**Содержание глутаминовой кислоты в камерной влаге у больных первичной открытоугольной глаукомой**

Glutamic acid concentration in aqueous humor of open angle glaucoma patients

By many authors glutamate renders neurotoxic effect on retinal ganglion cells. It is possible that glutamic acid concentration increase in eye tissues with primary open angle glaucoma (POAG) plays an important role in optic nerve glaucoma atrophy pathogenesis.

Aqueous humor of 10 patients with POAG were taken during cataract extraction and examined. The quantities of glutamic acid were determined by chromatographic method.

Glutamic acid concentration in aqueous humor of control group was 28.6±1.6 mkg/ml and in group with POAG – 84.9±28.7 mkg/ml. The difference wasn’t statistically reliable. Thus there is a tendency to glutamic acid concentration increase in eyes with POAG.

**Р**езультаты исследований последних лет существенно повлияли на представления о патогенезе глаукоматозной атрофии зрительного нерва – глаукоматозной оптической нейропатии.

Было установлено, что характерным проявлением глаукоматозной оптической нейропатии является апоптоз – гибель ганглиозных клеток сетчатки. Quigley [6] считает, что поврежденный, возможно, вследствие высокого ВГД, аксон ганглиозной клетки сетчатки не несет достаточной информации, что приводит к активации механизмов естественной гибели клетки. Возможно, эти процессы активизируются недостаточностью кровотока в сосудах глаза при повышенном ВГД. Было показано, что одновременно с этим имеется значительное увеличение содержания глутаминовой кислоты (глутамата) в стекловидном теле больных первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ). Глутамат является основным нейромедиатором ЦНС и сетчатки. В то же время повышение концентрации глутамата выше физиологического уровня вызывает в сетчатке блокаду межнейрональной передачи нервных импульсов и сочетается с селективным апоптозом ганглиозных клеток сетчатки из–за нейротоксического действия глутамата [5]. Brooks D.E. et al. [7] обнаружили в собачьих глазах с экспериментально вызванной глаукомой повышенное содержание витреального глутамата, триптофана и низкое содержание глицина по сравнению с контролем. По мнению авторов, высокая концентрация глутамата токсична для ганглиев сетчатки и доказывает ишемический механизм нарушений, происходящих в клетках сетчатки.

Сама по себе идея о нейротоксическом действии глутамата на нервную ткань, в частности, на ганглиозные клетки сетчатки, заимствована из неврологической практики. Неврологи около 20 лет придают значение большим концентрациям данного трансмиттера в развитии такой патологии, как болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, деменция, амиотрофический боковой склероз и другие [4]. Повышенное содержание глутамата в стекловидном теле больных глаукомой, гибель ганглиозных клеток сетчатки под его воздействием в опытах на крысах позволили E.B. Dreyer и соавт. [6] предположить, что данный механизм их гибели имеет место и при ПОУГ. Однако причина внутриклеточного выпуска глутамата не полностью ясна. E.B. Dreyer и соавт. [6] считают, что, возможно, высокое внутриглазное давление приводит к выходу глутамата во внутриклеточные пространства, вызывая гибель клеток, который токсичен для ганглиозных клеток. Второй вероятной причиной гибели клеток, по мнению авторов, является сбой в ферментных системах, ответственных за разрушение данного нейромедиатора после выхода его из синапсов. Трудность подтверждения этих воззрений заключается в том, что очень трудно проверить данные факты на «живом» глазу, однако несомненно, что большие концентрации гутамата токсичны для нервной ткани.

Учитывая вышесказанное, целью нашего исследования явилось обнаружение глутамата у больных ПОУГ.

Материалы и методы исследования

Опытную группу составили 10 больных ПОУГ (6 мужчин, 4 женщины, средний возраст – 74 года), у которых забиралась камерная влага во время экстракапсулярной экстракции катаракты с антиглаукоматозным компонентом. 8 больных были с развитой стадией ПОУГ, 2 с далекозашедшей. Контрольную группу составили больные со старческой катарактой – 14 пациентов (11 мужчин, 3 женщины, средний возраст – 68 лет). Основная и контрольная группы были сопоставимы по возрасту и сопутствующим соматическим заболеваниям.

В основу метода положены описанные Боде и Гири методы количественного определения аминокислот в виде медных производных с нингидридином после хроматографического их разделения на бумаге в нашей модификации [1].

***1. Подготовка пробы для анализа.*** Пробы камерной жидкости объемом 0,1–0,2 мл взвешивают на аналитических весах, упаривают досуха на водяной бане при 40°С в стеклянных микрочашках, используя плавающий штатив. Сухой остаток растворяют в 0,05 мл дистиллированной воды.

***2. Получение одномерных хроматограмм камерной жидкости глаза.*** 20 мкл полученных растворов порциями по 5 мкл с помощью автоматической пипетки наносят на хроматографическую бумагу марки «быстрая» размером 2 x 27 см. Хроматографирование проводят нисходящим методом два раза в одном направлении сначала в смеси растворителей I, затем два раза в смеси II. Смесь I: н–бутиловый спирт, ледяная уксусная кислота, дистиллированная вода (4 : 1 : 5). Смесь II: н–бутиловый спирт, ледяная уксусная кислота, дистиллированная вода (40 : 15 : 5). После каждого пропускания растворителя бумагу высушивают на воздухе и снова помещают в хроматографическую камеру. Время прохождения растворителя в одном направлении 7 часов. Высушенную хроматограмму погружают на несколько секунд в 0,5% раствор нингидрина в ацетоне, просушивают в течение нескольких минут на воздухе и подогревают 10 минут в сушильном шкафу при 50°С для развития окраски. Пятна аминокислот становятся более четкими через сутки, поэтому определение количественного содержания аминокислот следует проводить на следующий день.

***3. Количественное определение глутаминовой кислоты в камерной жидкости глаза.*** Фиолетовые пятна, соответствующие глутаминовой кислоте, вырезают, разрезают на мелкие кусочки и помещают в микропробирки, содержащие 0,25 мл спиртового раствора сульфата меди. Фиолетовая окраска переходит в оранжево–красную в результате образования медного производного аминокислот с нингидрином. Экстракцию продолжают в течение одного часа при комнатной температуре. Интенсивность окраски измеряют на фотоэлектроколориметре Humalyzer 2000 при длине волны 505 нм в микрокюветах против контрольной пробы на бумагу. Расчеты по содержанию аминокислоты проводят по калибровочному графику, полученному со стандартными растворами глутаминовой кислоты.

***4. Построение калибровочного графика.*** Готовят растворы глутаминовой кислоты 0,001 М, 0,00075 М, 0,0005 М, 0,000375 М, 0,00025 М. На бумагу наносят по 20 мкл растворов. Расчет производят по формуле:

А = (С x 5 x 10–2)/V

А – концентрация глутаминовой кислоты в камерной влаге (мкг/мл); C – содержание глутаминовой кислоты, найденной по калибровочному графику (мкг/мл); V – объем проб (мл).

Результаты исследования и обсуждение

Содержание глутамата камерной влаги в контрольной группе составило 28,6±1,6 мкг/мл, при ПОУГ – 84,9±28,7 мкг/мл (разница статистически недостоверна, p>0,05).

Хотя нами и не получено статистически достоверных различий в содержании глутамата у больных ПОУГ и возрастной катарактой, однако имеется явная тенденция к более высокой концентрации данного нейромедиатора в камерной влаге больных ПОУГ. У 5 из 10 больных ПОУГ содержание глутамата в камерной влаге было значительно выше, чем в контрольной группе и колебалось в пределах от 37,6 мкг/мл до 260,3 мкг/мл.

У больных старческой катарактой наивысшая концентрация глутаминовой кислоты составила всего 33 мкг/мл.

Участие некоторых нейромедиаторов в регуляции офтальмотонуса показано в работах А.В. Мягкова [2,3], который доказал влияние опиоидных пептидов на повышение ВГД, воздействуя электрическими колебаниями и химическими раздражителями на миндалевидный комплекс. В результате полученных данных нельзя не согласиться с гипотезой усиления апоптоза ганглиозных клеток сетчатки при ПОУГ вследствие накопления в них глутаминовой кислоты. Однако данная гипотеза требует дальнейшего изучения.

Проведенные исследования впервые позволили обнаружить глутаминовую кислоту в камерной влаге у больных ПОУГ. Содержание глутамата у больных ПОУГ выше, чем в контрольной группе.

**Литература:**

1. Медицинские лабораторные технологии и диагностика: Медицинские лабораторные технологии. Справочник в 2 томах / Под ред. А.М. Карпищенко// Микрометод определения свободных аминокислот в сыворотке крови при помощи хроматографии на бумаге. Т.2. – С–Петербург, «Интермедика», 1999. – С. 106–109

2. Мягков А. В. Влияние пунктурных воздействий на офтальмогипертензию, вызванную электрической и химической стимуляцией миндалевидного комплекса: Авореф. дисс. на соиск. учен. степ. канд. мед. наук. – Казань, 1997 – 21 с.

3. Мягков А.В. Участие опиоидных пептидов в центральной регуляции внутриглазного давления и гидродинамики глаза // Тез. Докладов 7съезда офтальмологов России. – М., 2000.– С.175–176.

4. Пляхин И.В. Биохимические основы пролонгируемой клеточной смерти. // Межрегиональный сборник научн. Трудов / Биохимия на рубеже XXI века. – 2000.– Рязань. – С.173–177.