

ВЛИЯНИЕ КАРОТИНОИДОВ НА СТАБИЛЬНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ И БИОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ХРУСТАЛИКОВЫХ КОМПОНЕНТОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СВЕТОВОЙ ЭНЕРГИИ

Н. Ф. Леус, проф., **Будайа Низар**, аспирант, **Т. В. Пархоменко**, ст. лаборант

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии АМН Украины»

Введение. Катаракта является одним из самых серьезных офтальмологических заболеваний, которое приводит к ограничению и утрате трудоспособности и является наиболее частой причиной слепоты [2, 9].

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в микрохирургии катаракты, это не может полностью обеспечить снижение высокого процента инвалидности в связи с низким зрением и профессиональными ограничениями [12, 15]. Эффективных консервативных методов лечения катаракты и способов ее профилактики в настоящее время также нет, что в частности, обусловлено отсутствием единой концепции о причинах и механизмах развития помутнений хрусталиков с возрастом [18, 19].

Известно, что с возрастом в хрусталике происходит ряд изменений, которые можно рассматривать как признаки физиологического старения: увеличение уровня нерастворимых белков, снижение свободных сульфгидрильных групп, появление пигментированных соединений и увеличение концентрации флуорогенов [1, 3, 6, 7, 13, 21].

Серьезная роль в развитии патологических изменений отводится повышенной генерации свободно-радикальных соединений, которая может быть вызвана нарушением метаболических процессов в хрусталике и окружающих его тканях [11, 14].

В настоящее время существует широкий спектр терапевтических средств для консервативного лечения катаракты [20, 25].

В последнее время большой интерес у медиков вызывают препараты, которые не являются чужеродными для организма человека. Так, в частности, особый интерес проявляется к биофлавоноидам — каротиноидам [8, 16, 17, 23].

Результаты ряда клинических наблюдений позволяют рассматривать их как предпосылки того, что лютеин и зеаксантин могут способствовать снижению риска возникновения возрастной катаракты. Оба каротиноида поступают с пищей в кровяное русло и в конечном итоге накапливаются в тканях глаза [22, 24].

Наиболее высокая концентрация этих каротиноидов отмечается в сетчатке, однако эти флавоноиды обнаруживаются и в хрусталиках. Получены четкие доказательства, что эти вещества обладают антиоксидантными, цитопротекторными свойствами [23, 25].

В связи с этим актуальным является изучение влияния лютеина и зеаксантина на хрусталиковые компоненты глаза в условиях воздействия катарактогенных факторов и, в частности, световой энергии.

Цель настоящей работы заключалась в изучении оптических свойств хрусталикового вещества и активности антиоксидантных ферментов при световом облучении в присутствии физиологических концентраций лютеин/зеаксантина.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Для исследования влияния каротиноидов на биофизические свойства хрусталиковых компонентов при световом воздействии были проведены эксперименты *in vitro*.

В качестве источника света использовали дуговую ртутно-вольфрамовую лампу ДРФ-1000. Гомогенат хрусталиков готовили с использованием 0,9 % раствора хлорида натрия в соотношении 1 : 9 (вес : объем). Облучение гомогенатов производили в кварцевых пробирках (высота — 200 мм, диаметр — 15 мм) сверху, на расстоянии 1,5 м при температуре, равной 0 — +4°С при постоянном перемешивании гомогената. Контрольные пробы выдерживали при тех же временных и температурных условиях, что и опытные, но в темноте.

Первая группа была контрольной, без облучения (12 проб). Вторая — без облучения + лютеин/зеаксантин (12 проб), третья — исследуемые образцы — световое воздействие (12 проб), четвертая — световое воздействие и применение лютеина/зеаксантина (12 проб). Все опытные образцы облучали полихромным светом лампы ДРФ-1000 в течение трех часов. В гомогенаты четвертой группы перед облучением добавляли лютеин и зеаксантин из расчета 0,5 мл соответствующего раствора в 5 мл гомогената для достижения конечной концентрации 25 нг каротиноидов на 1 г влажного веса хрусталика.

Через 3 часа измеряли интенсивность светорассеивания, светопоглощения и флуоресценции хрусталиковых компонентов на спектроколориметре «Spectol» фирмы «Карл Цейс» (Германия). Данные выражали в относительных единицах (ОЕ) светорассеивания и флуоресценции и логарифмических единицах оптической плотности (ОП) при оценке светопоглощения [24].

В гомогенатах хрусталика производили определение активности каталазы и глутатионпероксидазы (во всех группах экспериментов).

Принцип метода определения активности каталазы основан на способности непрореагировавшей перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс с максимумом поглощения при 410 нм.

Энзиматическую реакцию запускали посредством добавления 0,1 мл материала для исследований — гомогената

та хрусталика, содержащего 0,05М трис-НС1-буфере (рН 7,8) — к 2 мл 0,03 % раствора перекиси водорода. В холодную пробу вместо исследуемого материала вносили 0,1 мл дистиллированной воды. Реакцию останавливали через 10 мин добавлением 1 мл 4 % молибдата аммония. Интенсивность развившейся окраски измеряли на спектрофотометре «Спекол-210» — при длине волны 410 нм против контрольной пробы, в которую вместо перекиси водорода добавляли 2 мл воды.

Активность каталазы выражали в нкат/мг ткани [4, 10]. Коэффициент вариации методики — 8,7 %.

Активность глутатионпероксидазы определяли спектрофотометрически по скорости образования окисленного глутатиона с помощью сопряженной реакции с НАДФН-зависимым ферментом глутатионредуктазой, регистрируя изменение оптической плотности при окислении редуциента — НАДФН.

Для определения в пробирку вносили 0,1 мл раствора, содержащего 0,1 М К-фосфатного буфера (рН 7,5), 2 мМ ЭДТА и 10 мМ восстановленного глутатиона и 0,1 мл материала для исследования. Через 3 мин инкубации при 25°С вносили 0,01 мл 40 мМ гидроперекиси трет-бутила. Спустя 5 мин в реакционную смесь добавляли 3,84 мл раствора 0,5 М трис-НС1 буфера (рН 7,7) с 1 мМ ЭДТА. Сразу после этого 2 мл полученного раствора вносили в кювету и добавляли 0,05 мл 3,5 мМ НАДФН и 0,02 мл глутатионредуктазы (0,06 ед.). Быстро перемешивали и определяли изменение оптической плотности при 340 нм в течение 1 мин на спектрофотометре «Спекол-210».

Коэффициент вариации методики — 1,8 %.

Активность фермента выражали в нкат/мг ткани [10].

Полученные экспериментальные данные обрабатывали с помощью статистического пакета SPSS 11.0 [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Данные о влиянии лютеин/зеаксантина на показатели светорассеивания, светопоглощения и флуоресценции хрусталиковых компонентов при световом облучении *in vitro* представлены в таблице 1.

Исследование светорассеивания хрусталиковых компонентов в эксперименте *in vitro* выявило несущественное понижение исследуемого показателя без облучения, с применением лютеин/зеаксантина до (36,5±1,1) ОЕ, что составило 97,6 % по сравнению с контролем (37,24±1,2) ОЕ, при воздействии света отмечается повышение показателей светорассеивания до (45,8±1,4) ОЕ, что составило 122,5 % по сравнению с контролем, а при световом воздействии и применении лютеин/зеаксантина показатели светорассеивания составили — (41,0±1,3) ОЕ — 109,6 %. Таким образом, применение лютеин/зеаксантина при световом воздействии снижает показатели светорассеивания до 89,5 % по сравнению с группой «свет».

В наших исследованиях *in vitro* было обнаружено, что без облучения и с применением лютеин/зеаксантина показатели светопоглощения от нормы не отличались и составили — (0,08±0,004) ОП, при облучении гомогенатов хрусталика светом показатели светопоглощения повысились до (0,14±0,007) ОП, что составило 175 % по отноше-

нию к контролю, при световом воздействии и применении лютеин/зеаксантина исследуемый показатель составил — (0,10±0,006) ОП — 125 %. В целом, применение лютеин/зеаксантина при воздействии света снижает показатели светопоглощения до 71,4 % по сравнению с группой облученных гомогенатов.

Таблица 1

Влияние лютеин/зеаксантина на показатели светорассеивания, светопоглощения и флуоресценции хрусталиковых компонентов при облучении *in vitro*

Статистич. показатели	Условия эксперимента			Свет + лютеин / зеаксантин (n=12)
	Без облучения (n=12)	Без облучения + лютеин/ зеаксантин (n=12)	Свет (n=12)	
Светорассеивание, относительные ед.				
М	37,4	36,5	45,8	41,0
m	1,2	1,1	1,4	1,3
P	—	>0,05	<0,001	>0,05
%	100	97,6	122,5	109,6
pl	—	—	—	<0,05
%1	—	—	100	89,5
Светопоглощение, ед. оптической плотности				
М	0,08	0,08	0,14	0,10
m	0,003	0,004	0,007	0,006
P	—	>0,05	<0,001	<0,01
%	100	100	175,0	125,0
pl	—	—	—	<0,001
%1	—	—	100	71,4
Флуоресценция, относительные ед.				
М	57,1	63,4	72,3	61,8
m	1,3	1,2	1,5	1,4
P	—	<0,01	<0,001	<0,05
%	100	111,0	126,6	108,2
Pl	—	—	—	<0,001
%1	~	—	100	85,5

Примечания: p — уровень значимости по отношению к группе «Без облучения»; p1 — уровень значимости по отношению к группе проб, подвергнутых световому воздействию.

Анализируя экспериментальные данные по определению флуоресценции в гомогенатах хрусталика, следует отметить, что без облучения, но с применением лютеин/зеаксантина исследуемый показатель составил (63,4±1,2) ОЕ — 111,0 % по отношению к контролю — (57,1±1,3) ОЕ. При световом воздействии показатели флуоресценции были повышены до (72,3±1,5) ОЕ, что составило 126,6 % по отношению к контролю. При воздействии света и применении лютеин/зеаксантина показатели флуоресценции составили (61,8±1,4) ОЕ — 108,2 % по отношению к норме. Таким образом, применение лютеин/зеаксантина при воздействии света снижает показатели флуоресценции до 85,5 % по сравнению с группой «свет».

Данные об активности каталазы и глутатионпероксидазы после облучения хрусталиковых компонентов в присутствии и отсутствии лютеин/зеаксантина представлены в таблице 2.

Таблица 2

Активность каталазы и глутатионпероксидазы после облучения хрусталиковых компонентов в присутствии и отсутствии лютеин/зеаксантина

Исследуемые ферменты	Стат. показатели	Условия эксперимента			
		Без облучения (n=12)	Без облучения + лютеин / зеаксантин (n=12)	Свет (n=12)	Свет + лютеин / зеаксантин (n=12)
Каталаза, нкат/мг белка	M	4,50	4,64	2,62	3,56
	m	0,32	0,34	0,28	0,33
	P	—	>0,05	<0,001	>0,05
	%	100	103,1	58,2	79,1
	pl	—	—	—	<0,05
	%1	—	—	100	135,9
Глутатионпероксидаза, нкат/мг белка	M	3,24	3,40	2,12	2,73
	m	0,20	0,23	0,19	0,21
	P	—	>0,05	<0,001	>0,05
	o/o	100	104,9	65,4	84,3
	pl	—	—	—	<0,05
	%1	—	—	100	128,8

Примечания: p — уровень значимости различий данных по отношению к группе «Без облучения»; pl — уровень значимости различий данных по отношению к группе проб, подвергнутых световому воздействию.

Изучая активность каталазы в хрусталиковых компонентах, следует отметить, что в группе без облучения, но с применением лютеин/зеаксантина она составила — (4,64±0,34) нкат/мг — 103,1 % по сравнению с нормой — (4,50±0,32) нкат/мг, т. е. практически не изменялась. При световом воздействии активность каталазы снизилась до (2,62±0,28) нкат/мг, что составило 58,2 % по сравнению с нормой. При воздействии света и применении лютеин/зеаксантина активность каталазы составила (3,56±0,33) нкат/мг — 79,1 % по отношению к норме. Под действием лютеин/зеаксантина на облученные гомогенаты активность каталазы повышается до 135,9 % по сравнению с группой «свет».

Активность глутатионпероксидазы в группе без облучения и с применением лютеин/зеаксантина была незначительно повышена до (3,40±0,23) нкат/мг, что составило 104,9 % по отношению к норме — (3,24±0,20) нкат/мг. При воздействии света активность исследуемого фермента была снижена до (2,12±0,19) нкат/мг, что составило 65,4 % по отношению к норме. При световом воздействии и применении лютеин/зеаксантина активность глутатионпероксидазы составила (2,73±0,21) нкат/мг — 84,3 % по отношению к норме. В целом же применение лютеин/зеаксантина при воздействии света повышает активность глутатионпероксидазы до 128,8 % по сравнению с группой «свет».

Анализируя полученные экспериментальные данные, необходимо отметить, что изучаемые каротиноиды оказывали выраженное защитное влияние от повреждающего действия световой энергии на

оптические свойства хрусталиковых компонентов. Наряду с этим лютеин/зеаксантин в значительной мере предотвращали фотоинактивацию антиоксидантных ферментов: глутатионпероксидазы и каталазы.

В механизме такого позитивного действия каротиноидов на хрусталик при световом облучении его компонентов, несомненно, важная роль принадлежит их способности гасить образуемые при фотохимических процессах свободно-радикальные формы кислорода (супероксидный и гидроксильный радикалы). Прямым защитным влиянием каротиноидов на глутатионпероксидазу и каталазу можно объяснить выявленное снижение пероксидативного стресса при световом облучении [14, 23].

В целом представленные результаты позволяют обосновать дальнейшее изучение антикатарактальных свойств каротиноидов.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что каротиноиды лютеин/зеаксантин оказывают выраженное защитное воздействие на хрусталиковые компоненты при световом воздействии *in vitro*. В этих условиях показатели светорассеивания, светопоглощения и флуоресценции возрастают в меньшей степени по сравнению с облучаемым контролем — в среднем соответственно на 10,5 %, 28,6 %, 14,5 % соответственно.

2. Фотоинактивация антиоксидантных ферментов хрусталика в присутствии физиологических концентраций лютеин/зеаксантина заметно меньше — для глутатионпероксидазы — на 28,8 %, для каталазы — на 35,9 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Иванова О. Н.** Влияние флогэнзима на оптические свойства хрусталиковых компонентов при воздействии световой энергии в эксперименте / Иванова О. Н., Леус Н. Ф., Коломийчук С. Г. // Проблемы экологічної та медичної генетики і клінічної імунології. — Київ-Луганськ-Харків. — 2002. — Вип. 6 (45). — С 211–217.
2. **Корхмазян М. М.** Механизмы фотоповреждения структур глаза. Действие УФ-света на растворимые белки хрусталика / Корхмазян М. М., Федорович И. Б., Островский М. А. // Биофизика. — 1983. — Т. 28. — № 6. — С. 966–971.
3. **Курганов Б. И.** Кинетика агрегации белков. Количественная оценка шаперонной активности в тестах, основанных на подавлении и агрегации белков // Биохимия. — 2002. — Т. 67. — Вып. 4. — С. 492–507.
4. **Меньшиков К. Ф.** Лабораторные исследования в клинике / Меньшиков К. Ф., Делекторская Л. Н., Золотницкая Р. П. // Справочник. — М.: Медицина. — 1987. — 268 с.
5. **Наследов А.** SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках // Спб.: Питер, 2005. — 416 с.

6. Трофимова Н. Н., Зак П. П., Островский М. А. Функциональная роль каротиноидов желтого пятна сетчатки глаза // Сенсорные системы. — 2003. — Т. 17. — № 3. — С. 198–208.
7. Шальк В. Лютеин и зеаксантин: два основных компонента для здоровья глаз / Шальк В. // Офтальмологический журнал. — 2010. — № 1. — С. 108–110.
8. Arnal E. Lutein prevents cataract development and progression in diabetic rats / Arnal E., Miranda M., Almansa I. // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. — 2008. — Vol. 3. — P. 233–258.
9. Berendschot T. T. Lens aging in relations to nutritional determinants and possible risk factors for age-related cataract / Berendschot T. T., Broekmans W. M. R. // Arch. Ophthalmol. — 2002. — Vol. 120. — P. 1732–1737.
10. Bergmeyer H. U. Methoden der enzymatischen Analyse. — Herausgegeben von H. U. Bergmeyer. — Berlin. — 1986. — S. 2254–2265.
11. Bunce G. E. Nutritional factors in cataract / Bunce G. E., Kinoshita J., Horwitz J. // Annu Rev. Nutr. — 1990. — Vol. 10. — P. 233–254.
12. Chasan-Taber L. A prospective study of carotenoid and vitamin A intakes and risk of cataract extraction in US women / Chasan-Taber L., Willett W. C., Seddon J. M. // Am. J. Clin. Nutr. — 1999. — Vol. 70. — P. 509–516.
13. Chitchumroonchokchai C. Xanthophylls and a-tocopherol decrease UVB-induced lipid peroxidation and stress signaling in human lens epithelial cells / Chitchumroonchokchai C., Bomser J. A., Glamm J. E. // J. Nutr. — 2004. — Vol. 134. — P. 3225–3232.
14. Fernandez M. M. Nutrition and the prevention of cataracts / Fernandez M. M., Afshari N. A. // Curr. Opin. Ophthalmol. — 2008. — Vol. 19. — № 1. — P. 66–70.
15. Gale C. R. Plasma antioxidant vitamins and carotenoids and age-related cataract / Gale C. R., Hall N. F., Phillips D. I. W. // Ophthalmol. — 2001. — Vol. 108. — P. 1992–1998.
16. Gruseki W. I. Carotenoid orientation: role in membrane stabilization / Gruseki W. I. // Marcel Dekker. — 2004. — P. 123–128.
17. Hankinson S. E. Nutrient intake and cataract extraction in women: a prospective study / Hankinson S. E., Stampfer M. J., Seddon J. M. // BMJ. — 1992. — Vol. 305. — P. 335–339.
18. Jacques P. E. Long-term nutrient intake and early age-related nuclear lens opacities / Jacques P. E., Chylack L. T. // Arch. Ophthalmol. — 2001. — Vol. 119. — P. 1009–1019.
20. Krinsky N. I., Landrum J. T., Bone R. A. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye // Annu Rev. Nutr. — 2003. — Vol. 23. — P. 171–201.
21. Leske M. C. The lens opacities case-control study / Leske M. C., Chylack L. T., Wu S-Y. // Arch. Ophthalmol. — 1991. — Vol. 109. — P. 244–251.
22. Mares J. A. Predictors of optical density of lutein and zeaxanthin in retinal of older women in the carotenoids in age-related eye disease study, an ancillary study of the women's health initiative / Mares J. A., La Rowe T. L., Snodderly D. M. // Am. J. Clin. Nutr. — 2006. — Vol. 84. — P. 1107–1122.
23. Moeller S. M. Associations between age-related nuclear cataract and lutein and zeaxanthin in the diet and serum in the carotenoids in age-related eye disease study, an ancillary study of the women's health initiative / Moeller S. M., Volland R., Tinker L. // Arch. Ophthalmol. — 2008. — Vol. 126. — № 3. — P. 354–364.
24. Trevithick-Sutton C. C The retinal carotenoids zeaxanthin and lutein scavenge superoxide and hydroxylradicals: a chemiluminescence and ESR study / Trevithick-Sutton C. C, Foote C. S., Collins M. // Мої. Vis. — 2006. — Vol. 12. — P. 1127–1135.
25. Van den Berg T. J. T. P. Importance of pathological intraocular light scatter for visual disability / Van den Berg T. J. T. P. // Doc. Ophthalmol. — 1986. — Vol. 61. — P. 327–333.
26. Vu H. T. V. Lutein and zeaxanthin and risk of cataract: the Melbourne visual impairment project / Vu H. T. V., Robman L., Hodge A. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2006. — Vol. 47. — P. 3783–3786.

Поступила 09.02.2012

Рецензент д-р мед.наук С. К. Дмитриев

