

## Antioksidativni kapacitet očne vodice kod različitih vrsta i pigmentacije senilne katarakte

Lepša Žorić\*, Petar Aleksić†, Darinka Koraćević\*, Goran Trajković\*

Medicinski fakultet, \*Klinika za očne bolesti, Kosovska Mitrovica; Vojnomedicinska akademija, †Klinika za očne bolesti, Beograd; Medicinski fakultet,

‡Institut za biohemiju, Niš

**Uvod/Cilj.** Oksidativni stres nastaje usled pojačanih procesa oksidacije, smanjenja antioksidativne zaštite ili istovremenog odvijanja oba navedena procesa. Fotooksidativni stres, kao vid oksidativnog stresa indukovano energijom sunčevog zračenja, danas se smatra osnovnim etiopatogenetskim mehanizmom u procesu geneze senilne katarakte. Drugi poznati i nepoznati, endogeni i egzogeni faktori, koji pojačavaju intenzitet oksidativnog stresa mogu doprineti intenzitetu i formi opacifikacije humanog ocnog sočiva. Otud intenzitet i tip oksidativnog stresa može biti različit kod određenih tipova katarakti, što pokušaje moderiranja kataraktogeneze čini složenijim. Cilj ovog rada je ispitivanje razlika u intenzitetu antioksidativnog kapaciteta (zaštite) u očnoj vodici u različitim vrstama i pigmentaciji humane senilne katarakte. **Metode.** Transverzalna studija 80 uzoraka očne vodice bolesnika sa senilnom kataraktom, dobijenih tokom ekstrakapsularne ekstrakcije katarakte. Tiobarbiturnim testom u 0,1 ml očne vodice ispitivan je procenat gvoždem indukovano malondialdehida (%iMDA), kao ekvivalenta ukupne antioksidativne zaštite. **Rezultati.** Mešovite katarakte pokazuju statistički značajno niži intenzitet antioksidativne zaštite u odnosu na kortikalne i nuklearne katarakte ( $p < 0,001$ ). Brune sentne katarakte imaju niži nivo antioksidativne zaštite u odnosu na nepigmentovane na istom nivou značajnosti. Kortikalne katarakte, zavisno od maturiteta, pokazuju statistički značajnu pozitivnu korelaciju sa %iMDA ( $p = 0,026$ ). **Zaključak.** Uloga oksidativnog stresa nije jednaka u kataraktogenezi različitih tipova senilne katarakte. Promene u očnom sočivu odražavaju se na sastav očne vodice, kao što i promene u očnoj vodici determinišu metabolizam u sočivu. Rezultati pokazuju najviši intenzitet oksidativnog stresa u očnoj vodici kod mešovitih i brunesentnih humanih senilnih katarakti. Korelacija maturiteta kortikalnih katarakti i %iMDA ukazuje na značajan pad antioksidativne zaštite tokom progresije kortikalne katarakte.

**Ključne reči:** katarakta; starenje; očna vodica; stres, oksidativni; malondialdehid.

### Uvod

Kiseonik je uslov aerobnog života na Zemlji, kao što je i Sunce neophodno za život diurnalnih vrsta i razvitak čula vida. Međutim, kiseonik i sunčeva svetlost imaju i oštećujući potencijal. Stvaranje reaktivnih radikala kiseonika i oksidativni stres su neizbežna posledica aerobnog načina života i postoje u nizu patoloških, ali i fizioloških procesa.

Sočivo, kao epitelni organ, stvara nove ćelije tokom celog života, počevši još u intrauterinom periodu. Ono, takođe, sve vreme i čuva svoje epitelne ćelije i održava ih

providnim. Ljudsko sočivo decenijama biva izloženo ambijentalnom sunčevom zračenju, koje, osim vidljivog dela spektra, poseduje i infracrvene i ultraljubičaste zrake (UV). Sočivo apsorbira delove ultraljubičastog spektra koji prolaze kroz rožnjaču (UVA i UVB zraci). Štiteći retinu i druga očna tkiva, samo sočivo, na taj način trpi oštećenja. Oksidativni stres iniciran svetlosnim elektromagnetnim zračenjem zove se fotooksidativni stres (1). On participira i u genezi senilne degeneracije makule (2).

Uporedo sa oksidacijskim procesima, tokom evolucije razvili su se i elementi antioksidativne zaštite. Poremećaj rav-

noteže između oksidacijskih oštećenja i antioksidativne zaštite dovodi do oksidativnog stresa. Oksidativni stres oštećuje strukturne proteine, enzime, lipide, polisaharide i nukleinske kiseline. U savremenim hipotezama smatra se ključnim događajem u procesima starenja (3), pa tako i u genezi senilne katarakte. On ima i kumulativni karakter, tako da količina oštećenih biomolekula, koji nisu mogli biti reparisani, raste tokom života. Neki procesi koji se odvijaju tokom geneze katarakte podsećaju na one tokom senescencije sočiva, ali su intenzivniji i/ili ekstenzivniji tokom opacifikacije sočiva (4).

Sočivo poseduje zaštitne mehanizme protiv oksidacijskih i fotooksidacijskih oštećenja. To su spori metabolizam, nizak parcijalni pritisak kiseonika, visoka koncentracija vitamina C, glutation i sulfhidrilne grupe kristalina, antioksidativni enzimi i vitamini (5–7).

Sočivo je avaskularno i metabolički potpuno zavisno od očne vodice koja ga okružuje. Energiju u vidu glukoze potrebnu za sintetičke, transportne i druge procese sočivo dobija iz očne vodice. Amino kiseline, glutation, vitamin C i hormoni koji su detektovani u sočivu potiču iz očne vodice. Cilijarni epitel aktivno luči askorbat u očnu vodicu, gde njegova koncentracija dostiže vrednosti i do 20 puta veće od onih u plazmi (8). Očna vodica može imati i negativno dejstvo na sočivo. Produkti oksidacije i medijatori inflamacije iz očne vodice tokom uveitisa prodiru u sočivo, gde mogu izazvati pojavu uveitične katarakte. Vodonik peroksid, nastao oksidacijom askorbata u očnoj vodici, deluje na procese oksidacije u sočivu.

Međutim, sadržaj očne vodice reflektuje metabolizam sočiva i promene u njemu. Laktati u očnoj vodici potiču od anaerobnog metabolizma glukoze u sočivu (9). Slično se dešava sa produktima oksidativnog stresa.

Senilna katarakta (*age-related cataract*) je dijagnoza ekskluzije i definiše se kao замуćenje sočiva bez drugog poznatog uzroka kod osoba starijih od 45 godina. S obzirom na lokaciju početnih замуćenja, ona može biti kortikalna, nuklearna, zadnja i prednja supkapsularna ili mešovita (10). Priroda pigmenta kod brunescentnih katarakti još uvek je predmet istraživanja, ali se najčešće vezuje za produkte oksidacije triptofana (10, 11). Potencijalni faktori rizika za pojavu određenih tipova katarakte tema su brojnih studija sa raznovrsnim zaključcima (12–15). Mogućnost moderiranja kataraktogeneze otud je moguća samo kroz bolje razumevanje njene etiopatogeneze.

### Metode

Sprovedena je transversalna studija 80 uzoraka očnih vodica uzetih tokom ekstrakapsularne ekstrakcije sočiva kod 72 bolesnika sa dijagnozom senilne katarakte. Tip i pigmentacija katarakte određivani su na osnovu oftalmološkog pregleda i potvrđeni u toku operacije. Svi bolesnici operisani su u analgeziji narkolepticima i lokalnoj anesteziji ksilokainom. Preoperativna midrijaza indukovana je neosinefrinom i atropinom, lokalno, u vidu kapi. Očna vodica uzimana je paracentezom prednje očne komore na početku intervencije. Uzorci su duboko zamrzavani odmah po uzimanju i transportovani pod istim uslovima.

Očna vodica je analizirana metodom određivanja ukupne antioksidativne zaštite u serumu i drugim telesnim tečnostima (16, 17), a rezultati su izražavani kao procenat gvoždem indukovano malondialdehida (%iMDA). Metod je baziran na inhibiciji produkcije lipidnih peroksida, malondialdehida (MDA), ili kao produkt reakcije sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA), odnosno na indukciji MDA pomoću fero soli. Izračunavanje %iMDA uzorka vršeno je njihovom zamenom u odgovarajućoj formuli (16, 17). Za analize je korišćeno 0,1 ml očne vodice. Dobijeni podaci analizirani su prema tipu i pigmentaciji katarakte pomoću univarijantne analize varijanse (ANOVA), *t*-testa i koeficijenta korelacije (Spearman).

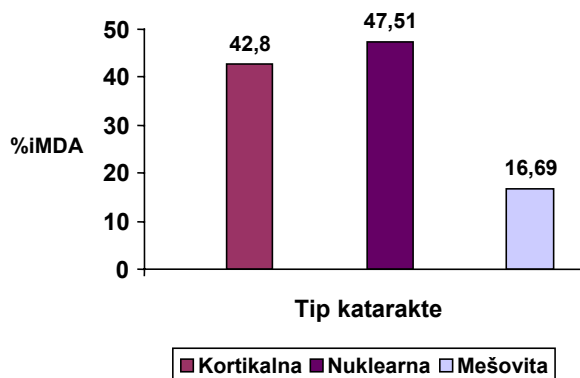
### Rezultati

Analizirano je 80 uzoraka očnih vodica dobijenih od 72 bolesnika sa dijagnozom senilne katarakte. U grupi je bilo 46 muškaraca i 26 žena starosti 45–84 godine ( $64,94 \pm 8,81$ ).

Dijagnostikovano je 50 kortikalnih, 16 mešovitih i 14 nuklearnih katarakti. U grupi kortikalnih katarakti bilo je 18 incipijentnih, 16 intumescentnih i 16 maturnih („totalnih“) katarakti. Iako stepen maturacije nema kliničkog značaja, ovde je korišćen u istraživačke svrhe. Ostali tipovi nisu stepenovani prema intenzitetu замуćenja. Mešovite katarakte imale su nuklearna i zadnja supkapsularna, ili kortiko-nuklearna замуćenja. U grupi nije bilo bolesnika sa izolovanim zadnjim supkapsularnim opacitetima. Dijagnostikovane su 32 brunescentne katarakte i 48 bez klinički vidljive brunescencije.

U očnoj vodici merena je antioksidativna zaštita izražena kao %iMDA. Prosečna vrednost %iMDA u celoj grupi bila je  $39,9 \pm 17,58\%$  sa širokim rasponom variranja ( $5,0–74,0\%$ ).

Najniže vrednosti ( $16,69 \pm 7,07\%$ ) ukupne antioksidativne zaštite evidentirane su u očnoj vodici kod mešovite katarakte, a najviše ( $47,51 \pm 16,1\%$ ) u grupi nuklearnih katarakti (slika 1). Stepent antioksidativne zaštite kod kortikalnih katarakti iznosio je  $42,8 \pm 16,75\%$ .

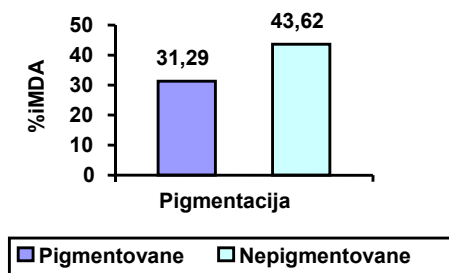


Sl. 1 – Srednje vrednosti %iMDA prikazane na ordinati zavisno od vrste senilne katarakte.

Mešovite katarakte imaju značajno niži antioksidativni kapacitet očne vodice u odnosu na nuklearne i kortikalne katarakte;  $p < 0,001$ .

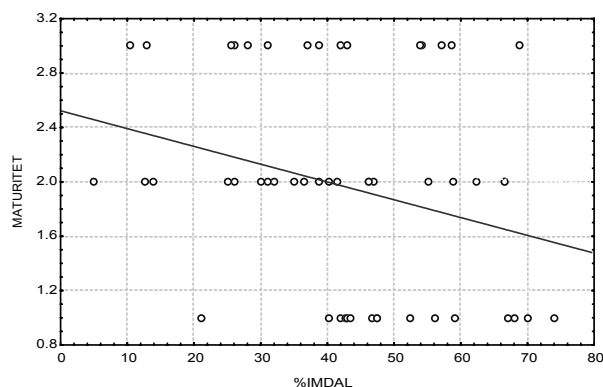
Analiza varijanse pokazala je da očna vodica kod mešovitih katarakti ima statistički značajno niže vrednosti u odnosu na druge dve grupe ( $F = 10,77$ ;  $p < 0,001$ ).

Očna vodica kod postojanja brunescenčnih katarakti imala je, takođe, značajno niže vrednosti %iMDA ( $31,29 \pm 16,66\%$ ), a u odnosu na nepigmentovane katarakte ( $43,62 \pm 16,92\%$ ) ( $t = 2,89$ ;  $p < 0,001$ ) (slika 2).



Sl. 2 – Srednje vrednosti %iMDA kod pigmentovanih i nepigmentovanih katarakti (razlika intenziteta na nivou značajnosti  $p < 0,001$ )

Maturacija kortikalnih katarakti pokazuje značajnu negativnu korelaciju sa antioksidativnim kapacitetom očne vodice ( $R = -0,305$ ;  $p = 0,026$ ) (slika 3).



Sl. 3 – Korelacija %iMDA i maturiteta kortikalne katarakte ( $R = -0,305$ ,  $p = 0,026$ ).

Maturitet katarakte prikazom na ordinatnoj skali po nivoima: 1 (interval 0,8–1,2) – incipijentne, 2 – (interval 1,2–2,8) intumescentne, 3 (interval 2,8–3,2) – mature. Vrednosti %iMDA izražene brojevnim vrednostima na apscisi.

## Diskusija

Vodonik peroksid je normalni sastojak očne vodice. Međutim, njegova koncentracija se značajno razlikuje kod zdravih osoba i kod bolesnika sa kataraktom (9). Ireverzibilna oštećenja lipida membrane i proteina u procesu geneze katarakte inicirana su u epitelnom sloju oksidativnim stresom koji ima poreklo u fotodinamskim reakcijama, ali i od peroksida generisanih tokom oksidacije askorbata u očnoj vodici (18).

Azot monoksid (NO), kao drugi značajan generator oksidativnog stresa, takođe postoji u očnoj vodici i njegov sadržaj značajno raste sa starenjem ili sa traumom, kao još jednim analiziranim mogućim uzrokom geneze katarakte. Sadržaj NO najviši je upravo u očnoj vodici ispitanika sa maturnom kataraktom (19).

Procenat indukovano malondialdehida je praktičan parametar procene ukupne antioksidativne zaštite. Njegova vrednost je primarno u korelaciji sa lipidima oksidanim *in vivo* i on fiziološki i biohemijski odgovara ukupnoj antioksidativnoj zaštiti. Odražava funkciju kompleksa enzimskih i neenzimskih antioksidativnih mehanizama.

Nizak nivo antioksidativne zaštite u očnoj vodici može imati značaj primarne, ali i sekundarne promene. Naime, on može odražavati nizak nivo antioksidanata koji dospevaju do sočiva iz očne vodice, ali i njihovu visoku potrošnju u sočivu izloženom oksidacijskim oštećenjima. Pronađen je visok stepen korelacije između produkata lipidne peroksidacije u sočivu i antioksidativnih elemenata sočiva sa %iMDA očne vodice (20). Takvi nalazi podržavaju koncept dvosmernih procesa u oksidativnom stresu i istovremeno pojačavaju procese oksidacije i sniženje antioksidativne zaštite. Takođe, potvrđuju metaboličku i biohemijsku uzajamnu povezanost dva bliska kompartmana – prednje očne komore, odnosno očne vodice i sočiva.

Verovatno je da proces geneze senilne katarakte primarno odražava opadanje nivoa antioksidativne zaštite u oba navedena kompartmana oka, dok sekundarni procesi, poput dijabetesa, pseudoeksfolijacijskog sindroma i drugih, dodatno pojačavaju oksidativni stres većim intenzitetom oksidacije, a otud i većom potrošnjom antioksidativnih elemenata (21–23). U našoj grupi bilo je bolesnika sa dijabetesom tip II, sa pseudoeksfolijacijskim sindromom i drugim bolestima sekundarnog senijuma (23). Iako oboleli od dijabetesa imaju povišen nivo oksidativnog stresa na sistemskom i lokalnom nivou, u oku intenzitet oksidativnog stresa u očnoj vodici i sočivu grupe bolesnika sa kataraktom i dijabetesom nije bio visok kao kod mešovitih i brunescenčnih katarakti. Dominantan tip opaciteta sočiva kod dijabetičara je najpre kortikalni-pigmentovani i nepigmentovani, zatim zadnji supkapsularni, a ne i mešoviti (24).

Korelacija između maturiteta kortikalnih katarakti i %iMDA potvrđuje iscrpljivanje antioksidativnog kapaciteta sa progresijom katarakte. Ne može se isključiti da bi slična korelacija mogla da se evidentira i kod progresije drugih tipova katarakte, s obzirom na to da većina napreduje ka totalnom замуćenju svih slojeva sočiva. Pošto studija predstavlja presek statusa u kataraktogenezi, to limitira donošenje takvog zaključka.

Mešovite katarakte u ovoj studiji nisu bile totalne. Međutim, svakako da opacifikacija sočiva koja se odvija u nekoliko slojeva znači i jači stepen oksidativnog stresa. Slično je i sa brunescencijom. Moguće objašnjenje samo se delom može potražiti u različitim modelima kataraktogeneze (pojačana agregacija proteina ili jonski disbalans) (25).

Noviji izveštaji ukazuju da mešoviti tip katarakte može biti značajan faktor predviđanja mortaliteta u dvogodišnjem periodu, nezavisno od drugih faktora rizika poput pola, starosti, telesne težine, pušenja ili komorbiditeta (26). U svakom slučaju, značaj ovih i sličnih rezultata treba dalje evaluirati.

Brunescentne katarakte sadrže hromofore sa apsorbujućim i fluorescentnim svojstvima. Neke od njih imaju poreklo u produktima uznapredovale glikozilacije ili fotooksidacije triptofana (27). Produkti brunescencije, poput onih tokom same kataraktogeneze, evidentni su u očnoj vodici, a ne samo u sočivu, i svakako utiču na nivo ispoljene antioksidativne zaštite (28).

Sistem oksidacije i antioksidativne zaštite je veoma kompleksan i još uvek se izučava. Takva složenost, ali i speci-

fičnosti oksidativnog stresa u pojedinim kompartmanima i sistemima organizma, mogu da otežaju komparaciju podataka različitih istraživanja i donošenje jedinstvenih zaključaka.

### Zaključak

Smanjenje kapaciteta antioksidativne zaštite evidentno je u očnoj vodici tokom senilne kataraktogeneze. Rezultati rada ukazuju na značajno viši intenzitet oksidativnog stresa u prednjem segmentu oka kod brunescentnih i mešovitih katarakti, u poređenju sa kortikalnim i nuklearnim, kao i nepigmentovanim kataraktama. Sa maturacijom kortikalnih katarakti registruje se dalji pad nivoa antioksidativne zaštite u očnoj vodici.

### L I T E R A T U R A

1. Foote CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol* 1991; 54(5): 659.
2. Taylor HR, West S, Munoz B, Rosenthal FS, Bressler SB, Bressler NM. The long-term effects of visible light on the eye. *Arch Ophthalmol* 1992; 110(1): 99–104.
3. Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78(11): 7124–8.
4. Dillon J. The photophysics and photobiology of the eye. *J Photochem Photobiol B* 1991; 10(1–2): 23–40.
5. Pau H, Graf P, Sies H. Glutathione levels in human lens: regional distribution in different forms of cataract. *Exp Eye Res* 1990; 50(1): 17–20.
6. Reiss GR, Werness PG, Zollman PE, Brubaker RF. Ascorbic acid levels in the aqueous humor of nocturnal and diurnal mammals. *Arch Ophthalmol* 1986; 104(5): 753–5.
7. Fecondo JV, Augusteyn RC. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the human cataractous lens. *Exp Eye Res* 1983; 36(1): 15–23.
8. Garland DL. Ascorbic acid and the eye. *Am J Clin Nutr* 1991; 54(6 Suppl): 1198S–1202S.
9. Berman ER. *Biochemistry of the Eye*. New York: Plenum Press; 1991.
10. Chylack LT Jr, Leske MC, Sperduto R, Khu P, McCarthy D. Lens Opacities Classification System. *Arch Ophthalmol* 1988; 106(3): 330–4.
11. Cheng R, Lin B, Ortwerth BJ. Separation of the yellow chromophores in individual brunescent cataracts. *Exp Eye Res* 2003; 77(3): 313–25.
12. Risk factors for age-related cortical, nuclear, and posterior subcapsular cataracts. The Italian-American Cataract Study Group. *Am J Epidemiol* 1991; 133(6): 541–53.
13. Taylor HR, West SK, Rosenthal FS, Munoz B, Newland HS, Abbey H, et al. Effect of ultraviolet radiation on cataract formation. *N Engl J Med* 1988; 319(22): 1429–33.
14. Delcourt C, Carriere I, Ponton-Sanchez A, Lacroux A, Covacho MJ, Papoz L. Light exposure and the risk of cortical, nuclear, and posterior subcapsular cataracts: the Pathologies Oculaires Liees a l'Age (POLA) study. *Arch Ophthalmol* 2000; 118(3): 385–92.
15. Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E and beta carotene for age-related cataract and vision loss: AREDS report no. 9. *Arch Ophthalmol* 2001; 119(10): 1439–52.
16. Koraćević D, Koraćević G, Đorđević V, Andrejević S, Čosić V. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *J Clin Pathol* 2001; 54(5): 356–61.
17. Promyslov MŠ, Demchuk ML. A modified method of determination of the total serum antioxidant activity. *Vopr Med Khim* 1990; 36(4): 90–2. (Russian)
18. Spector A. Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action. *FASEB J* 1995; 9(12): 1173–82.
19. Kao CL, Chou CK, Tsai DC, Hsu WM, Liu JH, Wang CS, et al. Nitric oxide levels in the aqueous humor in cataract patients. *J Cataract Refract Surg* 2002; 28(3): 507–12.
20. Žorić L. Antioxidation status in aqueous humour, lens and serum of patients with age-related cataract. *Anali* 2004; 7: 103–5. (Serbian)
21. Kawai K, Yoh M, Hayashi T, Imai H, Negawa T, Tomida M, et al. Effect of diabetic retinopathy on redox state of aqueous humor and serum albumin in patients with senile cataract. *Tokai J Exp Clin Med* 2001; 26(3): 93–9.
22. Koliakos GG, Konstas AG, Schlotzer-Schrehardt U, Bufidis T, Georgiadis N, Ringvold A. Ascorbic acid concentration is reduced in the aqueous humor of patients with exfoliation syndrome. *Am J Ophthalmol* 2002; 134(6): 879–83.
23. Žorić L. Parameters of oxidative stress in the lens, aqueous humor and blood in patients with diabetes and senile cataracts. *Srp Arh Celok Lek* 2003; 131(3–4): 137–42. (Serbian)

24. Leske MC, Chylack LT Jr, Wu SY. The Lens Opacities Case-Control Study. Risk factors for cataract. Arch Ophthalmol 1991; 109(2): 244–51.
25. Adley U. photooxidative stress. In: Albert DM, Jakobiec FA, editors. Principles and practice of ophthalmology. Philadelphia: WB Saunders; 1994. p. 575–90.
26. West SK, Munoz B, Istre J, Rubin GS, Friedman SM, Fried LP, et al. Mixed lens opacities and subsequent mortality. Arch Ophthalmol 2000; 118(3): 393–7.
27. Ortwerth BJ, Olesen PR. Glutathione inhibits the glycation and crosslinking of lens proteins by ascorbic acid. Exp Eye Res 1988; 47(5): 737–50.
28. Laganovska G, Martinsons A, Pitrans B, Widner B, Fuchs D. Kynurenine and neopterin in the aqueous humor of the anterior chamber of the eye and in serum of cataract patients. Adv Exp Med Biol 2003; 527: 367–74.

Rad je primljen 5. IV 2005.

### Abstract

Žorić L, Aleksić P, Koraćević D, Trajković G. Vojnosanit Pregl 2005; 62(12): 909–913.

#### THE AQUEOUS HUMOUR ANTIOXIDATIVE CAPACITY IN DIFFERENT TYPES AND COLOR OF THE AGE-RELATED CATARACT

**Background/Aim.** Oxidative stress results from increased oxidative processes, decreased antioxidative protection, or both processes simultaneously. Photooxidative stress, as a form of oxidative stress, induced by the energy of solar radiation, today is considered as crucial in the age-related cataractogenesis. Other known and unknown, endogenous and exogenous factors that contribute to the oxidative stress intensity, can influence the cataract type and brunescence. Thus the oxidative stress intensity and its form might determine the cataract type and brunescence, and also make the efforts in cataract prevention more complex. Hence, the objective of the present paper was to investigate the current amount of antioxidative capacity in aqueous humour during the cataract genesis of different types and pigmentation of cataract. **Methods.** Transversal review of 80 samples of humour aqueous obtained during extracapsular cataract extraction. Aqueous were analyzed by tiobarbituric acid (TBA) method for the total antioxidant activity estimation, expressed as %iMDA, and by using 0.1 ml of aqueous. **Results.** The mixed type of cataract showed the statistically significantly lower values of the intensities of antioxidative protection in aqueous humour compared to cortical and nuclear cataracts ( $p < 0.001$ , respectively). Between pure nuclear and cortical cataracts we found the small differences of the investigated parameter, but they pointed to the decreased level of antioxidative protection, i.e. the increased intensity of the aqueous humour oxidative stress in the cortical cataract type. A significant correlation between the cortical cataract maturation and the %iMDA ( $p < 0.05$ ) was found. **Conclusions.** The role of the oxidative stress, here expressed as the antioxidative capacity of aqueous humour, could not be the same for all the cataract types. The lower level of antioxidative protection of aqueous in brunescence and mixed cataracts may point to the higher intensity of oxidative stress in those cataract types. The correlation between the cortical cataract maturity and %iMDA points to the significant decrease of the aqueous antioxidative protection in the cataract progression.

**Key words:** cataract; aging; aqueous humor; oxidative stress; malondialdehyde.