

УДК 617.7–007.681–07:612.112.91

Радченко Ю. А.Национальная медицинская академия последипломного образования
им. П. Л. Шупика, г. Киев, Украина

Митохондриальная активность мононуклеарных клеток крови у больных с первичной открытоугольной глаукомой

Резюме. Глаукома – одна из актуальных проблем современной офтальмологии. На данный момент ее рассматривают не только как офтальмологическое, но и нейродегенеративное заболевание. Митохондриальная дисфункция участвует в развитии нейродегенерации, а системная митохондриальная эффективность связана с устойчивостью к прогрессированию глаукомной оптической нейропатии. Проведено исследование митохондриальной активности (в частности, анализ количества клеток с гиперполяризованными митохондриями) в мононуклеарных клетках крови (МНК) у больных с первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ) и катарактой. Выявлено снижение количества МНК с повышенным содержанием гиперполяризованных митохондрий у больных с ПОУГ по сравнению с контрольной группой, а также практически линейная зависимость снижения количества МНК с повышенным содержанием гиперполяризованных митохондрий в зависимости от степени тяжести ПОУГ. Это подтверждает значительное снижение адаптационных свойств клеток организма, а также роль системного снижения митохондриальной функции на уровне организма в развитии ПОУГ.

Ключевые слова: первичная открытоугольная глаукома, мононуклеарные клетки крови, митохондриальная активность, гиперполяризованные митохондрии.

ВВЕДЕНИЕ

Глаукома – одна из наиболее актуальных проблем в современной офтальмологии. Это вызвано высоким процентом инвалидизации пациентов в связи с необратимой утратой зрения, а также ростом заболеваемости глаукомой во всех регионах мира.

До сих пор, к сожалению, многие аспекты особенностей патогенеза данного заболевания остаются неизвестными. Изучение таких проблем может послужить источником для поиска новых, патогенетически обоснованных путей терапевтического воздействия.

Как известно, глаукому характеризуют как мультифакторное заболевание с пороговым эффектом [3]. При этом патологические изменения наблюдаются не только локально (как офтальмологическая патология), но и на уровне всего организма

в целом. Практически постоянно глаукоме сопутствуют заболевания сердечно-сосудистой системы, эндокринологические нарушения [12, 2]. На данный момент глаукоме рассматривают также и как нейродегенеративное заболевание [7, 1]. В течение нескольких последних лет было установлено, что митохондриальная дисфункция участвует в развитии нейродегенерации [4] и, следовательно, является одной из причин прогрессирования нейродегенеративных процессов при первичной открытоугольной глаукоме (ПОУГ). Это подтверждают исследования, которые указывают на возможность того, что митохондриальная дисфункция у некоторых людей является предрасполагающим фактором в развитии ПОУГ [8]. Также в клинических исследованиях в периферической крови больных ПОУГ наблюдалось увеличение количества мутаций митохондриальной ДНК (митДНК) и снижение на 20 % окислительной митохондриальной активности по сравнению с контрольной группой пациентов того же возраста [5]. В свою очередь, есть исследования, подтверждающие, что устойчивость к прогрессированию глаукоматозной оптической нейропатии (ГОН) связана с системной митохондриальной эффективностью. Так, при исследовании выделенных лимфоцитов крови и мочи у таких «устойчивых» лиц обнаружили значительно более высокие темпы АДФ (аденозиндифосфат) фосфорилирования митохондриальным респираторным комплексом I, II и IV, гиперполяризованный митохондриальный мембранный потенциал, более высокий уровень митохондриальной ДНК и расширение потенциала для борьбы с цитозольной перегрузкой кальцием и экзогенным оксидативным стрессом [10].

В основе прогрессирования ПОУГ лежит гибель ганглионарных клеток сетчатки, которая происходит преимущественно путем апоптоза [11]. Апоптоз – это энергозависимый процесс, он имеет много факторов и путей, но все они связаны с митохондриями как основной единицей, ответственной за энергетические процессы в клетке [9]. Поэтому изучение состояния митохондрий, их активности у больных с различной степенью тяжести глаукомного процесса является актуальным и характеризует общепатологические процессы, протекающие на уровне организма у больных с ПОУГ. Эти процессы являются фоном, а также могут быть причиной развития и прогрессирования заболевания. Функциональное состояние митохондрий характеризует митохондриальный мембранный потенциал (ММП). Исследование данного показателя актуально проводить в мононуклеарных клетках крови (МНК), которые имеют очень разнообразные функции, широкий спектр рецепторов на своей мембране и могут отражать общее состояние организма. При этом представляет интерес выяснить уровень содержания в клеточной популяции МНК с признаками гиперактивации митохондрий у пациентов с ПОУГ, а также наличие корреляции их количества со степенью тяжести ПОУГ.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель работы – исследовать митохондриальную активность иммунных клеток у больных с первичной открытоугольной глаукомой.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории Национальной медицинской академии последипломного образования им. П. Л. Шупика.

Под наблюдением находился 61 пациент. Исследовались образцы крови. Было сформировано 2 группы исследуемых. Основная группа ($n = 34$) – больные с первичной открытоугольной глаукомой I–IV стадий с разной степенью нормализации внутриглазного давления и возрастной катарактой. В свою очередь, основная группа была разделена на 4 подгруппы:

- 1) больные с ПОУГ не более I стадии на одном или обоих глазах;
- 2) больные с ПОУГ не более I–II стадии на одном или обоих глазах;
- 3) больные с ПОУГ I–III стадии на одном или обоих глазах;
- 4) больные с ПОУГ I–IV стадии на одном или обоих глазах.

Контрольная группа ($n = 27$) – больные с диагнозом возрастной катаракты. Возраст пациентов в обеих группах колебался от 42 до 74 лет.

В исследование не включались пациенты с сахарным диабетом, аутоиммунными заболеваниями, заболеваниями соединительной ткани, значительным поражением сердечно-сосудистой системы (инфаркты, инсульты в анамнезе). Из общих заболеваний некоторые пациенты имели гипертоническую болезнь I–2 степени.

Распределение больных по полу и возрасту во всех исследуемых группах имело однородный характер.

Исследование изменений мембранного потенциала митохондрий проводили на проточном цитометре PAS (Partec, Германия) по общепринятой методике с родамином 123 и пропидий йодидом («Fluka») [6]. Родамин 123 накапливается в мембранах митохондрий зависимо от поляризации мембран. При этом количество инкорпорированного родамина 123 прямо пропорционально разности потенциала мембран митохондрий, таким образом, накопление родамина 123 указывает на клетки с активными и гиперактивными митохондриями, а способность накапливать пропидий йодид указывает на нарушение проницаемости цитоплазматической мембраны. Таким образом, клетки, которые накопили в среднем больше родамина 123 в своих митохондриях, светятся интенсивнее и, соответственно, идентифицируются как клетки с гиперактивированными (гиперполяризованными) митохондриями.

Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данная методика позволяет дифференцировать субпопуляции клеток с признаками гиперактивации митохондрий. В таких субпопуляциях параметры накопления родамина 123 значительно выше, чем в основной субпопуляции. Таким образом, нам удалось выявить клетки с гиперактивированными митохондриями и подсчитать их процентный вклад в общую популяцию.

Нами исследовались такие популяции в контрольной и основной группах. Установлено статистически значимое снижение количества клеток с гиперактивиро-

ванными митохондриями у пациентов с ПОУГ $0,94 \pm 0,43$ % ($M \pm SD$ (стандартное отклонение выборочного среднего)) относительно контрольного значения $1,59 \pm 0,43$ % (рисунок 1).

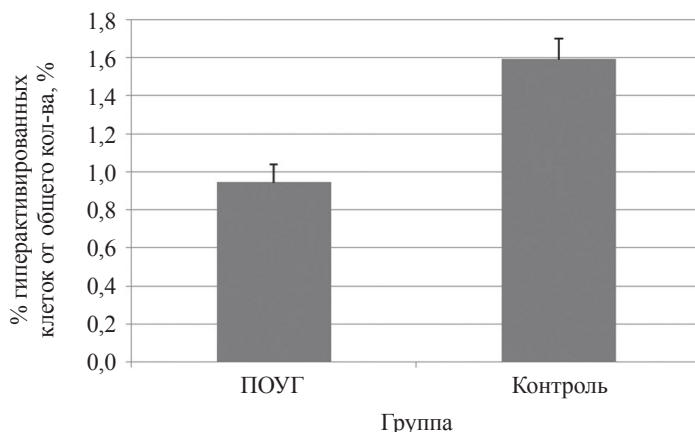


Рисунок 1. Относительное количество гиперактивированных клеток в основной и контрольной группах

Также были изучены уровни содержания МНК с гиперактивированными митохондриями в зависимости от степени тяжести ПОУГ. Было выявлено линейное снижение количества гиперактивированных МНК по мере нарастания тяжести заболевания. Так, в первой группе – $1,24 \pm 0,71$ %, во второй – $1,12 \pm 0,40$ %, в третьей – $0,79 \pm 0,40$ %, в четвертой – $0,76 \pm 0,40$ % (рисунок 2).

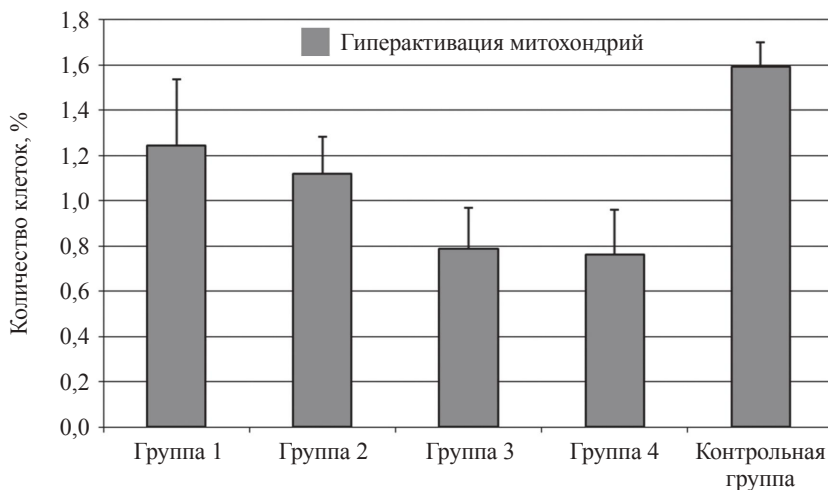


Рисунок 2. Изменение относительного количества гиперактивированных клеток в зависимости от стадии ПОУГ

Данная тенденция указывает на значительное снижение адаптационных свойств МНК, что подтверждается статистически значимо меньшими показателями относительно контрольного значения во 2-й, 3-й и 4-й группах, поскольку гиперактивация митохондрий – это процесс сугубо адаптационный и наблюдается только при достаточном функциональном резерве клеток. Это также указывает на системное снижение митохондриальной функции на уровне организма у больных ПОУГ и еще раз подчеркивает то, что глаукома является одним из проявлений общих дегенеративных изменений на уровне организма.

ВЫВОДЫ

1. Статистически достоверное различие количества клеток с повышенным содержанием гиперполяризованных митохондрий между основной группой и контрольной (основная – $0,94 \pm 0,43$ % (M \pm SD); контрольная – $1,59 \pm 0,43$ %), а также практически линейная зависимость снижения количества клеток с повышенным содержанием гиперполяризованных митохондрий в зависимости от степени тяжести ПОУГ ($1,24 \pm 0,71$ % в первой группе; $1,12 \pm 0,40$ % во второй группе; $0,79 \pm 0,40$ % в третьей группе; $0,76 \pm 0,40$ % в четвертой группе) подтверждает значительное снижение адаптационных свойств клеток организма, а также роль системного снижения митохондриальной функции на уровне организма в развитии ПОУГ.

2. Дальнейшее изучение роли митохондриальной дисфункции в развитии ПОУГ открывает перспективу для разработки путей новой, патогенетически обоснованной терапии.

Радченко Ю. О.

Національна медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика,
м. Київ, Україна

Мітохондріальна активність мононуклеарних клітин крові у хворих на первинну відкритокутову глаукому

Резюме. Глаукома – одна з актуальних проблем сучасної офтальмології. Нині її розглядають не тільки як офтальмологічне, а і як нейродегенеративне захворювання. Мітохондріальна дисфункція бере участь у розвитку нейродегенерації, а системна мітохондріальна ефективність пов'язана зі стійкістю до прогресування глаукомної оптичної нейропатії. Проведено дослідження мітохондріальної активності (зокрема, аналіз кількості клітин з гіперполяризованими митохондріями) в мононуклеарних клітинах крові (МНК) у хворих на первинну відкритокутову глаукому (ПВКГ) та катаракту. Виявлено зниження кількості МНК із підвищеним вмістом гіперполяризованих митохондрий у хворих на ПВКГ порівняно з контрольною групою, а також практично лінійна залежність зниження кількості МНК із підвищеним вмістом гіперполяризованих митохондрий залежно від тяж-

кості ПВКГ. Це підтверджує значне зниження адаптаційних якостей клітин організму, а також роль системного зниження мітохондріальної функції на рівні організму в розвитку ПВКГ.

Ключові слова: первинна відкритокутова глаукома, мононуклеарні клітини крові, мітохондріальна активність, гіперполяризовані мітохондрії.

Radchenko Yu. A.

P. L. Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education, Kyiv, Ukraine

Mitochondrial activity of mononuclear blood cells in patients with primary open-angle glaucoma

SUMMARY

Abstract. Nowadays primary open-angle glaucoma (POAG) is considered as both ophthalmic and neurodegenerative disease. Mitochondrial dysfunction is proved to cause the development of neurodegeneration, and systemic mitochondrial efficiency is associated with resistance to progressive glaucomatous optic neuropathy.

Objective. To investigate the mitochondrial activity of immune cells in patients with primary open-angle glaucoma.

Object and research methods. There were investigated blood samples. There were formed 2 study groups. The main group ($n = 34$) consisted of patients with POAG stage I–IV showing different degrees of intraocular pressure normalization and age-related cataract. The main group was also divided into 4 subgroups depending on POAG severity degree. The control group ($n = 27$) comprised patients with age-related cataract. The patient's sex and age distribution was uniform in all the groups. Autoimmune diseases and severe impairments of the cardiovascular system were exclusion criteria. The mitochondrial membrane potential changes were tested on PAS flow cytometer (Partec, Germany) using a routine method with rhodamine 123 and propidium iodide («Fluka»). There were differentiated cellular subpopulations with hyperactivated mitochondria in which rhodamine 123 accumulation values were significantly higher than those in the main subpopulation; it was calculated their percentage contribution to the general population. The statistical data were processed using Statistica program.

Results and discussion. There was revealed a statistically significant decrease in the number of cells with hyperactivated mitochondria in patients with POAG ($0.94 \pm 0.43 \% (M \pm SD)$) as compared with the reference value ($1.59 \pm 0.43 \%$). While studying the dependence of MBC (blood mononuclear cells) level with hyperactivated mitochondria on the severity of POAG there was found the disease severity dependent linear decrease in the number of hyperactivated MBC ($1.24 \pm 0.71 \%$ – in the first group, $1.12 \pm 0.40 \%$ – in the second group, $0.79 \pm 0.40 \%$ – in the third group, $0.76 \pm 0.40 \%$ – in the fourth group).

Conclusions. 1. A statistically significant difference in the number of cells with a high content of hyperpolarized mitochondria between the main group and the controls, as

well as almost linear dependence of the decreased number of cell with a high content of hyperpolarized mitochondria on the degree of POAG, are indicative of a significant decline in the adaptation properties of the cells and implication of systemic decrease in mitochondrial function at the bodily level in development of POAG.

2. A further study of the role of mitochondrial dysfunction in the development of POAG may open up prospects for the development of new pathogenetically substantiated therapy.

Keywords: primary open-angle glaucoma, blood mononuclear cells, mitochondrial activity, hyperpolarized mitochondria.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Газизова И. Р. Нейродегенеративные изменения в головном мозге при глаукоме (обзор литературы) / И. Р. Газизова, Р. Алмайсам // Клиническая Офтальмология. – 2012. – № 3. – С. 88–91.
2. Кашинцева Л. Т. Открытоугольная глаукома как локальное проявление общих сосудистых проявлений / Л. Т. Кашинцева // Тез. докл. VI Всесоюзного съезда офтальмологов. – М., 1985. – Т. 2. – С. 37–38.
3. Нестеров А. П. Глаукома / А. П. Нестеров. – М. : МИА, 2008. – 360 с.
4. Судаков Н. П. Мітохондріальна дисфункція як один з механізмів патогенезу нейродегенеративних захворювань / Н. П. Судаков, В. А. Деев, С. Б. Нікіфоров [и др.] // Лабораторна діагностика. – 2008. – № 2. – С. 58–65.
5. Abu-Amero K. K. Mitochondrial abnormalities in patients with primary open-angle glaucoma / K. K. Abu-Amero, J. Morales, T. M. Bosley // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2006. – Vol. 47. – No. 6. – P. 2533–2541.
6. Ormerod M. G. Flow cytometry: a practical approach / M. G. Ormerod. – Oxford : Oxford University Press, 2000. – 276 p.
7. Gupta N. Glaucoma as a neurodegenerative disease / N. Gupta, Y. H. Yucel // Curr Opin Ophthalmol. – 2007. – Vol. 2. – P. 110–114.
8. Izzotti A. Mitochondrial damage in the trabecular meshwork of patients with glaucoma / A. Izzotti, S. C. Sacca, M. Longobardi, [et al.] // Arch Ophthalmol. – 2010. – Vol. 128. – No. 6. – P. 724–730.
9. Kerr J. F. Apoptosis: a basic biological phenomen with wide-ranging implications in tissue kinetics / J. F. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Currie // British Journal of Cancer. – 1972. – Vol. 26. – P. 239–257.
10. Lascaratos G. Resistance to the most common optic neuropathy is associated with systemic mitochondrial efficiency / G. Lascaratos, K. Y. Chau, H. Zhu, [et al.] // Neurobiol Dis. – 2015. – Vol. 82. – P. 78–85.
11. Ling Z. H. Glial cell and glaucomatous optic neuropathy / Z. H. Ling, X. H. Sun // Prog Retin Eye Res. – 2013. – Vol. 31. – No. 2. – P. 152–181.
12. Pashe M. A sick eye in a sick body? Systemic findings in patients with primary open-angle glaucoma / M. Pashe, J. Flammer // Surv Ophthalmol. – 2006. – Vol. 51. – No. 3. – P. 179–212.

REFERENCES

1. Gazizova I. R., Almayasam R. Neurodegenerative changes in the brain in glaucoma (review). *Klinicheskaya Oftalmologiya* [Clinical Ophthalmology]. 2012; (3): 88–91 (in Russian).
2. Kashintseva L. T. Open-angle glaucoma as a local manifestation of common cardiovascular manifestations. Proceedings of the VI *Vsesoyuznyy sezd oftalmologov*. Moscow, 1985, pp. 37–38 (in Russian).
3. Nesterov A. P. *Glaucoma*. Moscow, MIA, 2008, 360 p. (in Russian).

-
4. Sudakov N. P., Deev V. A., Nikiforov S. B., Devina O. A. Mitochondrial dysfunction as one of the mechanisms of the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Laboratorna diahnozyka* [Laboratory diagnosis]. 2008; 2(44): 58–65 (in Ukrainian).
 5. Abu-Amero K. K., Morales J., Bosley T. M. Mitochondrial abnormalities in patients with primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006; 47(6): 2533–2541.
 6. Ormerod M. G. *Flow cytometry: a practical approach*. Oxford, Oxford University Press, 2000, 276 p.
 7. Gupta N., Yucel Y. H. Glaucoma as a neurodegenerative disease. *Curr Opin Ophthalmol*. 2007; (2): 110–114.
 8. Izzotti A., Sacca S. C., Longobardi M., Cartiglia C. Mitochondrial damage in the trabecular meshwork of patients with glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 2010; 128(6): 724–730.
 9. Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 1972; (26): 239–257.
 10. Lascaratos G., Chau K. Y., Zhu H., Gkotsi D., King R., Gout I., Kamal D., Luthert P. J., Schapira A. H., Garway-Heath D. F. Resistance to the most common optic neuropathy is associated with systemic mitochondrial efficiency. *Neurobiol Dis*. 2015; (82): 78–85.
 11. Ling Z. H., Sun X. H. Glial cell and glaucomatous optic neuropathy. *Prog Retin Eye Res*. 2013; 31(2): 152–181.
 12. Pashe M., Flammer J. A sick eye in a sickbody? Systemic findings in patients with primary open-angle glaucoma. *Surv Ophthalmol*. 2006; 51(3): 179–212.

Стаття надійшла в редакцію 18.05.2016 р.

Рецензія на статтю надійшла в редакцію 20.06.2016 р.