считали целесообразным исследовать его уровень у больных ПОУГ.

МСР-1-моноцитарный хемоаттрактантный протеин – маркер аутоиммунного воспаления. МСР играет патогенную роль при множестве заболеваний, характеризующихся инфильтрацией мононуклеарными клетками, включая атеросклероз, ревматоидный артрит и аллергическую реакцию. Кроме того, повышенные уровни МСР-1 были выявлены у лиц с болезнью Альцгеймера, а также при рассеянном склерозе [8–10].

Цель: исследование молекулярных механизмов регуляции апоптоза ганглиозных клеток сетчатки у больных ПОУГ.

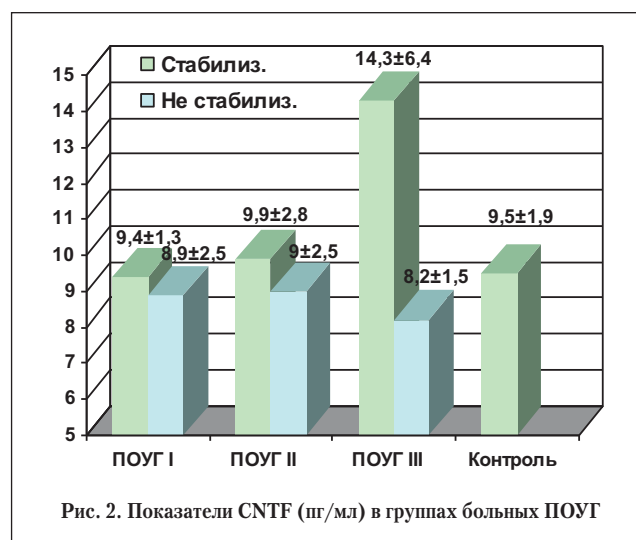
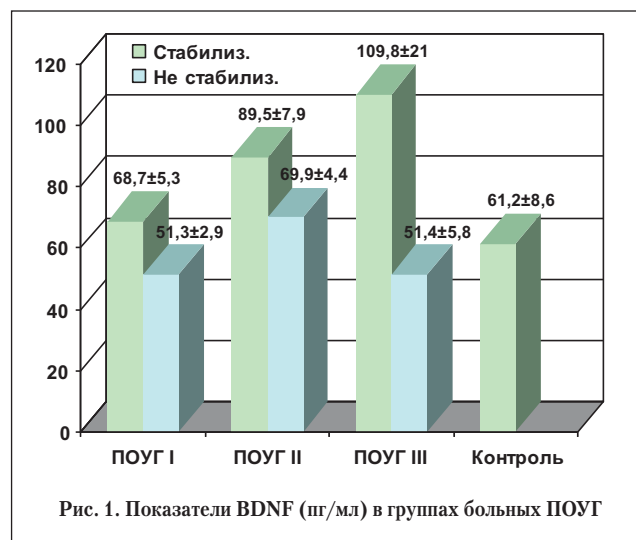
Материал и методы исследования: проведено обследование 64 больных (64 глаза) с диагнозом ПОУГ I–III стадий в возрасте от 66 до 72 лет, из них женщин – 34, мужчин – 30. Длительность заболевания составляла от 2 до 10 лет. Целевой уровень ВГД у больных был достигнут медикаментозно: применением 0,5% раствора тимолола (8 больных), 0,004% раствора травопта (12 больных), их фиксированной комбинации – Дуотрава (27 больных) или с помощью антиглаукомной операции (лазерной) (5 больных), микрохирургической проникающей (8 больных) либо непроникающей типа (4 больных) в различные сроки.

В исследовании у каждого из пациентов рассматривали показатели состояния глаза с более продвинутой стадией глаукомы, исключая терминальную. Несмотря на достижение ВГД цели, у 42 отобранных пациентов глаукомный процесс не был стабилизирован (данные НРТ, ком-

пьютерной периметрии). Критериями исключения были терминальная глаукома, аномалии рефракции средней и высокой степеней, недостаточная прозрачность оптических сред, повышенное ВГД, возрастная макулярная дегенерация, органические поражения ЦНС. Сопутствующие заболевания – гипертоническая болезнь I–II степени у 25 больных, ишемическая болезнь сердца (ИБС) – отмечались у 13 больных. Контрольную группу составили 32 пациента той же возрастной группы без значимой офтальмологической патологии и заболеваний ЦНС.

Всем пациентам проводили комплексное обследование, включавшее визометрию, кинетическую периметрию, биомикроофтальмоскопию, тонометрию (по Маклакову), гониоскопию. Выполнялись конфокальная НРТ-томография диска зрительного нерва (Heidelberg Retina Tomograph II, Германия), оценка поля зрения с помощью статического периметра (Oculus twinfield-2, Германия), исследование зрительных вызванных потенциалов (Roland, Германия). Также проводилось определение белка S-100 с помощью наборов Fjirebio, BDNF (нейротрофический фактор головного мозга), CNTF (цилиарный нейротрофический фактор роста), NF-200 (BCM Diagnostics).

Концентрацию маркеров активности аутоиммунного воспалительного процесса: моноцитарного хемоаттрактанта (МСР), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа, используя соответствующие наборы реагентов (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск).

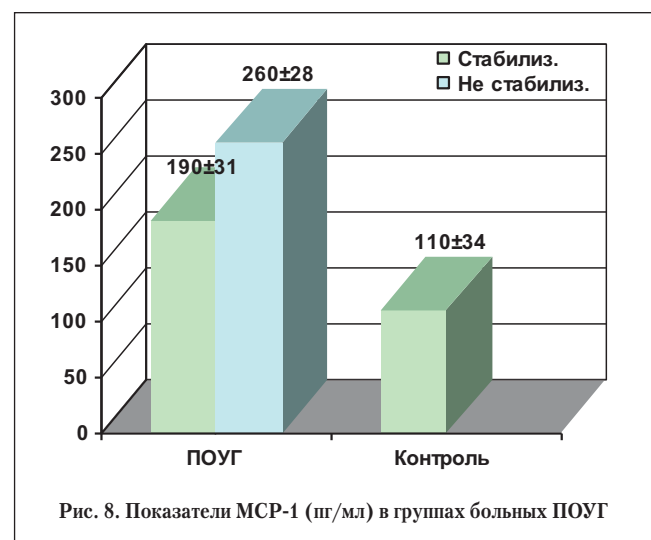
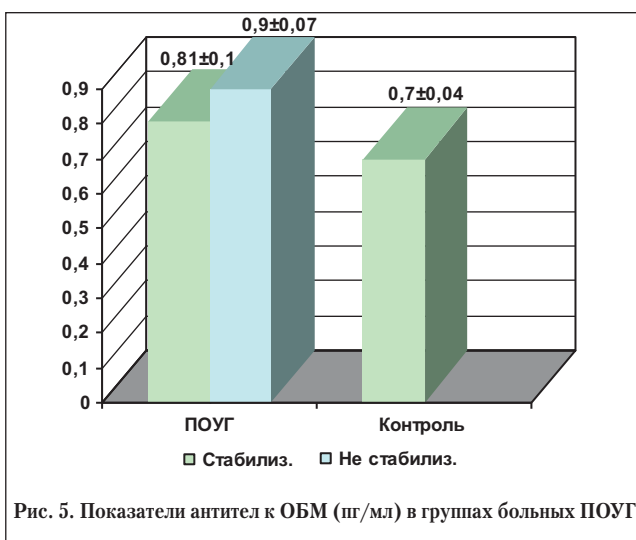
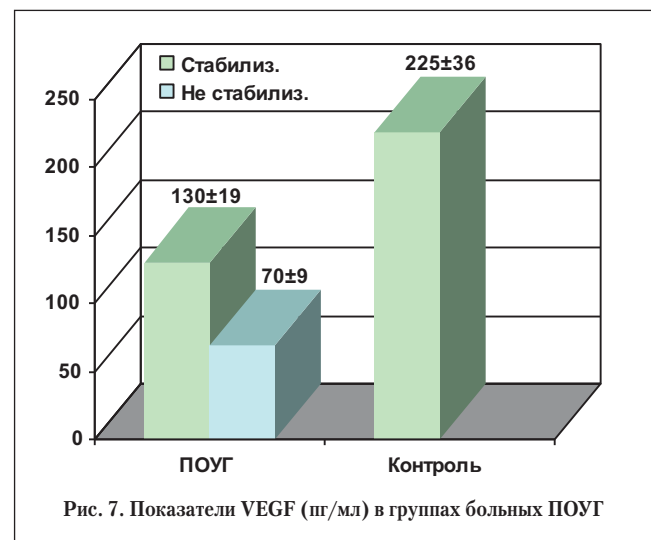
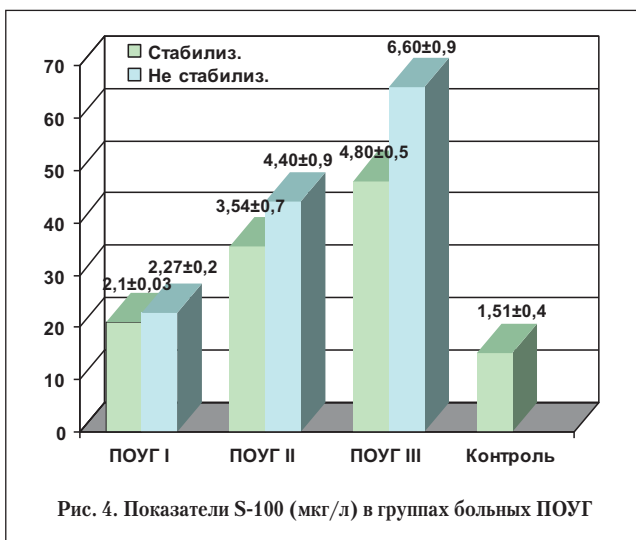
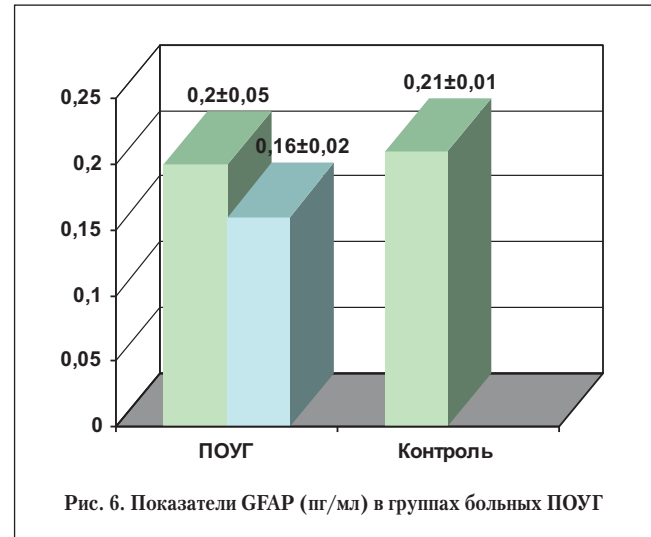
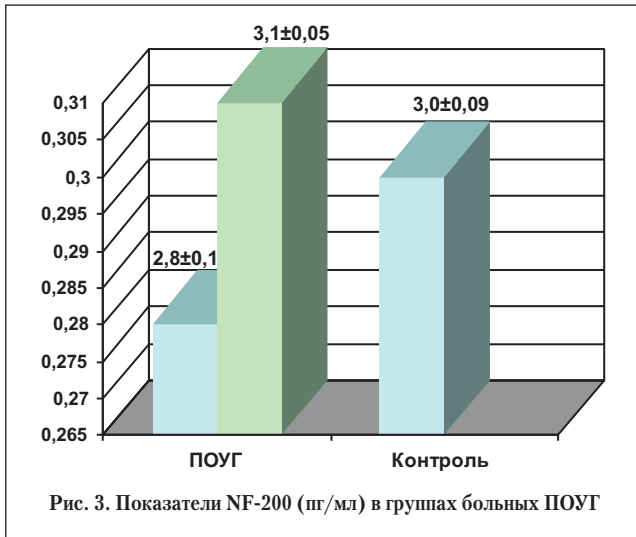


Для забора крови, который проводили у пациентов натощак, в утренние часы из кубитальной вены, и получения сыворотки использовали систему Vacuette, снабженную активатором свертывания крови и разделительным гелем. Аликвоты сыворотки крови разливали в пробирки с крышками типа Eppendorf объемом 2 мл и хранили до проведения исследования при -25°C .

Статистический анализ результатов обследования и лечения пациентов осуществляли с помощью пакета при-

кладных программ Statistica 6.0. Поскольку распределение значений в выборках отличалось от нормального, в процессе статистической обработки использовали методы непараметрического анализа.

Результаты и обсуждение. В результате исследований был выявлен ряд закономерностей. Анализ содержания в плазме крови нейротрофического фактора головного мозга показал, что имеются отличия в его концентрации у больных ПОУГ с различными стадиями процесса



(рис. 1). Также выявлены отличия по данному показателю у лиц со стабилизацией глаукомы и больных с зафиксированным в течение 1 года прогрессированием заболевания (по данным HRT-томографии и компьютерной периметрии). У больных с быстро прогрессирующей глаукомой III стадии уровень BDNF значимо выше, чем в группе контроля и у пациентов со стабилизацией глаукомного процесса. Не исключено, что именно этот механизм антиапоптотической защиты позволяет предотвратить потерю ганглиозных клеток сетчатки.

Те же закономерности прослеживаются и в отношении цилиарного нейротрофического фактора, который участвует в защите поврежденных или аксонотомированных нейронов. Его концентрация возрастает по мере прогрессирования глаукомы у лиц с медленным развитием болезни (рис. 2).

Содержание белка NF-200, который является специфическим белком аксонов, ниже, чем в группе контроля у больных со стабилизированным процессом независимо от стадии, и выше при ускоренной деструкции ганглиозных клеток и их аксонов (рис. 3).

Средние показатели белка S-100, маркера нейродегенерации, выше, чем в группе контроля у всех больных глаукомой. Причем ярко выражено его нарастание по стадиям при более высоких значениях в случае нестабилизации глаукомы (рис. 4).

Количество антител к общему белку миелина, уровень которого повышается после инсульта, при рассеянном склерозе и который отражает деструкцию миелиновых оболочек, несколько выше у больных с нестабильной глаукомой, чем при стабилизации процесса и в контрольной группе, однако различия не значимы (рис. 5).

Глиальный фибриллярный кислый белок, показатель гибели аксонов и глиоза у больных со стабильной глаукомой – в пределах данных контрольной группы и ниже при быстром прогрессировании процесса (рис. 6).

Выработка вазопротрофического фактора оказалась ниже у больных глаукомой, особенно при нестабилизации. Это может свидетельствовать об отсутствии ответа на ишемию (рис. 7).

Показатель же аутоиммунного процесса – MCP-1 выше вдвое у больных глаукомой, особенно быстро прогрессирующей (рис. 8).

Корреляционная матрица показывает, что имеется значимая положительная корреляция между BDNF и площадью нейроретинального пояса (коэффициент корреляции составляет 0,654) и отрицательная с латентностью ЗВП (коэффициент корреляции – 0,409). CNTF отрицательно коррелирует с отношением площади экскавации к площади диска зрительного нерва (коэффициент корреляции 0,55). Белок S-100 имеет высокую отрицательную корреляцию с площадью нейроретинального пояса (коэффициент корреляции – 0,690). Наиболее сильная корреляционная связь выявлена между ОБМ и латентным периодом ЗВП (коэффициент корреляции составляет 0,845). NF-200 и GFAP коррелируют с антителами к ОБМ (коэффициенты корреляции – 0,563 и 0,604 соответственно). Значения VEGF коррелируют с MCP-1 (коэффициент корреляции – 0,467).

Выводы:

1. Имеются значимые отличия концентраций нейротрофических факторов, маркеров нейродегенерации и аутоиммунного процесса у больных с быстро- и медленно прогрессирующей глаукомной оптической нейропатией.

2. У больных ПОУГ с относительной стабилизацией глаукомного процесса фиксируется повышение содержания в плазме крови нейротрофических факторов. Активация продукции нейротрофических факторов является компенсаторной реакцией организма, противостоящей ускорению апоптоза ганглиозных клеток сетчатки.

3. Повышение концентраций S-100 и антител к ОБМ на поздних стадиях глаукомы – показатель общего процесса нейродегенерации в ЦНС, сопутствующего дегенерации ганглиозных клеток и зрительных нервных волокон.

4. Низкие относительно группы контроля показатели VEGF у больных ПОУГ являются показателем нарушения компенсаторных механизмов реакции глаза на ишемию.

5. Рост количества MCP-1 у больных глаукомой может свидетельствовать об аутоиммунном компоненте процесса прогрессирования заболевания.

6. Исследование молекулярных механизмов апоптоза применительно к ПОУГ позволяет расширить представление о патогенезе данного заболевания.

Литература

1. Национальное руководство по глаукоме / под ред. Е.А. Егорова, Ю.С.Астахова, А.Г. Шуко. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 279 с.
2. Курьшева Н. И. Глаукомная оптическая нейропатия. М., 2006. 136 с.
3. Курьшева Н.И., Гаврилова Н.А., Аникина А.Ю. Исследование нейротрофического фактора BDNF у больных первичной глаукомой // Глаукома. 2006. № 4. С. 9–15.
4. Шпак А.А., Гаврилова Н.И., Ланевская Н.И., Дегтярева М.В. Нейротрофический фактор головного мозга у больных первичной глаукомой // Офтальмохирургия. 2006. № 4 – С. 14–16.
5. Barde Y.A., Davies A.M., Johnson J.E., et al. Brain derived neurotrophic factor // Prog. Brain Res. 1987. Vol. 71. P. 185–189.
6. Gupta N., Ang L.C., Noel de Tilly L. et al. Human glaucoma and neural degeneration in intracranial optic nerve, lateral geniculate nucleus and visual cortex // Br. J. Ophthalmol. 2006. Vol. 90. P. 674–678.
7. Gupta N., Greenberg G., de Tilly L.N. et al. Atrophy of the lateral geniculate nucleus in human glaucoma by magnetic resonance imaging // Br. J. Ophthalmol. 2008. Vol. 93. P. 56–60.
8. Minckler D.S., Bunt A.H. Orthograde and retrograde axoplasmic transport during acute ocular hypertension in the monkey // Invest Ophthalmol Vis Sci. 1977. Vol. 16. P. 426.
9. Tokumine J., Kakinohana O., Cizkova D. et al. Changes in spinal GDNF, BDNF, and NT-3 expression after transient spinal cord ischemia in the rat // J. Neurosci. Res. 2003. Vol. 74. P. 552–561.
10. Quigley H.A., McKinnon S.J., Zack D.J. et al. Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2000. Vol. 41. P. 3460.