

УДК 577.125.33.: 616.5.-008.922.

©Л.Н.Бышнева, В.В.Сенчук.

### ВЛИЯНИЕ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ, SH-ГРУПП И АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗЫ В ХРУСТАЛИКЕ ГЛАЗА.

Л.Н.Бышнева, В.В.Сенчук.

Белорусский государственный университет,  
220080, г.Минск, пр.Ф.Скорины, 4. тел.(0172) 77-18-34, факс (0172)77-55-35.

Изучено влияние УФ-излучения *in vitro* на содержание аскорбиновой кислоты (АК), SH-групп и функциональную активность глутатионредуктазы (ГР) в ткани хрусталика бычьего глаза. Полученные результаты свидетельствуют об интенсивном окислении АК, снижении общего уровня SH-групп, а также ингибировании ГР при воздействии УФ излучения и продуктов фотоокисления АК. Обнаружена активация NADPH-зависимой оксидоредуктазы (ОР) под действием УФ облучения и в присутствии АК и  $\text{Cu}^{2+}$ . Предполагается, что АК играет существенную роль в формировании патологии хрусталика.

**Ключевые слова:** УФ-излучение, хрусталик, аскорбиновая кислота, восстановленный глутатион, глутатионредуктаза, оксидоредуктаза.

**ВВЕДЕНИЕ.** В настоящее время считается общепринятым, что среди оптических излучений наибольшее разрушающее воздействие на биологические системы несет коротковолновая часть спектра УФ-излучения, которая вызывает активацию свободнорадикальных реакций, интенсификацию окислительных процессов, снижение уровня антиоксидантной защиты ткани, агрегацию белков [1-3]. Согласно фотохимической теории старения хрусталика деструктивные реакции, индуцируемые УФ-излучением, относятся к одному из пусковых механизмов возникновения сенильной катаракты [4]. Защитную роль в предотвращении разрушающего воздействия свободно-радикальных процессов выполняет антиоксидантная система (АОС) хрусталика, которая включает в себя как ферментативную, так и неферментативную системы, тесно взаимодействующие между собой. К важнейшим представителям неферментативной антиоксидантной системы хрусталика относятся аскорбиновая кислота (АК) и восстановленный глутатион (GSH), для которых характерен активный метаболизм и высокий уровень содержания в тканях [5]. Высокий уровень витамина С в хрусталике глаза давно привлекает к себе внимание многих исследователей, однако до сих пор нет единого мнения о его функциональном значении и роли в развитии патологии хрусталика. Существует представление, что АК поступает в хрусталик в виде дегидроаскорбиновой кислоты (ДАК) из ресничного тела через камерную влагу, где восстанавливается при участии GSH до

Принятые сокращения: АК - аскорбиновая кислота, ДАК - дегидроаскорбиновая кислота, ГР - глутатионредуктаза, ОР - оксидоредуктаза, АОС - антиоксидантная система, GSH - восстановленный глутатион, GSSG - окисленный глутатион.

#### ВЛИЯНИЕ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ НА ХРУСТАЛИК ГЛАЗА

АК и в восстановленной форме возвращается в кровь, участвуя т.о. в транспорте атомов водорода. Окисленный глутатион при участии кофермента NADPH восстанавливается глутатионредуктазой (ГР), играющей важную роль в поддержании функционального равновесия системы АК-ДАК и уровня GSH [5].

АК является сильным внутриклеточным восстановителем, значение которого в механизме катарактогенеза остается не ясным, а данные об уровне АК в ткани хрусталика в условиях УФ облучения практически отсутствуют в научной литературе. Вместе с тем известно, что в водных растворах витамин С обладает достаточной фоточувствительностью и разрушается под действием УФ лучей [6].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния различных доз УФ излучения *in vitro* на содержание АК, SH-групп в ткани хрусталика бычьего глаза и влияние физиологических концентраций восстановленной и окисленной форм витамина С на функциональную активность ГР.

**МЕТОДИКА.** В эксперименте использовали прозрачные хрусталики бычьих глаз массой 2,0-2,4 г. Источником УФ-излучения служила лампа ДРК-120, тестируемая радиометром полосовым СРП-86, с диапазоном длины волн 200-400 нм и общей интенсивностью УФ излучения 1,5 Вт/м<sup>2</sup>. В работе использовали NADPH, 2,6-дихлорфенолиндифенол, окисленный глутатион (GSSG) и GSH фирмы "Reanal" (Венгрия), все остальные реактивы производства "Реахим" (Россия) квалификации не ниже х.ч.

Облучение надмитохондриальной фракции хрусталика бычьего глаза проводили в кварцевом стакане в течение 10, 30, 60, 90 и 120-ти минут. Надмитохондриальную фракцию получали при гомогенизации цельного хрусталика бычьего глаза в 0,9% растворе NaCl в тefлоновом гомогенизаторе с образованием 20%-го гомогената и последующем центрифугировании при 14000g, 0°C [7]. Все измерения производили сразу после УФ облучения и определяли по отношению к контролю - необлученной надмитохондриальной фракции 20%-го гомогената ткани с соответствующей временной экспозицией и условиями эксперимента.

Для изучения влияния различных доз УФ-облучения на уровень АК были использованы две модельные системы: 1 - надмитохондриальная фракция 20%-го гомогената хрусталика; 2 - водный раствор АК. В обоих случаях начальное содержание АК составляло 0,07 мг/мл (0,4 мМ).

Количественное определение АК производили по методу, основанному на реакции восстановления 2,6-дихлорфенолиндифенола витамином С [8].

Суммарное содержание белковых и небелковых SH-групп определяли фотокolorиметрическим ультраметодом [9].

Активность ГР измеряли спектрофотометрически по убыли NADPH [10] с использованием контрольной пробы на NADPH-зависимую оксидоредуктазную активность (ОР), которую определяли в тех же условиях, что и активность ГР, но без внесения GSSG. Реакционная среда объемом 2,65 мл содержала 0,056 М KCl, 0,038 М Na<sub>2</sub>K-фосфатного буфера (рН 7,4), 7,5 мМ ЭДТА, 0,3 мМ GSSG, 0,075 мМ NADPH (концентрация белка в пробе 2,2 мг). Реакцию инициировали добавлением NADPH и проводили в термостатируемых кварцевых кюветах в течение 10 минут при 37°C.

Для изучения влияния витамина С на функциональное состояние ГР добавляли окисленную и восстановленную формы витамина С в надмитохондриальную фракцию с достижением его физиологического уровня 0,4 мг/мл (2,7 мМ) [5]. Фотоокисленную форму витамина С получали при УФ облучении водного раствора АК до достижения 50%-го окисления АК.

При изучении влияния ионов меди на УФ-чувствительность NADPH-зависимой ОР в надмитохондриальную фракцию 20%-го гомогената хрусталика добавляли раствор CuSO<sub>4</sub> с достижением конечной концентрации в надмитохондриальной фракции 1 мМ, 100 мкМ и 10 мкМ. В контроль соответственно добавляли 0,9% NaCl. Контрольные и опытные пробы подвергали

УФ-облучению с временной экспозицией 120 минут.

Концентрацию белка определяли микробиуретовым методом [11].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** При изучении влияния различных доз УФ-облучения на уровень эндогенной АК в ткани хрусталика бычьего глаза и в водном растворе была продемонстрирована высокая фоточувствительность витамина С. Как видно из представленных данных (рис.1), окисление АК в ткани хрусталика протекало более интенсивно, чем в водном растворе (достигая максимальной глубины окисления равной 50% и 20% соответственно при 120-минутной экспозиции). Интенсификация окисления АК может привести к сдвигу равновесия окислительно-восстановительной системы АК-ДАК.

Согласно современным представлениям в регуляции окислительно-

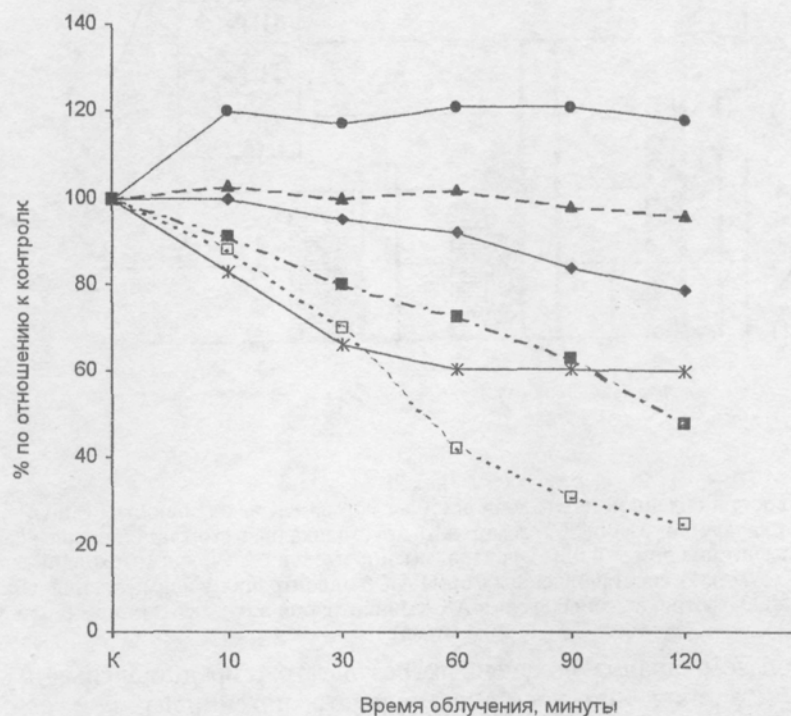


Рисунок 1

Зависимость содержания АК в 9% растворе NaCl (◆) и содержания АК (■), белковых SH-групп (▲), небелковых SH-групп (□), активности ГР (\*) и ОР (●) в надмитохондриальной фракции 20% гомогената хрусталика бычьего глаза от времени экспозиции к УФ облучению.

восстановительного равновесия АК-ДАК существенную роль играет ГР, которая восстанавливает окисленный глутатион (GSSG), используемый для восстановления ДАК.

Данные, представленные на рис.1, демонстрируют ингибирующее влияние УФ излучения на ГР и снижение содержания небелковых SH-групп, в то время как уровень SH-групп, связанных с белком, достоверно не изменялся в условиях эксперимента. Это позволяет предположить, что наиболее чувствительной мишенью при повреждающем воздействии УФ излучения является GSH, а SH-группы белков хрусталика более устойчивы к действию УФ. Полученные результаты согласуются с данными литературы [12].

Исходя из полученных данных, представлялось интересным изучить влияние АК и ее фотоокисленной формы на функциональное состояние ГР без УФ-облучения (рис. 2). Результаты исследований демонстрировали некоторую тенденцию к снижению активности ГР в присутствии физиологической концентрации АК и достоверное ингибирование фермента по отношению к



### ВЛИЯНИЕ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ НА ХРУСТАЛИК ГЛАЗА

контролю в присутствии фотоокисленной формы витамина С. Это позволяет предположить, что высокая чувствительность ГР к воздействию УФ-излучения (рис.1) может быть обусловлена не только прямым повреждающим влиянием УФ лучей на состояние молекулы фермента, приводящим к окислению его SH-групп, но, возможно, также и ингибирующим действием продуктов фотоокисления витамина С. При этом ингибирование ГР может, в свою очередь, способствовать снижению восстановительного потенциала ткани хрусталика, что и наблюдается в условиях УФ-облучения надмитохондриальной фракции ткани хрусталика *in vitro* (рис.1).

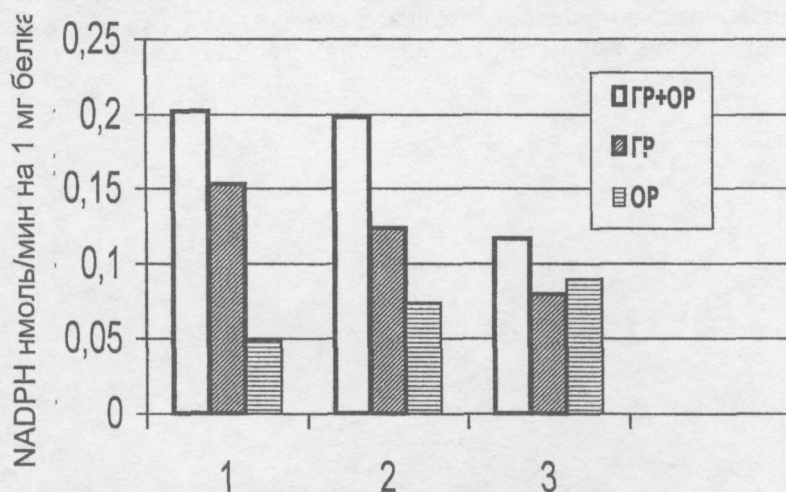


Рисунок 2.

Влияние восстановленной и окисленной (50%) формы АК на активность ГР и ОР в надмитохондриальной фракции 20% гомогената хрусталика бычьего глаза (доверительные интервалы рассчитаны при  $p=0,05$ ). 1-контроль (концентрация АК в надмитохондриальной фракции 0,07 мг/мл); 2- восстановленная форма АК (концентрация в надмитохондриальной фракции 0,4 мг/мл); 3- фотоокисленная форма АК (концентрация в надмитохондриальной фракции 0,4 мг/мл)

Таким образом, анализ полученных результатов, представленных на рис.1, свидетельствует о снижении восстановительного потенциала хрусталика при воздействии УФ-излучения, что может явиться результатом активации окислительно-восстановительных реакций, которые могут носить как ферментативный, так и неферментативный характер. Подтверждением этого предположения может быть интенсификация NADPH-зависимых окислительно-восстановительных процессов (не связанных с функциональной активностью ГР) в надмитохондриальной фракции гомогената хрусталика бычьего глаза при УФ-облучении в различные сроки облучения (рис.1). Активация этих процессов может привести к резкому снижению уровня эндогенного NADPH и способствовать падению восстановительного потенциала ткани. В литературе есть данные о снижении уровня содержания NADPH в хрусталике в условиях УФ-облучения [13].

При определении субстратной специфичности фотоиндуцируемой NADPH-оксидоредуктазы установлено, что ОР окисляла NADPH со скоростью приблизительно в 3 раза выше, чем при использовании NADH в качестве субстрата реакции (рис.3), а в присутствии восстановленной и окисленной формы АК в концентрации 0,04 мг/мл (рис.2) и  $\text{Cu}^{2+}$  в концентрации 10 мкМ - 1 мМ (рис.3) наблюдалась ее активация. При этом  $\text{NaN}_3$  в конечной концентрации 2,3 мМ не оказывал влияние на скорость окисления NADPH (результаты не представлены). Известно, что АК может оказывать свое действие на молекулу фермента, либо благодаря своей восстановительной функции, либо в качестве кофермента. Предполагается, что АК не оказывает действия на ферменты, если в их молекуле

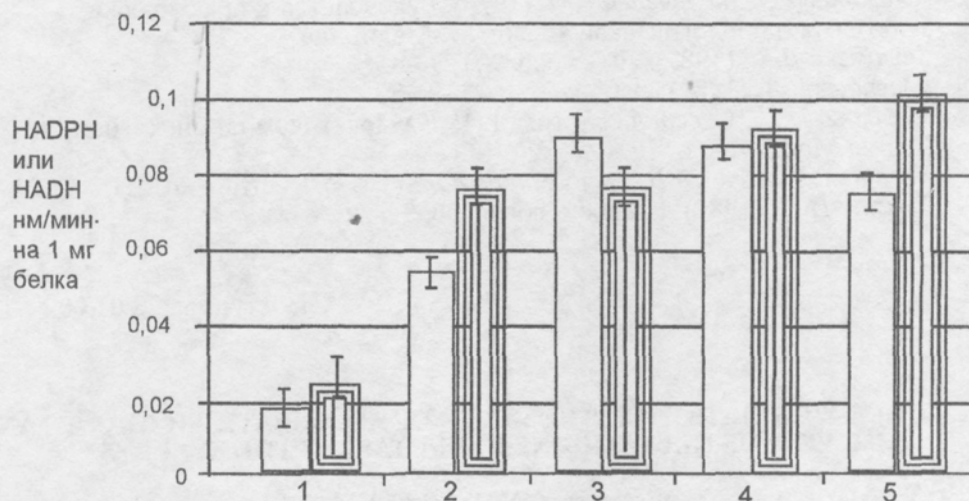


Рисунок 3

Влияние  $\text{Cu}^{2+}$  на активность ОР в надмитохондриальной фракции 20% гомогената хрусталика бычьего глаза без облучения (□) и после облучения в течение 120 минут (▨). Доверительные интервалы рассчитаны при  $p=0,05$ . 1- NADH-ОР без добавления  $\text{Cu}^{2+}$ ; 2- NADPH-ОР без добавления  $\text{Cu}^{2+}$ ; 3- NADPH-ОР в присутствии 1 мМ  $\text{Cu}^{2+}$ ; 4- NADPH-ОР в присутствии 100 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$ ; 5- NADPH-ОР в присутствии 10 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$ .

отсутствуют ионы металлов [6]. Учитывая, что окислительно-восстановительное равновесие является регулятором уровня АК в ткани, фотоиндуцированная интенсификация NADPH-зависимой ОР в условиях накопления ДАК, снижения уровня SH-групп и ингибирования ГР может оказаться защитной реакцией на окислительный стресс. Для более точной идентификации фотоиндуцированного NADPH-зависимого окислительно-восстановительного процесса необходимо проведение дальнейших исследований.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют об интенсивном окислении АК, снижении общего уровня SH-групп (главным образом за счет GSH) и ингибировании ГР в условиях УФ-облучения надмитохондриальной фракции 20% гомогената хрусталика бычьего глаза, что свидетельствует о снижении восстановительного потенциала ткани, активации окислительных процессов при воздействии УФ-излучения, что может играть существенную роль в формировании патологических состояний хрусталика.

## ЛИТЕРАТУРА.

1. Майсурадзе В.Н., Кудряшов Ю.Б. (1987). Проблемы современной биологии. Труды 18-й научной конференции молодых ученых биологического факультета МГУ. Москва, 20-24 апреля, 1987, М.: МГУ, 123-127.
2. Akimov V.G., Potapenko A.Ya., Lashmanova A.P., Knorseva N.I., Polinskaya N.P., Bezdetnaya L.N. (1988). *Studia biophysica*. **124**, 239-249.
3. Ельчанинов В.В., Федорович И.Б. (1989). *Биофизика*. **34**, 758-762.
4. Леус Н.Ф. (1985). *Офтальмол. ж.* **7**, 430-434.
5. Мальцев Э.В. (1988). *Хрусталик. М.: Медицина*.
6. Колотилова А.И., Глушаков Е.П. (1976). *Витамины. Химия, биохимия и физиологическая роль*. Л.: Изд-во Ленинградского ун-та.
7. *Методы биохимических исследований*. (1982). Под ред. проф. Прохоровой М.И. Л.: Изд-во Ленинградского ун-та.

#### ВЛИЯНИЕ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ НА ХРУСТАЛИК ГЛАЗА

8. Кушманова О.Д., Ивченко Г.М. (1974). Руководство к практическим занятиям по биологической химии. М.: Медицина.
9. Фоломеев В.Ф. (1987). Лаб. дело. №1, 33-35.
10. Юсупова Л.В. (1989). Лаб. дело. №4, 19-21.
11. Мешкова Н.П., Северин С.Е. (ред.) (1979) Практикум по биохимии. М.: Изд-во Моск. ун-та.
12. Деев А.И., Асейчев А.В., Владимиров Ю.А. (1999). Вестник РАМН. №2, 22-26
13. Круман И.И. (1989). Радиобиология. 30, 75-79.

Поступила 28.01.00.

#### EFFECT OF UV-RADIATION ON THE LEVEL OF ASCORBATE, SH-GROUPS AND ACTIVITY OF GLUTATHIONE REDUCTASE IN THE EYELENS.

*Byshneva L.N., Senchuk V.V.*

Byelorussian State University, Biology Faculty, Department of Biochemistry,  
220080, Minsk, F.Scorina Pr, 4., tel.: (0172) 77-18-34, fax: (0172)77-55-35.

The effect of UV radiation *in vitro* on the level of ascorbate, SH-groups and glutathione reductase activity in the soluble fraction of bovine eye lens was studied. UV-Irradiation increased NADPH-oxidoreductase activity, the level of ascorbate oxidation and decreased the content of SH-groups and activity of glutathione reductase. Significant activation of the NADPH-oxidoreductase activity in the presence of ascorbate and  $\text{Cu}^{2+}$  was observed after UV-irradiation. It is suggested that ascorbate may play an important role in the UV-induced lens pathology.

**Key words:** UV-radiation, lens, ascorbate, glutathionreductase, oxidoreductase.