

Сравнительный химический анализ внутриглазной жидкости и тканей дренажной зоны глаза при первичной открытоугольной глаукоме

Кравчик М.В., младший научный сотрудник¹;
Новиков И.А., старший научный сотрудник¹;
Суббот А.М., к.м.н., старший научный сотрудник¹;
Петров С.Ю., д.м.н., главный научный сотрудник¹;
Пахомова Н.А., врач-офтальмолог¹;
Подопригора В.С., к.м.н., ассистент кафедры офтальмологии².

¹ФГБНУ «НИИ глазных болезней», 119021, Российская Федерация, Москва, ул. Россолимо, 11А.

²ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им Н.Н. Бурденко», кафедра офтальмологии, 394036, Российская Федерация, Воронеж, ул. Студенческая, 10.

Авторы не получали финансирование при проведении исследования и написании статьи.
Конфликт интересов: отсутствует.

Для цитирования: Кравчик М.В., Новиков И.А., Суббот А.М., Петров С.Ю., Пахомова Н.А., Подопригора В.С. Сравнительный химический анализ внутриглазной жидкости и тканей дренажной зоны глаза при первичной открытоугольной глаукоме. *Национальный журнал глаукома*. 2020; 19(3):3-11.

Резюме

ЦЕЛЬ. Провести сравнительный химический анализ внутриглазной жидкости (ВГЖ), склеры и трабекулы при первичной открытоугольной глаукоме (ПОУГ). Оценить химический состав тканей при различных стадиях ПОУГ, а также при псевдоэкссфолиативной глаукоме (ПЭГ).

МЕТОДЫ. Определено содержание ряда химических элементов: углерода (С), азота (N), кислорода (O), алюминия (Al), кальция (Ca), хлора (Cl), калия (K), магния (Mg), натрия (Na), фосфора (P), кремния (Si), серы (S) в сухом веществе ВГЖ, биоптатах трабекулярной ткани и склеры у пациентов со II и III стадиями ПОУГ, а также у пациентов с ПЭГ и ПОУГ без псевдоэкссфолиативного материала. Визуализация проводилась с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) EVO LS 10 («Zeiss», Германия), исследование химического состава осуществлялось на энергодисперсионном спектрометре (ЭДС) Oxford-X-MAX-50 («Oxford», Великобритания) в режиме низкого вакуума (70 Па) при ускоряющем напряжении 21,5 кВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Выявлены различия в распределении Cl в сухом веществе ВГЖ и Si в трабекуле у пациентов со II и III стадиями ПОУГ. При сравнительном анализе

тканей пациентов с ПЭГ и ПОУГ без псевдоэкссфолиативного материала (ПЭМ) показано различие в распределении N сухого вещества ВГЖ, а также Ca, Cl, Na трабекулы. При сравнительном анализе элементного состава склеры между указанными группами статистически значимых различий в распределении исследуемых элементов выявлено не было.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Изменения, выявленные при сравнении II и III стадий ПОУГ, могут свидетельствовать о нарастании электролитного и кислотно-основного дисбаланса при прогрессировании заболевания. Отличия в распределении элементов между группами ПОУГ без ПЭМ и ПЭГ обусловлены молекулярным строением ПЭМ. Различия в водно-солевом и молекулярно-химическом составе тканей следует учитывать в дальнейших исследованиях, направленных на поиск оптимального медикаментозного метода лечения пациентов с разными стадиями и формами глаукомы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: первичная открытоугольная глаукома, псевдоэкссфолиативная глаукома, энергодисперсионная спектроскопия, элементный состав, внутриглазная жидкость, трабекулярная ткань, склера.

Для контактов:

Кравчик Марина Владимировна, e-mail: kravchik.mv@gmail.com

ENGLISH

Changes in the elemental composition of aqueous humour outflow pathways in primary open-angle glaucoma

KRAVCHIK M.V., Junior Research Associate¹;

NOVIKOV I.A., Senior Research Associate¹;

SUBBOT A.M., Ph.D., Senior Research Associate¹;

PETROV S.YU., Med.Sc.D., Leading Research Associate¹;

ПАХОМОВА Н.А., M.D.¹;

ПОДОПРИГОРА В.С., Ph.D., Assistant of Ophthalmology Department².

¹Scientific Research Institute of Eye Diseases, 11A Rossolimo st., Moscow, Russian Federation, 119021;

²The State Budgetary Institution of Higher Professional Education "Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko" of the Ministry of Public Health of the Russian Federation.

Conflicts of Interest and Source of Funding: none declared.

For citations: Kravchik M.V., Novikov I.A., Subbot A.M., Petrov S.Yu., Pakhomova N.A., Podoprighora V.S. Changes in the elemental composition of aqueous humour outflow pathways in primary open-angle glaucoma. *Natsional'nyi zhurnal glaukoma*. 2020; 19(3):3-11.

Abstract

PURPOSE: There are two primary aims of this study: 1. To perform a comparative chemical analysis of aqueous humour (AH), scleral tissue, and trabecular meshwork in patients with primary open-angle glaucoma (POAG). 2. To evaluate the tissue's chemical composition at the different POAG stages and with in patients with pseudoexfoliation glaucoma (PEG).

METHODS: The concentration of certain chemical elements — carbon (C), nitrogen (N), oxygen (O), aluminum (Al), calcium (Ca), chlorine (Cl), potassium (K), magnesium (Mg), sodium (Na), phosphorus (P), silicon (Si), sulfur (S) — was determined in the dried AH residue, trabecular meshwork and sclera biopsy samples obtained from patients with POAG (stage I and II), patients with pseudoexfoliation glaucoma (PEG), and patients with POAG without pseudoexfoliation material (PEM). Samples were analyzed using a scanning electron microscope (SEM) EVO LS 10 ("Zeiss", Germany). The chemical composition study was performed with an energy-dispersive spectrometer (EDS) Oxford-X-MAX-50 ("Oxford", UK) in a low-vacuum mode (70 Pa) with an accelerating voltage of 21.5 kV.

RESULTS: In the case of POAG (stage I and II) patients, there were significant differences in Cl distribution in dried

AH residue and Si distribution in the trabecular meshwork. In the case of pseudoexfoliative glaucoma (PEG) and patients with POAG without PEM, there was a difference in the N distribution in dried AH residue, as well as Ca, Cl, and Na distribution in the trabecular meshwork. During scleral tissue comparative chemical analysis, no significant changes in studied elements' concentration between patient groups were evident.

CONCLUSION: Changes between stage II of POAG and stage III of POAG patient groups may indicate that there is an increase in the electrolyte and acid-base imbalance associated with the progression of the disease. Differences in chemical elements distribution in patients with PEG and in patients with POAG without PEM result from the molecular structure of PEM. The tissue's water and salt balance and molecular chemical composition alterations provide the following insights for future research in finding the optimal treatment method for patients with all stages and types of glaucoma.

KEYWORDS: primary open-angle glaucoma, pseudoexfoliation glaucoma, energy-dispersive X-ray spectroscopy, elemental composition, aqueous humour, trabecular meshwork.

Различные методы химического анализа глазных тканей широко использовались с целью изучения их особенностей в норме и при патологии. Еще в 1943 г. исследован элементный состав различных тканей глаз крупного рогатого скота, где обнаружены такие элементы, как Fe, Cu, Mg, Zn [1]. В 1965 г. проведены попытки определить

соотношение Na, K, Mg, Ca, P и Cu в тканях человеческого глаза: склере, конъюнктиве, роговице, хрусталике, сосудистой оболочке, сетчатке, стекловидном теле, зрительном нерве, а также в экстраокулярных мышцах и орбитальной жировой клетчатке при помощи спектрофотометрии, пламенной фотометрии, титриметрического анализа [2].

С помощью элементного анализа можно косвенно судить о молекулярных соединениях в тканях. Так, при исследовании химического состава склеры, сетчатки и хориоидеи животных обнаружена более высокая концентрация S в склере, что связывается с присутствием в данной ткани большого количества сульфатированных гликозаминогликанов (ГАГ).

Также элементный анализ позволяет судить о физико-химических процессах, происходящих в тканях. Например, превышение концентрации Na в склере по сравнению с концентрацией Na сосудистой оболочки исследователи объясняют эффектом Гиббса - Доннана: дополнительным увеличением осмотического давления в физиологическом растворе за счет диффузии ионов неорганических солей через проницаемые для них мембраны (в данном случае за счет присутствия молекул сульфатированных ГАГ) [3].

В настоящее время практически отсутствуют структурированные сведения об элементном анализе тканей при глаукоме, которая на протяжении многих лет занимает одно из первых мест среди причин, приводящих к снижению зрительных функций. Недостаток сведений об элементном составе тканей дренажной зоны отчасти связан с требующейся в классических случаях пробоподготовкой биологического образца, влекущей за собой изменения в строении объекта. Процесс сопровождается воздействием на ткань агрессивных химических агентов, при котором может теряться значительная часть информации о химическом составе.

Исследования ткани в нативном состоянии, в том числе и с использованием анализа на энергодисперсионном спектрометре (ЭДС), могут дать довольно обширную информацию не только о физико-химических свойствах данной ткани, но и о физиологических процессах, происходящих на тканевом и даже на клеточном уровне. Так, в 2008 г., анализируя при помощи ЭДС соотношения Na^+ , K^+ , Cl^- и P, группа исследователей косвенно оценила способность клеток дренажной зоны изменять свой объем в различных условиях [4].

Таким образом, актуальными остаются исследования структуры и состава тканей дренажной зоны глаза в нативном состоянии. Данная работа направлена на изучение элементной химии нативной ткани дренажной зоны при различных стадиях и формах первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ).

Материал и методы

В рамках кросс-секционного исследования были изучены сухое вещество внутриглазной жидкости (ВГЖ), ткани трабекулы и склеры у пациентов с ПОУГ на фоне применения максимально возможной гипотензивной терапии. Всем пациентам перед включением в исследование проводили визометрию, периметрию, биомикроскопию и офтальмоскопию. Оценку стадии глаукомы проводили по классификации

А.П. Нестерова. Забор ВГЖ, склеры и трабекулярной ткани у пациентов осуществлялся в ходе антиглаукомной операции (синустрабекулэктомии).

Для сравнительного анализа ткани дренажной зоны при II и III стадиях глаукомы были сформированы выборки:

- для анализа сухого вещества ВГЖ: 43 пациента (43 глаза) в возрасте 71 [67; 76] года (II стадия — 15 глаз, III стадия — 28 глаз);

- для анализа трабекулярной ткани: 89 пациентов (89 глаз) в возрасте 71 [65; 76] года (II стадия — 33 глаза, III стадия — 56 глаз);

- для анализа склеры: 41 пациент (41 глаз) в возрасте 70,5 [65; 76] года (II стадия — 15 глаз, III стадия — 28 глаз).

Для сравнительного анализа ткани дренажной зоны при псевдоэксфолиативной глаукоме (ПЭГ) и ПОУГ без псевдоэксфолиативного материала (ПЭМ) были сформированы выборки:

- для анализа сухого вещества ВГЖ: 38 пациентов (38 глаз) в возрасте 72 [67; 76] лет (ПЭГ — 24 глаза, ПОУГ без ПЭМ — 14 глаз);

- для анализа трабекулярной ткани: 78 пациентов (78 глаз) в возрасте 71 [65; 76] года (ПЭГ — 48 глаз, ПОУГ без ПЭМ — 30 глаз);

- для анализа склеры: 36 пациентов (36 глаз) в возрасте 71 [65; 76] года (ПЭГ — 23 глаза, ПОУГ без ПЭМ — 13 глаз).

Образцы исследуемых тканей размещали на поверхность химически чистой углеродной ленты. Образцы ВГЖ капали на поверхность углеродной ленты и в дальнейшем подвергали эвапоризации, получая сухой остаток.

Анализ тканей и сухого остатка ВГЖ проводили на микроскопе EVO LS 10 («Zeiss», Германия). Для всех образцов получали изображения на детекторе обратно-рассеянных электронов (BSE) в режиме низкого вакуума (EP, 70 Па) при ускоряющем напряжении 21,5 кВ и токе на образце 420 пА. Валовый химический микроанализ проводился при помощи энергодисперсионного рентгеновского спектрометра (ЭДС) Oxford X-Max-50 («Oxford», Великобритания) с использованием силы тока на образце 490-520 пА. Валовый анализ выполняли для выборочных химических элементов тканей сухого остатка ВГЖ, склеры и трабекулы: C, N, O, Al, Ca, Cl, K, Mg, Na, P, Si, S.

Элементы, весовая доля которых по результатам валового анализа систематически оказывалась ниже границы типичного предела обнаружения в ЭДС (<0,1 вес.%), исключали из обработки: Al — для сухого остатка ВГЖ; Mg, Al, K, Cl — для склеры; Mg, Al, K — для ткани трабекулы. Для сухого вещества ВГЖ из анализа также был исключен C, учитывая его преобладающую долю в подложке из углеродной ленты. Итоговые данные о содержании химических элементов в сухом остатке ВГЖ, ткани склеры и трабекулы приводили к 100% весу по каждому образцу.

Учитывая неоднородную поверхность анализируемых фрагментов тканей, невозможность рассчитать весовую долю водорода, обусловленную самой методикой ЭДС-анализа, а также отсутствие эталонов для биологических образцов, метрологический класс выполненного анализа характеризовали как «качественный» и лишь в определенных случаях — «полуколичественный».

Статистическую обработку осуществляли используя программы Excel (Microsoft) и Statistica 12.6 (StatSoft). Критерием исключения выбросов из статистического анализа являлось смещение среднего значения всей выборочной совокупности единичным измерением более чем на 5%. Принимая в расчет близость регистрируемых значений химических элементов к пределу обнаружения детектором и качественный характер анализа, распределение каждого оцениваемого параметра по умолчанию не относили к нормальному закону, даже в случае прохождения теста на нормальность распределения, исходя из чего при сравнении двух групп использовали статистические тесты Манна - Уитни. Средние величины приводили в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха Me [Q25; Q75]. В качестве критериев оценки статистически значимых различий определяли вероятность ошибки $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

По данным элементного анализа распределение некоторых химических элементов в ВГЖ и трабекуле меняется в зависимости от стадии ПОУГ. При сравнении образцов группы пациентов со II стадией ПОУГ и группы пациентов с III стадией ПОУГ выявлено, что статистически значимо различаются распределение Cl в сухом веществе ВГЖ (рис. 1), а также Si в трабекулярной ткани (рис. 2). Статистически значимые различия в распределении весовых долей N, O, Na, Mg, P, S, K, Ca в сухом веществе ВГЖ, а также C, N, O, Na, P, S, Cl, Ca в трабекулярной ткани у пациентов со II и III стадиями отсутствовали.

Также элементный состав в ВГЖ и трабекуле меняется при ПЭГ. При сравнительном анализе образцов группы пациентов с ПЭГ и группы ПОУГ без ПЭМ было выявлено, что статистически значимо различается распределение N в сухом веществе ВГЖ (рис. 3), а также Ca (рис. 4), Na (рис. 5) и Cl (рис. 6) в трабекулярной ткани. Статистически значимые различия в распределении весовых долей Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca в сухом веществе ВГЖ, а также C, N, O, Si, P, S, Cl, Ca в трабекулярной ткани у пациентов с ПЭГ и ПОУГ без ПЭМ отсутствовали.

Химический состав склеры по данным валового анализа в ЭДС при различной стадии ПОУГ и при ПЭГ не меняется. При сравнении элементного состава склеры группы пациентов со II стадией ПОУГ и группы пациентов с III стадией ПОУГ,

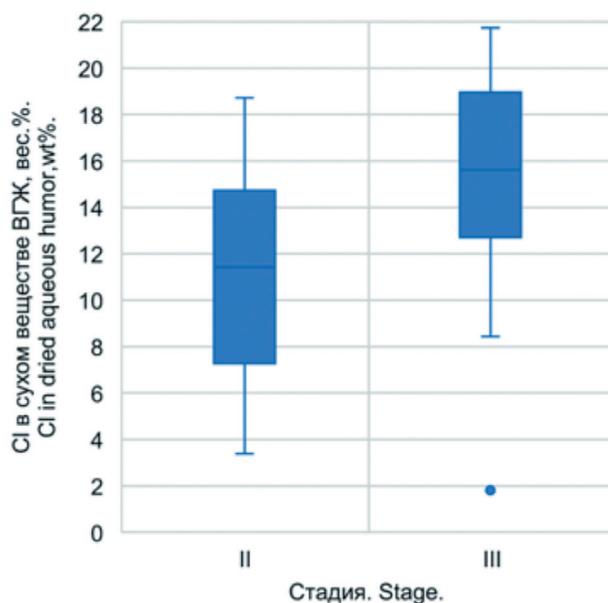


Рис. 1. Распределение весовой доли Cl в сухом веществе ВГЖ без учета углерода в зависимости от стадии глаукомы

Fig. 1. The distribution of the Cl weight fraction in the dried AH residue without taking carbon into account in relation to glaucoma stage

а также групп пациентов с ПЭГ и ПОУГ без ПЭМ статистически значимых различий в распределении C, N, O, Na, Si, P, S, Ca выявлено не было.

Детальное описание различий в содержании некоторых элементов ВГЖ и тканей дренажной зоны при ПОУГ, а также возможные причины, приводящие к выявленным отличиям, будут приведены нами ниже.

Содержание хлора в ВГЖ при различных стадиях ПОУГ

При сравнении элементного состава сухого вещества ВГЖ было выявлено, что распределение весовой доли Cl в образцах у пациентов со II и III стадиями статистически значимо ($p=0,010$) различается (рис. 1). При II стадии медиана весовой доли Cl в сухом веществе без учета углерода составляла 11,42 [7,28; 14,72] вес.%, при III стадии — 15,63 [12,71; 18,96] вес.%.

Различия в распределении весовой доли Cl в сухом веществе камеральной влаги можно объяснить, рассмотрев процесс формирования ВГЖ. Считается, что образование ВГЖ является совокупностью пассивных (диффузии и ультрафильтрации) и активных (секреция эпителием цилиарного тела) процессов. Ряд исследователей полагает, что для понимания процессов, ответственных за поддержание офтальмотонуса, особое внимание следует обратить на транспорт ионов через эпителий цилиарного тела, а именно — на секрецию в переднюю камеру анионов Cl⁻ [5].

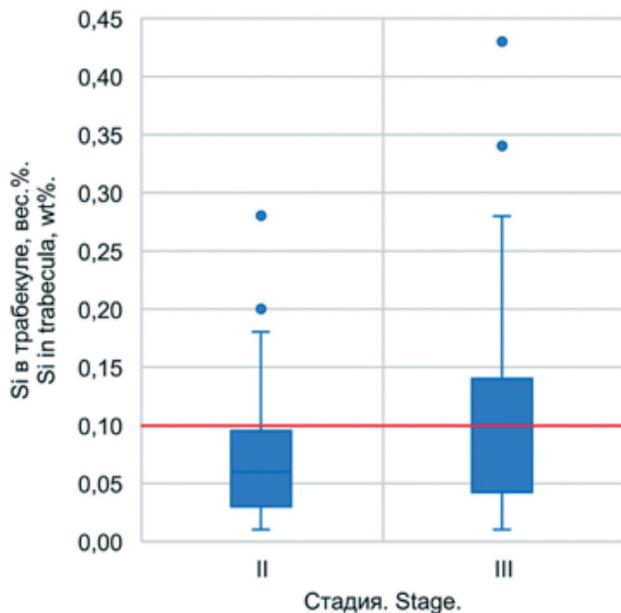


Рис. 2. Распределение весовой доли Si в трабекуле в зависимости от стадии глаукомы. Красной линией обозначен типичный предел обнаружения в ЭДС
Fig. 2. The distribution of the Si weight fraction in trabecular meshwork in relation to of glaucoma stage. The red line indicates the typical detection limit of EDS

Известно, что в человеческом организме концентрация хлоридов ВГЖ примерно в 1,2 раза превышает концентрацию хлоридов в плазме [6]. Примечательно, что некоторые фармакологические агенты, в том числе широко используемые в терапии глаукомы ингибиторы карбоангидразы, способны снижать концентрацию хлоридов в передней камере [7].

Таким образом, различия в распределении Cl в сухом веществе ВГЖ согласуются с данными литературы о возможном вовлечении транспорта анионов через цилиарный эпителий в патогенез нарушений офтальмотонуса. Стоит отметить, что несмотря на особое внимание, уделяемое потенциальным изменениям в процессах формирования ВГЖ при глаукоме, ведущей причиной повышения уровня офтальмотонуса до сих пор остается ретенция на уровне трабекулы. Учитывая это, следует понять, является ли выявленное по нашим данным повышение медианы Cl при III стадии компонентом патогенеза глаукомы, является ли следствием потенциально различающегося воздействия медикаментозных средств на пациентов данных групп или же может объясняться иными причинами.

Содержание кремния в трабекуле при различных стадиях ПОУГ

При сравнении элементного анализа трабекулы выявлено, что у пациентов со II и III стадиями статистически значимо ($p=0,024$) различается распределение весовой доли Si (рис. 2). При II стадии

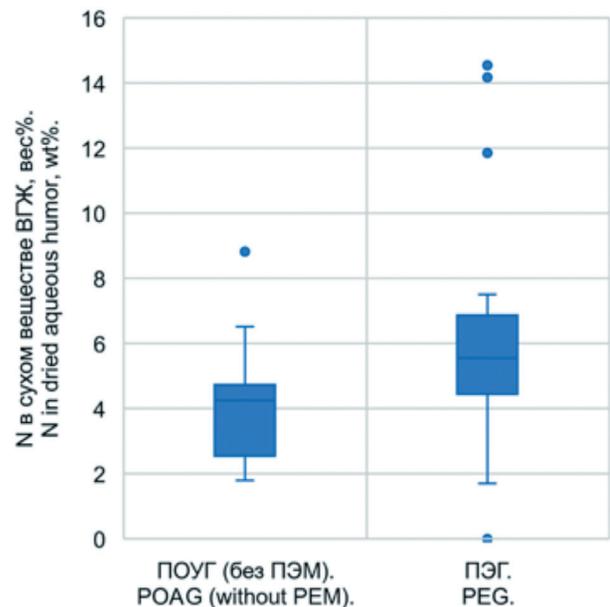


Рис. 3. Распределение весовой доли N в сухом веществе ВГЖ без учета углерода в зависимости от наличия ПЭМ при ПОУГ
Fig. 3. The distribution of the N weight fraction in the dried AH residue without taking carbon into account in relation to PEM's presence in POAG

заболевания весовая доля Si в большинстве образцов трабекулярной ткани не превышала типичного для ЭДС предела обнаружения (0,1 вес.%): вычисленная медиана составила 0,06 [0,03; 0,19] вес.%. При III стадии содержание Si повышалось в отдельных образцах до 0,43, при медиане в 0,1 [0,04; 0,14] вес.%.

Различие в распределении Si у пациентов со II и III стадиями ПОУГ, вероятно, указывает на длительно существующий кислотно-основной дисбаланс в ткани при III стадии. Несмотря на то что кремний является вторым по распространенности элементом земной коры, химическая инертность, а также низкая растворимость в воде делают его непригодным к широкому использованию в биологических системах. Основной формой кремния в водном растворе является кремниевая кислота $\text{Si}(\text{OH})_4$. Самый простой механизм полимеризации кремниевой кислоты — это зависимый от реакции среды процесс, происходящий на мембране в зоне постоянного и длительно существующего градиента pH.

Таким образом, накопление кремния свидетельствует о продолжительном локальном дисбалансе кислотно-основной реакции ткани. Это позволяет говорить о кремнии как о маркере длительно существующей локальной дисрегуляции pH биологической системы. Различие в распределении Si у пациентов со II и III стадиями ПОУГ свидетельствует о локальном снижении pH тканей при прогрессировании глаукомы, которое сопровождается ограниченной силитизацией дренажной зоны.

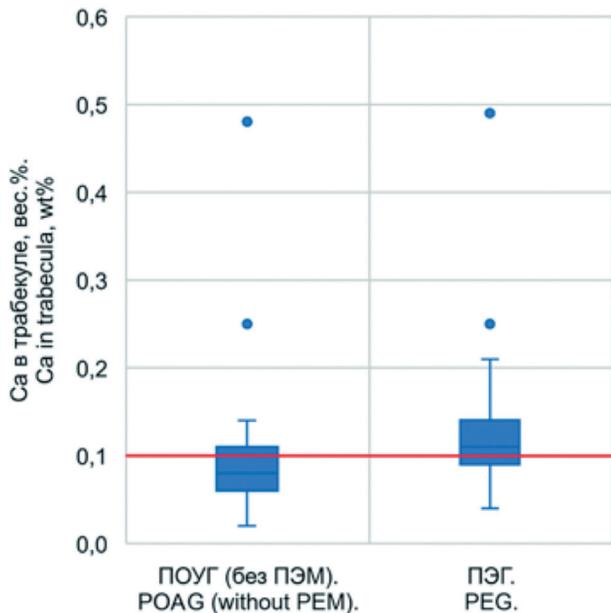


Рис. 4. Распределение весовой доли Ca в трабекуле без учета углерода в зависимости от наличия ПЭМ при ПОУГ. Красной линией обозначен типичный предел обнаружения в ЭДС

Fig. 4. The distribution of the Ca weight fraction in trabecular meshwork without taking carbon into account in relation to PEM's presence in POAG. The red line indicates the typical detection limit of EDS

Содержание азота в ВГЖ при ПЭГ

При сравнении элементного состава сухого вещества ВГЖ у пациентов показано, что распределение весовой доли N в образцах пациентов с ПЭГ и ПОУГ без ПЭМ статистически значимо ($p=0,025$) различается (рис. 3). При ПОУГ без ПЭМ медиана весовой доли N в сухом веществе ВГЖ без учета углерода составила 4,26 [2,55; 4,73] вес.%, а при ПЭГ — 5,55 [4,45; 6,87] вес.%.

Увеличение медианы весовой доли N в сухом веществе ВГЖ при ПЭС можно объяснить доказанным присутствием N в структуре ПЭМ. Так, при помощи энергетически фильтруемой просвечивающей электронной микроскопии (ЭФПЭМ) совокупности с ЭДС в СЭМ на образцах хрусталика глаз с ПЭС продемонстрировано присутствие N, S, Ca, Cl и Zn в фибриллах [8]. Высокое содержание N, в свою очередь, указывает на белковую природу ПЭМ [8]. Таким образом, различия в содержании N в ВГЖ при ПЭГ объясняется включением азотсодержащих белков в структуру ПЭМ.

Существуют и другие данные об участии N в патогенезе ПОУГ. Так, при помощи ЭДС показано повышение на уровне границы статистической значимости ($p=0,042$) доли N в ВГЖ у пациентов с ПОУГ при декомпенсированном ВГД относительно ВГЖ группы пациентов без глаукомы при нормальном давлении. По мнению исследователей, повышенная концентрация N влаги передней камеры

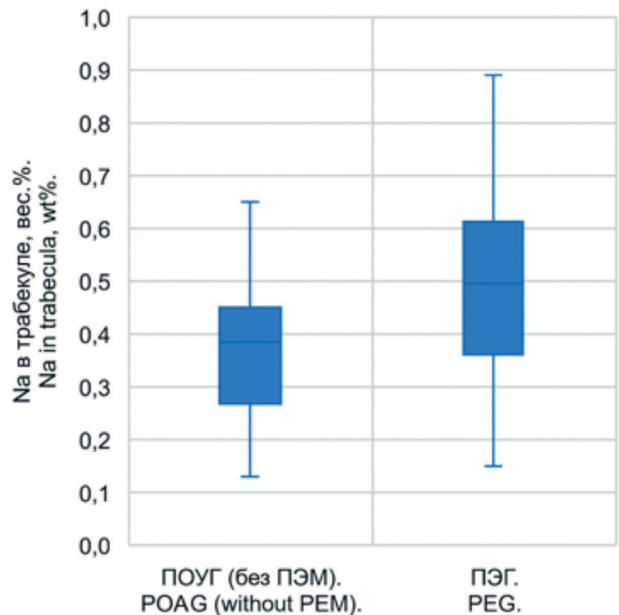


Рис. 5. Распределение весовой доли Na в трабекуле в зависимости от наличия ПЭМ при ПОУГ

Fig. 5. The distribution of the Na weight fraction in trabecular meshwork in relation to PEM's presence in POAG

указывает на возможное участие азотсодержащих осмотически активных соединений в аномальной гиперсекреции ВГЖ [9].

Содержание кальция в трабекуле при ПЭГ

При сравнении элементного анализа трабекулы выявлено, что группы пациентов с ПЭГ и ПОУГ без ПЭМ статистически значимо ($p=0,002$) различаются по распределению весовой доли Ca (рис. 4).

Несмотря на то что статистический тест показал значимость различий между группами в распределении Ca, стоит отметить, что некоторые величины дескриптивной статистики при этом оказались ниже типичного для ЭДС значения предела обнаружения. Хотя отдельные значения весовой доли Ca в трабекуле при ПОУГ без ПЭМ достигали 0,48 вес.%, медианное значение Ca трабекулы для пациентов без ПЭМ не превышало типичного для ЭДС предела обнаружения (0,1 вес.%): 0,08 [0,06; 0,11] вес.%. При ПЭГ медиана доли Ca трабекулы составила 0,11 [0,09; 0,14] вес.%, в отдельном случае достигая значения 0,49 вес.%.

Увеличение медианы весовой доли Ca при ПЭС соотносится с литературными данными о Ca как о структурном компоненте внеклеточного матрикса [10]. При помощи ЭФПЭМ в совокупности с ЭДС в СЭМ на образцах хрусталика глаз с ПЭС обнаружено, что Ca локализуется на периферии фибрилл ПЭМ [8]. Предположено, что положительно заряженные ионы Ca^{2+} связываются с отрицательно заряженными сульфатированными ГАГ, которые окружают белковое ядро фибрилл. Наличие Ca на периферии фибриллярного материала, по мнению ряда авторов,

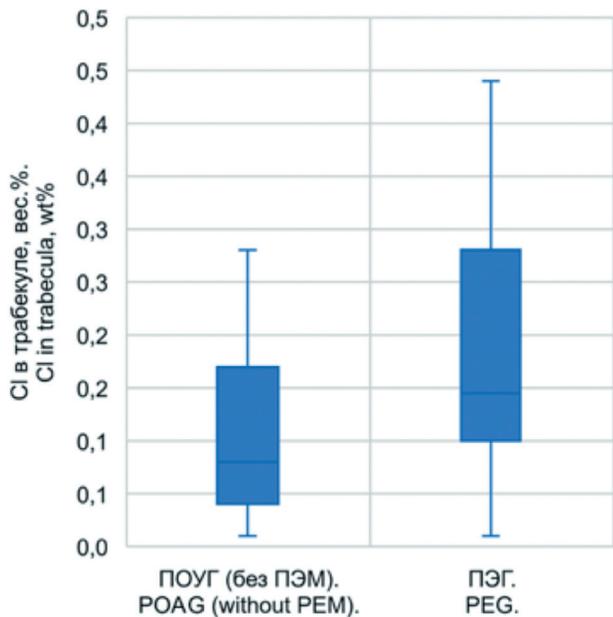


Рис. 6. Распределение весовой доли Cl в трабекуле в зависимости от наличия ПЭМ при ПОУГ
Fig. 6. The distribution of the Cl weight fraction in trabecular meshwork in relation to PEM's presence in POAG

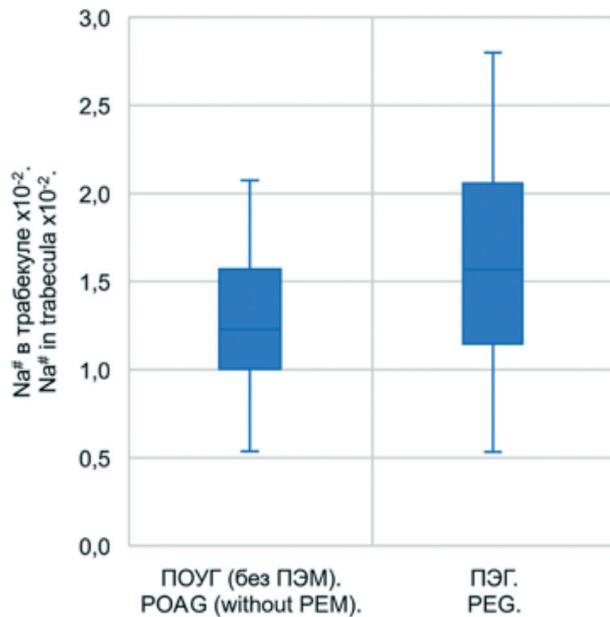


Рис. 7. Распределение количества неосмогенного Na в трабекуле в зависимости от наличия ПЭМ при ПОУГ
Fig. 7. The distribution of the non-osmotic Na fraction in trabecular meshwork in relation to PEM's presence in POAG

дает право предположить, что данный элемент играет роль в процессе агрегации микрофибрилярных субъединиц [11]. Также значительное депо Ca обнаруживается в Ca-зависимых трансмембранных белках кадгеринах, определяющих прочность межклеточной связи. Следует отметить то, что во время классической подготовки образца Ca может быть легко потерян, что подчеркивает значимость изучения нативного биологического материала.

Гомеостаз Ca, по-видимому, крайне важен для нормального функционирования клеток дренажной зоны. Существуют исследования, подтверждающие гипотезу о том, что клетки трабекулярного аппарата обладают свойствами, подобными сократительным клеткам у гладкомышечной ткани [12-14], а сокращение клеток на клеточном уровне связано с деполяризацией и ростом уровня внутриклеточного кальция [15].

Содержание натрия и хлора в трабекуле при ПЭГ

При сравнении элементного анализа трабекулы выявлено, что группы пациентов с ПЭГ и ПОУГ без ПЭМ статистически значимо различаются по распределению весовой доли Na ($p=9,776 \times 10^{-4}$) (рис. 5) и Cl ($p=2,177 \times 10^{-4}$) (рис. 6).

Медианное значение весовой доли Na при ПОУГ без ПЭМ — 0,39 [0,27; 0,45] вес.%, при ПЭГ — 0,50 [0,36; 0,61] вес.%.

Медианное значение весовой доли Cl при ПОУГ без ПЭМ — 0,08 [0,04; 0,17] вес.%, при ПЭГ — 0,15 [0,10; 0,28] вес.%.

Закономерно различие между группами в распределении одновременно и Na, и Cl, так как в организме катион Na^+ , как правило, связан с катионом Cl^- . Содержание соли NaCl в ткани при этом определяется степенью и длительностью воздействия промывочного раствора в процессе пробоподготовки. При одинаковых условиях пробоподготовки для всех образцов при объяснении увеличения медианы весовой доли Cl в трабекуле у пациентов с ПЭГ при глаукоме в таком случае следует рассмотреть возможные процессы, препятствующие высвобождению соли при промывке. Повышение доли Na и Cl в трабекуле у пациентов с ПЭГ может свидетельствовать о механизмах, способствующих удержанию хлорида натрия в ткани.

Содержание неосмогенного натрия в трабекуле при ПЭГ

При детальном изучении распределения Na было отмечено, что и весовая, и молярная доля Na в трабекуле превышала долю Cl во всех проанализированных образцах. Поэтому для каждого образца было определено количество вещества Na, превышающее количество вещества Cl, и вследствие этого не способного быть в составе NaCl. Количество не связанного с хлорид-анионом Na ($Na\#$) было рассчитано по формуле:

$$Na\# = ((C(Na) \div Ar(Na)) - k(C(Cl) \div Ar(Cl))),$$

где $C(E)$ — процентное весовое содержание химического элемента E;
 $Ar(E)$ — относительная атомная масса химического элемента E;

k — коэффициент молярной пропорциональности, показывающий соотношение между количеством вещества Na и Cl в соединении (для NaCl равен 1).

Распределение рассчитанного по указанной формуле $Na^{\#}$ также статистически значимо ($p=1,119 \times 10^{-2}$) различалось в ткани трабекулы пациентов с ПЭГ и ПОУГ без ПЭМ (рис. 7).

Медианное значение весовой доли $Na^{\#}$ в трабекуле при ПОУГ без ПЭМ составило $1,23 \times 10^{-2}$ [$1,00 \times 10^{-2}$; $1,57 \times 10^{-2}$], при ПЭГ — $1,57 \times 10^{-2}$ [$1,15 \times 10^{-2}$; $2,06 \times 10^{-2}$].

По данным литературы, значительное количество катионов Na^+ может аккумулироваться в интерстиции, не вызывая при этом колебания уровня Na в жидких средах, таких как плазма крови, ВГЖ. В соединительной ткани катион Na^+ способен связываться с кислыми ГАГ, состоящими из чередующихся сополимеров уроновых кислот и аминокислот и являющимися отрицательно заряженными полианионами [16, 17]. Связывание Na^+ с ГАГ приводит к хранению неосмогенного Na в биологической ткани.

Гистохимические и иммуногистохимические данные свидетельствуют о том, что ПЭМ представляет собой сложную структуру гликопротеинов и протеогликанов [18]. Показано, что в структуре волокон фибриллярного ПЭМ входят сульфатированные ГАГ [19-21]. Цепи ГАГ (гепарансульфата, хондроитинсульфата, дерматансульфата, гиалуроната), по данным литературы, присутствуют на поверхности фибриллярных волокон ПЭМ и в межфибрилярном веществе [8]. Таким образом, увеличение в трабекуле «нехлоридного» Na объясняется способностью катиона Na^+ связываться с полианионными цепями ГАГ — одним из основных компонентов ПЭМ.

Учитывая существующую ретенцию на уровне трабекулярного аппарата при глаукоме, представляется интересной параллель между накоплением связанного с тканью трабекулы Na при ПЭС и интерстициальной тканью при патологии сердечно-сосудистой системы. Существует предположение, что уровень депонированного Na в миокарде имеет связь с жесткостью миокарда. Исследователи предполагают, что высокий уровень Na в миокарде является самостоятельным фактором, изменяющим жесткость ткани и, по-видимому, влияющим на формирование дисфункции миокарда [22].

Тем не менее следует отметить, что механизм увеличения жесткости соединительной ткани при повышении неосмогенного Na может быть обусловлен не столько увеличением катионов в ткани, сколько изменениями в самой структуре ГАГ. Депонированный в соединительной ткани Na может являться лишь маркером увеличения доли длинных полимерных цепей ГАГ и/или сульфатированных ГАГ, которые и обуславливают жесткость соединительной ткани. Действительно, механизмы, способствующие большей аккумуляции катионов Na^+

в ПЭС, связаны с ростом плотности отрицательно заряда ГАГ при увеличении степени сульфатирования [23]. Также увеличивает плотность отрицательного заряда в соединительной ткани активация инициации и/или удлинения цепи ГАГ, что, по мнению исследователей, и приводит к увеличению процессов накопления неосмогенного Na [24].

Заключение

Изменения в элементном составе тканей, выявленные при сравнении II и III стадий ПОУГ, свидетельствуют о нарастании электролитного и кислотно-основного дисбаланса при прогрессировании заболевания. Отличия в распределении весовой доли Cl в сухом веществе ВГЖ у пациентов со II и III стадиями ПОУГ согласуется с литературными данными о возможном различии в процессах транспорта анионов Cl^- через эпителий цилиарного тела. Эффект может быть обусловлен как самостоятельным компонентом патогенеза глаукомы, так и следствием потенциально различающегося воздействия ингибиторов карбоангидразы на пациентов представленных групп или иными причинами. Выявленное повышенное содержание Si в трабекуле у пациентов с III стадией глаукомы в сравнении со II стадией трактуется как свидетельство длительно существующего кислотно-основного дисбаланса и локального снижения pH тканей при прогрессировании глаукомы.

Выявленные отличия в распределении элементов между группами ПОУГ без ПЭМ и ПЭГ обусловлены молекулярным строением ПЭС. Статистически значимые различия в распределении N сухого остатка ВГЖ при ПЭГ объясняются включением азотсодержащих молекул в структуру ПЭМ. Увеличение медианы весовой доли Ca при ПЭС соотносится с данными о Ca как о структурном компоненте внеклеточного матрикса и, в частности, фибрилл ПЭМ. Увеличение медианы весовой доли Na и Cl в трабекуле у пациентов с ПЭС при глаукоме следует рассматривать как следствие существования механизмов, способствующих удержанию хлорида натрия в ткани. Увеличение количества Na, не связанного с Cl, при ПЭС объясняется связыванием катиона Na^+ с полианионными цепями гликозаминогликанов ПЭС.

По нашему мнению, различия в элементной химии тканей дренажной зоны при II и III стадиях ПОУГ, а также при ПЭГ и ПОУГ без ПЭМ подчеркивают важность дифференциального подхода к лекарственной терапии глаукомы. Различия в водно-солевом и молекулярно-химическом составе тканей, их способность накапливать и удерживать определенные химические вещества также следует учитывать при выборе медикаментозного сопровождения хирургического лечения пациентов с разной стадией и формой глаукомы.

Литература

1. Tauber F.W., Krause A.C. The role of iron, copper, zinc, and manganese in the metabolism of the ocular tissues, with special reference to the lens. *Am J Ophthalmol.* 1943; 26:260-266. doi:10.1016/s0002-9394(43)92830-2
2. De Azevedo M., De Jorge F. Some mineral constituents of normal human eye tissues (Na-K-Mg-Ca-P-Cu). *Ophthalmologica.* 1965; 149(1):43-52. doi:10.1159/000304729
3. Marshall A.T., Goodyear M.J., Crewther S.G. Sequential quantitative X-ray elemental imaging of frozen-hydrated and freeze-dried biological bulk samples in the SEM. *J Microscopy.* 2012; 245(1):17-25. doi:10.1111/j.1365-2818.2011.03539.x
4. McLaughlin C.W., Karl M.O., Zellhuber-McMillan S., Wang Z. et al. Electron probe X-ray microanalysis of intact pathway for human aqueous humor outflow. *Am J Physiology-Cell Physiology.* 2008; 295(5):1083-1091. doi:10.1152/ajpcell.340.2008
5. Lucia U., Grisolia G., Astori M.R. Constructural law analysis of Cl⁻ transport in eyes aqueous humor. *Scientific reports.* 2017; 7(1):1-4. doi:10.1038/s41598-017-07357-8
6. Chi-ho To, Chi-wing Kong, Chu-yan Chan, Mohammad Shahidullah, Chi-wai Do. The mechanism of aqueous humour formation. *Clin Exper Optom.* 2002; 85(6):335-349. doi:10.1111/j.1444-0938.2002.tb02384.x
7. Becker B. Carbonic anhydrase and the formation of aqueous humor: The Friedenwald Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol.* 1959; 47(1):342-361. doi:10.1016/s0002-9394(14)78041-9
8. Ritch R., Schlötzer-Schrehardt U. Exfoliation syndrome. *Surv Ophthalmol.* 2001; 45(4):265-315. doi:10.1016/s0039-6257(00)00196-x
9. Ермолаев А.П., Новиков И.А., Мельникова Л.И., Грибоедова И.Г., Аветисов К.С. Элементный состав влаги передней камеры и сыворотки крови при различном уровне внутриглазного давления. *Вестник офтальмологии.* 2016; 132(6):43-48. doi:10.17116/oftalma2016132643-48
10. Evenas J., Malmendal A., Forsen S. Calcium. *Curr Opin Chem Biol.* 1998; 2(2):293-302. doi:10.1016/s1367-5931(98)80072-0
11. Kiely C.M., Shuttleworth C.A. The role of calcium in the organization of fibrillin microfibrils. *FEBS letters.* 1993; 336(2):323-326. doi:10.1016/0014-5793(93)80829-j
12. Gipson I., Anderson R. Actin filaments in cells of human trabecular meshwork and Schlemm's canal. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1979; 18(6):547-561.
13. de Kater A.W., Shahsafaei A., Epstein D.L. Localization of smooth muscle and non muscle actin isoforms in the human aqueous outflow pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992; 33(2):424-429.
14. De Kater A., Spurr-Michaud S., Gipson I. Localization of smooth muscle myosin-containing cells in the aqueous outflow pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990; 31(2):347-353.
15. Stumpff F., Wiederholt M. Regulation of trabecular meshwork contractility. *Ophthalmologica.* 2000; 214(1):33-53. doi:10.1159/000027471
16. Kopp C., Linz P., Dahlmann A., Hammon M. et al. 23Na magnetic resonance imaging-determined tissue sodium in healthy subjects and hypertensive patients. *Hypertension.* 2013; 61(3):635-640. doi:10.1161/hypertensionaha.111.00566
17. Titze J. Sodium balance is not just a renal affair. *Curr Opin Nephrology And Hypertension.* 2014; 23(2):101. doi:10.1097/01.mnh.0000441151.55320.c3
18. Challa P., Johnson W.M. Composition of exfoliation material. *J Glaucoma.* 2018; 27 Suppl 1:29-31. doi:10.1097/IJG.0000000000000917
19. Schlötzer-Schrehardt U., Körtje K.-H., Erb C. Energy-filtering transmission electron microscopy (EFTEM) in the elemental analysis of pseudoexfoliative material. *Curr Eye Res.* 2001; 22(2):154-162. doi:10.1076/ceyr.22.2.154.5522
20. Schlötzer-Schrehardt U., Dorfler S., Naumann G.O. Immunohistochemical localization of basement membrane components in pseudoexfoliation material of the lens capsule. *Curr Eye Res.* 1992; 11(4):343-355. doi:10.3109/02713689209001788
21. Tawara A., Fujisawa K., Kiyosawa R., Inomata H. Distribution and characterization of proteoglycans associated with exfoliation material. *Curr Eye Res.* 1996; 15(11):1101-1111. doi:10.3109/02713689608995141
22. Arutyunov G., Dragunov D., Sokolova A., Papyshv I. et al. The effect of the level of total sodium deposited in the myocardium on its stiffness. *Ther Arch.* 2017; 89(1):32-37. doi:10.17116/terarkh201789132-37
23. Volpi N. Disaccharide analysis and molecular mass determination to microgram level of single sulfated glycosaminoglycan species in mixtures following agarose-gel electrophoresis. *Anall Biochem.* 1999; 273(2):229-239. doi:10.1006/abio.1999.4218
24. Titze J., Shakibaei M., Schaffhuber M., Schulze-Tanzil G. et al. Glycosaminoglycan polymerization may enable osmotically inactive Na⁺ storage in the skin. *Am J Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 2004; 287(1):203-208. doi:10.1152/ajpheart.01237.2003

References

1. Tauber F.W., Krause A.C. The role of iron, copper, zinc, and manganese in the metabolism of the ocular tissues, with special reference to the lens. *Am J Ophthalmol.* 1943; 26:260-266. doi:10.1016/s0002-9394(43)92830-2
2. De Azevedo M., De Jorge F. Some mineral constituents of normal human eye tissues (Na-K-Mg-Ca-P-Cu). *Ophthalmologica.* 1965; 149(1):43-52. doi:10.1159/000304729
3. Marshall A.T., Goodyear M.J., Crewther S.G. Sequential quantitative X-ray elemental imaging of frozen-hydrated and freeze-dried biological bulk samples in the SEM. *J Microscopy.* 2012; 245(1):17-25. doi:10.1111/j.1365-2818.2011.03539.x
4. McLaughlin C.W., Karl M.O., Zellhuber-McMillan S., Wang Z. et al. Electron probe X-ray microanalysis of intact pathway for human aqueous humor outflow. *Am J Physiology-Cell Physiology.* 2008; 295(5):1083-1091. doi:10.1152/ajpcell.340.2008
5. Lucia U., Grisolia G., Astori M.R. Constructural law analysis of Cl⁻ transport in eyes aqueous humor. *Scientific reports.* 2017; 7(1):1-4. doi:10.1038/s41598-017-07357-8
6. Chi-ho To, Chi-wing Kong, Chu-yan Chan, Mohammad Shahidullah, Chi-wai Do. The mechanism of aqueous humour formation. *Clin Exper Optom.* 2002; 85(6):335-349. doi:10.1111/j.1444-0938.2002.tb02384.x
7. Becker B. Carbonic anhydrase and the formation of aqueous humor: The Friedenwald Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol.* 1959; 47(1):342-361. doi:10.1016/s0002-9394(14)78041-9
8. Ritch R., Schlötzer-Schrehardt U. Exfoliation syndrome. *Surv Ophthalmol.* 2001; 45(4):265-315. doi:10.1016/s0039-6257(00)00196-x
9. Ermolaev A.P., Novikov I.A., Mel'nikova L.I., Griboedova I.G., Avetisov K.S. Elemental composition of aqueous humour and blood serum at various levels of intraocular pressure. *Vestn oftalmologii.* 2016; 132(6):43-48. doi:10.17116/oftalma2016132643-48
10. Evenas J., Malmendal A., Forsen S. Calcium. *Curr Opin Chem Biol.* 1998; 2(2):293-302. doi:10.1016/s1367-5931(98)80072-0
11. Kiely C.M., Shuttleworth C.A. The role of calcium in the organization of fibrillin microfibrils. *FEBS letters.* 1993; 336(2):323-326. doi:10.1016/0014-5793(93)80829-j
12. Gipson I., Anderson R. Actin filaments in cells of human trabecular meshwork and Schlemm's canal. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1979; 18(6):547-561.
13. de Kater A.W., Shahsafaei A., Epstein D.L. Localization of smooth muscle and non muscle actin isoforms in the human aqueous outflow pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992; 33(2):424-429.
14. De Kater A., Spurr-Michaud S., Gipson I. Localization of smooth muscle myosin-containing cells in the aqueous outflow pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990; 31(2):347-353.
15. Stumpff F., Wiederholt M. Regulation of trabecular meshwork contractility. *Ophthalmologica.* 2000; 214(1):33-53. doi:10.1159/000027471
16. Kopp C., Linz P., Dahlmann A., Hammon M. et al. 23Na magnetic resonance imaging-determined tissue sodium in healthy subjects and hypertensive patients. *Hypertension.* 2013; 61(3):635-640. doi:10.1161/hypertensionaha.111.00566
17. Titze J. Sodium balance is not just a renal affair. *Curr Opin Nephrology And Hypertension.* 2014; 23(2):101. doi:10.1097/01.mnh.0000441151.55320.c3
18. Challa P., Johnson W.M. Composition of exfoliation material. *J Glaucoma.* 2018; 27 Suppl 1:29-31. doi:10.1097/IJG.0000000000000917
19. Schlötzer-Schrehardt U., Körtje K.-H., Erb C. Energy-filtering transmission electron microscopy (EFTEM) in the elemental analysis of pseudoexfoliative material. *Curr Eye Res.* 2001; 22(2):154-162. doi:10.1076/ceyr.22.2.154.5522
20. Schlötzer-Schrehardt U., Dorfler S., Naumann G.O. Immunohistochemical localization of basement membrane components in pseudoexfoliation material of the lens capsule. *Curr Eye Res.* 1992; 11(4):343-355. doi:10.3109/02713689209001788
21. Tawara A., Fujisawa K., Kiyosawa R., Inomata H. Distribution and characterization of proteoglycans associated with exfoliation material. *Curr Eye Res.* 1996; 15(11):1101-1111. doi:10.3109/02713689608995141
22. Arutyunov G., Dragunov D., Sokolova A., Papyshv I. et al. The effect of the level of total sodium deposited in the myocardium on its stiffness. *Ther Arch.* 2017; 89(1):32-37. doi:10.17116/terarkh201789132-37
23. Volpi N. Disaccharide analysis and molecular mass determination to microgram level of single sulfated glycosaminoglycan species in mixtures following agarose-gel electrophoresis. *Anall Biochem.* 1999; 273(2):229-239. doi:10.1006/abio.1999.4218
24. Titze J., Shakibaei M., Schaffhuber M., Schulze-Tanzil G. et al. Glycosaminoglycan polymerization may enable osmotically inactive Na⁺ storage in the skin. *Am J Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 2004; 287(1):203-208. doi:10.1152/ajpheart.01237.2003