

Сравнительное изучение возрастных особенностей уровня поперечной связанности коллагена склеры пациентов с различными стадиями первичной открытоугольной глаукомы

Е.Н. Иомдина¹, Л.Л. Арутюнян², Н.Ю. Игнатьева³

¹ ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России

² Центр «Восток-Прозрение», Москва

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Изучены возрастные особенности уровня поперечной связанности коллагена образцов склеры 75 пациентов в возрасте 50–91 года (в среднем $69,9 \pm 9,2$ года) с различными стадиями первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ), полученных во время проведения непроникающей глубокой склерэктомии. Пациенты были разделены на три возрастные группы: 50–59 лет (21 пациент), 60–69 лет (22 пациента), старше 70 лет (32 пациента); в том числе с I стадией ПОУГ было 19 глаз, со II стадией — 24 глаза, с III стадией — 32 глаза. Для оценки уровня поперечной связанности коллагена анализировали термограммы склеры, полученные с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (Phoenix DSC 204, Netzsch, Германия), с определением температуры денатурации (T_m) коллагена и значения энтальпии (ΔH_m). Установлено, что уровень поперечной связанности коллагена склеры глаукомных глаз увеличивается с возрастом, а также растет по мере развития глаукомного поражения. Однако формирование избыточных сшивок, связанное с глаукомным поражением, по-видимому, играет более существенную роль в нарушении ее структурно-биомеханических свойств, чем сшивание коллагеновых комплексов, вызванное естественным процессом старения, поскольку различия по термомеханическим показателям T_m и ΔH_m между разными возрастными группами (в пределах $0,8–1,0$ °C и $0,3–2,1$ Дж/г сухого остатка соответственно) оказались менее значительными, чем различия, связанные с прогрессированием глаукомного поражения (в пределах $1,9–2,6$ °C и $6,7–13,2$ Дж/г сухого остатка соответственно). Выявленные структурно-биомеханические изменения корнеосклеральной оболочки глаза у пациентов с ПОУГ не укладываются в рамки естественных геронтологических процессов, в их основе, очевидно, лежит нарушение метаболизма соединительной ткани.

Ключевые слова: глаукома, склера, старение, коллаген, поперечные сшивки.

Российский офтальмологический журнал, 2016; 1: 19–26

Роль возрастных изменений органа зрения в патогенезе первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ) до конца не определена. В том числе обсуждается вопрос, может ли патологическое ускорение естественных геронтологических изменений склеры и повышение ее ригидности при отсутствии устойчивой нормализации внутриглазного давления (ВГД) predispose к прогрессированию глаукомного

процесса или быть фактором, способствующим развитию глаукомного поражения [1–8].

В работе В. Geraghty и соавт. на основании механических испытаний полосок склеры, вырезанных из различных областей склеральной оболочки глаз лиц разного возраста, установлено, что по мере старения жесткость склеры увеличивается, причем с различной скоростью, зависящей от локализации [9].

Одним из значимых факторов, способствующих появлению такого рода возрастных изменений склеры как соединительнотканного образования, является накопление внутри- и межмолекулярных поперечных связей в фибриллярном коллагене, обеспечивающих в большой степени ее структурную стабильность. Эти связи формируются в основном за счет неферментативной гликации, но также и за счет окислительного деаминарования под действием лизилоксидазы [10]. В результате образуется сшитая сетевая структура, которая обуславливает выполнение специфической механической функции соединительной ткани. В ходе как возрастных, так и патологических процессов сетевая структура может изменяться за счет многих факторов, в том числе за счет локальных и глобальных нарушений конформаций тройной спирали коллагена, способа укладки в коллагеновые фибриллы и волокна и степени их сшивания. Это приводит к отклонению биомеханических характеристик от оптимальных и, как следствие, к нарушению функционирования соединительной ткани [11].

Результаты измерений ВГД в передней камере выделенных свиных глаз, заполненных одинаковым объемом жидкости, показали, что при искусственном повышении уровня поперечной сшитости коллагеновых структур роговицы путем кросслинкинга растет ее жесткость и увеличивается ВГД [12]. При этом более эластичная роговица (кадаверных глаз человека) способна предотвратить колебания ВГД, вызываемые резкими изменениями объема [13]. Повышенная жесткость корнеосклеральной капсулы снижает ее демпфирующую способность, особенно в области решетчатой пластинки (РП) и диска зрительного нерва (ДЗН) при скачках ВГД, свойственных течению данного заболевания [1, 2]. Некоторые авторы отмечают, что с возрастом утолщаются эластические волокна РП склеры, в ней увеличивается содержание 1-го, 2-го и 3-го типов коллагена [14, 15]. Изменяется и состав межклеточного матрикса [14, 15], а также функциональная активность астроцитов [16]. Все эти изменения приводят к возрастному уменьшению эластичности РП и к увеличению ее жесткости. По мнению некоторых авторов, при глаукоме эти процессы сопровождаются ремоделированием РП, по-видимому, вызванным нарушенным синтезом матричных металлопротеиназ [17]. Однако структурная перестройка собственно склеры в процессе развития глаукомного поражения только начинает изучаться [18, 19].

Для оценки состояния коллагена в соединительной ткани широко используется термический анализ [20]. Термическая стабильность коллагена, характеризующаяся температурой и теплотой денатурации (соответственно, T_m и ΔH_m), зависит от посттрансляционной модификации макромолекул коллагена [20–23], от упаковки макромолекул в фибриллы, волокна и пучки [24], а также от взаимодействия колла-

гена с другими матричными макромолекулами [25]. Таким образом, термически индуцированные трансформации коллагена «спираль — клубок» отражают общее состояние коллагеновой структуры.

Для оценки уровня внутри- и межмолекулярной связанности соединительной ткани используют значение температуры пика эндотермического перехода «спираль — клубок» (T_m), а также значение энтальпии ΔH_m , которое определяется энергией нагревания, необходимой для разрушения связей, стабилизирующих тройную спираль нативных макромолекул коллагена. Обе характеристики определяют методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) [22, 25–27]. С помощью ДСК установлено, что величина ΔH_m и форма кривой денатурации здоровых и патологически измененных коллаген-содержащих тканей (хрящей, сухожилий и других соединительнотканых образований) существенно различаются между собой. Возрастание температуры денатурации, определяемой по значению температуры пика эндотермического процесса денатурации T_m , принято связывать с увеличением степени сшивания коллагенового волокна [20]. Величина ΔH_m отражает количество интактных макромолекул коллагена в ткани и количество стабилизирующих связей [27].

Метод ДСК был использован нами ранее для определения уровня поперечной связанности коллагена склеры глаз с разными стадиями ПОУГ [28, 29]. Термомеханический анализ выявил существенное повышение этого уровня по мере прогрессирования глаукомного процесса [18]. Очевидно, что формирование избыточных поперечных химических связей в коллагеновых структурах глаукомной склеры способствует повышению ее жесткости.

Рост поперечных сшивков в склере может быть вызван накоплением конечных продуктов гликации (КПГ), связанным с активацией процессов старения тканей глаза при глаукоме. Резкое повышение содержания КПГ в экстрацеллюлярном матриксе ДЗН, РП и даже в сетчатке глаукомных глаз отмечено в литературе [30].

Однако в недавно проведенном эксперименте, где моделировали глаукомное поражение на глазах молодых и старых макак-резус, получили более выраженные проявления глаукомного процесса именно у молодых животных, а не у старых, как можно было ожидать, исходя из гипотезы о патологическом ускорении процесса старения как факторе развития ПОУГ [31]. Эти данные коррелируют с ранее полученными нами результатами, которые показали, что у старых кроликов в норме модуль упругости склеры несколько выше, чем у молодых, но при этом коэффициент легкости оттока достоверно не отличается в этих группах [32]. Если же искусственно увеличивать уровень поперечной связанности склеры за счет формирования сшивков не возрастной, а другой природы [33]

и тем самым более значительно повышать модуль ее упругости, то отток внутриглазной жидкости заметно снижается [32].

Действительно, рост поперечной сшитости склеры может происходить не только за счет возрастного накопления КПП, но и вследствие патологического дисбаланса ферментативной активности, в частности за счет увеличенной активности лизилоксидазы или роста уровня трансклутаминазы. Эти ферменты способствуют образованию поперечных сшивок амидной природы между аминокислотными остатками глутамина и (гидрокси)лизина [29, 34].

До настоящего времени возрастные особенности формирования поперечных сшивок в коллагеновых структурах склеры и их влияние на течение глаукомного поражения не изучались. Такое исследование представляется существенным шагом в понимании этиологии заболевания и может служить основанием для разработки новых критериев диагностики и методов патогенетической терапии.

В связи с этим **ЦЕЛЬЮ** данной работы явилось сравнительное изучение возрастных особенностей уровня поперечной связанности коллагена склеры пациентов с разными стадиями ПОУГ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

С этой целью были исследованы 75 образцов склеры, взятых у 75 пациентов в возрасте 50–91 года (в среднем $69,9 \pm 9,2$ года) с различными стадиями ПОУГ во время проведения непроникающей глубокой склерэктомии. Пациенты были разделены на три возрастные группы: в возрастной группе 50–59 лет оказался 21 пациент, в группе 60–69 лет — 22 пациента, в группе старше 70 лет — 32 пациента, в том числе с I стадией ПОУГ было 19 глаз, со II стадией — 24 глаза, с III стадией — 32 глаза.

Для определения уровня поперечной связанности проанализированы ДСК-термограммы склеры, полученные с помощью калориметра Phoenix DSC 204 (Netzsch, Германия).

Полученные данные обработаны статистически: определяли среднее значение показателя (Mean) и стандартное отклонение от среднего (St. Dev.), критерий Стьюдента, коэффициент корреляции R

по Спирмену. При проведении непараметрического анализа определяли медиану (Median), минимальные и максимальные значения (Minimum, Maximum), квартили (25,0 и 75,0) и уровень достоверности различий между группами по U-критерию Манна — Уитни ($p < 0,05$ соответствует достоверной разнице).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных показал, что величины T_m , ΔH_m и форма кривых денатурации коллагена (ДСК-термограммы) образцов склеры существенно различаются у больных с начальной (I), развитой (II) и далеко зашедшей (III) стадиями ПОУГ, а также зависят от возраста пациентов.

Проведенный корреляционный анализ показал наличие статистически значимых коэффициентов корреляции T_m и ΔH_m с возрастом пациентов ($R = 0,44$, $p < 0,009$ и $R = 0,44$, $p < 0,009$ соответственно). Положительные значения параметров корреляции свидетельствуют о росте поперечной связанности, а значит, и жесткости склеры с возрастом, что соответствует литературным данным о патологическом изменении матрикса соединительной ткани при старении [11].

Мы получили также положительную корреляционную зависимость между T_m коллагена склеры и стадией ПОУГ ($R = 0,48$, $p < 0,007$). Во всех возрастных группах T_m повышалась по мере развития глаукомного поражения, что совпало с выявленной нами ранее закономерностью [18, 28, 29]. Однако термомеханические показатели склеры в выделенных возрастных группах имели некоторые характерные особенности.

Для пациентов в возрастной категории от 50 до 59 лет с начальной стадией ПОУГ характерен эндотермический переход в денатурированное состояние со средним температурным пиком $T_m = 64,8 \pm 0,06$ °C и энтальпией $\Delta H_m = 8,8 \pm 4,4$ Дж/г сухого остатка, с развитой стадией ПОУГ $T_m = 65,2 \pm 0,3$ °C, $\Delta H_m = 14,0 \pm 5,8$ Дж/г сухого остатка, с далеко зашедшей стадией $T_m = 66,1 \pm 0,8$ °C, $\Delta H_m = 14,3 \pm 3,4$ Дж/г сухого остатка (табл. 1).

На рисунке 1 представлены примеры ДСК-термограмм образцов склеры пациентов этой возрастной категории с различными стадиями ПОУГ.

Таблица 1. Значение термомеханических параметров склеры пациентов в возрасте 50–59 лет в зависимости от стадии ПОУГ

Стадия ПОУГ	T_m , °C						
	Mean	Median	Minimum	Maximum	25,0 th	75,0 th	Std. dev.
I	64,8	64,7	64,6	65,0	64,7	64,9	0,058
II	65,2	65,3	64,8	65,6	65	65,4	0,283
III	66,1	66,2	65,4	66,9	65,6	66,7	0,778
	ΔH_m , Дж/г сухого остатка						
	Mean	Median	Minimum	Maximum	25,0 th	75,0 th	Std. dev.
I	8,8	7,6	4,9	14,0	5,2	13,7	4,378
II	14,0	14,2	9,7	18,1	9,9	18,0	5,827
III	14,3	14,4	11,1	17,9	11,9	16,7	3,408

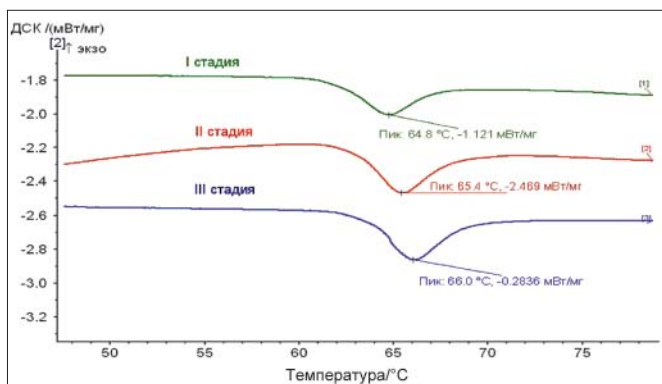


Рис. 1. ДСК-термограммы образцов склеры пациентов с различными стадиями ПОУГ в возрастной категории 50–59 лет.

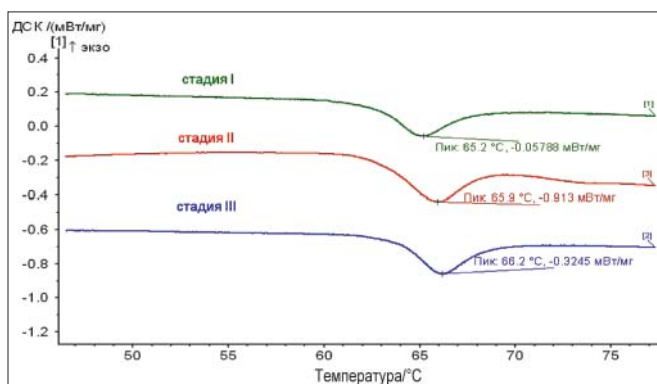


Рис. 2. ДСК-термограммы образцов склеры пациентов с различными стадиями ПОУГ в возрастной категории 60–69 лет.

В данной возрастной группе значения T_m достоверно отличаются в I и II ($p < 0,0007$), II и III ($p < 0,03$), I и III стадиях ($p < 0,000$). При этом диапазон значений T_m по стадиям ПОУГ (min-max) варьирует в пределах 2,3 °C (от 64,6 до 66,9 °C), а разница медиан составляет 1,5 °C (от 64,7 до 66,2 °C).

Значения ΔH_m также достоверно отличаются в I и II ($p < 0,0001$), I и III стадиях ($p < 0,0002$), в то же время достоверная разница по этому показателю между II и III стадиями отсутствовала ($p < 0,34$). При этом диапазон значений ΔH_m по стадиям ПОУГ (min-max) варьирует в пределах 13,2 Дж/г сухого остатка (от 4,9 до 18,1 Дж/г сухого остатка).

При анализе образцов склеры пациентов в возрастной категории от 60 до 69 лет получены несколько другие данные, показывающие рост T_m по сравнению с предыдущим возрастным периодом: для начальной стадии глаукомы характерен эндотермический переход со средним температурным пиком $T_m = 65,6 \pm 0,7$ °C и $\Delta H_m = 6,8 \pm 2,9$ Дж/г сухого остатка, для развитой стадии $T_m = 66,0 \pm 1,3$ °C и $\Delta H_m = 12,2 \pm 3,4$ Дж/г сухого остатка, для далеко зашедшей стадии $T_m = 66,2 \pm 0,8$ °C и $\Delta H_m = 13,7 \pm 3,2$ Дж/г сухого остатка (табл. 2).

В этой возрастной группе значения T_m и ΔH_m с высокой достоверностью отличаются в I и II ($p < 0,0007$), I и III стадиях ($p < 0,000$). Однако у пациентов этой возрастной группы отсутствовала

достоверная разница по показателям T_m и ΔH_m между II и III стадиями ПОУГ ($p < 0,49$). При этом диапазон значений T_m по стадиям ПОУГ (min-max) варьировал в пределах 1,9 °C (от 64,8 до 66,7 °C), а диапазон значений ΔH_m — в пределах 12,2 Дж/г сухого остатка (от 3,2 до 15,4 Дж/г сухого остатка). На рисунке 2 представлены примеры ДСК-термограмм образцов склеры пациентов с различными стадиями ПОУГ в этой возрастной категории.

Незначительный дальнейший рост T_m отмечен у пациентов в возрастной категории от 70 лет и старше: при начальной стадии глаукомы выявлен эндотермический переход со средним температурным пиком $T_m = 65,9 \pm 1,3$ °C и $\Delta H_m = 10,6 \pm 2,6$ Дж/г сухого остатка, при развитой стадии $T_m = 66,4 \pm 0,8$ °C и $\Delta H_m = 11,9 \pm 2,9$ Дж/г сухого остатка, при далеко зашедшей стадии $T_m = 66,7 \pm 0,9$ °C и $\Delta H_m = 14,6 \pm 3,1$ Дж/г сухого остатка (табл. 3).

У пациентов этой возрастной группы значения T_m и ΔH_m достоверно отличались только при I и III стадиях ПОУГ ($p < 0,05$). При этом диапазон значений T_m по стадиям ПОУГ (min-max) варьировал в пределах 2,6 °C (от 65,1 до 67,7 °C), а диапазон значений ΔH_m — в пределах 6,7 Дж/г сухого остатка (от 9,7 до 16,4 Дж/г сухого остатка). На рисунке 3 представлены примеры ДСК-термограмм образцов склеры пациентов с различными стадиями ПОУГ в этой возрастной категории.

Таблица 2. Значение термомеханических параметров склеры пациентов в возрасте 60–69 лет в зависимости от стадии ПОУГ

Стадия ПОУГ	T_m , °C						
	Mean	Median	Minimum	Maximum	25,0 th	75,0 th	Std. dev.
I	65,6	65,4	64,8	66,7	65,2	65,8	0,731
II	66,0	65,5	65,0	67,7	65,1	67,5	1,291
III	66,2	66,2	65,4	67,1	65,7	66,8	0,781
	ΔH_m , Дж/г сухого остатка						
	Mean	Median	Minimum	Maximum	25,0 th	75,0 th	Std. dev.
I	6,8	6,4	3,2	10,8	5,3	8,4	2,941
II	12,2	13,6	7,9	15,1	8,3	14,6	3,401
III	13,7	14,1	10,9	15,4	11,6	16,4	3,214

Таблица 3. Значение термомеханических параметров склеры пациентов в возрасте 70–91 года в зависимости от стадии ПОУГ

Стадия ПОУГ	T _m , °C						
	Mean	Median	Minimum	Maximum	25,0 th	75,0 th	Std. dev.
I	65,9	66,0	65,1	67,5	65,5	66,8	1,301
II	66,3	66,4	65,7	67,1	65,9	66,9	0,814
III	66,7	66,7	66,0	67,7	66,3	67,1	0,932
	ΔH _m , Дж/г сухого остатка						
	Mean	Median	Minimum	Maximum	25,0 th	75,0 th	Std. dev.
I	10,6	10,8	9,7	11,9	10,1	11,3	2,614
II	11,9	11,5	10,33	14,1	9,9	13,6	2,981
III	14,6	14,4	12,9	16,4	13,7	15,4	1,532

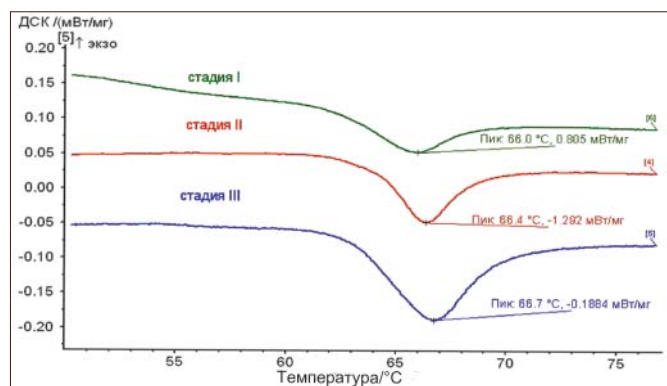


Рис. 3. ДСК-термограммы образцов склеры пациентов с различными стадиями ПОУГ в возрастной категории 70–91 год.

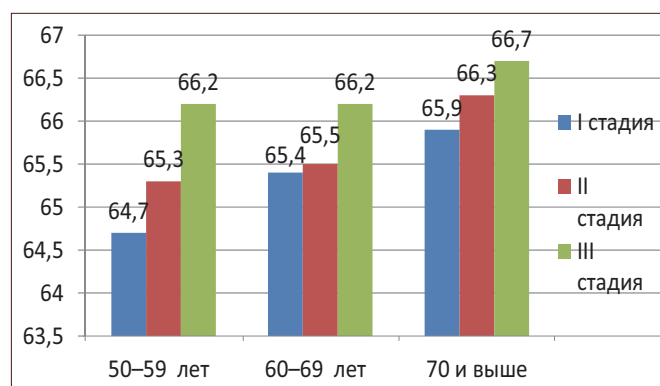


Рис. 4. Значение медиан температуры денатурации T_m (°C) склеры при разных стадиях ПОУГ в разных возрастных группах.

Закономерное повышение T_m по мере развития глаукомного поражения во всех исследованных возрастных группах в пределах 1,9–2,6 °C и ΔH_m в пределах 6,7–13,2 Дж/г сухого остатка свидетельствует об изменении структурно-механических свойств склеры при глаукоме, т. е. о ее ремоделировании.

Увеличение ΔH_m по мере развития патологии может быть связано с возрастанием доли коллагена в ткани. Ранее нами было показано, что количество коллагена в сухом остатке образцов глаукомных глаз меняется от 47 % (стадия I) до 53 % (стадия III) [18, 28, 29]. Однако этого увеличения содержания коллагена недостаточно для объяснения почти полуторакратного роста ΔH_m. По-видимому, возрастающее в результате патологических изменений глаукомного генеза количество связей, стабилизирующих тройную спираль коллагена, обуславливает необходимость в затрате дополнительной энергии для перехода макромолекул коллагена из нативной конформации тройной спирали в состояние случайного клубка.

В то же время повышение T_m и ΔH_m с возрастом в пределах одной и той же стадии ПОУГ менее значительно, чем при прогрессировании глаукомы, и составляет 0,8–1,0 °C и 0,3–2,1 Дж/г сухого остатка соответственно (рис. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ полученных данных позволяет заключить, что уровень поперечной связанности коллагена

склеры глаукомных глаз увеличивается с возрастом, а также растет по мере развития глаукомного поражения. Однако формирование избыточных сшивок, связанное с глаукомным поражением, по-видимому, играет более существенную роль в нарушении ее структурно-биомеханических свойств, чем сшивание коллагеновых комплексов, вызванное естественным процессом старения, поскольку различия по термомеханическим показателям T_m и ΔH_m между разными возрастными группами (в пределах 0,8–1,0 °C и 0,3–2,1 Дж/г сухого остатка соответственно) оказались менее значительными, чем различия, связанные с прогрессированием глаукомного поражения (в пределах 1,9–2,6 °C и 6,7–13,2 Дж/г сухого остатка соответственно). Выявленные структурно-биомеханические изменения корнеосклеральной оболочки глаза у пациентов с ПОУГ не укладываются в рамки естественных геронтологических процессов, в их основе, очевидно, лежит нарушение метаболизма соединительной ткани оболочки. По-видимому, процесс старения (пусть даже и ускоренного) отличается от глаукомного ремоделирования склеры тем, что действуют другие механизмы, изменяющие проницаемость склеры и ее демпфирующую способность в результате воздействия повышенного ВГД. Возможно, исходно более выраженные индивидуальные возрастные изменения структурно-биомеханических свойств склеры могут в совокупности с другими факторами способствовать возникновению ПОУГ,

а также (по механизму отрицательной обратной связи) прогрессированию глаукомного поражения. В целом инволютивные процессы, вызывающие естественную структурную перестройку склеральной ткани, следует, по-видимому, рассматривать как индивидуально выраженный фон, на котором при определенных условиях развиваются процессы ее патологического, глаукомного ремоделирования.

Литература

1. Нестеров А.П. Глаукома. Москва: Медицина; 1995.
2. Иомдина Е.Н., Бауэр С.М., Котляр К.Е. Биомеханика глаза: теоретические аспекты и клинические приложения. Москва: Реал Тайм; 2015.
3. Иомдина Е.Н., Арутюнян Л.Л., Игнатьева Н.Ю. Изучение уровня поперечной связанности коллагена склеры глаукомных глаз в возрастном аспекте. В кн.: VIII Российский общенациональный офтальмологический форум. Сборник научных трудов. Москва; 2015; Т. 1: 76–84.
4. Затулина Н.И., Панормова Н.В., Сеннова Л.Г. Концепция патогенеза первичной открытоугольной глаукомы. В кн.: VII съезд офтальмологов России. Москва; 2000; 1: 131.
5. Симановский А.И. Сравнительный анализ изменения биомеханических свойств склеры в процессе естественного старения и при развитии глаукоматозной патологии. Глаукома. 2005; 4: 13–9.
6. Светлова О.В., Кошиц И.Н. Старение оболочек глаза — возможное ключевое звено в патогенезе открытоугольной глаукомы. В кн.: VII съезд офтальмологов России. Москва; 2000; 1: 193.
7. Downs J.C. Optic nerve head biomechanics in aging and disease. *Experimental Eye Research* 2015; 133: 19–29.
8. Coudrillier B., Tian J., Alexander S., et al. Biomechanics of the human posterior sclera: age- and glaucoma-related changes measured using inflation testing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012; Apr 2; 53(4): 1714–28.
9. Geraghty B., Jones S.W., Rama P., Akhtar R., Elsheikh A. Age-related variations in the biomechanical properties of human sclera. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2012; 16: 181–91.
10. Николаева Т.И., Тиктопуло Е.И., Ильясова Е.Н., Кузнецова С.М. Упаковка коллагеновых фибрилл. *Биофизика*. 2007; 52: 899–911.
11. Fratzl P. Collagen. Structure and Mechanics. Potsdam: Springer; 2008.
12. Liu J., He X. Corneal stiffness affects IOP elevation during rapid volume change in the eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2009; 50(5): 2224–9.
13. Johnson C.S., Mian S.I., Moroi S., et al. Role of corneal elasticity in damping of intraocular pressure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2007; 48: 2540–4.
14. Albona J., Purslow P.P., Karwatowski W.S.S., Eastyd D.L. Age related compliance of the lamina cribrosa in human eyes. *Br. J. Ophthalmol*. 2000; 84: 318–23.
15. Hernandez M.R., Luo X.X., Andrzejewska W. Age-related changes in the extracellular matrix of the human optic nerve head. *Am. J. Ophthalmol*. 1989; 107: 476–84.
16. Kobayashi S., Vidal I., Pena J.D., Hernandez M.R. Expression of neural cell adhesion molecule (NCAM) characterizes a subpopulation of type I astrocytes in human optic nerve head. *Glia*. 1997; 20(3): 262–73.
17. Agapova O.A., Ricard C.S., Salvador-Silva M., Hernandez M.R. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human optic nerve head astrocytes *Glia*. 2001; 33(3): 205–16.
18. Иомдина Е.Н., Игнатьева Н.Ю., Данилов Н.А. и др. Биохимические и структурно-биомеханические особенности матрикса склеры человека при первичной открытоугольной глаукоме. *Вестник офтальмологии*. 2011; 6: 10–4.
19. Иомдина Е.Н., Игнатьева Н.Ю., Арутюнян Л.Л. и др. Изучение коллагеновых и эластических структур склеры глаз при глаукоме с помощью нелинейно-оптической (мультифотонной) микроскопии и гистологии. Предварительное сообщение. *Российский офтальмологический журнал*. 2015; 8(1): 50–8.
20. Игнатьева Н.Ю. Термическая стабильность коллагена в соединительных тканях. Автореф. дисс. ... докт. хим. наук. Москва; 2011.
21. Flandin F., Buffevant C., Herbage D. A differential scanning calorimetry analysis of the age-related changes in the thermal stability of rat skin collagen. *Biochim. Biophys. Acta*. 1984; 791: 205–11.
22. Le Lous M., Flandin F., Herbage D., Allain J.C. Influence of collagen denaturation on the chemorheological properties of skin, assessed by differential scanning calorimetry and hydrothermal isometric tension measurement. *Biochim. Biophys. Acta*. 1982; 717(2): 295–300.
23. Privalov P.L. Stability of proteins. Proteins which do not present a single cooperative system *Adv. Protein Chem*. 1982; 35: 1104.
24. Wallace D.G., Condell R.A., Donovan J.W., et al. Multiple denaturational transitions in fibrillar collagen. *Biopolymers*. 1986; 25(10): 1875–93.
25. Ignatieva N. Yu., Lunin V.V., Averkiev S.V., et al. DSC investigation of connective tissues treated by IR-laser radiation. *Thermochimica Acta*. 2004; 422(2): 43–8.
26. Kronick P., Maleef B., Carroll R. The location of collagens with differential thermal stabilities in fibrils of bovine reticular dermis. *Connect. Tissue Res*. 1988; 18: 123–34.
27. Miles C.A. Differential scanning calorimetry (DSC): protein structure probe useful for the study of damaged tendons. *Equine Vet. J*. 1994; 26: 255–6.
28. Арутюнян Л.Л. Роль вязко-эластических свойств глаза в определении давления цели и оценке развития глаукоматозного процесса. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Москва; 2009.
29. Данилов Н.А., Игнатьева Н.Ю., Иомдина Е.Н. и др. Исследование склеры глаукомных глаз с помощью физико-химического анализа. *Биофизика*. 2011; 56(3): 520–6.
30. Tezel G., Luo C., Yang X. Accelerated Aging in Glaucoma: Immunohistochemical Assessment of Advanced Glycation End Products in the Human Retina and Optic Nerve Head. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2007; 48(3): 1201–11.
31. Yang H., He Lin, Gardiner S.K., et al. Age-Related Differences in Longitudinal Structural Change by Spectral-Domain Optical Coherence Tomography in Early Experimental Glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014; 55: 6409–20.
32. Иомдина Е.Н., Киселева О.А., Назаренко Л.А. и др. Влияние биомеханических свойств корнеосклеральной капсулы глаза на гидродинамику внутриглазной жидкости (экспериментальное исследование). *Биомедицина*. 2012; 3: 25–34.
33. Данилов Н.А., Игнатьева Н.Ю., Иомдина Е.Н. и др. Увеличение стабильности склерального коллагена в ходе гликозилирования трезозой in vitro. *Журнал физической химии*. 2010; 84(1): 131–7.
34. Welge-Lussen U., May C.A. Induction of tissue transglutaminase in the trabecular meshwork by TGF-beta 1 and TGF-beta 2. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2000. 41(8): 2229–38.

A Comparative Study of Age-Related Level of Sclera Collagen Crosslinking in Patients with Different Stages of Primary Open Angle Glaucoma

E.N. Iomdina¹, L.L. Arutyunyan², N.Yu. Ignatieva³

¹Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russia

²Center "Vostok-Prozrenie" Moscow, Russia

³Lomonosov Moscow State University, Russia

iomdina@mail.ru

Age-related levels of sclera collagen crosslinking have been studied in 75 patients aged 50–91 (averagely 69.9 ± 9.2 years) with various degrees of primary open angle glaucoma (POAG), whose sclera samples were obtained during deep nonpenetrating sclerectomy. The patients were divided into three age groups: 50–59 years (21 patients), 60–69 years (22 patients), and over 70 years (32 patients). 19 eyes of these patients had POAG stage I, 24 eyes had POAG stage II, and 32 eyes had stage III. To assess the level of collagen cross-linkage, sclera thermograms obtained by differential scanning calorimetry (Phoenix[®], DSC 204, Netzsch, Germany) involving collagen denaturation temperature (T_m) and enthalpy value (ΔH_m) measurements were analyzed. The level of collagen cross-linkage of glaucomatous sclera was found to increase with age and the stage of glaucomatous damage. However, the formation of excessive cross links associated with glaucomatous damage seems to play a more important role in damaging its structural and biomechanical properties than crosslinking of collagen complexes caused by natural aging, since the differences in values of thermomechanical parameters T_m and ΔH_m across different age groups (staying, respectively, within 0.8 – 1.0 °C and 0.3 – 2.1 J/g of dry residue) proved to be less substantial than the differences associated with the progression of glaucoma (varying, respectively, within 1.9 – 2.6 °C and 6.7 – 13.2 J/g of dry residue). The identified structural and biomechanical changes of the corneoscleral eye shell in patients with POAG do not fit into the pattern of natural aging processes; they are most probably based on the metabolic disorder of the connective tissue.

Keywords: glaucoma, sclera, aging, collagen, crosslinking.

Russian Ophthalmological Journal, 2016; 1: 19–26

References

1. Nesterov A.P. Glaucoma. Moscow: Meditsina; 1995 (in Russian).
2. Iomdina E.N., Bauer S.M., Kotliar K.E. Eye Biomechanics: Theoretical Aspects and Clinical Applications. Moscow: Real Time; 2015 (in Russian).
3. Iomdina E.N., Arutyunyan L.L., Ignatieva N.Yu. The study of glaucoma eyes scleral collagen crosslinking in various age periods. In: Proc. of All-Russian Ophthalmological Forum. Moscow, 2015; 1: 76–84 (in Russian).
4. Zatulina N.I., Panormova N.V., Sennova L.G. Concept of the pathogenesis of primary open angle glaucoma. In: Proc. of VII congress of Russian ophthalmologists. Moscow; 2000; 1: 131.
5. Simanovsky A.I. Comparative analysis of the changing of sclera biomechanical properties in the process of natural aging and in glaucoma development. Glaucoma. 2005; 4: 13–9 (in Russian).
6. Svetlova O.V., Koshits I.N. Aging of eye shells – a possible key link in glaucoma pathogenesis. In: Proc. of VII congress of Russian ophthalmologists. Moscow; 2000; 1: 193 (in Russian).
7. Downs J.C. Optic nerve head biomechanics in aging and disease. Experimental Eye Research 2015; 133: 19–29.
8. Coudrillier B., Tian J., Alexander S., et al. Biomechanics of the human posterior sclera: age- and glaucoma-related changes measured using inflation testing. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012; Apr. 2; 53(4): 1714–28.
9. Geraghty B., Jones S.W., Rama P., Akhtar R., Elsheikh A. Age-related variations in the biomechanical properties of human sclera. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials. 2012; 16: 181–91.
10. Nikolaeva T.I., Tiktopulo E.I., Iliasova E.N., Kuznetsova S.M. Collagen fibrils packing. Biophysics. 2007; 52: 899–911 (in Russian).
11. Fratzl P. Collagen. Structure and Mechanics. Potsdam: Springer; 2008.
12. Liu J., He X. Corneal stiffness affects IOP elevation during rapid volume change in the eye. Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 2009; 50(5): 2224–9.
13. Johnson C.S., Mian S.I., Moroi S., et al. Role of corneal elasticity in damping of intraocular pressure. Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 2007; 48: 2540–4.
14. Albona J., Purslowb P.P., Karwatowski W.S.S., Eastyd D.L. Age related compliance of the lamina cribrosa in human eyes. Br. J. Ophthalmol. 2000; 84: 318–23.
15. Hernandez M.R., Luo X.X. Andrzejewska W. Age-related changes in the extracellular matrix of the human optic nerve head. Am. J. Ophthalmol. 1989; 107: 476–84.
16. Kobayashi S., Vidal I., Pena J.D., Hernandez M.R. Expression of neural cell adhesion molecule (NCAM) characterizes a subpopulation of type 1 astrocytes in human optic nerve head. Glia. 1997; 20(3): 262–73.
17. Agapova O.A., Ricard C.S., Salvador-Silva M., Hernandez M.R. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human optic nerve head astrocytes Glia. 2001; 33(3): 205–16.
18. Iomdina E.N., Ignatieva N.Yu., Danilov N.A., et al. Biochemical and structural peculiarities of human sclera matrix in primary open angle glaucoma. Vestnik oftal'mologii. 2011; 6: 10–4 (in Russian).
19. Iomdina E.N., Ignatieva N.Yu., Arutyunyan L.L., et al. A study of collagen and elastin structures of the sclera in glaucoma using nonlinear optical (multiphoton) microscopy and histology, a preliminary report. Russian Ophthalmological Journal. 2015; 8(1): 50–8 (in Russian).
20. Ignatieva N.Yu. Thermal stability of the collagen in connective

- tissues: Doctoral dis. of chemical sciences. Moscow; 2011 (in Russian).
21. *Flandin F., Buffevant C., Herbage D.* A differential scanning calorimetry analysis of the age-related changes in the thermal stability of rat skin collagen. *Biochim. Biophys. Acta.* 1984; 791: 205–11.
 22. *Le Lous M., Flandin F., Herbage D., Allain J.C.* Influence of collagen denaturation on the chemorheological properties of skin, assessed by differential scanning calorimetry and hydrothermal isometric tension measurement. *Biochim. Biophys. Acta.* 1982; 717(2): 295–300.
 23. *Privalov P.L.* Stability of proteins. Proteins which do not present a single cooperative system *Adv. Protein Chem.* 1982; 35: 1104.
 24. *Wallace D.G., Condell R.A., Donovan J.W., et al.* Multiple denaturational transitions in fibrillar collagen. *Biopolymers.* 1986; 25(10): 1875–93.
 25. *Ignatieva N.Yu., Lunin V.V., Averkiev S.V., et al.* DSC investigation of connective tissues treated by IR-laser radiation. *Thermochimica Acta.* 2004; 422(2): 43–8.
 26. *Kronick P., Maleef B., Carroll R.* The location of collagens with differential thermal stabilities in fibrils of bovine reticular dermis. *Connect. Tissue Res.* 1988; 18: 123–34.
 27. *Miles C.A.* Differential scanning calorimetry (DSC): protein structure probe useful for the study of damaged tendons. *Equine Vet. J.* 1994; 26: 255–6.
 28. *Arutunyan L.L.* The role of ocular viscous and elastic properties for the determination of target pressure and the assessment of glaucoma process: cand. dis. of medical science. Moscow; 2009 (in Russian).
 29. *Danilov N.A., Ignatieva N.Yu., Iomdina E.N., et al.* Sclera of the Glaucomatous Eye: Physicochemical Analysis. *Biophysics.* 2011; 56: 490–5.
 30. *Tezel G., Luo C., Yang X.* Accelerated Aging in Glaucoma: Immunohistochemical Assessment of Advanced Glycation End Products in the Human Retina and Optic Nerve Head. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007; 48(3): 1201–11.
 31. *Yang H., He Lin, Gardiner S.K., et al.* Age-Related Differences in Longitudinal Structural Change by Spectral-Domain Optical Coherence Tomography in Early Experimental Glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014; 55: 6409–20.
 32. *Iomdina E.N., Kiseleva O.A., Nazarenko L.A., et al.* The impact of corneoscleral shell biomechanical properties on the intraocular fluid hydrodynamics (experimental study). *Biomeditsina.* 2012; 3: 25–34 (in Russian).
 33. *Danilov N.A., Ignatieva N.Yu., Iomdina E.N., et al.* The increase of sclera collagen stability due in vitro glycosilation by threose. *Zhurnal fizicheskoy khimii.* 2010; 84: 131–7 (in Russian).
 34. *Welge-Lüssen U., May C.A.* Induction of tissue transglutaminase in the trabecular meshwork by TGF-beta 1 and TGF-beta 2. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000. 41(8): 2229–38.

Адрес для корреспонденции: 105062 Москва, ул. Садовая-Черногрозская, д. 14/19; ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России
iomdina@mail.ru