

УДК 617.741–004.1–092.9–085–07+577.11

Влияние каротиноидов и биофлавоноидов на процессы пероксидации в хрусталике при моделировании возрастной катаракты

Н. Ф. Леус, проф., Будаёа Низар, аспирант, А. В. Гиржева, аспирант

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова НАМН Украины», Одесса

У тварин з експериментальною катарактою вивчали вплив кверцетину, лютеїну і зеаксантину на процеси пероксидації в кристалику. Отримані результати показали, що досліджувані каротиноїди (лютеїн і зеаксантин) та біофлавоноїд (кверцетин) при моделюванні вікової катаракти знижують інтенсивність процесів перекисного окислення ліпідів.

Ключевые слова: катаракта, каротиноиды, биофлавоноиды

Ключові слова: катаракта, каротиноїди, біофлавоноїди

Effect of carotenoids and bioflavonoids on peroxidation processes in the lens modeling age-related cataract

N. F. Leus, Budayya Nizar, A. V. Girzheva

The Filatov Institute of Eye diseases and Tissue Therapy of National Medical Sciences Academy, Odessa

In animals with experimental cataract studied the effect of quercetin, lutein and zeaxanthin in the process of peroxidation in the lens. The results showed that the studied carotenoids (lutein and zeaxanthin) and bioflavonoids (quercetin) in modeling age-related cataracts reduce the intensity of lipid peroxidation.

Key words: cataract, carotenoids, bioflavonoids

Введение. В настоящее время повсеместно отмечается значительный рост заболеваемости возрастной катарактой, которую относят к главным причинам слепоты в мире.

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. Эффективных консервативных методов лечения катаракты и способов ее профилактики в настоящее время также нет, что в частности, обусловлено отсутствием научно-разработанной концепции о причинах и механизмах развития помутнений хрусталиков в возрастном аспекте [2, 8, 11].

Известно, что механизм развития возрастных катаракт является многофакторным и изучен не полностью. В самом общем виде патогенез возрастной катаракты можно представить как процесс ускоренного старения хрусталика в условиях дисбаланса между системой защиты и стабилизации его компонентов и многочисленными экзо- и эндогенными факторами, прямо или косвенно повреждающими хрусталик [14, 16].

В развитии катарактогенеза немаловажную роль играет физико-химический фактор повреждения белковых структур. Образование флюорогенов яв-

ляется следствием окисления триптофана с образованием окрашенных веществ. Так, в результате окислительного процесса возникают разного рода окрашенные вещества, изменяющие не только окраску хрусталика, но и ухудшающие светопропускные его способности, а также его светопоглощение [19, 21].

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

Исходя из свободно-радикальной теории катарактогенеза, высокореакционные соединения кислорода и продукты перекисного окисления липидов оказывают повреждающее воздействие на функциональные группы белков хрусталика, вызывают изменение их нативных свойств и полимеризацию, ведущую к образованию высокомолекулярных белковых соединений, нарушению оптических характеристик белков при снижении параметров антиоксидантной защиты хрусталика [1, 26].

В настоящее время существует широкий спектр терапевтических средств для консервативного лечения катаракты.

© Н. Ф. Леус, Будаёа Низар, А. В. Гиржева, 2013

В последнее время большой интерес у медиков вызывают препараты, которые не являются чужеродными для организма человека. Так, в частности, особый интерес проявляется к флавоноидам и каротиноидам [12, 15, 18, 20, 22, 24].

Результаты ряда клинических наблюдений можно рассматривать как предпосылки того, что кверцетин, лютеин и зеаксантин могут способствовать снижению риска возникновения возрастной катаракты. Оба каротиноида и кверцетин поступают с пищей в кровяное русло и в конечном итоге могут накапливаться в тканях глаза [13, 17, 23, 25].

В связи с этим актуальным является углубленное изучение влияния кверцетина, лютеина и зеаксантина на процессы пероксидации в хрусталике при моделировании возрастной катаракты.

Материал и методы исследования

Экспериментальные исследования проводились на кроликах (массой 2,5–3,2 кг).

Работа с животными проводилась с учетом требований Международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с экспериментальными животными, которые были предложены на Совете международных медицинских организаций (1985 г.) «О мерах по дальнейшему совершенствованию форм работы с использованием экспериментальных животных».

Моделирование световой катаракты осуществляли в течение 40 недель у кроликов породы Шиншилла. Опытные группы животных подвергали воздействию облучения светом дуговой ртутной лампы типа ДРФ — 1000 (1000 Вт) высокой интенсивности в спектральном диапазоне от 350 до 1150 нм ежедневно в режиме светового дня в течение 9 часов.

Подопытные животные были разделены на несколько групп: группа «свет» — 12 кроликов (24 глаза), группа «свет+каротиноиды» — 12 кроликов (24 глаза), группа «свет+кверцетин» — 12 кроликов (24 глаза).

На протяжении эксперимента состояние хрусталиков оценивали биомикроскопически с использованием щелевой лампы фирмы «Карл Цейс». Зрачки предварительно расширялись инстилляциями 1–2 капель 1 % раствора атропина. Осмотр проводили перед началом и каждые две недели до окончания эксперимента.

В гомогенатах хрусталиков определяли содержание малонового диальдегида и диеновых конъюгатов.

Принцип метода определения содержания малонового диальдегида состоит в том, что при температуре 100 °С в кислой среде малоновый диальдегид реагирует с 2-тиобарбитуровой кислотой, образуя окрашенный триметиновый комплекс с максимумом поглощения при длине волны 532 нм.

К исследуемому гомогенату объемом 0,1 мл приливали 3 мл 1 % ортофосфорной кислоты (рН 2,0), 1 мл 0,6 % раствора тиобарбитуровой кислоты и 0,1 мл 0,28 % раствора сернокислого железа. Пробирки помещали в кипящую водяную баню на 60 мин. Затем пробирки охлаждали в холодной воде при 0 °С — 2 °С и добавляли 4 мл бутанола, тщательно перемешивали и центрифугировали 10 мин при 3 тыс. об/мин.

Измеряли оптическую плотность верхней фазы на спектроколориметре «Spectol — 210» при длине волны 535 нм против бутанола.

Расчет содержания продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, проводили с учетом коэффициента

молярной экстинкции малонового диальдегида — $1,56 \cdot 10^5$ моль⁻¹·см⁻¹ и выражали в мкмоль/г ткани.

Коэффициент вариации методики — 5,2 %.

Принцип метода определения диеновых конъюгатов состоит в том, что при перекисном окислении на стадии образования свободных радикалов в молекулах полиненасыщенных высших жирных кислот возникает система сопряженных двойных связей, что сопровождается появлением нового максимума в спектре поглощения 233 нм.

К 0,5 мл исследуемого гомогената добавляли 4,5 мл экстрагирующей смеси гептана с изопропиловым спиртом в соотношении 1:1 (V:V). После экстракции к смеси добавляли 0,5 мл дистиллированной воды и отбирали из верхней (гептановой) фазы расслоившейся пробы 0,5 мл и смешивали с 2,5 мл абсолютного этилового спирта.

Оптическую плотность испытуемого раствора измеряли на спектрофотометре СФ-26 при 233 нм против этилового спирта.

Содержание диеновых конъюгатов рассчитывали с учетом молярного коэффициента экстинкции $2,2 \cdot 10^5$ М⁻¹·см⁻¹ и выражали в мкмоль/г ткани.

Полученные при экспериментальных исследованиях количественные данные были подвергнуты статистическому анализу [8].

Результаты и их обсуждение

Данные об уровне малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в хрусталике кроликов при моделировании катаракты и применении каротиноидов представлены в таблице 1.

Как видно из представленных данных, уровень малонового диальдегида в хрусталиках животных в группе со световым воздействием был повышен до $(14,03 \pm 1,02)$ мкмоль/г, что составило — 160,5 % по отношению к норме $(8,74 \pm 0,65)$ мкмоль/г. У животных со световым воздействием и применением каротиноидов содержание малонового диальдегида составило $(11,23 \pm 0,78)$ мкмоль/г, т.е. — 128,5 % по сравнению с нормой.

Содержание диеновых конъюгатов в хрусталиках животных в группе со световым воздействием повысилось до $(3,23 \pm 0,25)$ мкмоль/г, что составило — 131,8 % по сравнению с нормой $(2,45 \pm 0,20)$ мкмоль/г. В группе животных со световым воздействием и применением каротиноидов содержание диеновых конъюгатов составило $(2,82 \pm 0,18)$ мкмоль/г, т.е. — 115,1 % по отношению к норме.

Данные о влиянии флавоноидов на содержание малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в хрусталиках кроликов в условиях моделирования катаракты представлены в таблице 2.

Уровень малонового диальдегида в хрусталиках животных в группе со световым воздействием был повышен до $(13,98 \pm 1,10)$ мкмоль/г, что составило — 163,3 % по отношению к норме $(8,56 \pm 0,60)$ мкмоль/г. У животных со световым воздействием и применением кверцетина содержание малонового диальдегида составило $(9,63 \pm 0,80)$ мкмоль/г, т.е. — 112,5 % по сравнению с нормой.

Таблица 1. Влияние каротиноидов на содержание малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в хрусталиках кроликов в условиях моделирования катаракты (мкмоль/г ткани)

Биохимические показатели	Статистические показатели	Условия эксперимента		
		Норма	Свет	Свет + каротиноиды
Малоновый диальдегид	n	8	12	12
	M±m	8,74±0,65	14,03±1,02	11,23±0,78
	p	–	<0,01	<0,05
	%	100,0	160,5	128,5
	p1 %1	– –	– 100,0	<0,05 80,0
Диеновые конъюгаты	n	8	12	12
	M±m	2,45±0,20	3,23±0,25	2,82±0,18
	p	–	<0,05	>0,05
	%	100,0	131,8	115,1
	p1 %1	– –	– 100,0	>0,05 87,3

Примечания: p — уровень значимости различия данных по отношению к норме; p1 — уровень значимости различия данных по отношению к группе «Свет».

Таблица 2. Влияние флавоноидов на содержание малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в хрусталиках кроликов в условиях моделирования катаракты (мкмоль/г ткани)

Биохимические показатели	Статистические показатели	Условия эксперимента		
		Норма	Свет	Свет + флавоноиды
Малоновый диальдегид	n	8	12	12
	M±m	8,56±0,60	13,98±1,10	9,63±0,80
	p	–	<0,001	>0,05
	%	100,0	163,3	112,5
	p1 %1	– –	– 100,0	<0,01 68,9
Диеновые конъюгаты	n	8	12	12
	M±m	2,50±0,21	3,26±0,22	2,61±0,20
	p	–	<0,05	>0,05
	%	100,0	130,4	104,4
	p1 %1	– –	– 100,0	<0,05 80,1

Примечания: p — уровень значимости различия данных по отношению к норме; p1 — уровень значимости различия данных по отношению к группе «Свет».

Содержание диеновых конъюгатов в хрусталиках животных в группе со световым воздействием повысилось до (3,26±0,22) мкмоль/г, что составило — 130,4 % по сравнению с нормой (2,50±0,21) мкмоль/г. В группе животных со световым воздействием и применением флавоноидов содержание диеновых конъюгатов составило (2,61±0,20) мкмоль/г, т. е. — 104,4 % по отношению к норме.

В качестве одного из механизмов благоприятного действия относительных изменений уровня продуктов перекисного окисления липидов в хрусталике при катарактогенезе, необходимо отметить выраженную защиту от повреждающего действия световой энергии на энзиматическую антиоксидантную систему в хрусталике.

Нами было также установлено, что каротиноиды лютеин/зеаксантин оказывают выраженное защитное воздействие на ферменты антиоксидантной си-

стемы и хрусталиковые компоненты при световых воздействиях *in vitro*. В этих условиях показатели светорассеивания, светопоглощения и флуоресценции возрастают в меньшей степени по сравнению с облучаемым контролем.

Таким образом, приведенные в данной работе данные, в комплексе с ранее полученными результатами экспериментальных исследований, в значительной мере раскрывают механизм антикатарактогенного действия изученных природных соединений [2, 5].

Изученные флавоноиды и каротиноиды существенно повышают устойчивость хрусталика к длительному воздействию катарактогенного фактора и замедляют развитие первичных помутнений хрусталика.

Закключение. Каротиноиды оказывают защитное влияние на процессы перекисидации в хру-

сталике при повреждающем действии световой энергии высокой интенсивности в эксперименте. Это особенно выражено в отношении конечных продуктов перекисного окисления липидов —

малонового диальдегида, уровень которого при моделировании катаракты под влиянием каротиноидов был ниже на 20 % по сравнению с контролем.

Литература

1. **Бабижаев М. А., Шведова А. А., Архипенко Ю. В.** Накопление продуктов перекисного окисления липидов в хрусталике при катаракте // Бюл. exper. биол. — 1985. — № 9. — С. 299–301.
2. **Леус Н. Ф., Гиржева А. В., Журавок Ю. А.** Влияние биофлавоноидов (кверцетина и рутина) на развитие патологических изменений в хрусталике при моделировании возрастной катаракты // Офтальмол. журн. — 2010. — № 6. — С. 60–65.
3. **Леус Н. Ф.** Влияние каротиноидов на стабильность антиоксидантных ферментов и биофизические свойства хрусталиковых компонентов при воздействии световой энергии / Н. Ф. Леус, Будаёя Низар, Пархоменко Т. В. // Офтальмол. журн. — 2012. — № 2. — С. 54–57.
4. **Леус Н. Ф., Будаёя Низар.** Действие каротиноидов на антиоксидантную систему хрусталиков кроликов с экспериментальной возрастной катарактой // Офтальмол. журн. — 2012. — Т. 15. — № 3. — С. 82–84.
5. **Леус Н. Ф., Будаёя Низар.** Эффективность антикатарактогенного действия каротиноидов (лютеина и зеаксантина) при развитии экспериментальной катаракты // Офтальмол. журн. — 2012. — № 3. — С. 64–67.
6. **Леус Н. Ф.** Уровень свободных аминокислот в хрусталике и камерной влаге глаза при развитии экспериментальной катаракты / Н. Ф. Леус, Аслам Набилъ, А. А. Путиенко // Офтальмол. журн. — 2007. — № 3. — С. 50–54.
7. **Леус М. Ф., Метеліцина І. П., Дрожжина Г. І.** та ін. Спосіб моделювання променевої катаракти: Пат. 20178 Україна, ПМК G 09 В 23/28, № 4712831/SU; Заявл. 13.07.89; Опубл. 25.12.97; Бюл. «Пром. власн.» № 6. — ч. 2. — С. 576.
8. **Мальцев Э. В.** Эпидемиология катаракт / Э. В. Мальцев, Н. А. Багиров // Офтальмол. журн. — 2001. — № 6. — С. 45–49.
9. **Наследов А.** SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках. // Спб.: Питер, 2005. — 416 с.
10. Новые методы биохимического анализа. // Изд. Ленинградского универ. — 1991. — 395 с.
11. **Полунин Г. С.** Классификация катаракт и возможность их терапевтического лечения / Г. С. Полунин, Е. Г. Полунина, Н. Л. Шеремет // Рефракционная хирургия и офтальмология. — 2003. — Т. 3, № 2. — С. 37–42.
12. **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.
13. **Шальк В.** Лютеин и зеаксантин: два основных компонента для здоровья глаз / Шальк В. // Офтальмол. журн. — 2010. — № 1. — С. 108–110.
14. **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.
15. **Bian Q., Gao S., Zhou J.** Lutein and zeaxanthin supplementation reduces photooxidative damage and modulates the expression of inflammation-related genes in retinal pigment epithelial cells // Free Rad. Biol. Med. — 2012. — Vol. 53. — P. 1298–1307.
16. **Delcourt C.** Risk factors for cortical, nuclear, and posterior subcapsular cataracts / Delcourt C., Cristol J. P., Tessier F. // Am. J. Epidemiol. — 2000. — Vol. 151. — № 5. — P. 497–504.
17. **Dorey C. K., Granata L., Nichols C. R.** Dietary modulation of lens zeaxanthin in quail // Exp. Eye Res. — 2005. — Vol. 81. — P. 464–477.
18. **Eicher O., Sies H., Stahl W.** Divergent optimum levels of lycopene, β -carotene and lutein protecting against UVB irradiation in human fibroblasts // Photochem. Photobiol. — 2002. — Vol. 75. — P. 503–506.
19. **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.
20. **Gao S., Qin T., Liu Z.** Lutein and zeaxanthin supplementation reduces H₂O₂-induced oxidative damage in human lens epithelial cells // Mol. Vis. — 2011. — Vol. 17. — P. 3180–3190.
21. **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.
22. **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., Voland R., Tinker L. // Arch. Ophthalmol. — 2008. — Vol. 126. — № 3. — P. 354–364.
23. **Ribaya-Mercado J. D., Blumberg J. B.** Lutein and zeaxanthin and their potential roles in disease prevention // J. Am. College Nutr. — 2004. — Vol. 23. — P. 567S–587S.
24. **Trumbo P. R., Ellwood K. C.** Lutein and zeaxanthin intakes and risk of age-related macular degeneration and cataracts: an evaluation using the food and drug administration's evidence-based review system for health claims // Am. J. Clin. Nutr. — 2006. — Vol. 84. — P. 971–974.
25. **Vu H. T. V., Robman L., Hodge A.** Lutein and zeaxanthin and the risk of cataract: the melbourne visual impairment project // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2006. — Vol. 47. — P. 3783–3786.
26. **Wegner A., Khoramnia R.** Cataract is a self-defence reaction to protect the retina from oxidative damage // Med. Hypotheses. — 2011. — Vol. 76. — P. 741–744.

Поступила 3.04.2013