

Результаты исследования апоптоза клеток дренажной зоны методом иммунохимического анализа у пациентов с продвинутыми стадиями глаукомы

**В.Ю. Огородникова¹, Е.А. Егоров¹, А.В. Куроедов²,
Ю.В. Маркитантова³, А.Н. Петров⁴**

¹ ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова,

² ФКУ МУНКЦ им. П.В. Мандрыка МО РФ, Москва,

³ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва,

⁴ Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена

Резюме

Цель. Оценить степень выраженности апоптоза клеток дренажной зоны с применением метода иммунохимического анализа у пациентов с различными стадиями первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ).

Материалы и методы. В исследование включено 20 пациентов (20 глаз) с развитой и далеко зашедшей стадиями первичной открытоугольной глаукомы. Средний возраст пациентов составил $69,25 \pm 8,04$ года, а документально установленный анамнез заболевания $5,66 \pm 5,86$ года. В ходе проведенной всем пациентам антиглаукомной операции был выделен склерально-трабекулярный комплекс, который затем подвергался иммунохимическому анализу. Ядра клеток были окрашены ядерным красителем Hoechst 33342. Для выявления апоптотных клеток применяли метод TUNEL.

Результаты. Обнаружена умеренная положительная корреляция возраста пациентов и количества апоптотных клеток на развитой стадии заболевания ($r=0,57$). Для далеко зашедшей стадии глаукомы характерна умеренная положительная корреляция степени апоптоза клеток и длительности анамнеза заболевания ($r=0,55$). Статистической разницы в количестве апоптотных клеток дренажной зоны при развитой и далеко зашедшей стадиях обнаружено не было.

Заключение. Иммунохимический метод исследования апоптоза клеток дренажной зоны является перспективным и может быть предложен для дальнейшего изучения механизмов развития глаукомного процесса.

Ключевые слова: глаукома, апоптоз, дренажная зона, TUNEL-исследование.

Abstract

Immunochemical analysis of drainage areas cells in advanced glaucoma patients

**V.Yu. Ogorodnikova¹, E.A. Egorov¹,
A.V. Kuroyedov², Yu.V. Markitantova³, A.N. Petrov⁴**

¹ Pirogov Russian National Research Medical University,

² Mandryka Medical Training and Research Clinical Center, Moscow,

³ Koltzov Institute of Developmental Biology, Moscow,

⁴ Hertzen Moscow Research Oncological Institute, Moscow, Russia

Purpose. To estimate the degree of apoptosis in the drainage area in different glaucoma stages.

Material and methods. 20 patients (20 eyes) with primary open angle glaucoma were included. The mean age was $69,25 \pm 8,04$ years, glaucoma in past history – for $5,66 \pm 5,86$ years. All patients underwent a penetrating filtering surgery. Scleral–trabecular complex was separated and investigated by a TUNEL assay.

Results. Moderate positive correlation was found between a patient age and an apoptosis in a II stage of a glaucoma ($r=0,57$). In advanced glaucoma moderate positive correlation was found between the duration of the glaucoma history and the cell apoptosis ($r=0,55$). Statistical significant difference in the number of apoptotic cells of different glaucoma stages was not found.

Conclusion. Immunochemical method may be proposed for the further study of the mechanism of glaucoma process.

Key words: glaucoma, apoptosis, drainage area, TUNEL assay.

Введение

Одним из перспективных путей диагностики и последующего лечения таких нейродегенеративных заболеваний, как глаукома, является выявление клеточных источников регенерации и способов их стимулирования. В последние годы в литературе появилось значительное количество работ, посвященных изучению нейродегенеративных процессов в патогенезе глаукомы.

Известно, что значительную роль в развитии глаукомной оптической нейропатии играет механизм апоптоза в ганглионарных клетках сетчатки [1,9,15]. Однако проведение таких исследований является непростой задачей. Для выявления и изучения клеток, находящихся в состоянии апоптоза, было разработано множество разнообразных ме-

тодов и их модификаций. Большинство работ в офтальмологии было ориентировано на измерение размеров и плотности клеток, в меньшей степени – на изучение состава наружной мембраны, и, наконец, никогда не исследовались фрагментация ядерной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и изменения содержания молекулярных маркеров в клетках. Такие ограничения связаны с тем, что изучение процессов в тканях глаза возможно реализовать только в энуклеированных глазах или экспериментальных условиях. Клинические исследования «живых» глаз возможны на примере образцов дренажной зоны, полученных в ходе проведения хирургических антиглаукомных вмешательств. Р.А. Симаковой (1974) было обнаружено, что глаукомный анамнез в целом и переход от стадии к стадии усугубляют дистрофию дренажной зоны [10].

Нами ранее было проведено электронно-микроскопическое исследование трабекулярной сети у пациентов с продвинутыми стадиями глаукомы и обнаружено значительное число дегенеративно-измененных клеточных органелл в клетках с разной степенью апоптоза [8]. Однако существенным недостатком световой и электронной микроскопии является отсутствие возможности объективной оценки полученных данных. Помимо этого следует учитывать, что апоптоз реализуется двумя путями: при участии рецепторов клеточной поверхности либо вследствие повреждения внутриклеточных структур (чаще всего митохондрий). В своем большинстве отечественные ученые указывают лишь на последний (митохондриальный) путь гибели клеток [2–4,6,7]. В то же время в зарубежной литературе мы встретили работы по оценке выраженности апоптоза в норме, при первичной открытоугольной глаукоме (ПОУГ) и закрытоугольной глаукоме с использованием иммунохимических методик [12,15]. При этом авторы не приводят данные, касающиеся характеристик апоптоза при прогрессировании глаукомного процесса с использованием вышеуказанного метода лабораторной диагностики. В отечественной литературе нами не установлено работ, авторы которых проводили бы иммунохимические исследования склерально-трабекулярного комплекса, что позволило определить цель настоящего исследования: оценить степень выраженности апоптоза клеток дренажной зоны у пациентов с различными стадиями ПОУГ.

Материалы и методы

Исследование проводилось на клинической базе офтальмологического отделения ФКУ «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 антиглаукомную гипотензивную терапию (бета-блокаторы, аналоги простагландинов и местные 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 $69,25 \pm 8,04$ года, а документально установленный анамнез заболевания – $5,66 \pm 5,86$ года. Исследуемые были сгруппированы согласно стадиям заболевания (табл. 1). Во всех случаях диагноз глаукомы был подтвержден данными объективного и дополнительных обследований. Большинство пациентов имели далеко зашедшую стадию глаукомы (55%), пациентов мужского пола было больше (60%).

Несмотря на очевидную разницу в возрасте и установленном анамнезе заболевания, все результаты были статистически недостоверны ($p > 0,05$).

Всем пациентам была выполнена антиглаукомная операции проникающего типа. В ходе оперативного вмешательства удаляли склерально-трабекулярный комплекс, который затем подвергали иммунохимическому анализу. Для исследования образцы фиксировали в 4% нейтральном формалине, приготовленном на 0,1 М PBS (рН 7,4) с 5% сахарозой. Подготовка препаратов проводилась по стандартной методике. С помощью криостата Leica M1900 (Leica, Германия) были получены поперечные срезы толщиной 10 мкм. Ядра клеток были окрашены ядерным красителем Hoechst 33342. Иммунофлуоресценцию анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа 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, Promega, США). Оценка и анализ полученных изображений проводились 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 (программа Statistica, версия 6.0, StatSoft, Inc., Австралия – США) также с использованием лицензионного программного обеспечения.

Результаты

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

Из таблицы 1 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 $25,34 \pm 7,70$; $p > 0,05$). Такие данные противоречат опубликованным ранее данным исследований, проведенных с помощью световой и электронной микроскопии [10,13]. Однако недостатком этих методов исследования является отсутствие возможности объективной оценки результатов. При анализе данных, полученных с помощью 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

Таблица 1. Характеристики исследуемых групп пациентов, n=20

Стадия ПОУГ	Средний возраст, лет	Установленный анамнез, лет	Уровень ВГД, Р., мм рт.ст.
II	$66,8 \pm 9,23$	$7,4 \pm 7,43$	$24,4 \pm 4,5$
III	$71,0 \pm 7,30$	$4,42 \pm 4,68$	$24,4 \pm 4,34$

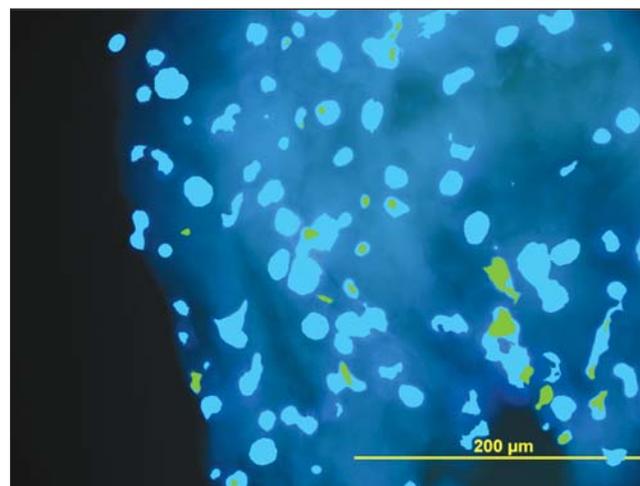


Рис. 1. Иммунохимический препарат после математической обработки с изображением ядер клеток, окрашенных красителем Hoechst 33342 (синий цвет), и ядер клеток, обработанных методом TUNEL (зеленый цвет)

не удалось обнаружить среди проведенных ранее исследований данных сравнения степени выраженности апоптоза клеток дренажной зоны с прогрессированием глаукомного процесса на основании других объективных методик.

На рисунках 2а и 2б представлен пример иммунохимического препарата склерально-трабекулярного комплекса пациента с развитой стадией ПОУГ.

На рисунке 3 (а, б) представлен пример 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 применен параметрический корреляционный анализ.

Для детализации полученные данные были разделены согласно стадиям заболевания. Результаты приведены в таблицах 3 и 4.

Выявлена умеренная положительная корреляция возраста пациентов с количеством апоптозных клеток ($r=0,57$), т.е. чем старше пациент, тем выраженность апоптоза в дренажной зоне больше. Апоптоз является нормальным механизмом процесса развития, инволюции, клеточного гомеостаза, атрофии и других физиологических состояний [5]. Alvarado J. et al. (1981) оценили возрастные изменения количества клеток трабекулярной сети в норме и нашли, что потеря клеток трабекулярного аппарата име-

Таблица 2. Морфологические характеристики дренажной зоны, $M \pm \sigma$, $n=20$

Среднее значение	Общее кол-во клеток, абс.	Кол-во апоптозных клеток, абс.	Апоптозные клетки, %
Группа пациентов с ПОУГ			
II ст.	197,20±143,41	59,80±62,83	23,95±12,30*
III ст.	143,42±76,22	34,57±15,46	25,34±7,70*
Средние данные	165,83±106,84	45,08±41,45	24,76±9,37
* $p > 0,05$			

Таблица 3. Корреляционные характеристики исследуемых параметров дренажной зоны у пациентов с развитой стадией глаукомы, $n=8$

Параметры	Возраст	Длительность анамнеза	Уровень ВГД	Апоптозные клетки, %
Возраст		0,07	0,18	0,57*
Длительность анамнеза	0,07		-0,94*	0,17
Уровень ВГД	0,18	-0,94*		-0,22
Апоптозные клетки, %	0,57*	0,17	-0,22	
* $p < 0,05$				

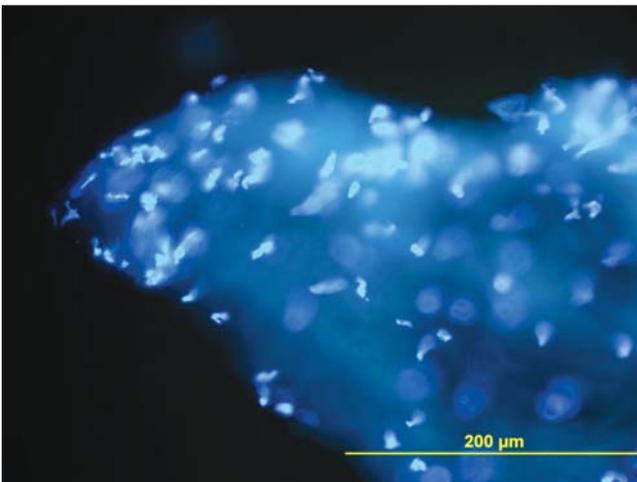


Рис. 2а. Препарат комплекса склера-трабекула пациента К., 66 лет, диагноз: ПОУГ IIв, нестабилизированная глаукома правого глаза. Документально установленный глаукомный анамнез – 10 лет. Окраска ядер клеток красителем Hoechst 33342

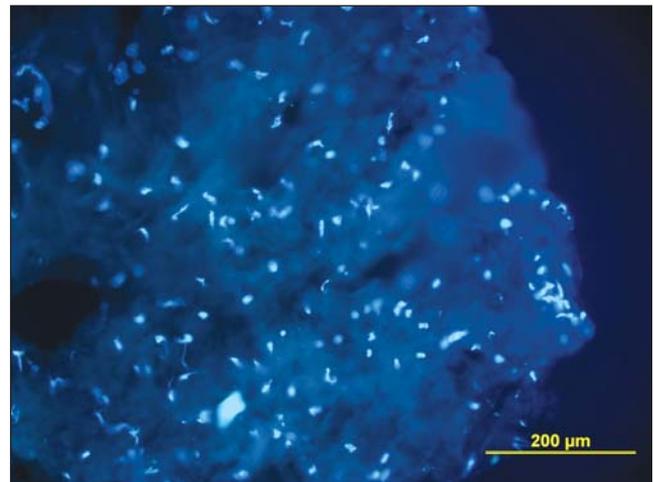


Рис. 3а. Препарат комплекса склера-трабекула пациента В., 69 лет, диагноз: ПОУГ IIIв, нестабилизированная глаукома левого глаза. Документально установленный глаукомный анамнез – 13 лет. Окраска ядер клеток красителем Hoechst 33342

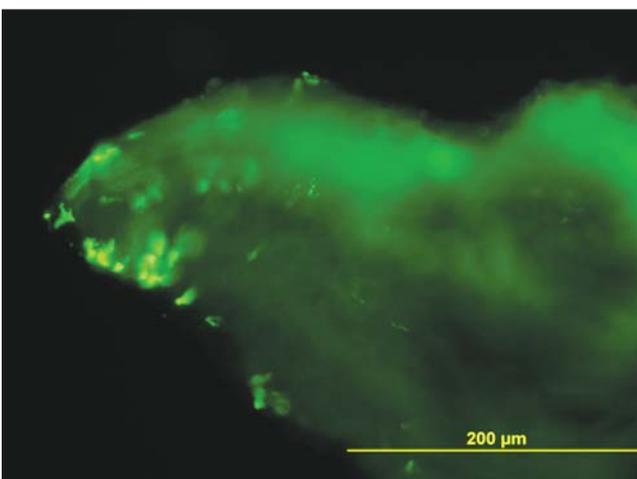


Рис. 2б. Тот же препарат после обработки методом TUNEL (ярко-зеленое окрашивание ядер апоптозных клеток)

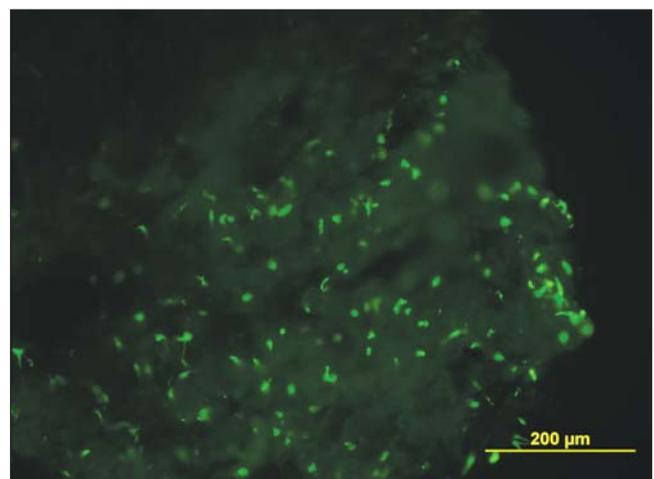


Рис. 3б. Тот же препарат после обработки методом TUNEL (ярко-зеленое окрашивание ядер апоптозных клеток)

ет линейную зависимость от возраста и составляет около 0,58% в год [11]. Считается также, что глаукомный процесс связан с нарушением программы апоптоза, которое может инициироваться рядом патологических факторов [15]. Далее прогрессирование заболевания запускает порочный круг процессов, в том числе и усугубление дистрофических изменений в структурах глаза. Тенденцию усиления дистрофии дренажной зоны при прогрессировании глаукомного процесса отметила Р.А. Симакова (1974) [10]. Согласно полученным нами данным, для развитой стадии заболевания характерна та же зависимость развития дистрофии, что и в норме. При далеко зашедшей стадии глаукомы мы не установили подобной зависимости.

В результате была обнаружена умеренная положительная корреляция количества апоптозных клеток с длительностью глаукомного анамнеза ($r=0,55$), т.е. чем дольше пациент болен глаукомой, тем более выражен процесс апоптоза в его дренажной зоне. Такая зависимость может быть свидетельством того, что запуск и развитие апоптоза имеют мультифакторную природу. Оксидативный стресс, нарушение кальциевого обмена, длительное применение местных гипотензивных препаратов могут влиять на процесс апоптоза, усиливая дистрофические нарушения. При прогрессировании глаукомы возникают условия для усиления апоптоза, и образуется порочный круг патологических реакций.

Кроме того, для обеих стадий болезни была выявлена положительная взаимосвязь развития апоптоза с возрастом и длительностью анамнеза ($r=0,36$ и $r=0,28$, $p<0,05$). Обнаружена отрицательная корреляция апоптоза и уровня офтальмотонуса. Принято считать, что стойкое повышение внутриглазного давления приводит к усилению развития апоптоза [14]. Однако исследования, указывающие на это, проводились лишь с изучением ганглионарных клеток сетчатки и не касались исследований апоптоза в дренажной зоне.

Заключение

Изучение процесса апоптоза является актуальной и сложной проблемой глаукоматологии. Исследование механизмов апоптоза может дать новое, более целостное, концептуальное представление о патогенезе ПОУГ, что позволит разработать и внедрить более эффективные методы ее прогнозирования, мониторинга и лечения. Проблемы на современном этапе в первую очередь связаны с получением достаточного количества материала для клинических исследований, объективной оценкой полученных результатов и стоимостью методики. Методика иммунохимического анализа позволяет провести подсчет и статистическую обработку параметров исследуемого объекта. Преимуществом применяемой методики является количественная оценка как живых клеток, так и клеток, погибших вследствие апоптоза.

Таблица 4. Результаты корреляционного анализа параметров дренажной зоны у пациентов с далеко зашедшей стадией глаукомы, n=12				
Параметры	Возраст	Длительность анамнеза	Уровень ВГД	Апоптозные клетки, %
Возраст		-0,07	0,56	0,08
Длительность анамнеза	-0,07		-0,46	0,55*
Уровень ВГД	0,56	-0,46		-0,35
Апоптозные клетки, %	0,08	0,55*	-0,35	
* $p<0,05$				

В проведенном исследовании не было обнаружено статистической разницы в степени выраженности апоптоза в клетках дренажной зоны развитой и далеко зашедшей стадий ПОУГ. Для развитой стадии глаукомы было установлено увеличение апоптоза с возрастом пациентов. В далеко зашедшей стадии прогрессирование апоптоза зависит от длительности анамнеза заболевания. Была определена потенциальная взаимосвязь уровня офтальмотонуса и апоптоза. Учитывая небольшое число исследованного материала и актуальность вопроса, необходимо дальнейшее продолжение работы в выбранном направлении. Принято считать, что стойкое повышение внутриглазного давления приводит к усилению развития апоптоза [14]. Однако исследования, указывающие на это, проводились лишь с изучением ганглионарных клеток сетчатки и не касались исследований апоптоза в дренажной зоне.

Литература

1. Алексеев В.Н., Мартынова Е.Б., Садков В.И., Самусенко И.А. Роль апоптоза и метаболизма мюллеровских клеток при экспериментальной глаукоме // *Клиническая офтальмология*. 2005. № 2. С. 52–54.
2. Алексеев В.Н., Никитин Д.Н., Садков В.И. и др. Нарушения энергетического обмена у больных первичной открытоугольной глаукомой: Конф. «Глаукома: теория и практика». Сб. научн. тр. СПб., 2012. С. 20–23.
3. Алексеев В.Н., Газизова И.Р., Никитин Д.Н. Морфологические изменения клеток шлеммова канала у больных первичной открытоугольной глаукомой: Научн.-практ. конф. «Восток–Запад». Сб. научн. тр. Уфа, 2012. С. 165–167.
4. Алексеев В.Н., Газизова И.Р. Признаки дегенеративных изменений зрительного тракта у больных первичной открытоугольной глаукомой: «Ерошевские чтения»: Тр. Всерос. конф. Самара, 2012. С. 133–135.
5. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Программированная клеточная смерть (апоптоз) // *Российский онкологический журнал*. 1996. № 1. С. 58–61.
6. Газизова И.Р. Митохондриальная патология и глаукома // *Глаукома*. 2012. № 4. С. 58–64.
7. Газизова И.Р. Коррекция митохондриальной дисфункции как основа нейропротекции при глаукоме // *Офтальмологические ведомости*. 2011. № 4. С. 63–69.
8. Куроедов А.В., Огородникова В.Ю., Смирнова Е.А. Изменение митохондрий в клетках трабекулярной сети глаза больных первичной открытоугольной глаукомой // *Офтальмология*. 2011. № 2. С. 8–11.
9. Нероев В.В., Зуева М.В., Каламкар Г.Р. Молекулярные механизмы ретикулярной ишемии // *Вестник офтальмологии*. 2010. № 3. С. 59–64.
10. Симакова Р.А., Войтова Р.Н. Структурно-обменные изменения дренажной системы глаза у больных первичной глаукомой // *Вестник офтальмологии*. 1974. № 3. С. 15–19.
11. Alvarado J., Murphy C., Polansky J., Juster R. Age-related changes in trabecular meshwork cellularity // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 1981. Vol. 21. № 5. P. 714–727.
12. Baleriola J., Garcia-Feijoo J., Martinez-de-la-Casa J.M., et al. Apoptosis in the trabecular meshwork of glaucomatous patients // *Mol. Vis*. 2008. Vol. 18. № 4. P. 1513–1516.
13. Izzotti A., Sacca S.C., Longobardi M., Cartiglia C. Mitochondrial damage in the trabecular meshwork of patients with glaucoma // *Arch. ophthalmol*. 2010. Vol. 128. № 6. P. 724–730.
14. Ju W.K., Kim K.Y., Lindsey J.D. et al. Intraocular pressure elevation induces mitochondrial fission and triggers OPA1 release in glaucomatous optic nerve // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2008. Vol. 49. № 11. P. 4903–4911.
15. Kong G.Y.X., Van Bergen N.J., Trounce I.A., Crowston J.G., Mitochondrial dysfunction and glaucoma // *J. Glaucoma*. 2009. Vol. 18. № 2. P. 93–100.