

## Содержание лютеина и его окисленных форм в тканях глаза человека в пренатальном развитии

М.А. Яковлева<sup>1</sup>, И.Г. Панова<sup>2</sup>, А.С. Татиколов<sup>1</sup>, Т.Б. Фельдман<sup>1</sup>, Р.А. Полтавцева<sup>3,4</sup>, Г.Т. Сухих<sup>4</sup>, М.А. Островский<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН», Москва;

<sup>2</sup> ФГБУ «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН», Москва;

<sup>3</sup> ФГБУ «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН», Пущино;

<sup>4</sup> ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва

### РЕФЕРАТ

**Цель.** Исследовать ткани глаза человека в пренатальном развитии на присутствие в них каротиноидов.

**Материал и методы.** Материал глаз получали от абортных плодов человека с 12-й по 28-ю неделю беременности. Плоды поступали в ФГУ НЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова из лицензированных учреждений Минздрава, действующих в рамках законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан, и в соответствии с утвержденным перечнем медицинских показаний. Возраст плодов соответствует срокам, установленным врачом-акушером. Всего в работе использовано 49 образцов тканей из глаз плодов человека на разных сроках беременности.

Офтальмохирургия. – 2013. – № 1. – С. 31-35.

Содержание каротиноидов и их окисленных форм контролировали с помощью хроматографического анализа (ВЭЖХ).

**Результаты.** В тканях пренатального глаза человека (роговица, склера, зрительный нерв, ретиальный пигментный эпителий вместе с сосудистой оболочкой, цилиарное тело вместе с радужкой, стекловидное тело) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) показано присутствие лютеина и/или его окисленных форм.

**Вывод.** Обнаружение лютеина и его окисленных форм в тканях глаза человека в ходе пренатального развития представляет существенный интерес для понимания физиологии пренатального и постнатального глаза.

**Ключевые слова:** лютеин, пренатальное развитие, каротиноиды, ткани глаза человека. ■

### ABSTRACT

#### The content of lutein and its oxidized forms in human eye tissues in prenatal development

M.A. Yakovleva<sup>1</sup>, I.G. Panova<sup>2</sup>, A.S. Tatikolov<sup>1</sup>, T.B. Feldman<sup>1</sup>, R.A. Poltavtseva<sup>3,4</sup>, G.T. Sukhikh<sup>4</sup>, M.A. Ostrovsky<sup>1</sup>

<sup>1</sup> N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, the Russian Academy of Sciences, Moscow;

<sup>2</sup> N.K. Koltsov Institute of Development Biology, the Russian Academy of Sciences, Moscow;

<sup>3</sup> The Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, the Russian Academy of Sciences, Pushchino;

<sup>4</sup> The Kulakov Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, the Ministry of Public Health of Russia, Moscow

**Purpose.** To study the presence of carotenoids in the tissues of prenatal human eye in the course of its development.

**Material and methods.** The eyes were obtained from abortive human fetuses of 12-28 weeks of pregnancy. The fetuses were brought to the Kulakov Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, the Russian Academy of Medical Sciences, from licensed institutions of the Ministry of Public Health, working under the Russian Federation legislation on citizen health protection, and in accordance with the approved list of medical indications. The ages of the fetuses were determined by an obstetrician. Totally, 49 samples of eye tissues from human fetuses at different pregnancy ages were used. The content of ca-

rotenoids and their oxidized forms was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) technique.

**Results.** The presence of lutein and/or its oxidized forms was estimated by HPLC in the tissues of prenatal human eyes (cornea, sclera, optic nerve, retinal pigment epithelium with choroid, ciliary body with iris, vitreous body).

**Conclusion.** The finding of lutein or oxidized forms of lutein in tissues of the human eye in the course of prenatal development is of essential interests for understanding physiology of the prenatal and postnatal eye.

**Key words:** lutein, prenatal development, carotenoids, tissues of the human eye. ■

Ophthalmosurgery. – 2013. – No. 1. – P. 31-35.

**И**з общего числа циркулирующих в плазме крови человека каротиноидов только лютеин и зеаксантин являются основными для тканей глаза человека [24]. Во взрослом глазу человека их находят в сетчатке, ретинальном пигментном эпителии, сосудистой оболочке, радужке, хрусталике и цилиарном теле. Единственная ткань, где ни лютеин, ни зеаксантин не были обнаружены, – это стекловидное тело [7, 8].

Каротиноиды в глазу выполняют важные физиологические функции, такие как светофильтрующая и антиоксидантная, предохраняющие сетчатку и хрусталик от опасности повреждающего действия света и активных форм кислорода. Предполагается участие каротиноидов в предотвращении катаракты и снижении риска развития других заболеваний глаза, например, таких как старческая макулярная дистрофия [13, 19].

Несмотря на то что в стекловидном теле взрослого глаза каротиноиды не выявлены, тем не менее, у плодов человека с 15-й по 28-ю неделю в этой структуре глаза был обнаружен лютеин [1, 3]. Имеется также работа, свидетельствующая о присут-

ствии лютеина в пренатальной сетчатке в зоне развивающейся макулы [9]. В хрусталике в пренатальном развитии человека в отличие от стекловидного тела были обнаружены только окисленные формы лютеина, но не сам лютеин [4]. Другие ткани глаза у плодов человека на присутствие каротиноидов исследованы не были.

### ЦЕЛЬ

Исследовать роговицу, склеру, глазной нерв, ретинальный пигментный эпителий (вместе с сосудистой оболочкой) (РПЭ + СОБ) и цилиарное тело вместе с радужкой (ЦТР) на присутствие в них лютеина и/или окисленных форм лютеина, а также стекловидное тело (СТ) на присутствие окисленных форм лютеина.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследовали ткани глаза – роговицу, склеру, глазной нерв, ретинальный пигментный эпителий вместе с сосудистой оболочкой (РПЭ + СОБ), цилиарное тело вместе с радужкой

(ЦТР) и стекловидное тело (СТ). Материал глаз получали от абортивных плодов человека с 12-й по 28-ю неделю беременности. Плоды поступали в ФГБУ «НЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» из лицензированных учреждений Минздрава России, действующих в рамках законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан и в соответствии с утвержденным перечнем медицинских показаний. Возраст плодов соответствует срокам, установленным врачом-акушером. Всего в работе использовано 49 образцов от глаз плодов разных возрастов: хрусталиков – 19, РПЭ + СОБ – 4, ЦТР – 6, роговиц – 2, глазного нерва – 1, склеры – 2, СТ – 15 (табл. 1, 2, 3).

Содержание каротиноидов и их окисленных форм контролировали с помощью хроматографического анализа (ВЭЖХ). Экстракцию каротиноидов из нативных тканей глаза проводили в системе «хлороформ-метанол-вода» в соотношении 2:1:1 (по объему). Для этого ткани предварительно тщательно гомогенизировали в гомогенизаторе с 0,5 мл воды, после чего добавляли остальные растворители для проведения экстракции. Перемешивали на электрической мешалке типа вортекс (ELMI Sky Line, Type V-3, Латвия) 2 мин. и затем инкубировали 10 мин. при температуре 4° С. После этого смесь центрифугировали на центрифуге MLW K 26 D (680 g, 10 мин., 4° С), отбирали нижний хлороформный слой и упаривали его на водоструйном насосе. Осадок растворяли в 100 мкл метанола непосредственно перед проведением анализа ВЭЖХ. Для анализа использовали аликвоту 30 мкл. Для хроматографического разделения методом ВЭЖХ на обращенной фазе был использован хроматограф производства фирмы Knauer (Германия), который состоял из двух насосов K-120, спектрофотометрического детектора K-2501 и колонки Диасфер 120 C18 (4\*150 мм, размер сорбента 5 мкм). Детектирование осуществляли по поглощению на спектрофотометрическом детекторе K-2501 на длине волны 430 нм. Разделение проводили путем линейного градиентного элюирования в системе от 100% растворителя А (10% метанола + 90%

#### Для корреспонденции:

*Яковлева Марина Андреевна*, мл. научн. сотрудник лаборатории физико-химических основ рецепции;

*Татиолов Александр Сергеевич*, докт. хим. наук, ведущ. научн. сотрудник лаборатории физико-химических основ регуляции биологических систем;

*Фельдман Татьяна Борисовна*, канд. биол. наук, ст. научн. сотрудник лаборатории физико-химических основ рецепции;

*Островский Михаил Аркадьевич*, академик, профессор МГУ, докт. биол. наук, зав. лабораторией физико-химических основ рецепции

ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН»

Адрес: 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

Тел.: (495) 939-7154

*Панова Ина Георгиевна*, докт. биол. наук, ст. научн. сотрудник лаборатории проблем регенерации

ФГБУН «Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН»

Адрес: 119334, Москва, ул. Вавилова, 26

Тел.: (499) 135-5507

*Полтавцева Римма Алексеевна*, канд. мед. наук, ст. научн. сотрудник лаборатории экспериментальной нейробиологии

ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН»

Адрес: 142290, г. Пушкино, ул. Институтская, 3

Тел.: (495) 438-2601

*Сухих Геннадий Тихонович*, академик РАН, профессор, докт. мед. наук, директор ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России

ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России

Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4

Тел.: (495) 438-2601

ацетонитрила) до 100% растворителя В (100% этилацетат) за 70 минут. Скорость потока 1 мл/мин.

Для расчета количественного содержания каротиноидов в исследуемых образцах был использован внешний стандарт лютеина или его окисленных форм [4], для расчета концентраций были использованы коэффициенты экстинкции (E1%, 1 см) 2800 для продуктов окисления лютеина при 443 нм [6] и 2550 при 445 нм – для лютеина [23].

В качестве контроля были использованы раствор лютеина (La Roch, Швейцария) и раствор окисленных форм лютеина в метаноле. Для получения окисленных форм лютеина раствор лютеина в метаноле облучали видимым светом, как было описано ранее [4].

Показателем содержания лютеина и окисленных форм лютеина в исследуемых тканях глаза служили относительные единицы, полученные как отношение массы каротиноидов (в нг) к влажной массе ткани (мг).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Контроли стандарта лютеина (темнового) (рис. А) и продуктов его окисления (после облучения темнового стандарта лютеина в течение 1 часа видимым светом в присутствии кислорода воздуха) (рис. Б) [4] свидетельствуют о том, что на хроматограммах ВЭЖХ, полученных из экстрактов тканей роговицы (рис. Д), склеры (рис. Е), глазного нерва (рис. Ж), РПЭ + СОБ (рис. З) и ЦТР (рис. И, табл. 1), представлены два пика в той же области, что и пики на хроматограммах лютеина, образующиеся при его облучении (фотоокислении) (рис. Б, табл. 2). Следовательно, можно заключить, что в экстрактах из этих нативных тканей глаза содержатся окисленные формы лютеина. Такую же картину мы наблюдали прежде и для хрусталика (рис. Г) [4]. Ранее нами было показано присутствие неокисленной формы лютеина в стекловидном теле глаза плодов человека [1, 3]. В данной работе мы провели более детальное исследование и показали, что в стекловидном теле, наряду с лютеином, обнаруживаются также и его окисленные формы (рис. В, табл. 3).

Таблица 1

### Содержание продуктов окисления лютеина в тканях глаза плодов человека

Ткани	Возраст плодов, недели	Вес нативной ткани, г	Масса продуктов окисления лютеина на вес влажной ткани, нг/г
Роговица	22,5	0,073	0
	24	0,045	9,56
Склера	22,5	0,583	0,82
	24	0,257	3,29
Глазной нерв	24	0,009	133,3
РПЭ + сосудистая оболочка	22,5	0,106	0
	24	0,044	0
	24	0,044	6,49
	28	0,247	0
Цилиарное тело + радужка	16,5	0,006	79,52
	22,5	0,22	1,65
	21,5	0,027	0
	24	0,008	66,17
	24	0,022	0
	28	0,041	5,85

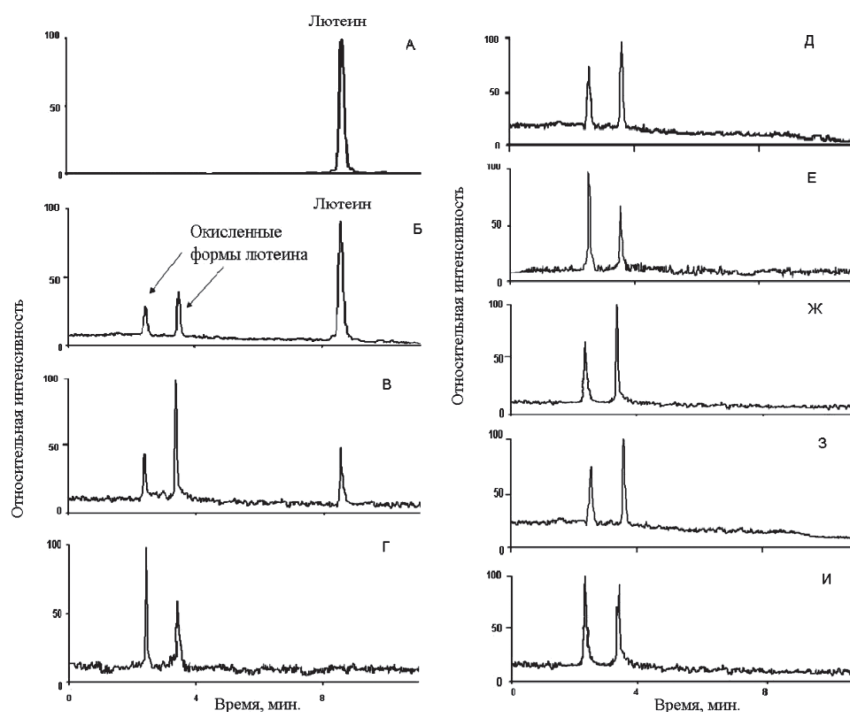


Рис. Хроматограммы хлороформных экстрактов из различных тканей глаза человека на 24 неделе пренатального развития, а также стандартов лютеина и его окисленных форм: А – лютеин, Б – стандарт лютеина, облученный в течение 1 часа, В – стекловидное тело, Г – хрусталик, Д – роговица, Е – склера, Ж – глазной нерв, З – РПЭ + сосудистая оболочка, И – цилиарное тело + радужка. Детектирование по поглощению на длине волны 430 нм. Пояснения в тексте

Таблица 2

**Содержание продуктов окисления лютеина  
в хрусталике глаза плодов человека (из работы Яковлева и др., 2011 [4])**

Возраст плодов, недели	Вес нативной ткани, г	Масса продуктов окисления лютеина на вес влажной ткани, нг/г
12	0,002	0
14	0,008	0
15	0,004	326,47
15	0,012	21,47
16	0,008	42,67
16,5	0,038	8,35
17	0,02	91,76
17	0,02	67,05
17	0,031	43,98
18,5	0,039	32,87
19,5	0,018	183,89
20,5	0,038	38,21
21,5	0,068	33,02
21,5	0,077	0
22	0,075	49,63
22,5	0,084	31,09
24	0,052	42,76
24	0,038	22,29
28	0,153	8,30

Помимо стекловидного тела и хрусталика, нами впервые исследованы и другие ткани глаза, такие как роговица, склера, глазной нерв, РПЭ + СОБ и ЦтР в пренатальном развитии плодов человека. В них было обнаружено присутствие окисленных форм каротиноидов. При этом неокисленных форм каротиноидов в этих тканях, как и в хрусталиках, нами не обнаружено. Единственная ткань глаза в ходе пренатального развития, в которой обнаруживаются как окисленные формы, так и сам лютеин, – это стекловидное тело (рис. В, табл. 3). Не наблюдалось также какой-либо закономерной количественной динамики содержания окисленных форм лютеи-

на в изученных тканях с возрастом плодов (табл. 1-3).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Отсутствие окисленных форм лютеина в тканях некоторых из исследованных глаз может быть объяснено либо слишком малым их количеством, недостаточным для их определения, либо отсутствием их в этих тканях (табл. 1-3), что, возможно, объясняет разброс, характерный для каротиноидов и, как правило, является отражением поступления каротиноидов с пищей [12, 17].

В то же время лютеин, присутствующий в стекловидном теле, по-

казывает четкую динамику изменения его содержания с 16 по 28 неделю [1]. При этом было показано, что в ходе пренатального развития лютеин в стекловидном теле исчезает после 28-й недели и уже не обнаруживается на 30-й неделе, как и в глазах взрослого человека [1, 3].

Таким образом, у плодов человека раннего плодного периода развития лютеин присутствует только в стекловидном теле [1, 3] и сетчатке [9]. В остальных тканях глаза сам лютеин не обнаруживался, но присутствовали его окисленные формы. Вопрос, является ли присутствие окисленных форм лютеина в исследованных тканях транзиторным, как это было показано для лютеина в стекловидном теле [1, 3], или они будут определяться в этих тканях и в более поздние сроки пренатального развития, остается открытым. Вместе с тем, присутствие окисленных форм лютеина и зеаксантина было показано в сетчатке глаза взрослого человека [15].

Если антиоксидантная и светофильтрующая функции лютеина в структурах глаза не вызывают сомнения, то физиологическое значение присутствия в них окисленных форм каротиноидов в пренатальном развитии остается не совсем ясным. Возможно, окисление каротиноидов происходит в процессе выполнения ими защитной антиоксидантной функции, предохраняя развивающиеся ткани глаза от опасности свободно-радикального повреждения [5, 11]. Действительно, было показано, что каротиноиды образуют окисленные формы, реагируя с активными формами кислорода [10], защищая ткани от окислительного стресса [18, 21, 22].

Возможной функцией каротиноидов и, в частности, окисленных форм лютеина может быть функция депо кислорода [2, 20]. Также существуют данные о том, что окисленные формы каротиноидов ведут себя как биологически активные молекулы [16].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поскольку глаз в исследуемый период развития активно формируется, то не исключено, что лютеин и его окисленные формы выполняют морфогенетическую функцию для



Таблица 3

## Содержание лютеина и продуктов окисления лютеина в стекловидном теле глаза плодов человека

Возраст плодов, недели	Вес нативной ткани, г	Масса продуктов окисления лютеина на вес влажной ткани, нг/г	Масса лютеина на вес влажной ткани, нг/г
12	0,005	61,7	54,35
15	0,004	73,4	142,94
16,5	0,095	3,01	1,63
17	0,079	227,370647	914,03
18	0,108	10,9827586	12,74
19,5	0,425	59	68,44
19,5	0,167	395,913333	1187,74
21,5	0,344	107,2	404,24
22,5	0,215	7,41551724	8,602
23	0,73	18,0869565	4,16
24	0,248	19,173913	4,41
28	0,54	17,0434783	3,92

становления структурной и функциональной организации глаза. В любом случае, обнаружение лютеина и его окисленных форм в тканях глаза человека в ходе пренатального развития представляет существенный интерес для понимания физиологии пренатального и постнатального глаза.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Панова И.Г., Татиколов А.С., Суших Г.Т. Корреляция между содержанием альбумина и каротиноидов в стекловидном теле глаза человека в пренатальном развитии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.– 2007.– Т. 144, № 11.– С. 522-525.
2. Примова Л.А., Высоцкий И.Ю. Каротиноиды: структура, метаболизм, биологические функции // Вестник Сумского государственного университета. Сер. Медицина.– 2005.– Т. 7, № 79.– С. 9-25.
3. Яковлева М.А., Панова И.Г., Фельдман Т.Б. и др. Обнаружение каротиноидов в стекловидном теле глаза человека в ходе его пренатального развития // Онтогенез.– 2007.– Т. 38, № 5.– С. 380-385.
4. Яковлева М.А., Панова И.Г., Татиколов А.С. и др. Обнаружение окислен-

ных форм каротиноидов в хрусталике глаза в ходе пренатального развития человека // Катарактальная и рефракционная хирургия.– 2011.– Т. 11, № 3.– С. 40-43.

5. Arnal E., Miranda M., Almansa I. et al. Lutein prevents cataract development and progression in diabetic rats // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.– 2009.– Vol. 247, № 1.– P. 115-120.

6. Barua A.B., Olson J.A. Xanthophyll epoxides, unlike beta-carotene monoepoxides, are not detectably absorbed by humans // J. Nutr.– 2001.– Vol. 131, № 12.– P. 3212-3215.

7. Bernstein P.S., Khachik F., Carvalho L.S. et al. Identification and quantitation of carotenoids and their metabolites in the tissues of the human eye // Exp. Eye Res.– 2001.– Vol. 72.– P. 215-223.

8. Bernstein P.S. New insights into the role of the macular carotenoids in age-related macular degeneration. Resonance Raman studies // Pure Appl. Chem.– 2002.– Vol. 74, № 8.– P. 1419-1425.

9. Bone R.A., Landrum J.T., Fernandez L., Tarsis S.L. Analysis of the macular pigment by HPLC: retinal distribution and age study // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.– 1988.– Vol. 29, № 6.– P. 843-849.

10. Carail M., Caris-Veyrat C. Carotenoid oxidation products: From villain to saviour? // Pure Appl. Chem.– 2006.– Vol. 78, № 8.– P. 1493-1503.

11. Daniel C.L., Thomas D.M. Antioxidant Reactions of  $\beta$ -Carotene: Identification of Carotenoid-Radical Adducts // Chem. Res. Toxicol.– 1996.– Vol. 9, № 1.– P. 8-11.

12. Hammond B.R., Caruso-Avery M. Macular pigment optical density in a southwestern sample // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.– 2000.– Vol. 41.– P. 1492-1497.

13. Jewell V.C., Northrop-Cleves C.A., Tubman R., Thurnham D.I. Nutritional factors and visual function in premature infants // Proc. Nutr. Soc.– 2001.– Vol. 60.– P. 171-178.

14. Jorgensen K., Skibsted L.H. Light sensitivity of carotenoids used as food colours. Quantum-yields dependence of wavelength and oxygen pressure for direct and sensitized photodegradation of solubilized lutein and  $\beta$ -carotene // Z. Lebensm. Unters. Forsch.– 1990.– Vol. 190, № 4.– P. 306-313.

15. Khachik F., Bernstein P.S., Garland D.L. Identification of Lutein and Zeaxanthin Oxidation Products in Human and Monkey Retinas // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.– 1997.– Vol. 38.– P. 1802-1811.

16. Krinsky N.I. The biological properties of carotenoids // Pure Appl. Chem.– 1994.– Vol. 66, № 5.– P. 1003-1010.

17. Landrum J.T., Bone R.A., Joa H. et al. A one year study of the macular pigment: the effect of 140 days of a lutein supplement // Exp. Eye Res.– 1997.– Vol. 65.– P. 57-62.

18. Ma L., Lin X.M. Effects of lutein and zeaxanthin on aspects of eye health // J. Sci. Food Agric. – 2010.– Vol. 90, № 1.– P. 2-12.

19. Mares-Perlman J.A., Millen A.E., Ficek T.L., Hankinson S.E. The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease // Overview J. Nutr.– 2002.– Vol. 132.– P. 518-524.

20. Pocock T., Krol M., Humer N.P.A. The Determination and Quantification of Photosynthetic Pigments by Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography, Thin-Layer Chromatography, and Spectrophotometry // Methods Mol. Biol. – 2004.– Vol. 274.– P. 137-148.

21. Prasain J.K., Moore R., Hurst J.S. et al. Electrospray tandem mass spectrometric analysis of zeaxanthin and its oxidation products // J. Mass Spectrom.– 2005.– Vol. 40.– P. 916-923.

22. Salerno C., Crifo C., Capuozzo E. et al. Effect of carotenoid oxidation products on neutrophil viability and function // BioFactors.– 2005.– Vol. 24.– P. 185-192.

23. Strain H.H. Leaf xanthophylls.– Washington: Carnegie Institute of Washington, 1938.

24. Zimmer J.P., Hammond B.R. Possible influences of lutein and zeaxanthin on the developing retina // Clin. Ophthalmol.– 2007.– Vol. 1, № 1.– P. 25-35.

Поступила 31.05.2012

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 13-03-00863).