

ВЛИЯНИЕ ЛИПИДОВ ХРУСТАЛИКА НА ЕГО ФИЗИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

УДК 612.844.1:577.115
Поступила 21.05.2009 г.



Ю.В. Кудрявцева*, к.м.н., доцент кафедры офтальмологии¹, врач-офтальмолог²;
А.Д. Чупров, д.м.н., главный врач², зав. кафедрой офтальмологии¹;
В.М. Треушников, генеральный директор³, биофизик;
Д.К. Чупров, инженер-химик;
И.П. Иванова, д.б.н., зав. научной группой физико-химических воздействий⁴;
П.И. Цапок, д.м.н., профессор, зав. кафедрой биологической химии¹

¹ Кировская государственная медицинская академия, Киров;

² Кировская клиническая офтальмологическая больница, Киров;

³ ИПП «Репер-НН», Н. Новгород;

⁴ НИИ прикладной и фундаментальной медицины НижГМА, Н. Новгород

English

Influence of the lens lipids on its physical characteristics

Yu.V. Kudryavtseva, c.m.s., assistant professor of the ophthalmology chair¹, ophthalmologist²;
A.D. Chuprov, MD, chief physician², head of ophthalmology chair¹;
V.M. Treushnikov, director general³, biophysicist;
D.K. Chuprov, engineer-chemist;
I.P. Ivanova, BD, head of the physicochemical effect scientific group⁴;
P.I. Tsapok, MD, professor, head of biological chemistry chair¹

¹ Kirov state medical academy, Kirov;

² Kirov clinical ophthalmologic hospital, Kirov;

³ IPP «Reper-NN», N. Novgorod;

⁴ SRI of applied and fundamental medicine of the NNSMA, N. Novgorod

The aim of investigation is a study of the lens lipid influence on its physical characteristics.

Materials and methods. 114 patients at the age of 55 to 78 years with a cataract of a different degree of maturity are selected for investigation. The clinical investigations of the lens in vivo, investigations of the lens nucleus lipids and the lipid peroxidation in vitro were conducted.

Results. It is established, that the most important link in the lens function disturbance processes is the lens fiber biological membrane lipids. A reverse strong dependence between the accommodation volume and nucleus hardness, a strong direct dependence between a content of the polyunsaturated fatty acids and the lens hardness ($r=0.7$; $p<0.05$) is revealed, a dependence of the lens hardness on a chemiluminescence sum ($r=0.8$; $p<0.01$) is revealed. The lens ageing is accompanied by its color alteration, frequently to a brown tint increase. An acquisition of the lens nucleus brown color with age is connected with accumulation of chromaatoophores, which actively participate in the lipid peroxidation processes, damage the fiber membranes and increase the lens nucleus mechanical hardness, possessing of the double chemical bonds. An accumulation of the peroxidation secondary products significantly influences the lens mechanical properties ($r=0.84$; $p<0.01$).

Key words: lens, lipids, oxidation.

* Кудрявцева Юлия Владимировна, тел. 8-909-131-85-58; e-mail: july_kud@mail.ru

Стремление к уменьшению операционного доступа при хирургии катаракты привело к тому, что главной задачей современных методик становится разрушение ядра хрусталика внутри глаза, без повреждения окружающих тканей. Современная аппаратура для факоэмульсификации позволяет быстро и эффективно разрушить ядро хрусталика, однако до сих пор существует проблема твердых катаракт, что обуславливает исследование механической твердости ядра хрусталика, а следовательно, и изучение процессов, ведущих к изменению физических характеристик хрусталика. Основные исследования хрусталика направлены на изучение механизмов его помутнения, а так как хрусталик более чем на 95% состоит из белков, то именно белкам хрусталика и посвящена большая часть научных работ в этом направлении [1—3]. Несмотря на это, рядом авторов отмечается исключительная важность роли липидов как инициаторов процессов, ведущих к трансформации белков и, как следствие, к изменению оптических и механических свойств хрусталика [1, 4—9]. По нашему мнению, нарушение липидного обмена является ведущим звеном в процессе катарактогенеза, хотя конкретные механизмы этих нарушений еще недостаточно изучены.

Цель исследования — изучить влияние липидов хрусталика на его физические характеристики.

Материалы и методы. Для исследования отобраны 114 пациентов в возрасте от 55 до 78 лет с катарактой различной степени зрелости.

Всем пациентам перед хирургическим лечением катаракты проводились традиционные офтальмологические исследования, включающие анализ остроты зрения, тонометрию, определение объема аккомодации, биомикроскопию на щелевой лампе в условиях медикаментозного мидриаза. Использовались щелевые лампы: ЦЛЗГ, ЦЛЗБ, Karl Kaps и Karl Zeiss. **Твердость ядра хрусталика определяли** ультразвуковым методом [10].

При биомикроскопии оценивался цвет хрусталика с использованием Японской классификации катаракт [11]. По этой классификации различают 4 цветовые градации катарактального хрусталика: I — бледно-желтый (**pale yellow**), II — **желтый (yellow)**, III — **желто-коричневый (brownish-yellow)**, IV — **коричневый, красно-коричневый, темно-коричневый (brown, reddish-brown, black-brown)**.

Объем аккомодации определяли у пациентов с наличием предметного зрения по формуле: $A=P-(\pm R)$, где A — объем аккомодации, P и R — **клиническая рефракция при фиксации глаза соответственно в ближайшей и дальней точках ясного зрения** [12].

Ядро хрусталика забирали по стандартной методике экстракапсулярной экстракции катаракты.

Исследования ядра хрусталика **in vitro включали:** определение механической твердости хрусталика на оригинальном устройстве для исследования механической твердости хрусталика (приоритет от 07.04.2004 г.), исследование состава высших жирных кислот на газожидкостном хроматографе, оцен-

ку уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) и состояния антиоксидантной системы в хрусталиках различной твердости, исследование растворимости ядра хрусталика в полярном растворителе в течение определенного времени.

Для оценки состояния реакций свободно-радикального окисления и антиоксидантной защиты проводили хемиллюминесцентный анализ. ПОЛ определяли по максимальному показателю фотовспышки I_m , дающему оценку содержания первичных продуктов ПОЛ [13, 14] в модификации П.И. Цапок и А.А. Галкина (1998) [15] на приборе Emilite EI 1105. Параллельно спектрофотометрически определяли соотношения экстинкций $E_{232/222}$ и $E_{278/222}$, выраженные в условных единицах, которые соответствовали диеновым конъюгатам и сопряженным кетотриенам [16]. Конечные продукты липопероксидации, реагирующие с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-ассоциированные продукты — ТБКAp), определяли спектрофотометрически [13, 17]. Антиоксидантную активность оценивали методом хемиллюминесценции по показателю светосуммы (S) за 60 с, ее величина указывает на содержание радикалов, находящихся в конце цепи свободно-радикальных реакций, и поэтому обратно пропорциональна антиоксидантной активности [13]. Кроме того, оценку активности антиоксидантной системы давали по отношению I_{max}/S [14]. Также часть ядер хрусталиков были помещены в 10% раствор диметилформамида (2 мл раствора). Перед этим ядра были взвешены на аналитических весах ВРЛ-200. Затем взвешивание проводили через 2 нед и через 4 нед после начала растворения. Всего было проведено исследование 41 ядра хрусталика. Все пробы находились в полутемном месте, при комнатной температуре.

Полученные данные обработаны статистически с использованием программы SPSS 10.0. Рассчитывали следующие показатели: среднюю арифметическую (M), ошибку средней (m), достоверность различий сравниваемых групп (P), коэффициенты корреляции, коэффициент достоверности (p).

Результаты. С возрастом начинают изменяться функциональные возможности органов и систем, в том числе и зрительного анализатора. В хрусталике происходят изменения, которые можно рассматривать как признаки старения. Одной из значимых проблем старения хрусталика является пресбиопия. Уменьшение объема аккомодации с возрастом связывают со склерозированием ядра хрусталика и снижением его эластичности.

Сопоставление объема аккомодации с механическими характеристиками ядра хрусталика (рис. 1) выявило обратную сильную зависимость между объемом аккомодации и твердостью ядра хрусталика — коэффициент корреляции r равен $-0,63$; $p < 0,01$.

Старение хрусталика сопровождается изменением его цвета, чаще всего в сторону увеличения коричневого оттенка. Появление окраски связано с появлением хромофоров, важную роль в возникно-

вении которых играют фотохимические свободно-радикальные реакции. Цветом среди органических веществ обладают те молекулы, которые способны легко поляризоваться, эта способность повышается, если в молекуле есть цепочки из связей, по которым электроны могут легко перемещаться. Например, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$, что, по сути, является первичным продуктом ПОЛ [18].

По нашим данным, с возрастом несколько усиливается коричневый цвет ядра хрусталика ($r=0,4$; $p<0,05$). Эти данные согласуются с результатами исследований других авторов [1, 6].

Выявлены закономерности, устанавливающие степень и направленность влияния некоторых органических веществ на механическую твердость ядра хрусталика. Обнаружена сильная прямая зависимость между содержанием полиненасыщенных высших жирных кислот (ПНЖК) и твердостью хрусталика — $r=0,7$; $p<0,05$ (рис. 2).

Также определена взаимосвязь содержания некоторых отдельных насыщенных и ненасыщенных высших жирных кислот и механической твердости ядра хрусталика:

миристиновая и лауриновая кислоты практически не оказывают влияния на твердость и имеют низкую концентрацию в ядре катарактального

хрусталика — $r=0,16$; $p>0,05$ и $r=0,09$; $p>0,05$ соответственно

пентадекановая и стеариновая насыщенные жирные кислоты не оказывают сильного влияния в связи с низким процентом их содержания в ядре хрусталика, однако имеют среднюю корреляцию с твердостью ядра хрусталика — в обоих случаях $r=-0,6$; $p<0,05$;

пальмитиновая кислота содержится в катарактальном хрусталике в концентрации, сопоставимой с уровнем ПНЖК, однако какой-либо существенной корреляции с твердостью не имеет — $r=0,21$; $p>0,05$;

имеющие двойные связи в цепи олеиновая, линолевая и линоленовая кислоты содержатся в катарактальном хрусталике в низкой концентрации; олеиновая и линолевая кислоты имеют среднюю ($r=-0,5$; $p<0,05$ и $-0,57$; $p<0,05$), а линоленовая кислота — слабую корреляцию с твердостью ядра хрусталика — $r=-0,22$; $p>0,05$.

При исследовании уровня ПОЛ в хрусталиках различной твердости выявлена достоверная прямая зависимость твердости хрусталика от суммы хемилюминесценции — $r=0,8$; $p<0,01$. Сумма хемилюминесценции обратно пропорциональна состоянию антиоксидантной системы и зависит от содержания

комплекса ферментов и неферментных соединений, обладающих антиоксидантной активностью. Эти данные свидетельствуют о том, что увеличение процессов интенсивности ПОЛ и снижение активности антиоксидантной системы сопровождается повышением твердости ядра хрусталика.

Первичные продукты ПОЛ, по нашим данным, практически не оказывают влияния на твердость ядра хрусталика: диеновые и триеновые конъюгаты имеют слабую прямую корреляцию с механическими свойствами хрусталика — $r=0,3$; $p>0,05$ и $0,27$; $p>0,05$.

Однако накопление вторичных продуктов, в частности малонового диальдегида (МДА), который относится к продуктам, реагирующим с тиобарбитуровой кислотой, значительно влияет на механические свойства хрусталика — $r=0,84$; $p<0,01$ (рис. 3). Это может быть связано с тем, что МДА является очень реакционным соединением, он легко и быстро вступает в реакцию альдольной конденсации, образуя трехмерную пространственную полимерную систему в виде гидрогеля. Затем со временем поликонденсат отщепляет воду и уплотняется.

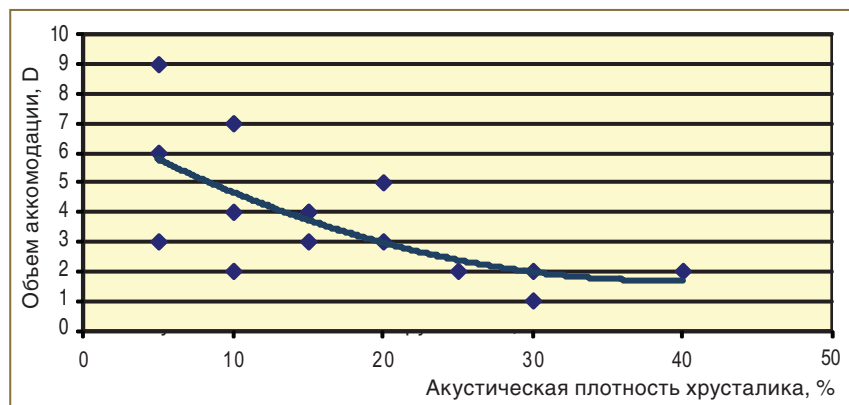


Рис. 1. Зависимость объема аккомодации от акустической плотности хрусталика

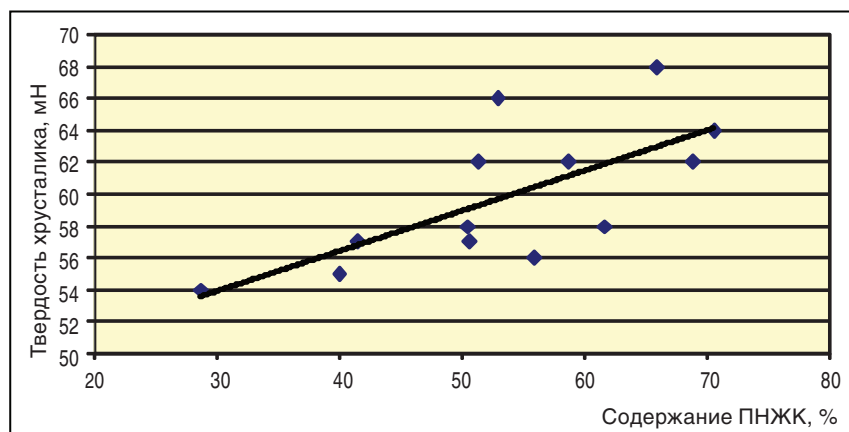


Рис. 2. Зависимость твердости хрусталика от содержания ПНЖК

С целью выявления этой полимерной структуры и для подтверждения данного предположения мы провели тест по растворению ядер хрусталиков в полярном растворителе. Полимерное соединение в этом случае должно быть нерастворимым.

После взвешивания ядра хрусталиков были помещены в 10% раствор диметилформамида. Затем взвешивание повторяли через 2 и 4 нед после начала эксперимента. Всего было исследовано 41 ядро хрусталика. В процессе замачивания в растворе стал появляться белый хлопьевидный осадок. В конце 2-й недели масса 21 ядра (50%) несколько увеличилась (возможно, это было связано с набуханием), у остальных — уменьшилась. Через 4 нед она стала уменьшаться. В среднем масса ядра хрусталика за месяц в растворе уменьшилась на 22% (рис. 4). 2 хрусталика растворились полностью (оба ядра имели низкую твердость и незрелую катаракту).

Средняя отрицательная зависимость получена при обработке массива «твердость—скорость растворения», $r=0,51$; $p<0,05$. Таким образом, чем тверже ядро, тем медленнее оно растворяется или практически не растворяется.

Обсуждение. Участие липидов в процессе изменения механических характеристик хрусталика, по нашему мнению, выглядит следующим образом: это влияние на все виды клеточного обмена через изменение свойств клеточных мембран. Мы допускаем, что все необратимые структурные изменения в биомембранах могут быть одной из основных причин старения организма, что приводит к изменению функциональных способностей органов и тканей. Основу мембран составляет билипидный слой толщиной 5—6 нм, на внутренней и внешней поверхностях которого адсорбированы, как правило, слои из белковых молекул толщиной порядка 1,0—1,3 нм.

В толще такой мембраны «плавают» белковые молекулы в глобулярном состоянии, диаметр их — 7,5—8,0 нм [13].

Практически все исследователи солидарны с тем, что в биомембранах в случае появления в них активных свободных радикалов становится вполне вероятным окисление липидов по цепному механизму с вырожденным разветвлением [19]. Известно, что вещество хрусталика представлено хрусталиковыми волокнами, которые, в свою очередь, являются производными эпителия передней

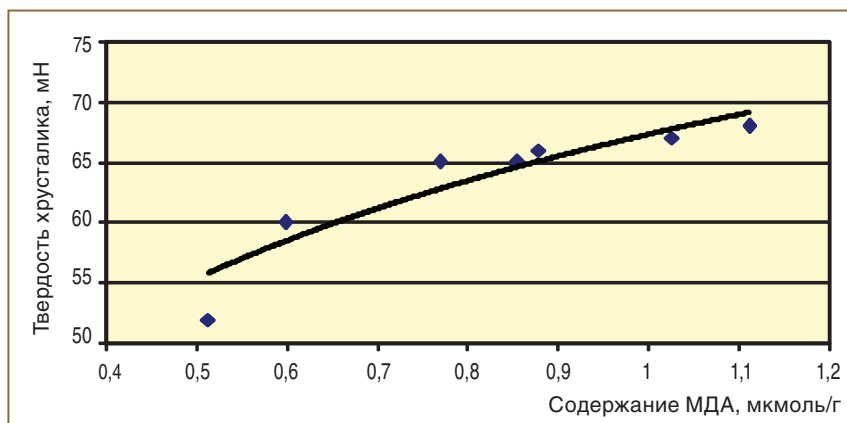


Рис. 3. Зависимость твердости хрусталика от содержания малонового диальдегида

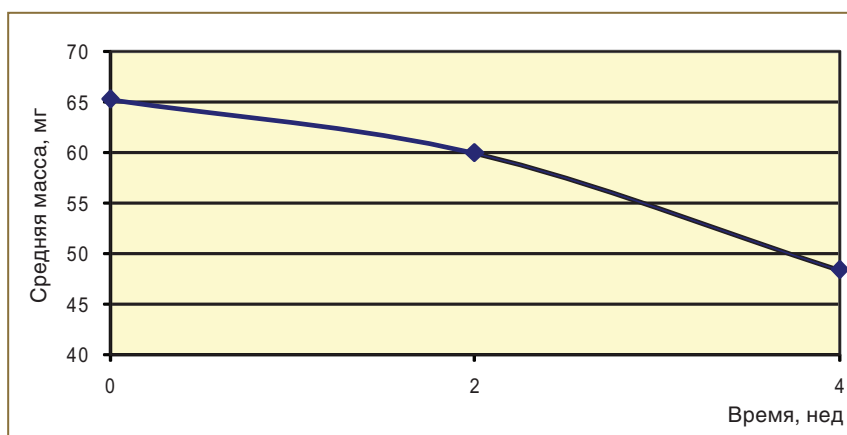


Рис. 4. Изменение массы ядра хрусталика при растворении в 10% растворе диметилформамида

капсулы. Подтверждено многочисленными исследованиями, что хрусталиковые волокна окружены мембранами и плотно упакованы [1]. Строго упорядоченная организация волокон обеспечивает прозрачность и эластические свойства хрусталика. Нормальное функционирование биологических мембран поддерживает постоянство биохимического состава внутри волокон, благодаря этому сохраняется структура белков, которые играют важнейшую роль в оптических (светопреломление, светопроведение) и механических свойствах (упругость, вязкость) хрусталика. Поэтому резонно предположить, что именно мембраны хрусталиковых волокон являются основой для сохранения функций хрусталика. Конечно, сами липиды не могут быть причиной увеличения или уменьшения механической твердости хрусталика, так как их содержание в его веществе относительно невелико — всего около 2—3%. Но опосредованно, через функционирование мембран волокон это вполне возможно. Что и подтверждается нашими исследованиями: сильная прямая зависимость между содержанием ПНЖК и твердостью хрусталика ($r=0,7$; $p<0,05$); достоверная прямая зависимость твердости хрусталика от суммы хемилюминесценции ($r=0,8$; $p<0,01$); накопле-

ние вторичных продуктов перекисного окисления приводит к увеличению твердости ядра хрусталика ($r=0,84$; $p<0,01$).

Заключение. Важнейшим звеном в процессах нарушения функций хрусталика являются липиды биологических мембран хрусталиковых волокон. Выявлено влияние на механические характеристики ядра хрусталика содержания полиненасыщенных высших жирных кислот, уровня перекисного окисления и содержания вторичных продуктов перекисного окисления липидов.

Приобретение с возрастом коричневой окраски ядром хрусталика связано с накоплением хроматофоров, которые, обладая двойными химическими связями, активно участвуют в процессах перекисного окисления липидов, повреждают мембраны волокон и увеличивают механическую твердость ядра хрусталика.

Литература

1. *Веселовская З.Ф.* Катаракта. Киев: Книга плюс; 2002; 208 с.
2. *Deyev A.I., Sitartchuk I.A., Aseychev A.V. et al.* Phys Chem Med 1996; 3(2): 38—42.
3. *Feng J., Smith D.L., Smith J.B.* Human lens beta-crystallin solubility. J Biol Chem 2000; Apr.; 275(16): 11585—11590.
4. *Воробей В.А., Черницкий Е.А.* Механизмы фотосенсибилизации повреждения белков и липидов биологических мембран. В кн.: Исследование структуры, физических свойств и энергетики биологически активных молекул. Материалы II координационного семинара по интегральной теме научно-технического сотрудничества минвузов СССР и ЧССР. Вильнюс; 1986; с. 54.
5. *Деев А.И., Асейчев А.В., Владимиров Ю.А.* Свободнорадикальные аспекты катарактогенеза. Вестник Российской академии медицинских наук 1999; 2: 22—26.
6. *Мальцев Э.В., Вит В.В., Черняева С.Н. и др.* Неспецифические эффекты воздействия света на орган зрения. Офтальмологический журнал 1999; 2: 88—93.
7. *Borchman D., Lamba O.P., Yappert M.C.* Structural characterization of lipid membranes from clear and cataractous human lenses. Exp Eye Res 1993; Aug.; 57(2): 199—208.
8. *Cenedella R.J., Fleschner C.R.* Selective association of crystallins with lens «native» membrane during dynamic cataractogenesis. Curr Eye Res 1992; 11(8): 801—815.
9. *Zigman S., Paxhia T., Marinetti G., Girsch S.* Lipids of human lens fiber cell membranes. Curr Eye Res 1984; Jul; 3(7): 887—896.
10. *Чупров А.Д., Кудрявцев В.А., Кудрявцева Ю.В.* Характеристика неинвазивного ультразвукового метода определения механической твердости хрусталика. Вестник офтальмологии М; 2006; 3: 23—25.
11. *Chylack L.T., Ransil B.J., White O.* Classification of human senile cataractous change by the American Cooperative Cataract Research Group (CCRG) method: III. The association of nuclear color (sclerosis) with extent of cataract formation, age, and visual acuity. Invest Ophthalmol 1984; 25(2): 174—180.
12. *Копаева В.Г.* Глазные болезни. М: Медицина; 2002; 560 с.
13. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М; 1972; 201 с.
14. *Луценко Е.В.* Влияние оптического излучения спектрального диапазона 600—750 нм на свободнорадикальные процессы печени в ходе ее регенерации. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Киров; 2002.
15. *Цапок П.И., Галкин А.А.* Хемилюминесцентный метод определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови. Информационный листок № 75-98 Кировского ЦНТИ. Киров; 1998.
16. *Винькова Г.А.* Современные возможности диагностики, прогнозирования и патогенетического лечения посттравматических увеитов. Автореф. дис. ... докт. мед. наук. СПб; 2001.
17. *Камышников В.С.* Клинико-биохимическая лабораторная диагностика. Справочник. В 2-х т. Минск: Беларусь; 2002; 495 с.
18. *Фадеев Г.Н.* Химия и цвет. М: Просвещение; 1977; 159 с.
19. *Треушников В.М.* Катаракта и процессы старения клеток: возможные механизмы старения и замедления этих процессов. Визит к офтальмологу 2009; 12: 10—45.