

• ТОЧКА ЗРЕНИЯ • ВОСТОК – ЗАПАД
• POINT OF VIEW • EAST – WEST

Научно-практический журнал

№4'2017

УДК 617.753.2

Сравнение антиоксидантной защиты глазной поверхности у пациентов молодого возраста с миопией высокой и средней степени

М.А. Ковалевская¹, М.И. Сергеева¹, И.В. Черникова²

¹ ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко», Минздрава России, Воронеж;

² ООО «Глазной центр доктора Черниковой», Воронеж

РЕФЕРАТ

Цель – сравнение уровня антиоксидантной защиты глазной поверхности у пациентов молодого возраста с миопией высокой и средней степени.

Материал и методы. Пациенты (18–35 лет) распределены на следующие 3 группы: 1-я – 72 (144 глаза) пациента с миопией высокой степени; 2-я – 57 (114 глаз) с миопией средней степени; 3-я – 25 (50 глаз) с эметропией. Оценивался уровень экспрессии пероксиредоксина 6 (PRDX6) до и после операции LASIK.

Результаты. Наибольшая экспрессия PRDX6 отмечалась во 2-й группе (31,55±0,71), в 1-й группе она была меньше в 1,8 раза (17,77±1,03).

Заключение. Уровень антиоксидантной защиты глазной поверхности при миопии средней степени выше, чем при миопии высокой степени. Экспрессия PRDX6 у пациентов с миопией высокой степени в течение нескольких месяцев после операции увеличивается в 1,5 раза сильнее, чем при миопии средней степени, что свидетельствует о более интенсивном воздействии окислительного стресса.

Ключевые слова: миопия, экспрессия пероксиредоксина 6, LASIK. ■

Точка зрения. Восток – Запад.– 2017.– № 4.– С. 109–112.

ABSTRACT

Comparison of the ocular surface antioxidant protection of young age patients with myopia high and average degree

M.A. Kovalevskaya¹, M.I. Sergeeva¹, I.V. Chernikova²

¹ Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko, Voronezh;

² ООО «Eye center Dr. Chernikova», Voronezh

Purpose. To compare the level of antioxidant protection of the ocular surface of patients with high and average degree myopia of young age.

Material and methods. Patients (18-35 years) divided into 3 groups: 1 – 72 (144 eyes) patients with high myopia; 2 – 57 (114 eyes) with average degree; 3 – 25 (50 eyes) with emmetropia. Level of peroxiredoxin 6 expression was evaluated before and after LASIK. Most PRDX6 expression was observed in group 2 (31,55±0,71), 1.8 times less than in group 1 (17,77±1,03).

Conclusion. The level of antioxidant protection of the ocular surface at average degree myopia above, than with high myopia. Expression PRDX6 patients with high myopia of patients within a few months after surgery is increased 1.5 times more than the average degree of myopia, which indicates more intensive exposure to oxidative stress.

Key words: myopia; expression peroxiredoxin 6; LASIK. ■

Point of View. East – West.– 2017.– No. 4.– P. 109–112.

Антиоксидантная защита глазной поверхности представлена ферментативными и неферментативными компонентами. К последним относятся низкомолекулярные соединения: витамины, биофлавоноиды, гормоны – антиоксиданты (мелатонин, фитоэстрогены, оксифенилкарбоновые кислоты) и низкомолекулярные тиолы (глутатион и эрготионеин). Наиболее важны-

ми представителями ферментов-антиоксидантов являются: супероксиддисмутаза (SODs), каталаза, глутатион пероксидаза (GPxs), глутатион S-трансферазы (GSTs), глутамил-цистеин синтазы (GCSs), глутаредоксин (Grxs), тиоредоксин (Trxs) и пероксиредоксин (PRDX) [1].

Антиоксидантная защита необходима для нейтрализации неблагоприятного влияния активных форм

кислорода (АФК), образующихся в результате клеточного дыхания, и некоторых других реакций, которые повреждают важнейшие биологические макромолекулы (нуклеиновые кислоты, белки, липиды и углеводы) и тем самым являются причиной различных патологий [2].

Уровень концентрации АФК внутри клеток и в межклеточном пространстве регулируется прооксидан-

тами и антиоксидантами. В здоровой клетке существует баланс между вышеуказанными системами и сдвиг равновесия в сторону повышения концентрации прооксидантов приводит к избыточной продукции АФК и, как следствие, – к окислительному стрессу и развитию патологии [3, 4]. Оксидативный стресс – процесс повреждения клетки в результате окисления. При этом уровень АФК выше, чем естественные биологические антиокислительные процессы, нейтрализующие их.

Токсическое действие АФК предотвращается в организме за счёт функционирования антиоксидантной защиты, в том числе и пероксидазной активности. На сегодняшний день известно более 35 структур PRDX. Анализ этих структур показал, что PRDX имеют общую для всех пероксиредоксинов тиоредоксиновую укладку, с небольшими отличиями в виде вставок дополнительных вторичных элементов структуры (различные вариации длины петель и изменение протяженности N- и C-концевых областей) [5].

Пероксиредоксины многих паразитов человека (простейшие, нематоды) являются их основными антиоксидантными ферментами. Знания о структуре и функции PRDX этих паразитических организмов позволяют развивать новый подход в лечении многих паразитарных заболеваний [6].

Пероксиредоксины (PRDX) – широко представленное в организме семейство неселеновых пероксидаз, осуществляющих разрушение пероксидов как органической, так и неорганической природы. Впервые пероксиредоксин 6 (PRDX6) был получен из цилиарного тела глаза быка и был назван селен-независимой глутатион пероксидазой (NSGPx), на основании N-концевой последовательности аминокислот [7]. Позже было обнаружено, что клонированный фрагмент к ДНК человека (названный ORF6) кодирует этот белок и по аминокислотной последовательности имеет гомологию с пероксиредоксинами [8].

PRDX6 в большей степени представлен у человека в эпителиальных тканях и играет наиболее важную роль в их антиоксидантной защите [6]. Антиоксидантная защитная

роль PRDX6 была показана при различных видах патологии кожи, легких, глаз и нервной системы [9–12].

В механизме антиоксидантной защиты глазной поверхности большую роль играют пероксиредоксины. Есть основание полагать, что PRDX6 может применяться в терапии заболеваний, патогенез которых связан с окислительным стрессом.

ЦЕЛЬ

Сравнить уровень антиоксидантной защиты глазной поверхности у молодых пациентов с миопией высокой и средней степени.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены 154 пациента (308 глаз) молодого возраста (18–35 лет), из которых 129 больным (258 глаз) с миопией высокой и средней степени проведена операция LASIK на базе ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» МЗ РФ.

Оценивался уровень экспрессии пероксиредоксина 6 в слезной жидкости пациентов до, непосредственно после операции LASIK (Laser Assisted In Situ Keratomileusis) и через 3 месяца после нее. В зависимости от вида клинической рефракции 154 пациента были распределены на следующие 3 группы. 1-ю группу составили 72 (144 глаза) пациента с миопией высокой степени. Во 2-ю группу вошли 57 (114 глаз) пациентов с миопией средней степени. 3-я группа (контроля) состояла из 25 (50 глаз) пациентов с эметропией.

Офтальмологическое обследование проводили по общепринятым методикам. Для определения вида клинической рефракции, степени астигматизма использовали автоматический рефрактометр HUMPHREY, определения толщины роговицы (пахиметрии) – ультразвуковую установку (Ocuscan RxP, Alcon, США), кератотопографии – Keratron Scout ОПТИКОН, (Италия). Операции производились на эксимерлазерной системе ESIRIS (SCHWIND, Германия). Для анестезии использовали прок-

симетакаин 0,5%. Для формирования лоскута использовали микрократом Carriazo-Pendular (SCHWIND, Германия).

Определяли экспрессию пероксиредоксина 6, наличие гамма-глобулина (протеомные технологии). Для иммуноферментного анализа использовали Western-блот. Мажорные белки слезы анализировали методом MALDI-TOF-триптического гидролиза белка в полиакриламидном геле, надгелевый раствор использовали для получения MALDI-масс-спектров. Подготовку образцов для масс-спектрометрии проводили смешиванием на мишени раствора образца и раствора 2,5-дигидроксисбензойной кислоты, масс-спектры получали на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенном УФ-лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона. Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Поиск проводили в базе данных NCBI среди белков всех организмов с указанной точностью с учетом возможного окисления метионина кислородом воздуха и возможной модификации цистеина акриламидом.

Статистическая обработка полученных данных была проведена с использованием прикладных программ STATISTICA, version 7.0 (StatSoft) и BIOSTST.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы оценили показатели антиоксидантной активности слезы до проведения операции LASIK. При анализе протемного спектра слезы нами были выявлены фрагменты PRDX6 во всех пробах. Существенным для катализа и характерным для всех пероксиредоксинов является N-концевой остаток Cys, который также называется пероксидазином – Sp (peroxidatic cysteine). Аминокислоты, формирующие пероксидазный каталитический центр, для всех пероксиредоксинов высоко консервативны. Наличие фрагментов PRDX6 в слезе является объективным критерием уровня антиоксидантной активности слезной жидкости.

Таблица 1

Оценка показателей антиоксидантной активности слезы у пациентов сравниваемых групп до проведения LASIK

Показатель \ Группа	1-я группа	2-я группа	3-я группа (контроль)
Уровень экспрессии PRDX6	17,77±1,03*	31,55 ± 0,71*	2,07±0,34*
Гамма-глобулин	отсутствие	отсутствие	отсутствие

Примечание: * – статистически значимые различия между 1-й, 2-й группами и группой контроля ($p < 0,05$).

Таблица 2

Оценка показателей антиоксидантной активности слезы у пациентов 1-й и 2-й групп после LASIK

Показатель \ Группа	1-я группа	2-я группа	3-я группа (контроль)
Уровень экспрессии PRDX6	19,87±1,05*	31,10±0,87*	2,07±0,34
Гамма-глобулин	наличие	наличие	отсутствие

Примечание: * – статистически значимые различия между 1-й, 2-й группами и группой контроля ($p < 0,05$).

Таблица 3

Оценка показателей антиоксидантной активности слезы у пациентов 1-й и 2-й групп через 3 месяца после LASIK

Показатель \ Группа	1-я группа	2-я группа	3-я группа (контроль)
Уровень экспрессии PRDX6	42,47±0,68	44,37±0,94*	2,07±0,34

Примечание: * – статистически значимые различия между 1-й, 2-й группами и группой контроля ($p < 0,05$).

Результаты оценки показателей антиоксидантной активности слезной жидкости в 3 группах пациентов до проведения операции представлены в *табл. 1*.

Как видно из *таблицы 1*, наибольшая экспрессия PRDX6 отмечалась во 2-й группе (31,55±0,71) у пациентов с миопией средней степени. Она оказалась в 1,8 раза меньше, чем экспрессия PRDX6 в 1-й группе (17,77±1,03). Во всех пробах слезы отсутствовал гамма-глобулин. Во 2-й группе уровень экспрессии PRDX6 был в 15,3 раза выше, а в 1-й группе в 8,6 раза больше (различие статистически достоверно), чем в группе контроля.

При оценке показателей антиоксидантной активности слезы после LASIK мы выявили, что во 2-й группе уровень экспрессии PRDX6 в слезе практически не изменился и был в 1,5 раза выше, чем в 1-й группе (*табл. 2*), где этот показатель увеличился только в 1,1 раза. При срав-

нении с группой контроля, уровень экспрессии PRDX6 оказался в 15 раз выше во 2-й группе и в 9,6 раза выше в 1-й группе.

Через 3 месяца после операции LASIK отмечалось увеличение уровня экспрессии PRDX6 в обеих сравниваемых группах: в 1-й – в 2,1 раза и во второй – в 1,4 раза (*табл. 3*), по сравнению с его уровнем, зафиксированным непосредственно после операции. Причем при сравнении данного показателя между двумя группами обнаружилось, что он отличался незначительно. Вместе с тем, уровень экспрессии PRDX6 оказался в 1-й группе в 20,5 раз, а во 2-й группе – в 21,4 раза больше, чем в группе контроля.

ВЫВОДЫ

Уровень антиоксидантной защиты глазной поверхности при

миопии средней степени выше (31,55±0,71), чем при миопии высокой степени (17,77±1,03).

Экспрессия PRDX6 у пациентов с миопией высокой степени в течение нескольких месяцев после операции LASIK увеличивается в 1,5 раза сильнее, чем при миопии средней степени, что свидетельствует о более интенсивном воздействии окислительного стресса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. 2002; 30: 620-650.

2. Halliwell B, Gutteridge J.M. 3rd ed. *Antioxidant defences. Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press. 1999, 105-245.

3. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты. *Вестник РАМН*. 1998; 7: 43-51.

4. Miki S., Ashraf M., Salka S., Sperelakis N. Myocardial dysfunction and ultrastructural alterations mediated by oxygen metabolites. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1988; 20: 1009-1024.
5. Copley S.D., Novak W.R., Babbitt P.C. Divergence of function in the thioredoxin fold superfamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochemistry.* 2004; 43: 13981-13995.
6. Новоселов В.И., Барышникова Л.М., Янин В.А., Амелина С.Е., Фесенко Е.Е. Влияние пероксиредоксина VI на заживление резаной раны у крыс. *Доклады Академии наук.* 2003; 393: 412-414.
7. Shichi H., Demar J.C. Non-selenium glutathione peroxidase without glutathione S-transferase activity from bovine ciliary body. *Exp Eye Res.* 1990; 50: 513-520.
8. Nagase T., Miyajima N., Tanaka A. et al. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. III. The coding sequences of 40 new genes (K1AA0081-K1AA0120) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1. *DNA Res.* 1995; 2: 37-43.
9. Fisher A.B., Dodia C., Feinstein S.I., Ho Y. S. Altered lung phospholipid metabolism in mice with targeted deletion of lysosomal type phospholipase A2. *J. Lipid. Res.* 2005; 46: 1248-1256.
10. Power J.H., Asad S. et al. Peroxiredoxin 6 in human brain: molecular forms, cellular distribution and association with Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol.* 2008; 115: 611-622.
11. Kumin A., Huber C., Rulice T., Wolf E., Werner S. Peroxiredoxin 6 is a potent cytoprotective enzyme in the epidermis. *Am. J. Pathol.* 2006; 169: 1194-1205.
12. Kubo E., Fatma N., Akagi Y., Beier D.R., Singh S.P., Singh D.P. TAT-mediated PRDX6 protein transduction protects against eye lens epithelial cell death and delays lens opacity. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2008; 294: 842-855.