КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

©. ОСКИРКО С.А., САЛМИН В.В., ЛАЗАРЕНКО В.И., ПРОВОРОВ А.С.,
ВЛАДИМИРОВА Е.С., ФОКИНА Д.С., САЛМИНА А.Б.

О РОЛИ ПИРИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ ВО ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ВОЗРАСТНОЙ КАТАРАКТЫ

С.А. Оскирко, В.В. Салмин, В.И. Лазаренко, А.С. Проворов,
Е.С. Владимирова, Д.С. Фокина, А.Б. Салмина

Красноярская государственная медицинская академия, ректор – д.м.н., проф. И.П. Артюхов; кафедра глазных болезней, зав. – д.м.н., проф. В.И. Лазаренко; кафедра квантовой электроники ГОУ ВПО СибФУ, зав. – д.ф.-м.н., проф. А.С. Проворов; НИИ молекулярной медицины и патобиохимии КрасГМА, руководитель – д.м.н., проф. А.Б. Салмина.

***Резюме.** В настоящее время основным методом диагностики катаракты является биомикроскопия на щелевой лампе, имеющий значительную степень субъективизма. Целью исследования явилась разработка методики объективной диагностики стадий возрастной катаракты с помощью флуоресцентного анализа. При люминесцентном анализе хрусталика наибольший интерес представляют восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидов (НАДН и НАДФН). Пиримидиновые нуклеотиды играют важную роль не только как кофакторы в целом ряде окислительно-восстановительных ферментативных систем, но и являются регуляторами скорости и направленности метаболических процессов в тканях. Выявлены закономерные изменения индекса помутнения хрусталика от стадии возрастной катаракты.*

***Ключевые слова:** хрусталик человека, возрастная катаракта, эндогенные флуорофоры, НАДН, НАДФН, аутофлуоресценция.*

Главная причина, приводящая к потере зрения во всем мире, принадлежит катаракте – помутнению хрусталика [5].

Одним из основных способов исследования хрусталика в настоящее время в России является биомикроскопия на щелевой лампе, в основе которого лежит явление рассеяния света средами с явно выраженными оптическими неоднородностями [2]. Недостатком способа диагностики катаракты с применением щелевой лампы является его субъективность. Поэтому для постановки диагноза возрастной катаракты необходимы дополнительные офтальмологические обследования. В настоящее время широко распространена постановка диагноза стадии катаракты по остроте зрения. На данный момент нет объективного метода диагностики катаракты на разных стадиях развития. Вследствие этого представляется важным разработка и внедрение в практику простого, нетравматичного метода объективной диагностики стадий возрастной катаракты, для оценки помутнений хрусталика.

В настоящее время флуоресцентные методы получили широкое распространение в медицине в качестве аналитических и диагностических методов, за счет своей чувствительности, универсальности и относительной простоты реализации. Методологическим основанием использования флуоресцентного анализа является наличие собственной флуоресценции клеток и тканей при их облучении ультрафиолетовым и видимым светом, причем зачастую динамику интенсивности излучения удается зарегистрировать даже тогда, когда никакие другие методы не улавливают каких-либо структурных и функциональных изменений в тканях [9]. В процессе биохимических реакций в ткани меняется относительное содержание основных флуорофоров, характеризующихся собственной флуоресценцией, или имеющих флуоресцирующие компоненты. Известны наиболее важные тканевые флуорофоры, такие как: триптофан; коллаген и эластин; восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (НАДН) и его фосфат (НАДФН); флавины и флавопротеины; бета-каротин; порфирины [3].

Измерение автофлуоресценции хрусталика – быстрый, объективный и неразрушающий метод, который может обеспечить информацией относительно изменений в хрусталике [6]. Существует теория, что уменьшенная передача видимого света в стареющем хрусталике и при катаракте происходит главным образом из-за накопления в хрусталике флуорофоров [1, 4, 7, 8]. При люминесцентном анализе хрусталика наибольший интерес представляют восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидов (НАДН и НАДФН). В целом все исследователи отмечают, что более высокая концентрация никотинамидных коферментов отмечается в хрусталике и превышает аналогичный показатель в других тканях глаза. Пиримидиновые нуклеотиды играют важную роль не только как кофакторы в целом ряде окислительно-восстановительных ферментативных систем, но и являются регуляторами скорости и направленности метаболических процессов в тканях [1]. Поэтому практически любые сдвиги в клеточном метаболизме отображаются в динамике свойств НАДН.

НАД(Ф)Н является сильным флуорофором в ткани. НАД(Ф)Н обладает характерными спектрами поглощения, включающими две полосы в ультрафиолетовой области (при $\lambda=260$ нм и $\lambda=340$ нм), а также типичным спектром собственной флуоресценции с максимумом, приходящимся на интервал от 455 до 480 нм. В водном растворе НАДН при возбуждении ртутной линией 365 нм флуоресцирует в голубой области с $\lambda=468$ нм и квантовым выходом 0,02. Было установлено, что переход НАДН в окисленное состояние сопровождается потерей одной из полос поглощения (при $\lambda=340$ нм) и утратой способности люминесцировать. Напротив, при связывании НАДН апоферментом интенсивность голубого свечения нарастает, причем максимум этой собственной флуоресценции сдвигается в коротковолновую область видимой части электромагнитного спектра $\lambda=440$ нм [9].

Целью данного исследования явилась разработка методики объективной диагностики стадий возрастной катаракты с помощью флуоресцентного анализа.

Материалы и методы

Были обследованы 3 группы людей. В I (57 человек) и II группах (192) проведено комплексное офтальмологическое обследование (острота зрения по таблицам Сивцева-Головина, биомикроскопия на щелевой лампе «Карл Цейс», офтальмоскопия, электро-функциональные исследования), и поставлен заключительный диагноз. В III группе офтальмологическое обследование не проводилось. Во всех группах проводилась диагностика катаракты лазерно-флуоресцентным методом. I группа – 57 человек – здоровые люди, средний возраст среди них составил $20 \pm 1,3$ года, без нарушения функции зрения. Во II группе выделялись подгруппы: 2.1 – здоровые люди, средний возраст $53 \pm 1,8$ года, без нарушения функции зрения, со сформировавшимся ядром хрусталика – факосклероз (27); 2.2 – больные начальной возрастной катарактой, средний возраст у них был $62 \pm 1,36$ (36 человек, 45 глаз) года; 2.3 – с незрелой возрастной катарактой, средний возраст $63 \pm 1,76$ (33 человека, 51 глаз) года; 2.4 – с зрелой возрастной катарактой, средний возраст равнялся $63 \pm 1,96$ (39

человек, 48 глаз). III группа – лица, с жалобами на снижение зрения, средний возраст составил $58 \pm 1,6$ (24 человека, 48 глаз) лет. Мужчины составили 53,2%, женщины – 46,8%.

Для проведения исследований аутофлуоресценции используется лазерный спектрофлуориметр. Устройство работает следующим образом: импульсно-периодический лазер формирует импульсно-периодическое излучение с длиной волны 337 нм, которое доставляется через оптическое волокно до окулярного зонда. Излучение из оптического волокна попадает на хрусталик. Под действием излучения лазера в тканях хрусталика возбуждается флуоресценция. Излучение флуоресценции попадает на торец оптического волокна и доставляется до спектрометра, электрический сигнал с которого поступает на усилитель, усиленный сигнал поступает на аналого-цифровой преобразователь. Данные с аналого-цифрового преобразователя поступают в программируемое устройство управления и обработки данных. Устройство управления и обработки данных устанавливает необходимую длину волны на спектрометре, формирует импульс запуска для лазера, формирует команду на получение данных с аналого-цифрового преобразователя и осуществляет получение и обработку данных. Результатом обработки является значение индекса помутнения хрусталика. Расчет значения индекса помутнения хрусталика производится по формуле (1).

Собственную флуоресценцию хрусталика регистрируют в трех, рассчитанных эмпирическим путем, точках с длинами волн 400, 440 и 500 нм, две из которых 400 и 500 нм являются изобестическими, а 440 нм – длине волны, при которой спектры флуоресценции хрусталика здоровых и больных катарактой людей, имеют максимальную амплитуду отклонения. Диагноз ставят в зависимости от значения индекса помутнения, который рассчитывают по формуле (1):

$$\alpha = \frac{\frac{I_{440}^H}{I_{400}^H - I_{500}^H} - \frac{I_2}{I_1 - I_3}}{\frac{I_{440}^K}{I_{400}^K - I_{500}^K} - \frac{I_{440}^H}{I_{400}^H - I_{500}^H}} \quad (1),$$

где α – индекс помутнения хрусталика;

I_1 – интенсивность флуоресценции на длине волны 400 нм;

I_2 – интенсивность флуоресценции на длине волны 440 нм;

I_3 – интенсивность флуоресценции на длине волны 500 нм;

$I_{400,440,500}^H$ – усреднённые значения интенсивности флуоресценции для людей с прозрачным хрусталиком, на соответствующих длинах волн

$I_{400,440,500}^K$ – усреднённые значения интенсивности флуоресценции для людей с катарактальным хрусталиком, на соответствующих длинах волн;

Статистическая обработка результатов проведена с использованием t-критерия Стьюдента и метода корреляционного анализа.

Результаты и обсуждение

Значения α для группы без нарушения функции зрения составило 0,20-0,40. Для людей без нарушения функции зрения, но со сформировавшимся ядром хрусталика – факосклероз α равно 0,41-0,60. Для лиц с начальной возрастной катарактой α составило 0,61-0,80. Для подгруппы с незрелой возрастной катарактой α равнялось 0,81-0,90. Для больных зрелой возрастной катарактой α составило 0,91-1,0.

В выше рассматриваемых группах прежде проведено комплексное офтальмологическое обследование и верифицирован диагноз катаракта и стадия её развития, впоследствии подтверждённый флуоресцентным методом. Для определения чувствительности и специфичности метода флуоресцентной диагностики нами была взята III группа больных. В III группе индекс помутнения (α) составил: 11 глаз – 0,41-0,60, т.е. у них диагностирован факосклероз; 21 – 0,61-0,80 – начальная возрастная катаракта; 16 – 0,91-1,0 – зрелая возрастная катаракта. Впоследствии лица III группы прошли

комплексное офтальмологическое обследование, которое полностью подтвердило диагноз, верифицированный флуоресцентным методом.

Применение ультрафиолетового излучения с длиной волны 337 нм обосновано тем, что именно излучение этого диапазона максимально поглощается хрусталиком и не поглощается другими средами глаза, например, роговицей и влагой глаза, и не вызывает повреждения тканей глаза [3]. Экспериментальные исследования устройства для регистрации флуоресценции хрусталика показали, что на проведение обследования одного хрусталика с учетом установки окулярного зонда и повторение десяти повторных замеров занимает в среднем 1 минуту. При этом максимальная доза излучения приходящаяся на исследуемый хрусталик равна 52 Дж/см^2 , что ниже максимально допустимой дозы (137 Дж/см^2) с длиной волны 337 нм.

Хочется заметить, что вследствие накопления флуорофоров в хрусталике с возрастом, соответственно, происходит изменение автофлуоресценции [1, 4, 7, 8] и при значениях $\alpha = 0,58-0,60$ больного можно отнести к группе риска по развитию возрастной катаракты, что диктует необходимость проведения мероприятий по её предотвращению.

Мы считаем, что причиной изменения флуоресценции на разных стадиях катаракты является изменение соотношения восстановленных и окисленных форм пиридиновых нуклеотидов. С учётом того, что при возбуждении длиной волны 337 нм именно эти молекулы доминируют в качестве фотоакцепторов, мы полагаем, что предлагаемый метод диагностики является объективным и патогенетически обоснованным. Выявленные изменения характера аутофлуоресценции хрусталика подтверждают важность нарушения окислительно-восстановительных процессов в механизмах формирования и прогрессирования катаракты.

Таким образом, предлагаемый способ диагностики возрастной катаракты позволяет с высокой степенью точности диагностировать стадии и прогнозировать риск её развития, сократить время проведения диагностики, исключить субъективную оценку, что в свою очередь позволит начать

своевременное медикаментозное лечение и обеспечить дифференцированный подход к лечению больных возрастной катарактой на разных стадиях развития.

ABOUT A ROLE PYRIDINE NUCLEOTIDES IN FLUORESCENT DIAGNOSTICS OF AGE CATARACT

S.A. Oskirko, V.V. Salmin, V.I. Lazarenko,
A.S. Provorov, E.S. Vladimirova, D.S. Fokina, A.B. Salmina

Krasnoyarsk state medical academy

At present, biomicroscopy with slit lamp is a main method for diagnostics of cataract. However, this method has high degree of subjectivism. Therefore, the goal of our study was to develop objective method for age cataract diagnostics using fluorescent analysis. At the luminescent analysis of a lens the greatest interest represent the restored form nicotinamideadeninedinucleotides (NADH and NADPH). Pyridine nucleotides play the important role not only as cofactors in lot oxidation-reduction enzyme systems, but also are regulators of speed and an orientation of metabolic processes in tissue. We have found changes in lens turbidity index depending on a stage of age cataract.

Литература

1. Веселовская З.Ф., Блюменталь М., Боброва Н.Ф. и др. Катаракта. – Киев.: Книга плюс, 2002. – 77 с.
2. Шульпина Н.Б. Биомикроскопия глаза. – М.: Медицина, 1974. – 35 с.
3. Andersson-Engels S., Claes af K., Svanberg K., Svanberg S. In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics // *Phys. Med. Biol.* – 1997. – Vol. 42, № 5. – P. 815–824.
4. Bessems G., Keizer E., Wollensak J., Hoenders H.J. Non-tryptophan fluorescence of crystallins from normal and cataractous human lenses // *Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1987. – Vol. 28, № 7. – P. 1157-1163.
5. Brian G., Taylor H. Cataract blindness – challenges for the 21st century // *Bulletin of the World Health Organization.* – 2001. – Vol. 79, № 3. – P. 678.
6. Siik S. Lens autofluorescence: in aging and cataractous human lenses, clinical applicability. – Oulu, Finland: Oulu University Library, 1999. – P. 15-28.
7. Yappert M.C., Lai S., Borchmanj D. Dependence and Distribution of Green and Blue Fluorophores in Human Lens Homogenates // *Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci.* – 1992. – Vol. 33, № 13. – P. 533-536.
8. Yappert M.C., Borchman D., Byrdwell W.C. Comparison of specific blue and green fluorescence in cataractous versus normal human lens fractions // *Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci.* – 1993. – Vol. 34, № 3. – P. 630-636.
9. Yavari N. Optical spectroscopy for tissue diagnostics and treatment control: Doctoral Thesis. – Bergen, Norway, 2006. – P. 95-97.