

УДК 617.7. 007. 681 616.89 - 008.454

Изучение окислительных процессов при глаукоме

Л.М. Овсепян, А.В.Зангинян, Г.С. Казарян

*Институт молекулярной биологии НАН РА
0014, Ереван, ул.Асратяна, 7*

Ключевые слова: глаукома, окислительная модификация белков, перекисное окисление липидов (ПОЛ), оксид азота

Первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) – заболевание, которое развивается с возрастом и характеризуется прогрессирующим течением даже на фоне нормализованного уровня офтальмотонуса. Глаукома характеризуется повышением внутриглазного давления, приводящим к нарушению в путях оттока внутриглазной жидкости в сетчатке и зрительном нерве, что вызывает гибель нейронов глаза. Этиология глаукомы связана с ишемией и развитием нейродегенеративных процессов [6,13]. Механизм гибели клеток сетчатки и аксонов зрительного нерва в глазу вследствие ишемии и при нейродегенеративных расстройствах – это запрограммированный апоптоз [4,7]. Нейродегенерация характеризуется повреждением клеток и межклеточного вещества, в результате чего происходит нарушение функции органа. В основе нейродегенерации лежит нарушение трофики, комплекса механизмов, обеспечивающих метаболизм и сохранность структуры клеток и тканей. Основным механизмом при ишемии и нейродегенеративных расстройствах признается активация процессов окислительной деградации белков и липидов.

Целью данной работы явилось изучение свободнорадикальных процессов белков и липидов в плазме крови у пациентов с ПОУГ.

Материал и методы

Исследования проводили на плазме крови больных глаукомой (n=15), которые прошли стандартное офтальмологическое обследование. Контролем служили здоровые доноры.

Об активности ПОЛ судили по количеству образования гидроперекисей липидов (ГПЛ) и малонового диальдегида (МДА). ГПЛ определяли по цветной реакции с тиоцианатом аммония при максимуме поглощения 480 нм [12]. МДА определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой [1]. Количество белка определяли по Лоури [10].

Оптическую плотность образовавшихся динитрофенилгидразонов регистрировали при длинах волн: 340,450, 525 нм (альдегидные и кетонные продукты окислительной модификации

белков нейтрального и основного характера). Степень окислительной модификации белков выражали в единицах оптической плотности, отнесенных на 1 мл плазмы крови, используя коэффициент молярной экстинкции $22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}$ [9].

Конечный продукт оксида азота определяли с помощью реактива Грейса, абсорбцию раствора измеряли при длине волны 546 нм. В качестве стандарта использовали нитрит натрия [3]. Полученные в ходе исследования результаты обрабатывали статистически по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Изучение процесса ПОЛ при глаукоме позволило обнаружить увеличение содержания ГПЛ и МДА в плазме крови пациентов с глаукомой (таблица). Согласно современным представлениям, ишемия является главным звеном патогенеза глаукомы. При ишемии вследствие недостатка кислорода происходит не полное восстановление кислорода и образуются активные формы кислорода, такие как суперактивный радикал, синглетный кислород, гидроперекиси, приводящие к активации свободнорадикального процесса. Согласно литературным данным, одной из причин развития глаукомы считается ишемия (гипоксия) вследствие повышения внутриглазного давления [5].

К активным формам кислорода (АФК) относится и оксид азота (NO). Молекула кислорода NO имеет неспаренный электрон, поэтому он относится к свободнорадикальным соединениям. Как показали результаты наших исследований (рисунок), в плазме крови пациентов с первичной глаукомой наблюдается увеличение содержания NO. Полагают, что источниками эндогенного NO в глазу являются роговица, конъюнктив, эпителий хрусталика, эндотелий сосудов цилиарного тела и сетчатки [11]. Основным биологический эффект NO заключается в регуляции кровотока, в том числе и микроциркуляторного русла, путем вазодилатации и уменьшения агрегации тромбоцитов и их адгезии.

Таблица

Содержание продуктов перекисного окисления липидов и содержание оксида азота в плазме крови больных глаукомой (n=15)

Показатели	Контроль	Больные глаукомой
Гидроперекиси, Е мг/белка	$0,72 \pm 0,042$	$0,92 \pm 0,05$; $p < 0,05$
МДА, нм/мг белка	$6,32 \pm 0,45$	$9,42 \pm 0,67$; $p < 0,01$
NO, мкмоль /л	$2,08 \pm 0,07$	$2,51 \pm 0,08$; $p < 0,01$

Известно, что взаимодействие NO с активными формами кислорода вызывает генерацию высокотоксичных продуктов, в частности пероксинитрита, что ведет к повреждению и гибели клеток. Оксид азота может присоединяться атомом азота к белкам, имеющим в своем составе

серосодержащие аминокислотные остатки. Цитотоксичность пероксинитрита проявляется в окислении прежде всего SH- и NH₂-групп белков, протеолипидов, ДНК [2].

Одним из мощных регуляторных эффектов оксида азота является подавление митохондриального дыхания через ингибирование цитохромоксидазы дыхательной цепи. Кроме того, пероксинитрит может непосредственно взаимодействовать с железом активных центров ключевых ферментов дыхательной цепи, необратимо окисляя их. Подавление митохондриального дыхания приводит к снижению заряда митохондрий, что может инициировать апоптотический процесс.

АФК вызывают также окислительную модификацию белков, в результате чего усугубляются повреждения. Окисление белков является более надежным маркером окислительных повреждений по сравнению с окислением липидов, так как образование карбонильных производных происходит быстрее, и они являются более стабильными [8].

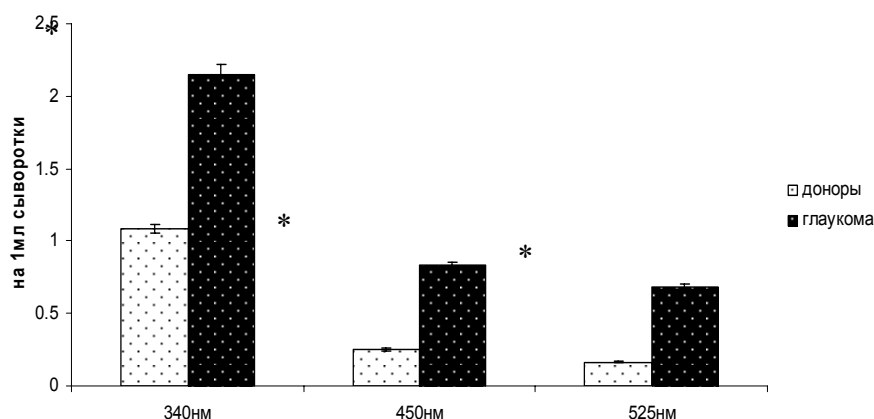


Рисунок. Окислительная модификация белков плазмы крови в норме и у больных глаукомой (n=15):

340 нм – кетондинитрофенилгидразон нейтрального характера,

450 нм – альдегиддинитрофенилгидразон основного характера;

525 нм – кетондинитрофенилгидразон нейтрального характера;

* $p < 0.001$

На рисунке даны продукты окисления белков, которые прореагировали с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием динитрофенилгидразонов, в плазме крови. Полученные результаты позволяют судить о достоверном характере изменений продуктов окислительной модификации белков в плазме крови больных с глаукомой. Так, содержание динитрофенилгидразонов, относящихся к альдегидо- и кетонпроизводным нейтрального характера (длины волн регистрации 340, 525 нм), увеличивается почти вдвое. Полученные результаты свидетельствуют об увеличении интенсивности процесса окислительной деструкции белков.

Фактически все аминокислотные остатки белков способны к окислению, что приводит к изменению их функций. Окислению подвергаются сульфо- и амингидроксильные группы аминокислот, что приводит к образованию поперечных сшивок между белками или между белком и другой молекулой, содержащей NH_2 -группу. Наиболее распространенным пусковым механизмом окислительного повреждения мембранных белков является реакция сульфгидрильных (SH) групп аминокислоты цистеина со свободными радикалами. При этом образуются радикалы с локализацией неспаренного электрона около атома серы ($-\text{S}^\bullet$), которые затем взаимодействуют друг с другом с образованием дисульфидов. Результатом окисления аминокислот может быть нарушение вторичной и третичной структуры белков, облегчающее дальнейшее окисление аминокислотных остатков, и денатурация белковых молекул, в результате чего нарушаются их функции, в частности инактивируются ферменты [8].

Повышенное образование свободнорадикальных форм кислорода в белках и липидах приводит к нарушению способности мембран генерировать, проводить нервный импульс, к нарушению рецепторных, медиаторных, энергетических, секреторных свойств, в результате чего запускается программа апоптоза.

Таким образом, проведенные данные показывают, что изменения окислительных процессов играют существенную роль в патогенезе глаукомы.

Накопление продуктов окисления липидов и белков и оксида азота при глаукоме способствует применению новых подходов к изысканию лекарственных средств, задерживающих прогрессирование развития глаукомы.

Поступила 01.07.15

Օքսիդային գործընթացների ուսումնասիրությունը գլաուկոմայի ժամանակ

Լ.Մ. Հովսեփյան, Հ.Վ. Զանգինյան, Գ.Ս. Ղազարյան

Արդի ժամանակներում բաց անկյունային գլաուկոմայի ախտաճնությունը մինչև վերջ դեռևս ուսումնասիրված չէ: Աշխատանքի նպատակն էր ուսումնասիրել գլաուկոմայի ժամանակ ընթացող օքսիդային գործընթացները: Որոշվել է սպիտակուցների օքսիդային մոդիֆիկացիաները, լիպիդների գերօքսիդների և ազոտի օքսիդի պարունակությունը գլաուկոմայով հիվանդների արյան պլազմայում: Ուսումնասիրությունների արդյունքում բացահայտվեց, որ հիվանդությունն ընթանում է սպիտակուցների օքսիդային մոդիֆիկացիաների, ինչպես նաև լիպիդների գերօքսիդների և ազոտի օքսիդի պարունակության ավելացմամբ: Ստացված արդյունքները վկայում են, որ հիվանդությունն ուղեկցվում է ազատ ռադիկալային գործընթացների ակտիվացմամբ, որը բերում է օքսիդային սթրեսի զարգացմանը:

The study of oxidative processes in glaucoma

L.M. Ovsepyan, A.V. Zanginyan, G.S. Kazaryan

Pathogenic mechanism of primary open-angle glaucoma has not been fully researched yet. It has been demonstrated the role of oxidation in biological membranes in normal metabolism in the etiology and pathogenesis of many diseases.

The aim of this work was to study the oxidative processes in glaucoma.

Oxidative modification of proteins, the content of lipid peroxides were determined in the blood plasma of glaucoma patients.

The analysis of the levels of oxidative modification of proteins has shown that glaucoma is characterized by increased levels of products of oxidative modification of proteins. The investigation of the content of lipid peroxides and nitric oxide showed an increase of their level in the blood plasma of patients with glaucoma. The findings suggest an activation of free-radical processes in glaucoma, leading to the development of oxidative stress.

Литература

1. *Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н.* Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты организма. СПб., 2000.
2. *Beatty S., Koh H., Phil M.* The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.*, 2000; 45: 115–134.
3. *Brett S.J., Evans T.W.* Measurement of endogenous nitric oxide in lungs of patients with the acute respiratory syndrome. *Amer. J. Respirat. Crit. Care*, 1998; 157 (3): 993–997.
4. *Cordeiro M.F., Migdal C., Bloom P., Fitzke F.W and Moss S.E.* Imaging apoptosis in the eye. *Cambridge Ophthalmological Symposium, Eye*, 2011; 25: 545–553.
5. *George Y.X., Van Bergen N.J., Trounce I. A.* Mitochondrial Dysfunction and Glaucoma. *J. of Glaucoma*, 2009, 18 (2) : 93–100.
6. *Gupta N., Yücel Y. H.* Glaucoma as a neurodegenerative disease. *Current Opinion in Ophthalmology*, 2007; 18 (2): 110–114.
7. *Jha P., Banda H., Tytarenko R.* Complement mediated apoptosis leads to the loss of retinal ganglion cells in animal model of glaucoma. *J. Neurosci. Res.*, 2011; 89 (11): 1783–1794.
8. *Kujoth G.C., Hiona A., Pugh T. D.* Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science*, 2005; 309(5733): 481– 484.
9. *Levine R.L., Garland D., Oliver C.N.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.*, 1990; 186: 464– 478.
10. *Lowry N.J., Rosenbogh A.J., Farr A.L.* Protein measurement with folinphenol reagent. *J.Biol. Chem.*, 1951; 193: 265–275.

11. *Oku H.* Function of nitric oxide in the retina. J .Neuro Ophthalmology Japan, 2002; 19: 213-219.
12. *Ovsepyan L.M., Kazaryan G.S., Lvov M.V.* Age Dependent Changes in Phospholipid Content and Neutral Lipid Contents During Aging. Advances in Gerontology, 2013; 3 (1):
13. *Sacca S.C., Lzzotti A.* Oxidative stress and glaucoma: injury in the anterior segment of the eye. Progress in Brain Research, 2008; 173: 385-407.