

Аутор	<b>Бојана М. Кисић</b>
Година рођења	1970.
e-mail	bojanabk2002@yahoo.com
<b>Подаци о докторској дисертацији</b>	
Универзитет	Универзитет у Приштини – Косовска Митровица
Факултет	Медицински факултет
Година	2009.
Датум одбране	9.07.2009.
Језик/писмо	ћирилица
Ментор и комисија	Проф. др Јеленка Николић (председник комисије), проф. др Дијана Мирић (ментор и члан комисије), проф. др Лепша Жорић (коментор и члан комисије).
Наслов	<b>Оксидациони стрес и елементи антиоксидационе заштите у генези катаракте</b>
<i>Title</i>	<b>Oxidative stress and antioxidant defense elements in the genesis of cataracts</b>
Сажетак	<p>Увод. Главни и непосредни узрок за појаву и развој катаракте до данас није познат, али се оксидациона оштећења током процеса старења, у савременој литератури сматрају значајним у њеној етиопатогенези.</p> <p>Циљ. Истраживање је имало за циљ испитивање оксидационих промена и чиниоца антиоксидационе заштите у серуму и кортиконуклеарним блоковима сочива пацијената са различитим типовима и различитим степеном матуритета сенилне катаракте.</p> <p>Материјал и методе. Клиничка и биохемијска испитивања спроведена су код 101 пацијента са дијагнозом сенилне катаракте (46 жена и 55 мушкараца), просечне старости 72.5 (SD ± 7.98). Према степену матуритета катаракте испитаници су груписани као: почетна сенилна катаракта (N=41) и зрела сенилна катаракта (N=60). У узорцима серума и кортиконуклеарним блоковима сочива одређивани су показатељи липидне пероксидације: коњуговани диени, малондиалдехид и флуоресцентни производи, као и ензими антиоксидативне заштите, супероксид дисмутаза, каталаза, глутатион пероксидаза, глутатин редуктаза и глутатион С-трансфераза.</p> <p>Резултати. У кортиконуклеарним блоковима сочива са дијагнозом почетне катаракте измерена је значајно већа концентрација коњугованих диена (<math>p &lt; 0.001</math>) и интензитет флуоресценце липосолубилних и хидросолубилних иминопиперидина (<math>p &lt; 0.001</math>). У групи испитаника са матурном катарактом измерена је значајно већа концентрација малондиалдехида у кортиконуклеарним блоковима сочива (<math>p &lt; 0.001</math>).</p> <p>Закључак. Промене сочивних структура изазване липидном пероксидацијом могу, уз наравно присутне друге факторе ризика, утицати на почетак и развој сенилне катаракте. У појединим типовима катаракти различит је интензитет липидне пероксидације са најизраженијим променама код катаракте са нуклеарним почетком.</p>

<i>Abstract</i>	<p>Introduction. The immediate cause for the occurrence of cataract is unknown, but oxidative damage and effects of reactive oxygen species are considered important in its etiopathogenesis.</p> <p>Aim. The study was aimed at testing the products oxidative stress and antioxidant protection factors in serum and corticonuclear lenses blocks of patients with different types and different degrees of maturity of age-related cataract.</p> <p>Material and Methods. Patients. Clinical and biochemical researches were carried out in 101 patients with age-related cataract, 46 women and 55 men. The average age of the group was 72.5 (SD <math>\pm</math> 7.98). According to the cataract maturity degree the patients were classified into two groups as follows: cataract senilis incipiens (N=41) and cataract senilis matura (N=60). Serum samples and corticonuclear lenses blocks were obtained to detect the products of lipid peroxidation: conjugated diene, fluorescent lipid peroxidation products and malondialdehyde and activities antioxidative enzymes: superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione S-transferase.</p> <p>Results. Significantly higher concentration of diene conjugation in corticonuclear lenses blocks was measured in the patients with cataract senilis incipiens (<math>p &lt; 0.001</math>) as well as the intensity of fluorescent iminopropens (<math>p &lt; 0.001</math>). Significantly higher concentration of malondialdehyde in corticonuclear lenses blocks (<math>p &lt; 0.001</math>) was measured in the patients with cataract senilis matura.</p> <p>Conclusion. Based on the found lipid peroxidation products measuring results in corticonuclear lenses blocks in the patients with cataract diagnosis, it can be concluded that the lens structure changes caused by lipid peroxidation can, with other risk factors present, influence occurrence and development of cataract. Some cataract types show different lipid peroxidation intensity with the most distinct changes in the cataract wich started as nuclear.</p>
Кључне речи	Оксидациони стрес, катаракта, липидна пероксидација, антиоксидантни ензими.
<i>Key words</i>	Oxidative stress, cataract, lipid peroxidation, antioxidant enzymes.

УВОД.....	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	1
2.1. Морфологија очног сочива.....	1
2.2. Биохемија очног сочива.....	2
2.3. Енергетски метаболизам сочива.....	4
2.4. Очна водица (Aqueous humour).....	4
2.5. Кисеоник као извор слободних радикала.....	5
2.6. Реактивне кисеоничке врсте.....	6
2.6.1. Синглет кисеоник ( $^1\text{O}_2$ ).....	6
2.6.2. Супероксид анјон радикал ( $\text{O}_2^- \bullet$ ).....	6
2.6.3. Водоник-пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).....	7
2.6.4. Хидроксил радикал ( $\text{HO} \bullet$ ).....	8
2.7. Ксантин оксидаза као извор реактивних кисеоничких радикала.....	9
2.8. Леукоцити као извор слободних радикала у организму.....	10
2.9. Утицај реактивних радикала кисеоника на биомолекуле.....	11
2.9.1. Промене у сочиву изазване утицајем реактивних кисеоничких радикала.....	11
2.9.1.1. Оксидациона модификација протеина сочива.....	12
2.9.2. Оксидациона модификација липида (липидна пероксидација).....	15
2.9.2.1. Утицај липидне пероксидације на појаву и развој катаракте.....	17
2.10. Фотооксидациони стрес.....	18
2.10.1. Промене биомолекула сочива настале у фотооксидационом стресу.....	20
2.11. Одбрана ћелија од утицаја реактивних кисеоничких радикала.....	23
2.12. Ензими значајни у антиоксидационој заштити.....	24
2.12.1 Супероксид дисмутаза (СОД).....	24
2.12.2. Каталаза.....	25
2.12.3. Глутатион пероксидаза.....	26
2.12.4. Глутатион-С-трансфераза.....	27
2.12.5. Глутатион редуктаза.....	28
2.13. Неензимска антиоксидациона одбрана организма.....	28
2.13.1. Глутатион.....	29
2.13.2. Л-Аскорбинска киселина (витамин Ц).....	30
2.14. Промене у сочиву изазване процесом старења.....	33
2.15. Сенилна катаракта.....	34
2.15.1. Типови катаракти.....	34
2.15.1.1. Кортикална катаракта.....	34
2.15.1.2. Нуклеарна катаракта.....	35
2.15.1.3. Задња субкапсуларна катаракта.....	35
2.15.1.4. Предња субкапсуларна катаракта.....	36
2.16. Биохемијске промене у сочиву током развоја катаракте.....	36
3. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	38
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА.....	39
4.1. Испитивани болесници.....	39
4.2. Биохемијске анализе испитиваног материјала.....	39
4.2.1. Припрема хомогената сочива за анализе.....	39
4.2.2. Одређивање концентрације протеина сочива и очне водице.....	40
4.2.3. Одређивање производа липидне пероксидације.....	40
4.2.3.1. Одређивање концентрације коњугованих диена.....	40
4.2.3.2. Одређивање концентрације липидних хидропероксида.....	40
4.2.3.3. Одређивање концентрације малондиалдехида (МДА).....	41
4.2.3.4. Процент $\text{Fe}^{+2}$ -индукованог малондиалдехида узорка.....	41

4.2.3.5. Одређивање флуоресцентних продуката липидне пероксидације .....	41
4.2.4. Одређивање активности прооксидационог ензима - ксантин оксидазе .....	42
4.2.5. Одређивање неензимских и ензимских антиоксиданаса .....	42
4.2.5.1. Одређивање концентрације аскорбинске киселине .....	42
4.2.5.2. Одређивање концентрације укупних непротеинских тиол једињења .....	43
4.2.5.3. Одређивање концентрације протеинских тиол група .....	43
4.2.5.4. Одређивање каталитичке активности супероксид дизмутазе .....	44
4.2.5.5. Одређивање каталитичке активности глутатион пероксидазе .....	44
4.2.5.6. Одређивање каталитичке активности каталазе .....	45
4.2.5.7. Одређивање каталитичке активности глутатион редуктазе .....	45
4.2.5.8. Одређивање каталитичке активности глутатион С – трансферазе .....	46
4.2.5.9. Одређивање фери-редуктивне способности плазме - The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) .....	46
4.3. Статистичка обрада података .....	46
5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА .....	47
5.1. Учесталост других обољења код пацијената са сенилном катарактом .....	47
5.2. Резултати биохемијских испитивања плазме пацијената оболелих од сенилне катаракте .....	49
5.2.1. Продукти липидне пероксидације у плазми пацијената са сенилном катарактом .....	50
5.2.2. Активности прооксидационог ензима, ксантин оксидазе, у плазми пацијената оболелих од сенилне катаракте .....	52
5.2.3. Неензимски чиниоци антиоксидационе заштите у плазми пацијента оболелих од сенилне катаракте .....	53
5.2.3.1. Концентрација непротеинских и протеинских тиола у плазми пацијената са сенилном катарактом .....	53
5.2.3.2. Концентрације витамина Ц у плазми пацијената са катарактом .....	55
5.2.4. Ензимски чиниоци антиоксидационе заштите у плазми пацијента оболелих од сенилне катаракте .....	57
5.3. Резултати биохемијских испитивања плазме пацијената са почетном сенилном катарактом .....	59
5.3.1. Продукти липидне пероксидације у плазми пацијената са почетном сенилном катарактом .....	59
5.3.2. Неензимски чиниоци антиоксидационе заштите у плазми пацијента са почетном сенилном катарактом .....	61
5.3.2.1. Концентрација витамина Ц у плазми пацијената са почетном сенилном катарактом .....	61
5.3.3. Ензимски чиниоци антиоксидационе заштите у плазми пацијената са почетном сенилном катарактом .....	63
5.4. Резултати биохемијских испитивања плазме пацијената са матурном катарактом .....	64
5.4.1. Продукти липидне пероксидације у плазми пацијента са матурном сенилном катарактом .....	64
5.4.2. Неензимски чиниоци антиоксидационе заштите у плазми пацијената са матурном сенилном катарактом .....	66
5.4.2.1. Концентрације витамина Ц у плазми пацијената са матурном сенилном катарактом .....	67
5.4.3. Ензимски чиниоци антиоксидационе заштите у плазми пацијената са матурном сенилном катарактом .....	70

5.5. Резултати биохемијских испитивања кортиконуклеарних блокова сочива болесника са сенилном катарактом .....	71
5.5.1. Продукти пероксидације липида у кортиконуклеарним блоковима катарактних сочива.....	72
5.5.2. Нензимски чиниоци антиоксидационе заштите у сочивима пацијената са сенилном катарактом .....	73
5.5.2.1. Концентрација витамина Ц у сочивима пацијента са сенилном катарактом .....	76
5.5.3. Ензимски чиниоци антиоксидационе заштите у сочивима пацијента са сенилном катарактом.....	78
5.6. Резултати биохемијских испитивања сочива са дијагнозом почетне сенилне катаракте.....	80
5.6.1. Продукти пероксидације липида у сочивима са почетном сенилном катарактом.....	80
5.6.2. Неензимски чиниоци антиоксидационе заштите у сочивима пацијената са почетном сенилном катарактом .....	85
5.6.2.1. Концентрација витамина Ц у сочивима пацијента са почетном сенилном катарактом.....	87
5.6.3. Активност антиоксидационих ензима у сочивима пацијената са почетном сенилном катарактом .....	88
5.7. Резултати биохемијских испитивања сочива са дијагнозом матурне сенилне катаракте.....	96
5.7.1. Продукти пероксидације липида у сочивима са матурном сенилном катарактом.....	96
5.7.2. Неензимски чиниоци антиоксидационе заштите у сочивима пацијената са матурном сенилном катарактом.....	99
5.7.2.1. Концентрација витамина Ц у сочивима пацијента са матурном сенилном катарактом.....	101
5.7.3. Активност антиоксидационих ензима у сочивима пацијената са матурном сенилном катарактом .....	102
5.8. Резултати биохемијског испитивања очне воде пацијената са сенилном катарактом.....	104
5.8.1. Продукти пероксидације липида у очној водици пацијента са сенилном катарактом.....	104
5.8.2. Неензимски чиниоци и ензими антиоксидационе заштите у очној водици пацијента са сенилном катарактом .....	104
5.9. Корелационе анализе између концентрација продуката липидне пероксидације и параметара антиоксидационе заштите у сочивима и плазми пацијената са сенилном катарактом .....	106
5.10. Регресиона анализа.....	109
5.10.1. Резултати регресионе анализе у сочивима са почетном катарактом.....	109
5.10.2. Резултати регресионе анализе у сочивима са матурном катарактом .....	110
5.10.3. Резултати регресионе анализе у плазми пацијената са почетном катарактом.....	112
5.10.4. Резултати регресионе анализе у плазми пацијената са матурном катарактом.....	114
6. ДИСКУСИЈА .....	116
6.1. Фактори ризика за појаву сенилне катаракте .....	116
6.2. Продукти липидне пероксидације у плазми пацијената са сенилном катарактом.....	118

6.3. Активност прооксидационг ензима - ксантин оксидазе у плазми пацијената са сенилном катарактом.....	121
6.4. Промене концентрација непротеинских и протеинских тиола у плазми пацијената са сенилном катарактом .....	122
6.5. Промене концентрације витамина Ц у плазми пацијента са сенилном катарактом.....	124
6.6. Укупна антиоксидациона способност плазме пацијената са сенилном катарактом.....	126
6.7. Активност антиоксидационих ензима у плазми пацијената са сенилном катарактом.....	127
6.8. Пацијенти који имају дијабетес мелитус и катаракту.....	130
6.9. Оксидационе промене и антиоксидациони параметри у сочиву и очној водици пацијената са сенилном катарактом.....	132
6.9.1. Продукти липидне пероксидације у сочиву и очној водици пацијената са сенилном катарактом .....	132
6.9.2. Промене концентрација непротеинских и протеинских тиола у сочивима и очној водици пацијената са сенилном катарактом.....	137
6.9.3. Промене концентрације витамина Ц у сочиву пацијента са сенилном катарактом.....	140
6.9.4. Активност антиоксидационих ензима у сочивима и очној водици пацијената са сенилном катарактом .....	143
6.9.5. Укупна антиоксидациона способност сочива и очне водице пацијената са сенилном катарактом .....	147
7. ЗАКЉУЧЦИ.....	149
8. ЛИТЕРАТУРА .....	151

## УВОД

Појава и развој катаракте код човека утичу на опадање видног, радног и животног комфора. Катаракта је очна болест тј болест очног сочива, која се везује углавном за процес старења хуманог организма, па се у домаћој литератури обично користи термин старачка или сенилна катаракта. У англо-саксонској литератури у употреби је термин "age-related" катаракта.

Катаракта је структурна, физичка, биохемијска и оптичка промена у очном сочиву, која мења трансмисију и рефракцију светлосних зрака нарушавајући оштрину и дефинисаност лика на ретини. Најчешће се јавља код старијих особа, код људи старијих од 65 година (45,9%), а практично све особе старије од 70 година имају одређени степен замућења сочива.

Катаракта се може манифестовати и пре 45. године живота, али њена учесталост знатно расте у позним годинама.

Сунчево зрачење, тачније поједини делови сунчевог спектра, временом доводе до промена на органима, који су му најизложенији, очима и кожи. За око су важни фото-оксидациони процеси, тј удружено штетно дејство сунчеве светлости (зрачења) и кисеоника, који доводе до старења, морфолошких и функционалних промена свих структура у оку.

Молекулски кисеоник је неопходан за постојање читавог аеробног света, али је истовремено и токсичан. Међутим, токсичне ефекте на ћелијама аеробних организама кисеоник не испољава у молекулској форми, већ у форми слободних радикала кисеоника. Слободни радикали настају унивалентним трансфером електрона на молекулски кисеоник. Због своје биохемијске природе и ниске енергије активације способни су да реагују са биомолекулима свих ћелијских структура, вршећи при томе њихову хемијску и физиолошку модификацију. У физиолошким условима стварање слободних радикала контролише механизам антиоксидационе заштите.

Међутим, када процес у коме се стварају слободни радикали „измакне“ физиолошкој контроли, било због повећане продукције реактивних кисеоничких метаболита или због смањеног капацитета антиоксидационе заштите, настаје низ ланчаних реакција, са међусобно потенцирајућим ефектом, односно настаје стање оксидационог стреса.

Главни и непосредни узрок за појаву и развој катаракте до данас није познат, али се оксидациона оштећења током процеса старења у савременој литератури, сматрају значајним у њеној етиопатогенези. Бројни литературни подаци указују на значајну улогу слободних кисоничких радикала као медијатора катарактогенезе.

## 2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

### 2.1. Морфологија очног сочива

Очно сочиво (lens cristalina) је аваскуларна, биконвексна структура, која се налази иза дужице, танким нитима (zonula zinni) везано за цилијарне наставке. Оно је део диоптријског апарата ока који пропушта и прелама светлосне зраке, фокусирајући их према макули ретине, тј. има улогу у рефракцији, акомодацији и апсорпцији UV зрака.

Очно сочиво чине три метаболички различите зоне: нуклеус, кортекс и епител, који се налази испод предње капсуле сочива. Ћелије епитела су метаболички најактивније и контролишу транспорт у сочиво, јер су у директном контакту са очном водицом. Епителне ћелије имају велико једро са два нуклеолуса, као и бројне органеле: митохондрије, Голџи апарат, глатки и гранулирани ендоплазматични ретикулум, рибозоме и полизоме, лизозоме и гликогенске грануле (37).

Капсула сочива је веома густа, провидна и еластична мембрана. Епител, смештен испод предњег дела капсуле, чини слој кубоидних, полигоналних ћелија. Герминативна зона епитела је прекекваторијална, док су у централном делу митозе ретке (125). Епителне ћелије се у подручју екватора издужују према напред и назад, ротирају се, добијају хексагонални пресек и постају сочивна влакна (126).

Сочивна влакна се даље мењају, тако што им једро постаје пикнотично и ишчезава заједно са другим органелама (213), а влакна се сустичу испред и иза сочивног нуклеуса, повезују се и формирају предње и задње сочивне сuture. Сочивна влакна се концентрично и хомогено слажу у центру формирајући једро (nucleus) и кору (cortex) сочива.

Да би се формирао један слој или ламела сочива са својим сатурама потребно је просечно око 15 година. Тако сочиво расте приближно 0.2 mm сваке деценије (125).

## 2.2. Биохемија очног сочива

Метаболизам очног сочива, као аваскуларне структуре, зависи од састојака очне воде и њиховог транспорта у сочиво, као и од елиминације продукта сочивног метаболизма у очну водицу. Биохемијски процеси који се дешавају у сочиву су веома значајни за одржавање транспаренције сочива.

Капсула сочива окружује сочиво. Као и друге базалне мембране и она је богата колагеном. Капсула хуманог сочива је пропустљива за воду, јоне и неке протеинске молекуле, мање молекулске масе, величине албумина (Mr 67 kDa) и хемоглобина (Mr 68.5 kDa) (37), док у очну водицу из сочива истиче мања количина  $\gamma$ -кристалина и подјединице  $\alpha$ -кристалина. Из очне воде, кроз капсулу, сочиво добија глукозу, аминокиселине, витамине, хормоне, кисеоник, катјоне и анјоне.

Кретање и концентрацију интрацелуларних јона у сочиву регулишу  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФ-азна и  $\text{Ca}^{++}$ -АТФ-азна пумпа. Слободни јони калцијума се у ћелијама сочива налазе у минималним концентрацијама, због активности трансмембранске пумпе и због секвестрације овог јона у ендоплазматски ретикулум (235).

Амино киселине се транспортују у сочиво везане са јонима  $\text{Na}^+$  и у ћелијама сочива достижу високе концентрације, више него у очној водици.

Садржај протеина у сочиву је велики, они чине 60% његове суве масе (245). Око 90% од тих протеина су кристалини, структурни протеини који су специфични за сочиво. У људском сочиву су присутне три класе кристалина:  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  (225). Њихова висока концентрација и организација у сочиву обезбеђује висок рефрактивни индекс, неопходан за сочивну оптичку функцију. Кристалини имају важну улогу и транспаренцији сочива тј. смањују расипање светлости на најмању меру.

Алфа ( $\alpha$ ) кристалини (600-900 kDa) су сочивни протеини највеће молекулске масе и за разлику од  $\beta/\gamma$  кристалина имају мали садржај тиол група. Бројне тиол групе на површини  $\beta/\gamma$  кристалина, првенствено  $\gamma$ -кристалина, су подложне оксидационим променама и расположиве су за формирање протеинских агрегата помоћу дисулфидних веза (114).

Алфа ( $\alpha$ ) кристалини чине највећу класу протеина у хуманом сочиву. Њихово стварање је контролисано од два гена, па постоје две подкласе:  $\alpha\text{A}$  и  $\alpha\text{B}$  кристалини.



Бета ( $\beta$ ) кристалини у хуманом сочиву постоје као агрегати, а продукцију њихових субјединица контролише 8-10 гена. Молекулска маса им је 20 – 35 kDa (37).

Гама ( $\gamma$ ) кристалини су мономерни, чија свака субјединица има молекулску масу 20 kDa. Ова класа кристалина је веома богата тиол (СХ) групама.

Цитоскелетни протеини у сочиву имају главну улогу у детерминисању облика сочивних влакана, диференцијацији (посебно елонгацији) и организацији протеина и ћелијских органела. До сада су пронађене три класе цитоскелетних протеина у сочиву (виментин, актин и спектрин).

Количина воде у сочиву се смањује с годинама, а иначе половина присутне воде у сочиву је везана, тј. неслободна вода. С годинама живота, у сочиву се повећава количина слободне воде, што је удружено са повећањем замућености сочива.

Пермеабилност сочивне капсуле се мења код катарактозног сочива и у корелацији је са садржајем воде у сочиву.

У води растворљива једињења важна за сочиво су: аскорбат, глутатион и протеини - сочивни кристалини.

У сочиву се налази аскорбат у високој концентрацији, као и у очној водици (1-2 mmol). Претпоставља се, да се транспортује у сочиво у оксидованој форми, као дехидроаскорбат и конвертује се у редуковану форму у сочиву, где има важну функцију, моћног антиоксиданса (82).

Глутатион се налази у високој концентрацији у сочиву (1,43  $\mu\text{g/g}$  тежине), углавном у редукованој форми (GSH). Глутатион, са аскорбатом, у сочиву има следеће улоге:

- одржавање протеинских сулфхидрилних група (тј. редуковани глутатион штити протеинске тиол групе од оксидационих агенаса),
- неутралише слободне радикале и друге реактивне кисеоничке врсте (тј. неопходан је за активност ензима глутатион-пероксидазе),
- укључен је у процес детоксикације хидрофобних, токсичних супстанци (ксенобиотици), кроз активност ензима глутатион С-трансферазе,
- учествује у аминокиселинском транспорту, као  $\gamma$ -глутамил донор, за цистеин или глицин (88).

Глутатион је трипептид  $\gamma$ -глутамил-цистеинил-глицин. Његова синтеза захтева транспорт одговарајућих аминокиселина у сочиво, формирање  $\gamma$ -глутамил-цистеина и додавање глицина. Синтеза глутатиона захтева АТФ и  $\text{Mg}^{+2}$ . Око 12% укупно продукованог АТФ у сочиву користи се за потребе синтезе глутатиона. Мембрана сочива је непропустљива за редуковани глутатион (GSH), али је пропустљива за његову оксидовану форму (GSSG), чија је концентрација у сочиву последично ниска (142).

Редукција  $\text{H}_2\text{O}_2$  до воде глутатионом је катализована глутатион-пероксидазом, а ресинтеза редукованог глутатиона из оксидоване форме је катализована глутатион-редуктазом, при чему је неопходан  $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$ , настао у пентозном путу (142). Глутатион-редуктаза је лимитирајући ензим у глутатион – редокс циклусу.

### 2.3. Енергетски метаболизам сочива

Глукоза је главни извор енергије у сочиву. Она се уноси у сочиво олакшаним транспортом, користећи енергију  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФ-азне пумпе и постиже концентрацију од око 1 mmol/L (144). Стварање АТП-а у сочиву је доминантно анаеробни процес и дешава се у кортикалним сочивним влакнима. Аеробна разградња глукозе кроз циклус трикарбоксилних киселина (Кребсов циклус) има значаја у сочиву, нарочито у површинским влакнима сочива и епителу. Пошто аеробна гликолиза ствара већу количину АТП-а по молекулу глукозе у односу на анаеробну гликолизу, то се једна трећина укупно продуковане енергије у сочиву продукује у епителу у аеробним условима.

Аденозин-три фосфат (АТФ) створен у епителу и суперфицијалном кортексу је енергија важна за функцију јонских пумпи и за митозе у епителу (114). У кортикалним сочивним влакнима енергија је потребна за синтезу кристалина, цитоскелетних протеина, ензима, мембранских протеина и липида, као и за друге активности ћелија нпр. транспортну активност. Метаболичка активност у нуклеусу сочива је на нижем нивоу.

У сочиву се 10-20% глукозе метаболизује пентозо-фосфатним путем, где се глюкозо-6-фосфат преводи у рибулозо-5-фосфат и обезбеђује шећере пентозе за синтезу нуклеинских киселина. Хексозо-монофосфатни шант је главни извор  $\text{CO}_2$  у сочиву и продукује два редукована еквивалента  $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$  по молекулу глукозе. Тако је главни извор  $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$  за синтезу нуклеотида, масних киселина и за одржавање глутатиона у редукованом стању. Амино киселине обезбеђују додатни извор енергије у сочиву.

Своју функцију сочиво остварује захваљујући транспаренцији (провидности) и еластичности. Транспаренција сочива је резултат оптичке хомогености његових елемената и зависи од микроскопске структуре, хемијских конституената сочива и биохемијских процеса. У сочиву је врло мала екстрацелуларна средина, само 1,3% укупне запремине. Висока концентрација протеина (кристалина) и њихова структура, своде расипање светлости на најмању меру. Модификација сочивних протеина доводи до њихове агрегације у макромолекуле, који узрокују јаче расејање светлости, што се дешава код развоја катаракте.

### 2.4. Очна водица (Aqueous humour)

Очно сочиво је аваскуларна структура, чији метаболизам зависи од окружења, првенствено од очне водице. Очну водицу највећим делом ствара епител цилијарних наставка. Сочиво добија из очне водице глукозу, аминокиселине, витамине, хормоне, кисеоник, катјоне и ајоне. Парцијални притисак  $\text{O}_2$  у очној водици је око 60 mmHg, а  $\text{CO}_2$  39 mmHg. Наравно, биохемијски процеси који се дешавају у сочиву, одражавају се и на састав очне водице, тј. она садржи и продукте сочивног метаболизма. Висок садржај лактата (4,5 mmol) у очној водици, потиче из сочива чији је метаболизам примарно анаеробни.

Концентрација глукозе у очној водици је око два пута нижа од концентрације глукозе у плазми (144). Концентрације катјона  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Mg}^+$ , као и ајона  $\text{HCO}_3^-$  и  $\text{Cl}^-$  у очној водици су сличне концентрацијама ових јона у плазми, само је концентрација  $\text{Ca}^{++}$  значајно нижа у очној водици.

Аскорбат се активно секретује у очну водицу, од стране цилијарног епитела и ниво аскорбата је 10-20 пута већи у очној водици, него у плазми (82). Најважнија улога аскорбата је у заштити сочива од оксидационог оштећења. Глутатион се налази у малим концентрацијама у очној водици и око 99% је у редукованом облику (246), а има

заштитну улогу од оштећења водоник пероксидом и другим реактивним кисеоничким врстама. Водоник пероксид је присутан у ниској концентрацији у очној водици, а настаје при оксидацији аскорбинске киселине у присуству молекулског кисеоника (82).

У очној водици се налазе све аминокиселине, као у крви, али је њихова концентрација мања, због утроска од стране сочива. Оне су неопходне за раст сочива током целог живота.

Очна водица садржи још и стероидне хормоне, простагландине и катехолаmine. Концентрација норадреналина расте у очној водици болесника са катарактом. Инсулин, који не утиче на транспорт глукозе у сочиво, је присутан у очној водици, као и инсулину сличан фактор раста. Могуће је да и други присутни фактори раста у очној водици, као  $\beta$ -FGF, који потиче из ретине, регулишу раст сочива током живота. Рецептори за ове факторе раста су нађени у сочиву (125).

Протеини, првенствено албумин, налазе се у очној водици у ниским концентрацијама, неколико десетина пута нижим од концентрација у плазми.

Стакласто тело, као ацелуларно, анаеробно и метаболички инертно, у физиолошким условима мало утиче на метаболизам сочива.

## 2.5. Кисеоник као извор слободних радикала

Захваљујући еволуционом развоју одбрамбених механизма, аеробни организми могу ефикасно да користе кисеоник као крајњи акцептор електрона и да се заштите од његовог штетног утицаја и утицаја реактивних међупроизвода, насталих услед непотпуне редукције кисеоника. Токсичне ефекте на ћелијама аеробних организама кисеоник не испољава у молекулској форми, већ у форми слободних радикала.

Молекулски кисеоник у организму је слабо реактиван због: високе енергије активације, парамагнетичности, триплет основног стања и паралелних спинова његових неспарених електрона. Због тога, кисеоник може да оксидује само оне атоме или молекуле који имају електроне антипаралелних спинова (Паулијев принцип).

Главни метаболички догађај у којем учествује кисеоник у ћелији је процес ткивног дисања у митохондријама. Молекулски кисеоник се у организму сисара редукује до воде, примањем 4 електрона у респираторном ланцу митохондрија.

Слободни кисеонички радикали настају током бројних физиолошких и патолошких процеса, као споредни производи транспорта електрона у митохондријама. Нерадиакли у својим орбиталама имају паран број електрона супротних спинова и ово стање је енергетски најповољније и најстабилније.

Слободни радикали су атоми, јони или молекули са једним или више неспарених електрона у својој структури. Слободни радикали кисеоника настају унивалентним трансфером електрона на молекулски кисеоник. Због присуства неспареног електрона слободни радикали имају магнетна својства и показују изразиту реактивност, способни су да реагују са биомолекулима свих ћелијских структура и изазову њихове хемијске промене. Једном продукован слободни радикал може изазвати низ ланчаних реакција, реагујући са другим мање реактивним врстама.

Слободни радикали кисеоника се у ћелијама формирају у бројним биохемијским реакцијама: у току оксидативне фосфорилације у митохондријама, у процесу фагоцитозе, у реакцијама биотрансформације екзогенних и ендогених супстрата у ендоплазматском ретикулуму, у ензимским реакцијама које катализују оксидазе, у процесу синтезе еикозаноида, у реакцијама оксидоредукције у присуству метала с променљивом валенцом. Поред ових ендогених реакција значајни извори слободних радикала су реакције при апсорпцији зрачења (радијације), као и процес липидне

пероксидације кога покрећу примарни кисеонички радикали, али се у току његовог одвијања стварају секундарни слободни радикали.

Митохондрије су главно место стварања слободних радикала кисеоника у ћелији. Преко 90% кисеоника који дође циркулацијом до ћелија сисара, редукује се до воде, а енергија ослобођена у току транспорта електрона се користи за синтезу АТП-а. Током овог процеса, који се дешава у секвенци ткивног дисања, кисеоник се примањем једног електрона преводи у супероксид анјон радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), примањем два електрона у водоник-пероксид ( $H_2O_2$ ), три електрона у хидроксил радикал ( $HO\cdot$ ) и четири у воду ( $H_2O$ ) (41). Кисеоник је у току тог процеса чврсто везан за ензимски комплекс цитохром ц оксидазе, тако да не долази до отпуштања делимично редукованих форми кисеоника. Међутим, веза на преносницима електрона, који су у респираторном ланцу испред цитохром ц оксидазе, првенствено на нивоу NADH-коензим-Q редуктазе и редукованих форми коензима-Q није тако чврста, па неки од транспортованих електрона могу да „побегну“ из система на молекулски кисеоник, продукујући супероксид анјон радикал. Висока концентрација ензима манган-супероксид дисмутазе у матриксу митохондрија обезбеђује да се физиолошка количина створеног супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) неутрализује пре него што проузрокује оштећење ћелије.

У ћелијама сисара слободни радикали имају велику разорну моћ, али су укључени и у физиолошке процесе у организму. Они су део одбрамбеног арсенала фагоцитних ћелија (полиморфонуклеара, макрофага, моноцита) и део каскадних догађаја у антимикуробној активности фагоцита. Слободни радикали могу бити и регулаторни молекули у биохемијским процесима. Лимфоцити и фибробласти нпр. стварају мале количине супероксид анјона, који је регулатор раста (112). Слободни радикали учествују у инхибицији или индукцији различитих сигналних путева (деловање на протеинске киназе, фосфатазе, протеазе, факторе транскрипције), утичу на експресију појединих гена (55), индукцију или инхибицију пролиферације ћелија.

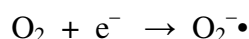
## 2.6. Реактивне кисеоничке врсте

### 2.6.1. Синглет кисеоник ( $^1O_2$ )

Синглет кисеоник ( $^1O_2$ ) је форма молекулског кисеоника у којој су електрони у задњој хибридизованој орбитали ексцитирани. Ово је активирани облик кисеоника који настаје током фотохемијских и термичких реакција.

### 2.6.2. Супероксид анјон радикал ( $O_2^{\cdot-}$ )

Непотпуном, једноелектронском редукцијом молекулског кисеоника у присуству донора електрона ( $e^-$ ) настаје супероксид анјон радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ):

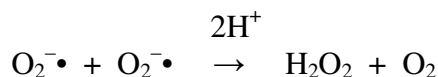


а његовим протонизовањем настаје хидропероксил радикал ( $HO_2\cdot$ ):



Супероксид анјон радикал представља слабу киселину и има способност да у воденој средини реагује са великим бројем биолошких супстрата, испољавајући при томе оксидациона или редукциона својства. Међутим, при физиолошким вредностима

pH дешава се спонтана дизмутација два супероксид радикала у водоник пероксид, па му је тиме реактивност према другим молекулима изузетно смањена:



Ова реакција се може одвијати спонтано или уз каталитичко дејство супероксид дизмутазе (СОД). Спонтано тече веома брзо у киселој средини (pH 4.8), док се у неутралној или алкалној средини одвија споро, те се *in vivo* углавном уклања ензимски.

Међутим, доказано је да  $\text{O}_2^{\cdot-}$  у воденој средини може да редукује феричитохром ц, хиноне, а у присуству метала са променљивом валенцом преводи се у хидроксил радикал ( $\text{HO}\cdot$ ), који има јака оксидациона својства (78).

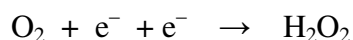
Супероксид анјон радикал може деловати као оксидишући агенс са супстанцама које могу дати водоников јон, као што су аскорбинска киселина,  $\alpha$ -токоферол, катехоламини, хемопротеиди и тиоли. Супероксид анјон радикал ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) се при томе протонује и настаје хидропероксидни радикал ( $\text{HO}_2\cdot$ ) или молекулски кисеоник. Синтетисан унутар ћелијске мембране,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  је веома токсичан, јер је нуклеофилни редукујући агенс и делује на карбонилне групе естарских веза између масних киселина и глицерола оштећујући фосфолипиде мембране.

Супероксид анјон радикал може настати у аеробним ћелијама током оксидо/редукционих реакција у митохондријама, у фагоцитима током респираторног праска, оксидацијом неких молекула и као резултат фотохемијских реакција (203).

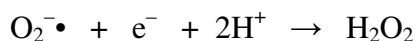
Адицијом још једног електрона на супероксид анјон радикал настаје пероксидни анјон, који нема неспарених електрона и није радикал. Сва количина пероксидног анјона настала у физиолошким условима бива протонизирана и настаје водоник пероксид.

### 2.6.3. Водоник-пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

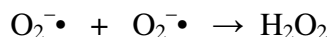
Водоник-пероксид је најстабилнији и најмање реактиван интермедијер редукације кисеоника. Настаје директно двоелектронском редукацијом молекулског кисеоника:



или једноелектронском редукацијом супероксид анјон радикала:



или дизмутацијом супероксид анјон радикала:



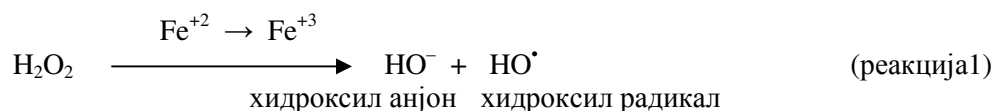
Стварање водоник пероксида се дешава у пероксизомима, митохондријама, микрозомима и ћелијским мембранама. Ове органеле поседују ензиме који врше деградацију  $\text{H}_2\text{O}_2$ , каталазу и глутатион-пероксидазу. Највећа количина водоник-пероксида се ствара у пероксизомима, у којима активност каталазе штити овај део ћелије од оксидационог оштећења.

Водоник пероксид не поседује неспарени електрон, па није у правом смислу слободни радикал, али испољава токсичне ефекте. Веома лако дифундује кроз ћелијску

мембрану и може ефекте испољити у другим ткивима удаљеним од места његовог стварања. Директне токсичне ефекте испољава на биомолекулима, када му је концентрација четири пута већа од концентрације присутне у *in vivo* условима. Претпоставља се да токсичност  $\text{H}_2\text{O}_2$  није последица директног дејства на биомолекуле, већ могућност да реагује са супероксид анјон радикалом (Haber-Weiss реакција) (140) у присуству метала (Фентонова реакција), у првом реду гвожђа или бабра, уз стварање високореактивног хидроксилног радикала (78). Ове реакције *in vivo* превенирају каталаза и пероксидаза, које разлажу водоник-пероксид, али и супероксид дисмутаза која онемогућава Haber-Weiss-ову реакцију (149).

#### 2.6.4. Хидроксил радикал ( $\text{HO}^\bullet$ )

Хидроксил радикал је хемијски најреактивнији кисеонички радикал и најодговорнији за цитотоксичне ефекте кисеоника. Настаје раскидањем  $\text{O}-\text{O}$  везе у молекулу водоник пероксида, под утицајем топлоте или зрачења. Да у условима ниске температуре и без дејства јонизације, формирање  $\text{HO}^\bullet$  из водоник-пероксида катализују соли двовалентног гвожђа, запазио је још 1894. године Фентон, а реакција је позната као Фентонова реакција (реакција 1):



Доказано је да и други катјони метала са променљивом валенцом, пре свега купро соли ( $\text{Cu}^+$ ) стварају хидроксил радикал у реакцији Фентоновог типа.

У Фентоновој реакцији, у присуству метала са променљивом валенцом,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  најпре реагује са оксидованом формом метала, који се редукује (уз ослобађање кисеоника) (реакција 2):



Редуковани метал, затим реагује са водоник-пероксидом и продукује се хидроксил радикал ( $\text{HO}^\bullet$ ) (реакција 1).

Сума реакција 1 и 2, специфична за живе ћелије је позната као Haber-Weiss реакција (78) у којој водоник-пероксид, иако није прави радикал, у реакцији са супероксид анјоном даје веома токсичан хидроксил радикал (реакција 3):



Метали са променљивом валенцом, нарочито гвожђе и бакар имају важну улогу у формирању хидроксил радикала у организму. За Фентонову и Haber-Weiss-ову реакцију највећи део гвожђа у организму је недоступан, јер је везан са различитим протеинима (хемоглобин, миоглобин, металоензими), или је у транспортним протеинима (трансферин, лактоферин) или је у складишним протеинима (феритин, хемосидерин) из којих се ослобађа само под контролисаним условима. У процесу прерасподеле гвожђа у ћелији, долази до његовог издвајања из феритина (као облика резервног гвожђа), што је критичан тренутак за његово укључивање у Фентон реакцију.

Хидроксил радикал се у ћелијама ствара увек када постоје услови за реакције Haber-Weiss и Фентон, у процесу фагоцитозе, као и у току неких ензимских реакција,

ксантин-оксидазе, NADPH-оксидазе и фотохемијских реакција. Хидроксил радикал је снажно оксидујуће средство, има изузетно кратак полуживот ( $10^{-9}$  s) и може одмах да реагује са сваком врстом молекула присутном у ћелији: угљеним хидратима, аминокиселинама, фосфолипидима, пуринским и пиримидинским базама и органским киселинама. При томе су могућа три типа реакције:

- одузимање водоника (реакције дехидрогенације) - хидроксил радикал може одузети водоников атом многим биомолекулима, па тако оксидишући полинезасићене масне киселине у биомембранама иницира процес липидне пероксидације, који се даље може пропагирати секундарно створеним радикалима,
- адиција (може се адирати на молекуле ароматичне структуре (нпр. пуринске и пиримидинске базе ДНК) и
- трансфер електрона.

Учешћем у овим реакцијама  $\text{HO}\cdot$  омогућује пропацију слободно радикалског процеса у организму.

Због кратког полуживота и високе реактивности,  $\text{HO}\cdot$ , директне штетне ефекте остварује само у непосредној околини места настанка, али  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{O}_2\cdot^-$  веома лако дифундују са места настанка, па се  $\text{HO}\cdot$  може створити, у присуству метала са променљивом валенцом, било где у ћелији или ван ње.

## 2.7. Ксантин оксидаза као извор реактивних кисеоничких радикала

У току каталитичке оксидације одређених супстрата, у присуству молекулског кисеоника, бројне оксидазе (ксантин оксидаза, моноаминооксидаза, диаминооксидаза, полиамин оксидаза, алдехид оксидаза и друге) продукују слободне радикале. Ксантин оксидаза је први ензим из ове групе утврђен као извор супероксид анјон радикала, који у присуству супстрата ксантина или хипоксантина може продуковати водоник пероксид и хидроксил радикал.

Ксантин оксидаза (ксантин : кисеоник – оксидоредуктаза ЕС 1.2.3.2) (ХО) је ензим широко распрострањен у живом свету. Учествује у оксидацији ендогених (пурини) и екзогених (етанол) супстрата (19). Код човека ксантин оксидаза контролише брзину деградације пуринских база.

Ксантин оксидаза је флавопротеин ензим, који садржи нехемски везано гвожђе и молибден (191). У физиолошким условима ксантин – катаболишући ензим постоји као ксантин дехидрегеназа, која користи оксидовани NAD ( $\text{NAD}^+$ ) (а не кисеоник) као акцептор електрона, при чему настаје NADH (а не супероксид анјон радикал) у току превођења хипоксантина и ксантина у мокраћну киселину (19). Међутим, под одређеним условима овај се ензим може трансформисати у кисеоник-зависну оксидазу (ХОD-O) у којој је електронски акцептор молекулски кисеоник, што доводи до стварања реактивних кисеоничких радикала. Биолошки услови који могу довести до превођења дехидрогеназне форме ксантин оксидазе у оксидазну форму су деловање протеолитичких ензима, сулфхидрилних реагенаса, интоксикације етанолом, као и услови смањеног дотока кисеоника у ткива (хипоксија, исхемија) (176).

Ксантин оксидаза и ксантин дехидрегеназа су у ствари две форме једног истог генског продукта. Ензим је широко распрострањен у живом свету, а молекулска маса ензима из различитих извора је око 300 kDa. Ензим је изграђен из две идентичне и каталитички независне субјединице. Свака субјединица садржи један молибденски центар, два гвожђе/сумпор центра и флавин аденин динуклеотид (ФАД). У условима *in vivo* ксантин оксидаза се налази у цитоплазми ендотелних ћелија капилара јетре, танког

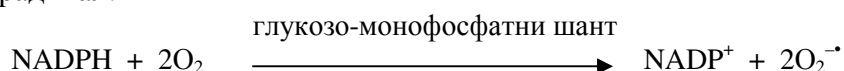
и дебелог црева, плућа, бубрега, хороидног плексуса, као и у цитоплазми ентероцита, хепатоцита, тубулоцита бубрега (164).

У условима *in vitro* додавањем супстрата ксантин оксидази ензим ствара супероксид анјон радикал и водоник пероксид, али се сматра да може настати и много агресивнији  $\text{HO}^\bullet$  радикал (48).

Слободно радикалска токсичност ксантин оксидазе није ограничена унутар ћелија, посебно у условима исхемије. Односно у току исхемије, слично другим интраћелијским ензимима, ксантин оксидаза се због повећане пропустљивости ћелијских мембрана може ослободити у циркулацију. Ова циркулишућа ксантин оксидаза продукујући слободне радикале може изазвати оштећење васкуларног ендотела, активирати инфламаторне ћелије које такође продукују слободне радикале, при чему се оксидационо оштећење шири од места порекла. Ксантин оксидаза и ксантин дехидрогеназа имају релативно дуг полуживот у циркулацији, па је и то потенцирајући фактор њихове токсичности.

## 2.8. Леукоцити као извор слободних радикала у организму

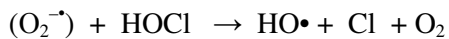
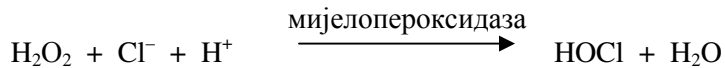
Важан део одбрамбеног система организма од деловања микроорганизама и других страних честица су полиморфонуклеарни леукоцити, циркулишући моноцити и ткивне макрофаге, чије је правилно функционисање важно какао за примарни, тако и за секундарни имуни одговор. У току одбрамбене реакције – фагоцитозе дешавају се карактеристичне промене метаболизма глукозе, кисеоника и липида, што чини респираторни прасак или „respiratory burst” (238). Том приликом потрошња кисеоника се повећава од 2 до 20 пута и удружена је са одговарајућим протоком глукозе кроз хексозомонофосфатни шант, што зависи од врсте ћелије и природе стимуланса. Повећана потрошња кисеоника у неутрофилима и макрофагима током процеса фагоцитозе постиже се активацијом ензимског комплекса NADPH оксидазе удружене са плазма мембраном. Активисани комплекс NADPH оксидазе оксидује цитосолни супстрат NADPH у присуству кисеоника, који се унивалентно редукује у супероксид анјон радикал:



У физиолошким условима највећи део створених радикала требало би да буде у форми супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ). Међутим током самог процеса ствара се и велика количина  $\text{H}^+$  јона (31) који доводе до пада рН средине, чиме се стварају повољни услови за стварање много реактивнијег перхидроксил радикала ( $\text{HO}_2^{\bullet}$ ). Супероксид анјон радикал створен у оксидазној реакцији брзо подлеже процесу спонтане дизмутације (231) при чему се као крајњи производ јавља водоник пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Продукција супероксид анјон радикала одвија се у два типа интраћелијских органела: у уским гранулама штапићастиг облика и сферичним или елиптичним гранулама које се директно стапају са плазма мембраном, што упућује на то, да се супероксид анјон радикал ослобађа из стимулираних неутрофила процесом егзоцитозе.

Секундарни (специфични) лизозоми неутрофилних леукоцита садрже знатне количине посебног облика пероксидазе – мијелопероксидазу (24). У присуству халогених елемената (хлор, бром и јод) ензим мијелопероксидаза катализује реакцију њихове оксидације водоник пероксидом, при чему настаје хипохалогена киселина. У условима *in vivo* у неутрофилима има највише хлора, тако да дејством мијелопероксидазе из лизозома на  $\text{H}_2\text{O}_2$ , створеног у NADPH оксидазној реакцији, долази до стварања хипохлорне киселине ( $\text{HOCl}$ ):





Хипохлорна киселина је снажан оксиданс и реагује са великим бројем биолошки реактивних молекула (оксидује аминокиселине и аminer, тиоле, тиоестре, ароматичне и друге незасићене угљоводонике) (219), а може и да уништава бактерије.

## 2.9. Утицај реактивних радикала кисеоника на биомолекуле

У аеробним организмима, реактивни радикали кисеоника у условима било њихове хиперпродукције, било неадекватне елиминације врше оксидациони напад на биомолекуле: незасићене масне киселине ћелијских мембрана, нуклеинске киселине, угљене хидрате, липопротеиде и друге молекуле, доводећи до промене редокс система у ћелији и промене флуидности ћелијске мембране. Када се наруши осетљива равнотежа између продукције реактивних оксидационих радикала (њихова повећана продукција) и система заштите од оксидационих оштећења (смањен капацитет антиоксидационе заштите) настаје стање оксидационог оштећења (оксидационог напада или стреса). Од прооксидационо-антиоксидационе равнотеже у организму зависи његово физиолошко стање и виталност. Постепеним старењем, деловањем прооксиданаса или неодговарајућим начином живота, ова равнотежа се све теже одржава; систем антиоксидационе заштите је све мање ефикасан, а интензивнија продукција реактивних кисеоничких врста изазива све обимнија оштећења организма.

Реактивне кисеоничке врсте, без обзира на место свог настанка, испољавају изузетну реактивност, због неспареног електрона у последњој орбитали. Практично су сви биомолекули осетљиви на агресију слободних радикала кисеоника. Након започињања (иницијације) процеса ствара се секундарни радикал, који затим реагује са другим интактним молекулима, преводeћи их у радикале и тако се пропагира ланчана радикалска реакција.

Последњих година је велики број патолошких стања доведен у везу са стварањем и деловањем слободних радикала кисеоника. Данас се и сам процес старења организма објашњава променама насталим деловањем реактивних кисеоничких врста на биомолекуле.

Последице оксидационог стреса су пероксидација липида ћелијске мембране, инактивација ензима изазвана оксидацијом сулфхидрилних група, стварање агрегата протеина, деполимеризација полисахарида, промене на нуклеинским киселинама и друго.

### 2.9.1. Промене у сочиву изазване утицајем реактивних кисеоничких радикала

Оксидациони стрес је поремећај који се може пронаћи у бројним обољењима хуманог организма, али катаракта је једно од најчешћих обољења, где је оксидациона модификација протеина један од главних метаболичких супстрата патолошког поремећаја. Бројна испитивања су потврдила да је интензивна оксидација протеина и липида сочива, удружена са хуманом катарактом старијих особа - age related катаракта. Експериментално је показано на култури органа, да катаракту може узроковати фотохемијски изазвана продукција супероксид радикала, хидроксил радикала и  $\text{H}_2\text{O}_2$  (203).

### 2.9.1.1. Оксидациона модификација протеина сочива

Оксидациона модификација протеина је неминован процес који и у физиолошким условима диктира дужину живота протеина. Да ли је то уствари и кључ старења организма? Многе научне студије су показале да јесте. Место слободних радикала у процесу старења је веома важно, о чему сведочи хипотеза старења која је постављена још 1956. године, по којој је разлог старења ефекат слободних радикала на биомолекуле организма (97,244).

Упоређивањем дужине живота различитих животињских врста (почев од инсеката па до сисара) продукција слободних радикала линеарно расте са старошћу организма (121).

Оксидациона модификација протеина подразумева њихову ковалентну модификацију, изазвану или индуковану реактивним интермедијерима слободних радикала или њиховим крајњим продуктима. Протеини су подложни оксидационој модификацији због садржаја различитих аминокиселина. Аминокиселине су веома осетљиве на оксидационо оштећење, а цистеин, цистин, хистидин, метионин, триптофан и тирозин су најосетљивији. Реактивни радикали кисеоника модификују структуру протеина кроз неколико механизма:

- металом катализована оксидација протеина са увођењем карбонилних група у молекулу,
- формирање интер- и интрамолекулских веза са протеинима и
- реакција алдехидних продуката липидне пероксидације са тиол групама аминокиселина.

Квантитативно гледано, протеини су главне компоненте сочива и чине 60% његове укупне суве масе. Процес оксидационе модификације протеина сочива се одражава на њихову функцију и као последице настају: смањење или губитак ензимске активности и агрегација протеина сочива (232). Од година зависно (age-related) повећање сочивне флуоресценције и протеинских агрегата велике молекулске масе и фракције сочивних протеина, који су у води нерастворљиви, указује да флуоресцентне компоненте могу бити укључене у стварање ковалентних веза и последичну нерастворљивост протеина сочива, током старења сочива, као и током развоја од година зависне (age-related) катаракте.

Оксидациона модификација протеина сочива може бити изазвана продукцијом радикала од стране разних агенаса и система, као што су хемијски агенси ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), гама радијација у присуству кисеоника, липидни пероксиди (МДА), митохондрије (електрон транспортни систем), ензими оксидоредуктазе (ксантин оксидаза, мијелопероксидаза), аминокиселине реакције и друго (204).

У току оксидационе модификације протеини мењају примарну структуру као последицу модификације појединих аминокиселина или комплетног губитка неке аминокиселине. Последица ових промена је и губитак секундарне и терцијарне структуре, праћен агрегацијом или фрагментацијом протеина. Промене физичко-хемијских својстава протеина доводе до промене њихове растворљивости, промене наелектрисања, смањења стабилности, промене вискозности и промене флуоресценције. Различите аминокиселине различито реагују на оксидациону модификацију (232).

Протеини сочива се формирају током ембрионалног живота, па су, може се рећи, протеини нуклеуса сочива старији од саме особе и током времена подлежу одређеним модификацијама. Бројни аутори су описали посттранслациону модификацију протеина сочива насталу током старења сочива (232) и током развоја "age-related" катаракте (32, 56,223,229). Висок ниво модификованих протеина код узнапредовале катаракте у

поређењу са нормалним сочивом, говори у прилог да су ове промене укључене у развој катаракте (36,145,224). Посттранслациона модификација протеина сочива подразумева две врсте промена протеина: промена молекулске тежине или адиција молекула на полипептидне ланце.

Неки аутори су доказали бројна места „цепања“ кристалина и других сочивних протеина (127,196) током старења сочива.

Изомеризација дугоживећих протеина у центру сочива може довести до њихове денатурације, при чему су резидуе неких аминокиселина (нпр. аспартата) веома осетљиве на ове промене (222).

Деаминација глутаминских и аспарагинских резидуа у протеинима сочива резултира променом наелектрисања и може довести до измена у протеин-протеин интеракцијама (128).

Оксидацијом метионина у протеинима сочива конвертују се хидрофобне у поларне групе. Гликозилација или карбамилација слободних аминокиселина лизина узрокује губитак позитивног наелектрисања и формирање мешовитих дисулфида. Фотооксидација триптофана у протеинима сочива доводи до стварања Н-формил кинуренина. Пошто и сами слободни радикали кисеоника и водоник пероксид могу да оксидишу триптофан до Н-формил кинуренина, као и сулфхидрилне групе ензима у дисулфидне, на тај начин убрзавају оксидацију сочивних кристалина.

Адитивна модификација протеина сочива подразумева ковалентно везивање, молекула мале молекулске масе, са нуклеофилним резидуама полипептида, као што су лизин, хистидин, аргинин или цистеин. Сматра се да је адитивна посттранслациона модификација протеина сочива одговорна за обојеност полипептида изолованих из катарактних сочива. Адитивна модификација протеина сочива доводи до промена у хемијском понашању аминокиселинских резидуа, што доводи до појаве нових неамино киселинских функција у протеинима, па оне појединачно могу различито реаговати, нпр путем полимеризације (222).

Ацетилација и карбамилација у протеинима катарактних сочива су потврђене, али су такве промене веома мале, међутим метилација цистеинских резидуа је веома изражена, нарочито у гама кристалинима. Извор метил групе која је укључена у ове промене за сада није познат (129).

Деривати оксидационе модификације протеина сочива су и комплекси са производима липидне пероксидације (МДА) или производи настали гликацијом протеина што је нарочито заступљено у дијабетес мелитусу (33). Гликооксидација дугоживећих протеина очног сочива може допринети развоју катаракте (166).

Гликооксидација је процес неензимског везивања редукујућег шећера (алдоза и кетоза) и слободних аминокиселина протеина (165). Описана је давне 1912. године као феномен да храна стајањем добија браон боју. Производи настали гликацијом протеина се акумулирају у ткивима током старења (21,35,165), а бројна испитивања показују удруженост процеса гликације протеина са патолошким стањима која прате и компликују дијабетес мелитус, као што су васкуларне промене, катаракта, дијабетичка ретинопатија и друго.

Једна од најважнијих „мета“ за гликооксидацију протеина, тзв. Maillard-ову реакцију, су дугоживећи протеини, какви су протеини сочива. Хумано сочиво је једно од првих ткива у коме је испитивана улога Maillard-ове реакције и акумулација производа поменуте реакције у старењу протеина. Симултано деловање глукозе и слободних радикала у оксидационој модификацији протеина има две фазе: рану – реверзибилну и касну – иреверзибилну. Прва је реакција стварања ковалентне везе између  $\epsilon$ -амино групе лизина и алдехидне групе глукозе када настаје Шифова база. Ова фаза је нестабилна и може доћи до реаранжирања унутар молекула тзв. Amadori

реакција. Иницијални производи протеинске гликације (тзв. Amadori производи) су детектовани, као и њихово нагомилавање у старијим и катарактним сочивима. Претпоставља се да гликација протеина може бити одговорна за агрегацију, ковалентно повезивање протеина и пигментацију (166) у катарактном сочиву.

У следећој фази гликације протеина долази до стварања стабилног фруктозолизин продукта. Његова концентрација је директно зависна од присутне концентрације глукозе. Услов за каснију фазу је постојање кетоамин деривата или његових дисоцијационих производа (који настају услед деловања слободних радикала), а то су: КМЛ (карбоксиметиллизин), пентозидин и пиралин, који се зову Milard-ови производи (Maillard products) и интензивно флуоресцирају. Пентозидин представља продукт оксидационе модификације у којој је дошло до интрамолекуларне интеракције између аргинина и лизина, а пиралин формира везе са цистеином. Пентозидин се нарочито акумулира у дугоживећим протеинима, линеарно са старошћу, а његова количина значајно расте код дијабетеса мелитуса. Даље, интеракције протеина и поменутих продуката (реакције дехидрације и кондензације) су ланчане и одвијају се у присуству слободних радикала. Настају унапредовали производи гликооксидације, који и сами постају генератори слободних радикала. Да је присуство слободних радикала услов за стварање поменутих интермедијера, доказано је у *in vitro* условима (20).

Редукујући шећери у хуманом сочиву (глукоза, пентозе (рибоза), тетрозе, триозе и кетозе) (68) могу реаговати са модификованим аминок групама протеина (најчешће лизин и аргинин), стварајући пентозидин и друге жуте и браон, флуоресцентне продукте у поменутој Milard-овој реакцији, што доводи до неензимског тамњења сочива.

Око 2% сочивних кристалина је гликозилисано у катарактном сочиву недијабетичара и око 3% у сочиву дијабетичара.

Dauger и сарадници (68) су описали акумулацију пентосидина у хуманом сочиву, везано за процес старења организма. Значајно је повећање пентосидина код сочива са брунесцентном катарактом у поређењу са нормалним сочивом (167). Запажено је да је повећање количине пентосидина у катарактном сочиву углавном последица промене  $\alpha$ -кристалина, а много мање  $\beta$ -кристалина. Lyons и сарадници (144) су описали значајно повећање нивоа пентосидина код дијабетичког катарактног сочива.

Полиолски пут разградње глукозе у хуманом сочиву представља адаптиван механизам уклањања прекомерних количина глукозе код дијабетеса мелитуса, конверзијом глукозе у полихидроксилне алкоhole од којих је најзначајнији сорбитол (129). Концентрација сорбитола у дијабетес мелитусу је посебно повећана у очном сочиву. У реакцији превођења глукозе у сорбитол учествује алдозо-редуктаза, чији је коензим  $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$ . На тај начин смањење концентрације  $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$  успорава регенерацију редукованог глутатиона (глутатион-редуктаза захтева исти коензим) и стварају се услови за оксидациона оштећења (124).

Аскорбат, који се у сочиву налази у већој концентрацији од глукозе, може такође у условима хроничног оксидационог стреса (као што је дијабетес мелитус, изложеност UV радијацији, старење) реаговати са протеинима, образујући продукте са спектрофотометријским и флуоресцентним карактеристикама (46). Оксидациони производи аскорбата: дехидроаскорбинска киселина (ДХА), 2,3-дикетоглукоонска киселина (ДКГ), L-ксилосон (L-xylulose) и L-треоза (L-threose) (200) могу бити укључени у процес гликације протеина (132). Низак ниво кисеоника у хуманом сочиву (око 20  $\mu\text{mol}$ ) подстиче редукацију ДХА у аскорбинску киселину, што захтева присуство редукованог глутатиона.

Главне последице оксидационих промена сочивних протеина су одвајање протеинских ланаца кристалина и ризично представљање реактивних протеинских

тиола оксидацији, као и формирање дисулфидних веза и агрегата велике молекулске масе (HMW). Агрегација сочивних протеина у насумично дистрибуиране молекуле велике молекулске масе, доводи до промене протеинске густине у сочиву и стварање протеински-богатих и протеински-сиромашних фаза, узрокујући локалне промене у индексу рефракције и повећано светлосно расејање, као и замућење у катарактном сочиву (32).

Агрегација сочивних протеина се повећава с годинама. Ове агрегационе промене протеина доводе такође, до измене везивања воде за протеине, промене протеинске растворљивости и друго.

## **2.9.2. Оксидациона модификација липида (липидна пероксидација)**

Ћелијске мембране су веома осетљиве на дејство радикала кисеоника, због присуства полинезасићених масних киселина у липидима. Масне киселине у липидима ћелијских мембрана садрже различити број угљеникових атома (од 14 до 24), а присутне двогубе везе се налазе у цис конфигурацији. Арахидонска киселина, као вишеструко незасићена масна киселина, је најважнији супстрат за процес липидне пероксидације. Присуство двогубе везе у суседству јако дестабилизује везу између угљеника и водоника метиленске групе у ланцу полинезасићене масне киселине, па одузимањем водоника из такве метиленске групе реактивно способним оксидансом започиње процес оксидационе модификације масних киселина (липидна пероксидација) (93).

Липидна пероксидација је оксидационо оштећење ћелијске мембране, липопротеина и других молекула, који садрже липиде у условима оксидационог стреса (69). Овај процес је неодвојив од оксидационе модификације протеина (205,226), с обзиром на липопротеинску структуру ћелијских мембрана (протеини су заступљени са око 60%, липиди са 40% и угљени хидрати са 1% у грађи ћелијске мембране). Засићене масне киселине (масне киселине са једном или две двогубе везе) резистентније су на оксидационо оштећење од полинезасићених масних киселина.

Процес липидне пероксидације је најчешћи негативни феномен деловања слободних радикала (71). Али овај процес може имати и своје физиолошке улоге у смислу регулације метаболизма мембранских липида (69,206), промене њихових физичко-хемијских својстава и пропустљивост (18). Такође, у контролисаним условима, омогућава контролу синтезе биолошки активних еикосаноида (69), контролу ћелијске пролиферације и иницијацију одумирања ћелије (95,206).

Међутим, токсични ефекти процеса липидне пероксидације се јављају при неадекватном балансу прооксидационих и антиоксидационих фактора у ћелији. Функционалне манифестације липидне пероксидације у биолошким мембранама су смањење флуидности биолошких мембрана, што је праћено појачаном пропустљивошћу за једновалентне и двовалентне јоне, инактивација мембранских ензима, фрагментација ланаца масних киселина и губитак интегритета ћелијских мембрана.

Неопходни услови за одвијање и завршетак процеса липидне пероксидације су: присуство супстрата који се оксидише, присуство радикала кисеоничког порекла високог оксидационог потенцијала, присуство молекулског кисеоника, присуство метала са променљивом валенцом, као и деловање антиоксидационих ензима, витамина и других антиоксиданаса важних за процес терминације.

Механизми пероксидације масних киселина подразумевају процесе неензимске пероксидације уз аутооксидацију (у присуству слободних радикала) и фотооксидацију, као и процес ензимске пероксидације са формирањем еикосаноида (18).

Липидна пероксидација у контролисаним условима, посредована је ензимима липооксигеназе или циклооксигеназе, које у ћелијама генеришу оксидоване липиде, а који функционишу као медијатори запаљенских процеса. Ензимском пероксидацијом, под утицајем липооксигеназа настају деривти хидропероксиеикоса-тетраеноичне киселине (HPETE<sub>s</sub>) и хидрокси продукти (HETE<sub>s</sub>) (241). Циклооксигеназе катализују реакцију између полинезасићених масних киселина и O<sub>2</sub> образујући ендпероксиде.

За разлику од ових, ензимски контролисаних реакција липидне пероксидације (у којима слободни радикали могу настати, али и брзо нестати – слободно радикалски интермедијер скоро никада не напушта активно место ензима), неензимска липидна пероксидација је неспецифичан и неконтролисан процес у коме настале реактивне врсте кисеоника лако реагују са околним молекулима, што доводи до интензивирања процеса, до оштећења ћелијске мембране и последичне смрти ћелије. Због свега наведеног, мембрански липиди су заштићени било присуством антиоксиданаса, било ензимима који могу уклонити перокси радикале и тако прекинути реакцију.

Неензимска пероксидација полинезасићених масних киселина (аутооксидација) је процес који се дешава у три фазе: иницијација, пропација и терминација (234). Интензитет овог процеса, као и способност делимичне или потпуне репарације оштећења, зависи од про/анти-оксидационих услова средине у којој се овај процес дешава.

Иницијацију могу да започну хидроксил радикал, синглет кисеоник, перхидрокси радикал и тиоли. Поменути радикали одузимају незасићеним масним киселинама H<sup>+</sup> из метил групе (-CH<sub>2</sub>-) у α положају од места двоструке везе, при чему настаје **алкил радикал** незасићене масне киселине (L•) (или липид радикал) (фаза иницијације).

Његовим цепањем и интрамолекуларним преуређивањем двогубих веза настају **коњуговани диени**. Они реагују са молекулским кисеоником и образују **липопероксид радикал (LOO•)** или липидни пероксид.

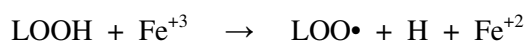
Пероксидни радикал има значајан оксидациони потенцијал, па може да адире водоник из суседне незасићене масне киселине формирајући **липидни хидропероксид (LOOH)** и нови алкил (липидни) радикал (L•) и тако пропацира даље ланчани низ процеса липидне пероксидације (фаза пропације).

Липидни хидроперокси (LOOH), као примарни молекулски продукти процеса липидне пероксидације, су добро растворљиви, имају способност мигрирања са места настанка и важни су потенцијални извори за формирање реактивног хидрокси радикала (HO•). У присуству метала са променљивим валенцом могу поново започети каскаду липидне пероксидације (93,94).

У реакцији липидних хидропероксида (LOOH) са Fe<sup>+2</sup>, у Фентоновој реакцији, разградњом LOOH настају HO• и **алоксил радикали (LO•)** масних киселина:



У присуству Fe<sup>+3</sup>, LOOH се разграђује до **пероксил радикала (LOO•)**:



Алоксил и пероксил радикали су одговорни за даљу иницијацију и пропацију процеса пероксидације липида (69), а алоксил радикал је реактивнији од пероксил радикала.

Оксидацијом алоксил радикала настаје дихидропероксид, чијом спонтаном разградњом настају испарљиви кратколанчани угљоводоници етан и пентан.

Уклањањем хидропероксида (LOOH), који настаје током прве фазе липидне пероксидације, активношћу глутатион-зависне селен-пероксидазе, која катализује редукцију хидропероксида у одговарајући алкохол, могу бити спречене реакције пропације липидне пероксидације. Затим, једињења која реагују са реактивним врстама кисеоника насталим током ланчане реакције, попут пероксил или алкоксил радикала, и доводе до формирања врста које нису у стању да одстране атом водоника из незасићених масних киселина, сматрају се антиоксидансима прекидачима ланчане реакције, од којих је најважнији липосолубилни  $\alpha$ -токоферол.

У серији сложених реакција деградације хидро- и дихидро-пероксида полинезасићених масних киселина, настају и алдехиди као што су 4-хидрокси-2,3-транс-ноненал, 4-хидрокси-пентенал, 4-хидрокси-октенал и краткочланчани малондиалдехид (МДА) (70).

Настали алдехиди, нарочито МДА, могу да реагују са аминок-групама протеина, образујући интра-молекулске унакрсне везе или да формирајући интер-молекулске везе, вежу два различита протеина (205), при чему се мењају структурно-функционална својстава протеина. Малондиалдехид се везује за лизинске остатке протеина, ензима, нуклеинске киселине и фосфолипиде, показује мутогена својства (39) и модификује ЛДЛ. Малондиалдехид, такође, инхибира бројне тиол зависне ензиме: глукозо-6-фосфатазу,  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФ-азу,  $\text{Ca}^{++}$ -АТФ-азу, аденилат циклазу.

Терминација процеса липидне пероксидације се постиже реаговањем пероксил радикала и  $\alpha$ -токоферола, реаговањем алкил радикала ( $\text{L}\cdot$ ) са липидним пероксидима ( $\text{LOO}\cdot$ ) уз формирање димера LOOL или хидроксил деривата LOH $\cdot$ , а могућа је и реакција липидних пероксида и мембранских протеина.

Детоксикација липидних хидропероксида је најзначајнија у терминацији процеса пероксидације липида. У овом процесу, као и у процесу репарације насталог дефекта учествују три ензима: класична глутатион пероксидаза (GSH-Px), фосфолипид хидропероксид глутатион пероксидаза (PHGSH-Px) и селен-независна глутатион-S-трансфераза (5).

Фотооксидација се дешава у присуству синглет кисеонка ( $^1\text{O}_2$ ) који у присуству фотосензитивних материја (хлорофил, порфирини, миоглобин, рибофлавин, билирубин) и светлости реагује са двоструким везама полинезасићених масних киселина. Фотооксидација је бржа реакција од аутооксидације, а инхибитори овог процеса су каротеноиди или директни „хватач“  $^1\text{O}_2$   $\alpha$ -токоферол.

Пероксидацијом холестерола настају разни оксидациони продукти оксистероли. Фотооксидацијом холестерола настаје 5 $\alpha$ -хидроперокси-холестерол.

Оштећење биомембрана липидном пероксидацијом обухвата промене физикохемијских својстава мембранских фосфолипида, деловањем на протеинске компоненте ћелијских мембрана и нарушавањем баријерне функције мембране, повећава се пропустљивост за воду, једно и двовалентне јоне (159), долази до инактивације мембранских ензима, повећава се ригидност ћелијске мембране, некада ћелијска мембрана губи интегритет и постоји ризик од мембранске руптуре (89).

### *2.9.2.1. Утицај липидне пероксидације на појаву и развој катаракте*

Пероксидација липида се сматра патогенетским фактором катарактогенезе (14,15,66,155,156). Липиди ћелијских мембрана (фосфолипиди, гликолипиди и холестерол) су најчешћи супстрати овог оксидационог напада, а пошто су ћелијске мембране липопротеинске структуре, истовремено бива нарушена и структура мембранских протеина. То доводи до поремећаја баријерне функције ћелијске мембране, оксидационе модификације  $\text{Ca}^{++}$ -АТФ-азе и  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФ-азе, што доводи до

промена у нивоу интраћелијског калцијума и других јона (3,204). Структурне промене ћелијске мембрне и њена повећана пропустљивост доводе до промена ћелијског волумена и даље промене конфигурације сочива, које су одговорне за рефрактарне промене удружене са почетком катаракте.

Литературни подаци показују да се током развоја катаракте нагомилавају у сочиву и очној водици крајњи производи пероксидације липида: малондиалдехид (МДА) (и то највише у предњим деловима сочивног нуклеуса), 4-хидроксиноненал и други (49,89). Настали МДА може даље да реагује и ствара агрегате са разним биомолекулима, протеинима, аминокиселинама, фосфолипидима, при чему се кроз Maillard-ову реакцију, формира и акумулира жуто-браон флуоресцентни пигмент, што узрокује тамњење сочива (116). Липидна пероксидација у сочиву се повећава с годинама живота (30).

## 2.10. Фотооксидациони стрес

Човеку и другим дневним организмима, сунчева светлост и енергија, као и кисеоник, су неопходни за живот на земљи. Сунчева светлост омогућује развој видне функције код човека. Међутим, спектар сунчеве светлости садржи и таласне дужине са штетним потенцијалом за биомолекуле људског организма. Нарочито су очи и кожа осетљиви на сунчево зрачење, јер су њему и најизложенији, а неке од најчешћих болести савременог човека, у чијој етиопатогенези значајно место заузима и штетно дејство ултраљубичастог дела сунчевог спектра, су катаракта и малигни меланом. Бројни подаци из савремене литературе говоре да одређени UV зраци сунчеве светлости могу учествовати у оштећењу биомолекула хуманог сочива и допринети старењу структура сочива, као и развоју "age-related" катаракте (65,103,153,168). Наравно, тај утицај зависи од интензитета и таласне дужине UV зрака, биомолекула на које ово зрачење утиче, парцијалног притиска кисеоника, присуства хромофора, одбрамбеног система организма и механизма репарације (189).

Сунчево зрачење чине зраци различите таласне дужине: UV-C ( $\lambda$  220-290 nm), UV-B ( $\lambda$  290-320 nm), UV-A ( $\lambda$  320-400 nm) и видљива светлост  $\lambda$  400-700 nm. Зраци краће таласне дужине садрже већу количину енергије и потентнији су за оштећења биомолекула, док зраци веће  $\lambda$  имају мање енергије и пенетрирају у дубље структуре ока (189).

Сочиво има важну заштитну улогу за друге структуре ока. Апсорпцијом дела ултраљубичастог спектра оно штити дубље структуре ока од штетног дејства овог дела сунчевог зрачења, при чему само, временом, подлеже фотодинамским оштећењима.

Хумано сочиво је константно изложено светлости таласне дужине веће од 280 nm. Зраке UVB (од 290-320 nm) апсорбују спољашње структуре ока, делимично корнеа и релативно мало ове енергије доспева до сочива (202). До сочива допиру UVB зраци од 295 до 320 nm и UVA зраци од 320 до 400 nm. Са старењем сочива апсорпционини спектар се проширује на веће таласне дужине.

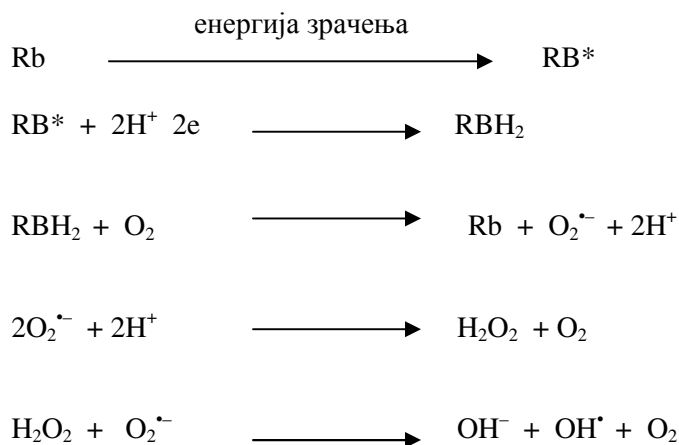
Многа експериментална испитивања су показала да ултраљубичаста светлост може изазвати катаракту (12,87,157).

Светлост (UVA), таласне дужине од 320 до 400 nm, може учествовати у оштећењу сочива кроз продукцију фотопродуката. Нпр. када се протеини изложе радијацији UVA зрацима, *in vitro*, фотохемијска реакција резултира оксидацијом триптофанских резидуа, при чему настају N-формил-кинуренин и кинуренинска киселина. Бројна испитивања потврђују да се ови производи акумулирају у старијим и катарактним сочивима, да доприносе појави жућкасто-браон боје сочива и да повећавају количину и распон апсорпционог спектра сочива (161).



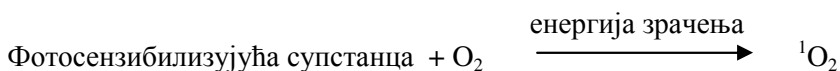
Током еволуције развио се код човека UV заштитни систем који ублажава и поправља ефекте фотооксидационог оштећења. Односно, у младом хуманом сочиву, светлост  $\lambda$  300-400 nm доминантно апсорбују деривати аминокиселине триптофана: кинуренин (Кун), 3-хидроксикинуренин (ЗОНКун), 3-хидроксикинуренин-*O*- $\beta$ -D-глукозид (ЗОНКунG) и 4-(2-амино-3-хидроксифенил)-4-оксобутерна киселина-*O*- $\beta$ -D-глукозид (АНBG) (62,221). Ови флуоресцентни деривати триптофана чине тзв. UV филтер, за који се сматра да штити ретину и сочиво од UV-индукованог фотооштећења, јер апсорбује 95% светлости  $\lambda$  300-400 nm која допире до сочива. Међутим, ови триптофански деривати, током процеса старења сочива и акумулације могу реаговати фотохемијски са сочивним протеинима у условима фотооксидационог стреса и допринети развоју катаракте (6,16). При апсорпцији светлости, ксантуренска киселина, настала разградњом триптофана, може продуковати реактивне кисеоничке врсте – синглет кисеоник и супероксид радикал (188).

Бројне супстанце у оку могу иницирати фотодинамске реакције, као рибофлавин, триптофан, оксидациони продукти триптофана (кинуренин и *N*-формил кинуренин), липофусцин, видни пигменти, али и егзогени фотосензитери нпр. неки лекови (Шема бр.1. Фотохемијска продукција реактивних кисеоничких врста) (193,204).



Шема број 1. Фотохемијска продукција реактивних кисеоничких врста  
(Rb – фотосензитизер, RB\* - ексцитирани фотосензитизер)

Разне врсте зрачења (јонизујуће, ултраљубичасто, видљиво или термално) могу у погодним условима изазвати формирање различитих слободних радикала. У случају нејонизујућег зрачења долази до стварања слободних радикала уколико ово зрачење има вишак унутрашње енергије, која ће изазвати хомолитичко цепање ковалентних веза. За хомолизу везе угљеник-угљеник (C-C) потребна је енергија од око 359 kJ/mol, што је еквивалент таласној дужини UV зрачења од 300 nm. У случају радијације са ниском унутрашњом енергијом (нпр. видљиво зрачење), слободни радикали се у биолошком систему могу произвести уколико је истовремено присутна фотосензибилизујућа супстанца. У том случају фотосензибилизујућа супстанца апсорбује светлост одређених таласних дужина, активише се, и у реакцији са другим молекулима одузима атом водоника или електрон, преводећи их у слободне радикале. У присуству молекулског кисеоника, фотосензибилизујућа супстанца, може да му преда енергију и преведе га у синглет кисеоник ( $^1\text{O}_2$ ) (56,204):



Синглет кисеоник ( $^1\text{O}_2$ ) је изразито електрофилни молекул, нема слободних електрона, али може хемијски реаговати са бројним молекулима или им предати део енергије. Због високе електрофилности реагује са компонентама богатим електронима, као што су полинезасићене масне киселине (иницира процес липидне пероксидације) и аминокиселински остаци са незасићеним хетероциклусима (55).

Екситација молекулског кисеоника у синглет кисеоник најчешће настаје када се биолошки пигменти као што су очни пигмент ретинол, флавин или порфирини изложе светлости у присуству молекулског кисеоника (69). *In vivo*, синглет кисеоник се ствара при излагању светлости у очном сочиву и ретини код сисара.

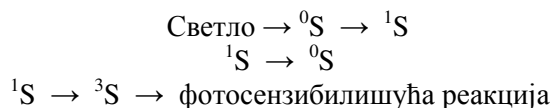
### 2.10.1. Промене биомолекула сочива настале у фотооксидационом стресу

Фотооксидациони стрес настаје примарно због апсорпције светла од стране биомолекула сочива. Фотодинамско дејство представља штетни ефект светла, кисеоника и сензибилишућих компоненти. Сензибилишуће компоненте су најчешће пигменти – хромофоре. Ендогене сочивне хромофоре: Н-формил кинуренин, кинуренинска киселина, ксантуренска киселина и рибофлавин имају одговарајућа фотосензибилишућа својства (75,123,187). Путем фотосензибилишућих реакција триптофански производи преносе апсорбовану енергију на кисеоник, који даље кроз оксидациони стрес доводи до низа ћелијских промена. Ћелије поседују репараторне ензиме за настала оштећења. Међутим, уколико је репарација некомплетна долази до трајног оштећења ДНК, до мутација и ћелијске смрти. Такве промене су регистроване код хумане сенилне катаракте и код експерименталних животиња код којих је катаракта изазвана UV зрацима (62,154,243).

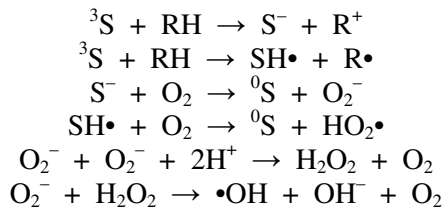
Директна фотохемијска реакција настаје када се хромофора апсорпцијом светла хемијски промени. Тим променама подлежу видни пигменти и то је суштина процеса видних функција. Фотосензибилишућа реакција настаје када молекул који је апсорбовао светлост не претрпи хемијске промене, већ низом реакција доводи до оштећења других молекула. Апсорпција фотона електромагнетног зрачења доводи молекул у ексцитирано синглет или триплет стање. Молекул се може релаксирати из оваквих побуђених стања емисијом флуоресценције или побуђени (ексцитирани) молекул може пренети енергију на други молекул и тако изазвати његову ексцитацију (244).

Процес фотодинамске реакције даље се може одвијати кроз два основна типа. Код првог типа реакције сензибилишући молекул, најчешће ексцитирани пигмент, реагује са редукујућим субстратом и преноси на њега електрон или прима његов протон. Тако настаје нови радикал, који може да реагује са молекулским кисеоником и започне стварање његових реактивних радикала и метаболита.

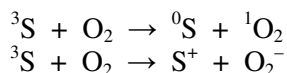
У другом типу реакције сензибилишућа хромофора реагује директно са молекулским кисеоником и започиње процес оксидационог стреса формирањем синглет кисеоника ( $^1\text{O}_2$ ) (76) (Шема бр.2. Шема фотодинамских реакција).



#### Тип I



#### Тип II



Шема број 2. Шема фотодинамских реакција: Фотон светла апсорбован од сензибилишуће хромофоре (S) побуђује њене електроне у ексцитирано синглет или триплет стање. Триплет стање започиње фотосензибилизацију по I типу реакције реагујући са органским молекулом (RH), или по II типу, реагујући директно са кисеоником.

Тип реакције зависи од доступности сензибилишућих супстанци, локалне средине, таласне дужине светлости, концентрације кисеоника, стварања и опстанка појединих радикала (76).

Протеини су главна потенцијална мета за фотооксидацију и то њихови аминокиселински ланци, као и простетичне групе нпр. флавин и хем (57). Главне хромофорне аминокиселине у протеинима сочива су триптофан, тирозин, фенилаланин, хистидин, цистеин и цистин (56). Неки оксидациони продукти, посебно триптофана и/или његових деривата су још осетљивији за формирање синглет кисеоника (183). После 40. године живота ензим кинуренин-амино-трансфераза повећава конверзију протективног 3-ОН кинуренин пигмента у деструктивну хромофору – ксантуренску киселину. Акумулација много потентнијих сензитизера Н-формилкинуренина и кинуренина у сочиву резултира повећањем фото-оштећења (56). Фототоксична реакција може довести до модификације ДНК, као и појединих аминокиселина и/или ковалентног везивања сензитизера за цитосолне протеине (187).

Фотооксидација протеина може бити изазвана на два начина. Прво, директна фотооксидација настала апсорпцијом UV зрака од стране протеинских структура, аминокиселинских ланаца или хромофора, када настају ексцитиране (побуђене) врсте ( ${}^1\text{O}_2$  или триплет стање), или радикали као резултат фото-јонизације.

Други начин оксидације протеина укључује индиректну оксидацију протеина преко формирања и последичних реакција  ${}^1\text{O}_2$ , насталог преносом енергије на молекулски кисеоник са ексцитиране хромофоре.

Синглет кисеоник ( ${}^1\text{O}_2$ ) реагује са већином органских молекула, укључујући ДНК, РНК, протеине, липиде и стероле (158). На овај процес може утицати више фактора као и локална средина.

Хемијске реакције између синглет кисеоника и аминокиселина доводе до протеинске оксидације, што резултира стварањем дисулфидних веза или фрагментацијом протеина. Иницијалана реакција између  ${}^1\text{O}_2$  и триптофана доводи до

стварања Н-формилкинуруенина. Н-формилкинуруенин и кинуруенин су бољи фотосензитери од триптофана тј. могу допринети продукцији  $^1\text{O}_2$  током континуираног излагања светлости (183).

Неке студије су показале да се током оксидације протеина узроковане  $^1\text{O}_2$  стварају пероксида (236). Будуће реакције ових протеинских пероксида могу довести до ензимске инактивације (нпр. ензима глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназе, глутатион-редуктазе) у не-радикал и радикал посредованим реакцијама (163).

Формирање Н-формилкинуруенина и кинуруенина из триптофана, мет-сулфооксида из метионина и цистина из цистеина представљају реакције фотооксидације протеина (57).

Бројна истраживања показују да су последице фотооксидације протеина њихова фрагментација (158), или формирање агрегата велике молекулске масе (НWM). Више испитивања је показало да UVA светлост може утицати на стварање дисулфидних веза у молекулима протеина хуманог сочива и у изолованим протеинима у бројним експериментима, у присуству синглет кисеоника или других кисеоничких радикала (57,64,87).

Оксидационе промене изазване  $^1\text{O}_2$  резултирају бројним биофизичким и биохемијским променама у протеинима: повећава се осетљивост оксидисаних протеина на протеолитичке ензиме, мењају се механичка својства, настају промене у протеинској конформацији, повећава се хидрофобност, дешавају се промене у везивању кофактора и металних јона у протеинима (199). Умерени степен оксидације протеина чини их осетљивим на протеолизу, док је последица интензивне оксидације формирање нерастворљивих агрегата велике молекулске масе. Променама под утицајем UV зрака подлежу и лентикларни ензими: глутатион редуктаза, глутатион пероксидаза, супероксид дизмутаза, глицералдехид-3-Р дехидрогеназа (G3PD) (137). Активност ензима G3PD се смањује током излагања UVA светлости, а претпоставља се да је то последица оксидације есенцијалних тиол група овог ензима.

С годинама, ниво слободних компоненти UV филтера тј. триптофанских деривата у сочиву се смањује, а повећава се њихово везивање за протеине сочива (119, 227). Продукти триптофана подлежу не-ензимској дезаминацији, при физиолошком рН, при чему настају  $\alpha,\beta$  несатурисана реактивна карбонил једињења (216). Даље, ова једињења се ковалентно везују са остацима аминокиселина најчешће лизина, цистеина и хистидина у протеинима хуманог сочива (227), или чак реагују са редукованим глутатионом (GSH) при чему настаје GSH-3ОНKynG (85). Оваква ковалентна модификација је нарочито изражена у нуклеусу сочива који садржи старије протеине. Разлог за ово код старијег сочива, је измењен транспорт/дифузија малих молекула у сочиву, нарочито после 40. године живота. Тачније, развија се баријера у кретању молекула између метаболички активног кортекса и инертног нуклеуса. Концентрација редукованог глутатиона у нуклеусу сочива се изразито смањује с годинама, па је и одговор на оксидациона оштећења у овом делу сочива смањен (207).

Ковалентна модификација протеина сочива се примарно дешава у нуклеусу сочива, који садржи старије протеине. Протеинска оксидација је карактеристична за "age-related" нуклеарну катаракту. У води нерастворљиви протеини, старијег хуманог сочива, способни су да, *in vitro*, продукују  $^1\text{O}_2$  и  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , при излагању UV зрацима (137), а UVA светлост индукује стварање пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) од стране сочивних протеина модификованих кинуруенином и сличним продукtima. Ово указује да ковалентна модификација сочивних протеина дериватима кинуруенина може повећати оксидацију у старијем сочиву и допринети развоју од година зависне (age-related) катаркте.

Фотооксидација оштећује и липиде ћелијских мембрана. Синглет кисеоник ( $^1\text{O}_2$ ) је изразито реактивни молекул, нарочито реагује са незасићеним масним киселинама и њиховим незасићеним двогубим везама. Тако настају липидни хидропероксиди.

## 2.11. Одбрана ћелија од утицаја реактивних кисеоничких радикала

Услов живота на земљи за аеробне организме је кисеоник. Пошто су они непрекидно изложени и штетном утицају кисеоника, развили су током еволуције системе одбране од оксидационих атака, који обухватају превенцију, лимитирање и репарацију оксидационог оштећења. Осетљивост неког ткива на дејство слободних радикала зависи од његових потреба за енергијом и заступљености полинезасићених масних киселина, а ефикасност заштите зависи од активности и присуства елемената који чине ензимске и неензимске механизме антиоксидационе заштите. Најважнији чиниоци антиоксидационе заштите организма су: ензими (супероксид дизмутаза, глутатион пероксидаза, глутатион редуктаза, глутатион С-трансфераза, каталаза) и неензимски антиоксиданси: витамини (аскорбинска киселина, токоферол,  $\beta$ -каротен), непротеински тиоли (првенствено редуковани глутатион), протеинске тиол групе, албумин, билирубин, мокраћна киселина, полиамини, коензим Q, неке фармаколошки активне супстанце: нестероидни антиинфламаторни лекови, блокатори калцијума, АЦЕ-инхибитори и други.

Хидроксилни радикал, који је веома реактиван, не може уклонити ни један до сада познати ензим, али овај радикал има изузетно кратак полуживот, што је једна врста специфичне заштите ћелија од његовог оксидационог деловања. С обзиром на то да у настајању овог радикала важну улогу имају метали са променљивом валенцом, првенствено гвожђе, протеини крвне плазме, трансферин, церулоплазмин и албумин, који везивањем јона метала са променљивом валенцом, спречавају њихово прооксидационо дејство, чине део антиоксидационог система.

Термин антиоксиданс обухвата све супстанце које, присутне у нижој концентрацији у односу на супстрате који се оксидишу, могу да спрече или смање њихову оксидацију. Са функционалног аспекта антиоксидационе заштите обухвата три нивоа деловања:

- први ниво обухвата системе антиоксидационе заштите који спречавају ендогено стварање слободних радикала. Протеини трансферин, лактоферин, феритин и хемосидерин везујући гвожђе спречавају његово учешће у Фентоновој реакцији, а церулоплазмин (феро оксидаза) оксидацијом гвожђа олакшава његово везивање за трансферин;

- други ниво одбране подразумева ангажовање ензимских и неензимских антиоксиданаса. Прву линију антиоксидационе заштите организма чине ензими, који катализују реакције детоксикације супероксид анион радикала и водоник пероксида: СОД, глутатион пероксидаза и каталаза и спречавају њихов утицај на осетљиве ћелијске структуре. Неензимски антиоксиданси чине секундарну линију одбране и лимитирају оксидационе процесе. Растворљивост у липидима одређује место деловања неензимских антиоксиданаса. Липосолубилни делују у липидној фази ћелијске мембране и мембрана ћелијских органела, као и у серумским липопротеинима. Хидросолубилни антиоксиданси делују у воденом медијуму;

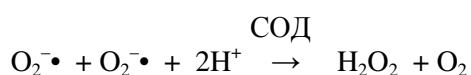
- последњи ниво антиоксидационе заштите остварују ензимски антиоксиданси, који учествују у репарацији насталог оксидационог оштећења липида, протеина, угљених хидрата и нуклеинских киселина (разни протеолитички ензими, фосфолипаза А<sub>2</sub>, ДНК-лигазе, ДНК-полимерзе и други).

## 2.12. Ензими значајни у антиоксидационој заштити

### 2.12.1 Супероксид дисмутаза (СОД)

Mc Cord и Fridovich су 1969. године показали да готово све ћелије аеробних организама поседују ензим способан да изврши дизмутацију супероксид анјон радикала и назвали га супероксид дизмутаза.

Супероксид дизмутаза (супероксид: супероксид оксидоредуктаза. ЕС 1.15.1.1) катализује реакцију дизмутације супероксид анјон радикала ( $O_2^{\bullet -}$ ) у присуству донора водоника до водоник пероксида и молекулског кисеоника:



Брзина ове ензимске реакције је за око 10000 пута већа од спонтане дизмутације супероксид анјон радикала.

Уклањањем  $O_2^{\bullet -}$ , СОД спречава стварање синглет кисеоника ( $^1O_2$ ), што је такође њена значајна функција.

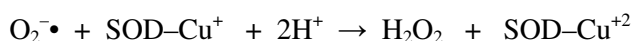
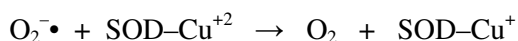
У организму човека су присутне три изоензимске форме СОД:

1. Cu/Zn-SOD (бакар, цинк-зависна СОД)
2. Mn-SOD (манган-зависна СОД)
3. ЕС SOD (екстрацелуларна СОД) (171).

Изоензими СОД еукариотских ћелија се међусобно разликују по електрофоретској покретљивости, осетљивости на инхибицију цијанидом и инактивацију хлороформ-етанолом.

Осетљивим имунолошким методама је утврђено да је СОД присутна у свим хуманим ткивима, активна је и у плазми и еритроцитима.

Највећа активност Cu/Zn-SOD је у цитосолу ћелија. У мањим количинама се налази у ћелијској мембрани, једру, интермембранском простору митохондрија и липозомима. Cu/Zn-SOD је по структури хомодимер у коме свака субјединица садржи по један атом  $Cu^{+2}$  и један атом  $Zn^{+2}$  (52), молекулске масе 32 kD. Јони бакра чине активни центар, а јони цинка стабилизују просторну конфигурацију ензима. Каталитичка активност Cu/Zn-SOD везана је за бакар, који је одговоран за реакцију дизмутације у којој мења своју валенцу, примањем или отпуштањем електрона:



Излагање Cu/Zn-SOD водоник пероксиду доводи до њене инактивације, а такође се инактивише процесом гликозилације, што је изражено у дијабетес мелитусу.

Cu/Zn-SOD је активна у интервалу рН од 5.3-10.5 и може се инхибирати цијанидима (237).

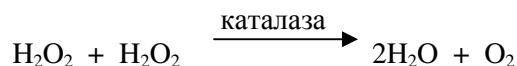
Манган зависна супероксид дизмутаза (Mn-SOD) је тетрамерни протеин у ћелијама еукариота, који садржи 2-4 атома мангана. Mn-SOD је локализована у матриксу митохондрија и унутрашњој страни мембрана митохондрија. Одвајањем мангана из холоензима, ензим губи каталитичку активност, а у току реакције дизмутације манган мења своју валенцу. Молекулска маса Mn-SOD је 80kD, активна је у интервалу рН од 7.8-10 и не може се инхибирати цијанидима.

Екстрацелуларна супероксид дизмутаза (ЕЦ СОД) је присутна у међућелијском простору и екстрацелуларној течности (плазма, лимфа, синовија, ликвор) (171). ЕЦ СОД је секреторни ензим, тетрамерни гликопротеин, чији активни центар чине јони бакра ( $\text{Cu}^{+2}$ ). ЕЦ СОД има велики афинитет за киселе гликозаминогликане, пре свега за хепарин, за који се везује екстрацелуларно (141). Овај изоензим СОД синтетишу фибробласти, глијалне ћелије, макрофаги, хондроцити и ендотелне ћелије. ЕЦ СОД, осим што утиче на концентрацију  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , сматра се да доприноси одржавању оптималне концентрације азот монооксида (NO), који се синтетише у макрофагима, ендотелним ћелијама у периферној крви и другим ћелијама (173). Пораст активности ЕЦ СОД доводи до интензивнијег уклањања супероксид анјона, чиме се пролонгира дејство NO, као посредника у мишићној релаксацији, неуротрансмисији или ћелијској сигнализацији. Обратно, смањена активност ЕЦ СОД и последично повећана концентрација  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , појачава настајање пероксинитрата, који могу иницирати даље оштећење ткива:



### 2.12.2. Каталаза

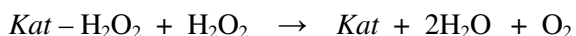
Каталаза ( $\text{H}_2\text{O}_2$  :  $\text{H}_2\text{O}_2$  оксидоредуктаза; ЕС 1.11.1.6) је један од најраспрострањенијих ензима у природи, чија је основна биолошка улога разлагање токсичног водоник пероксида:



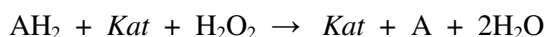
Каталаза разграђује водоник пероксид до воде и молекулског кисеоника, при чему се у зависности од концентрације супстрата, одвија каталазни или пероксидазни тип реакције (69). У оба случаја реакција почиње образовањем **комплекса I** између каталазе и молекула  $\text{H}_2\text{O}_2$ :



У каталазном типу реакције комплекс I, као донор водоника, користи други молекула водоник пероксида, при чему настају вода и молекулски кисеоник:



У пероксидазном типу реакције донори водоника или електрона могу бити различита органска и неорганска једињења (етанол, метанол, формалдехид и др.) са којима реагује комплекс I, а из реакције излази нативни ензим, оксидисани косупстрат и вода:



При мањој концентрацији  $\text{H}_2\text{O}_2$  доминира пероксидазна реакција, у којој различити донори водоника конкуришу са другим молекулом  $\text{H}_2\text{O}_2$  за комплекс I, док при већим концентрацијама  $\text{H}_2\text{O}_2$  доминира каталазни тип реакције.

Каталаза и глутатион пероксидаза (GSHPx) разграђују исти супстрат –  $\text{H}_2\text{O}_2$ , а ефикаснији ће бити онај ензим који има мању  $K_m$  вредност за водоник пероксид.

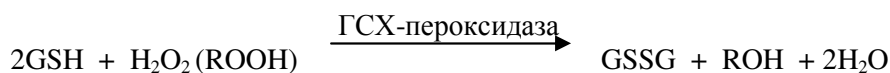
Максимална брзина реакције GSHPx зависи од концентрације редукованог глутатиона (GSH) и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. При концентрацијама водоник пероксида мањим од 10<sup>-6</sup> mol/L и, нормалним вредностима концентрације редукованог глутатиона, пероксидаза има главну улогу у детоксикацији ткива од H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, пошто је њена K<sub>m</sub> вредност мања од K<sub>m</sub> вредности за каталазу. Брзина каталазне реакције расте при високим концентрацијама водоник пероксида, па је овај ензим одговоран за разградњу H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> када је присутан у високим концентрацијама у ћелији.

Каталаза је хемопроteid, састављен од четири идентичне субјединице, у чијем саставу се налази по један хем, са Fe<sup>+3</sup> у центру (228). Каталаза је присутна у свим ткивима сисара, а најактивнија је у јетри, бубрезима и еритроцитима. У ћелијама је претежно локализована у пероксизомима и митохондријама, а само у еритроцитима се налази растворена у цитосолу, где са глутатион пероксидазом штити хемоглобин од пероксидативног оштећења. У пероксизомима каталаза постоји у два облика: као солубилна и као форма везана за мембране пероксизома.

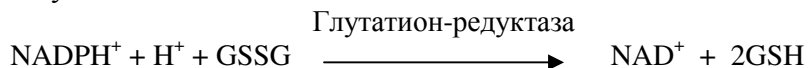
Каталаза је активна у интервалу рН вредности од 5-10 и може се инхибирати дејством азида, цијанида и аминотриазола.

### 2.12.3. Глутатион пероксидаза

Глутатион пероксидазну активност показују ензими, који катализују реакцију редукције водоник пероксида или органских и липидних хидропероксида у одговарајући алкохол, користећи редуковани глутатион као донор водоника (72,240,242):



Активношћу ензима глутатион редуктазе врши се стална регенерација редукованог глутатиона:



На основу супстратне специфичности и захтева за селеном идентификовани су селен-зависни ензими (класична глутатион пероксидаза (GSHPx), фосфолипид-зависна глутатион пероксидаза и глутатион пероксидаза плазме) и селен-независне глутатион пероксидазе (селен независна GSHPx присутна у цитозолу јетре и селен-независна GSH-Rx крвне плазме) (110). Селен-независне глутатион пероксидазе имају мањи афинитет за H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, али су ефикасне у редукцији органских хидропероксида.

Глутатион пероксидаза (глутатион: водоник пероксид оксидоредуктаза, EC 1.11.1.9) (GSHPx) је тетрамер, у коме свака субјединица садржи по један атом селена у форми селеноцистеина и има молекулску масу 76-92 kD.

Ензим глутатион пероксидаза или мРНК за синтезу овог ензима је доказана у многим органима хуманог организма: бубрезима, плућима, плаценти, тироидној жлезди, а главни извор овог ензима у хуманој плазми су бубрези (108). Такође, мРНК за синтезу глутатион пероксидазе је детектована у хуманом цилијарном епителу одакле се секретује у очну водицу (148).

Физиолошки значај овог ензима је уклањање H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Водоник пероксид може у присуству метала да иницира процес липидне пероксидације, па се сматра да GSH-Rx има значајну улогу у инхибицији иницијалног стадијума пероксидације липида



ћелијских мембрана, покренутог дифузибилним  $H_2O_2$ . Највећа активност Se-GSH-Px присутна је у цитосолу 65–70%, а у митохондријама 28-30%.

Разлика у кинетичким својствима GSH-Px и каталазе, условљава већи афинитет GSH-Px за супстрат –  $H_2O_2$  у односу на каталазу, када је водоник пероксид присутан у малим концентрацијама у ћелији или у плазми. Међутим, када је концентрација водоник пероксида у ћелијама висока, каталаза је ефикаснија у његовој детоксикацији од GSH-Px.

На активност селен-зависних глутатион пероксидаза утиче више фактора: расположивост селена, концентрација редукованог глутатиона, активност глутатион редуктазе, као и количина створеног  $NADPH^+ + H^+$  у пентозном путу.

Фосфолипид-зависна глутатион пероксидаза (PHGSH-Px) је мономер у чијем се активном центру налази један атом селена. Може да редукује фосфолипидне хидропероксиде, холестерол хидропероксиде и водоник-хидропероксид. Има способност да реагује директно са фосфолипидним хидропероксидима у ћелијској мембрани, без претходног деловања фосфолипазе  $A_2$  (110), за разлику од класичне GSH-Px. PHGSH-Px има велики афинитет за ћелијске мембране због хидрофобних карактеристика. Овај ензим поседује већи афинитет за редуkcију органских хидропероксида у односу на водоник пероксид, кога брже разграђује класична GSH-Px.

#### 2.12.4. Глутатион-С-трансфераза

Глутатион-С-трансфераза (EC 2.5.1.18) (ГСТ) обухвата фамилију мултифункционалних ензима чија је најважнија улога у процесима детоксикације, коју остварују каталишући коњугацију глутатиона са великим бројем електрофилних токсина и карциногена. Глутатион-С-трансферазе су производ две фамилије гена. Већа фамилија ГСТ гена кодира цитосолне изоензиме, који учествују у реакцијама биотрансформације токсичних материја ендогеног и егзогеног порекла (98). Мања фамилија ГСТ гена кодира микрозомалне протеине, који су укључени у метаболизам арахидонске киселине.

Глутатион-С-трансферазе каталишу два основна типа реакција: реакције коњугације и редуkcије. У реакцијама коњугације електрофилни метаболити ендогеног и егзогеног порекла коњугују се са глутатионом. Коњугација са глутатионом смањује токсичност електрофилних једињења чинећи их мање реактивним према нуклеофилним групама у важним биомолекулима, као што су нуклеинске киселине, протеини и липиди. Поред учешћа у реакцијама коњугације, неке класе ГСТ имају и селено-независну глутатион пероксидазну активност, помоћу које редукују оксидационо оштећене азотне базе нуклеинских киселина у одговарајуће алкоhole. Реакције редуkcије које каталишу глутатион-С-трансферазе могу такође, имати значаја у заштити од генотоксичних и канцерогених једињења.

Код сисара глутатион-С-трансферазу садрже сва ткива и органи. Код људи ГСТ је доказана у многим ткивима: јетри, плућима, бубрезима, еритроцитима, леукоцитима, тестисима и плаценти.

У ћелији, изоензими ГСТ се првенствено налазе у цитосолу. Од тринаест фамилија цитосолних ГСТ, код људи су највише изучаване класе  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$  и  $\theta$ . Структурно цитосолски ГСТ изоензими су димерни молекули, а међусобно се разликују према изоелектричним тачкама, молекулским масама субјединица, имунолошким својствима и специфичности према супстрату. Каталитичку активност ГСТ остварује уз учешће редукованог глутатиона као ко-супстрата.

Глутатион-С-трансфераза осим поменуте детоксикационе функције, има транспортну и синтетичку функцију (98).

Детоксикациона улога ГСТ се огледа у њеној способности да катализује реакцију коњугације редукованог глутатиона са бројним хидрофобним и електрофилним ксенобиотицима (канцерогени, хербициди, пестициди, фармаколошки активне супстанце) и ендогеним електрофилима који су најчешће продукти оксидационог стреса укључујући ДНК, липидне хидропероксиде и крајње продукте липидне пероксидације (98).

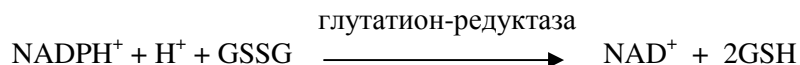
Глутатион-С-трансфераза може послужити и као везујући протеин за стероиде, метаболите и неке лекове, чиме се олакшава њихов транспорт. Такође, ГСТ учествује у синтези леукотриена C<sub>4</sub> и простагландина D<sub>2</sub>, E<sub>2</sub> и F<sub>2α</sub> (151).

Биолошка активност ГСТ је под контролом продуката реакције, коњугата глутатиона, цистеина и меркаптурне киселине. Око 100 различитих хемијских супстанци тзв.ксенобиотици имају способност да индукују ГСТ и на тај начин утичу на регулацију овог ензима у организму. Многе се од ових хемијских супстанци налазе у воћу и поврћу, због чега је човек стално изложен њиховом утицају.

Глутатион-С-трансфераза са глутатион-пероксидазом омогућава репарацију, или бар делимичну репарацију, већ постојећег оштећења, што је у случају већ започетог процеса липидне пероксидације за ћелију можда важније од деструкције самих иницијатора овог процеса, слободних радикала кисеоника.

#### 2.12.5. Глутатион редуктаза

Глутатион редуктаза (NAD(P)H: оксидовани глутатион оксидоредуктаза, EC 1.6.4.2) (ГР) катализује разградњу дисулфидне везе оксидованог глутатиона (GSSG) до редукованог глутатиона (GSH):



Глутатион редуктаза врши регенерацију редуковане форме глутатиона уз учешће редукованих коензима NADP (NADPH<sup>+</sup> + H<sup>+</sup>). Основна улога глутатион редуктазе је одржавање концентрације интраћелијског редукованог глутатиона (GSH) (118), који се користи за редукцију оксидованих тиол група протеина и ензима. Глутатион пероксидаза врши оксидацију глутатиона при чему се разлаже водоник пероксид или хидропероксид. Дејством глутатион пероксидазе и глутатион редуктазе кроз тзв. глутатион редокс систем, омогућава се одржавање физиолошког односа GSH/GSSG, који је важан за многе реакције у организму.

Глутатион редуктаза је по структури димер, молекулске масе 120kD, а налази се у цитосолу ћелија еукариота и прокариота.

Глутатион редуктаза има важну улогу у одржавању тиол група у сочиву, и њена активност се смањује са старењем, и са развојем катаракте. Испитивањем активности глутатион редуктазе у кортикалном и нуклеарном делу катарактног сочива нађена је значајно нижа активност у односу на некатарактна сочива старијих особа (104).

#### 2.13. Неензимска антиоксидациона одбрана организма

Протективно деловање антиоксидационих ензима допуњено је одбраном од стране редукционих средстава присутних у биолошким мембранама (α-токоферол, витамин А и каротеноиди) и у цитосолу (аскорбинска киселина, редуковани глутатион, цистеин).

### 2.13.1. Глутатион

Глутатион (ГСХ) чини 90% укупних непротеинских сулфхидрилних једињења у ћелији и његова интрацелуларна концентрација од око 10 mmol превазилази концентрацију многих органских једињења. Трипептид глутатион (Л-γ-глутамил-Л-цистеинил-глицин) је нискомолекулско, тиолно једињење. У ћелијама се глутатион налази највећим делом у слободној форми у облику редукованог глутатиона (GSH) и нешто мање у оксидованом облику (GSSG).

Улога глутатиона у заштити организма од утицаја реактивних кисеоничких врста је најважнија (99), али глутатион има и низ других значајних улога: учествује у детоксикацији ксенобиотика, синтези еикосаноида, синтези нуклеинских киселина и протеина, у ћелијској сигнализацији, пролиферацији и диференцијацији (122). Глутатион је неопходан за функцију ензима, који чине значајан део општег антиоксидационог потенцијала ћелија, као што су глутатион пероксидаза, глутатион-С-трансфераза, глутатион редуктаза, глутатион трансхидрогеназа (тиол трансфераза).

Редуковани глутатион (GSH), глутатион пероксидаза, глутатион редуктаза и  $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$  чине антиоксидациони систем глутатиона, у коме су глутатион редуктаза и  $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$  неопходни за редукцију оксидованог глутатиона (GSSG) и регенерацију GSH, која се остварује у глутатион редокс циклусу.

Глутатион-дисулфид – редуктазни систем ћелије, кога чине: глутатион, ензими тиол-дисулфидног система, глутатион редуктаза и  $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$ , омогућава редукцију различитих нискомолекулских дисулфида, као и одржавање у редукованој форми протеина (ензима) за чију је активност потребно присуство тиол група.

Глутатион је значајан и у одржавању интегритета ћелијских мембрана, тако што одржава протеине ћелијске мембране у редукованом облику и кроз систем антиоксидационе заштите обезбеђује њен интегритет и нормално одвијање процеса као што су активни транспорт, хомеостаза  $\text{Ca}^{+2}$ , стабилизацију рецептора, транспорт аминокиселина и друго.

Регулација интрацелуларне концентрације глутатиона (GSH) у ћелији одређена је: доступношћу аминокиселина (глутаминска киселина, цистеин и глицин) за његову синтезу, контролом ензима који учествују у његовој синтези (γ-глутамил цистеин синтетаза и глутатион синтетаза), интензитетом трошења редукованог глутатиона и његовом регенерацијом у глутатион редокс циклусу.

Јетра је веома значајан извор ГСХ за друга периферна ткива (172), па интензиван метаболизам ксенобиотика у њој доводи до смањења концентрације редукованог глутатиона у другим периферним ткивима. Доступност ГСХ и његово прихватање од стране епителних ћелија различитих органа обезбеђује превенцију и лимитирање оксидационог оштећења.

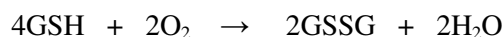
Еритроцити представљају веома важан транспортни систем за глутатион и његове коњугате. У еритроцитима је ГСХ присутан у три или четири различите метаболичке форме. Гвожђе у хемоглобину еритроцита је важан катализатор за формирање реактивних кисеоничких радикала, па је висок ниво ГСХ у овим ћелијама неопходан за заштиту протеина еритроцита од пероксидационог оштећења. Еритроцити могу да прихвате токсичне супстанце из плазме, врше њихову коњугацију са глутатионом, а затим их екскретују у плазму. Даља детоксикација С-коњугата до меркаптурне киселине наставља се у јетри и бубрезима, одакле се нетоксична једињења преко жучи или урина излучују из организма.

Редуковани глутатион има способност уклањања хидроксил радикала и синглет кисеоника, укључен је у процес ресинтезе витамина Е. Повећано стварање слободних

радикала у разним физиолошким или патолошким стањима, доводи до пада концентрације ГСХ и уједно пораста количине оксидованог глутатиона (GSSG).

У очном сочиву се налази највећа концентрација редукованог глутатиона (до 10 mmol), вероватно у циљу одбране и заштите од фотооксидативног оштећења. Концентрација ГСХ у јетри је између 5-7 mmol, у бубрезима око 3 mmol, у миокарду око 2 mmol.

У суштини, улога глутатиона је спречавање оксидације тиолних група ензима и протеина. Током тог процеса редуковани глутатион (GSH) отпушта  $H^+$  јон, који са кисеоником гради воду, а он се оксидује (GSSG):



### 2.13.2. Л-Аскорбинска киселина (витамин Ц)

Витамин Ц је по хемијској структури 2-оксо-Л-трео-хексоно 1.4-лактон-2.3-ендиол, ( $C_6H_8O_6$ ), а генерички витамин Ц представља Л-аскорбинску киселину.

Витамин Ц је врло реактивно једињење и брзо се оксидује у дехидроаскорбинску киселину. Неки организми, изузев човека, мајмуна и замораца, могу да синтетишу витамин Ц из глукозе. Међупродукти у тој синтези су Д-глукуронска киселина, Л-гулонска киселина и Л-гулоно- $\gamma$ -лактон, чијом оксидацијом посредованом ензимом Л-гулоно- $\gamma$ -лактон оксидазом настаје аскорбинска киселина.

Аскорбинска киселина је есенцијални микронутријент за људски организам. Човек не може да синтетише витамин Ц, јер не поседује генетску информацију за ензим Л-гулононо- $\gamma$ -лактон-оксидазу, па му концентрација у телесним течностима и ћелијама зависи од пероралног уноса (170). Апсорпција витамина Ц је најинтензивнија у дуоденуму и јејунуму. Након апсорпције витамин Ц се у плазми транспортује као слободан анјон или у оксидованој форми као дехидроаскорбинска киселина и само делимично је везан за протеине плазме.

Транспорт витамина Ц у ћелије различитих ткива је врло сложен. Наиме, утврђено је да постоји неколико различитих транспортних система за витамин Ц. У неке ћелије улази простом дифузијом (еритроцити и леукоцити), а за већину других ћелија је карактеристичан активан транспорт. Великим концентрацијама витамина Ц у ћелијама, које су 20–30 пута веће од екстрацелуларних, доприноси активни транспорт овог витамина, као и интрацелуларна редукција дехидроаскорбинске киселине (дејством аскорбат редуктазе и глутатиона) у мање дифузибилну аскорбинску киселину. Такође, транспортер за глукозу (GLUT-1) може транспортовати витамин Ц у ћелије (8).

Главни пут разградње витамина Ц је оксидација Л-аскорбата преко Л-дехидроаскорбата до 2,3-дикето-Л-гулонске киселине, која се затим, декарбоксилише у пентозу Л-ксилулозу. С друге стране, аскорбат се може конвертовати до Л-дехидроаскорбата уклањањем два електрона и два протона. Овај процес се одиграва у две фазе. У првој фази као инермедиијер настаје реактивна врста кисеоника – радикал семидехидроаскорбата. Након уклањања још једног електрона он даје Л-дехидроаскорбат. Надаље, сам семидехидроаскорбат може подлећи диспропорцији, при чему два молекула семидехидроаскорбата дају молекул аскорбата и молекул Л-дехидроаскорбата. Код људи је превођење аскорбата у Л-дехидроаскорбат реверзибилно, и у одређеном степену катализовано ензимом дехидроаскорбат-редуктазом. Овај ензим користи редуковани глутатион (GSH) као супстрат, а продукти његове активности су аскорбат и оксидовани глутатион (GSSG). Оксидовани глутатион је даље супстрат за глутатион редуктазу која користи  $NADPH^+ + H^+$  за редукцију

оксидованог глутатиона. На тај начин се формира циклус у коме се редуковани глутатион и  $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$  користе за превођење Л-дехидроаскорбата до аскорбата.

Екскреција витамина Ц и његових метаболита код људи се одвија путем урина.

Физиолошка улога витамина Ц је учешће у оксидо-редукционим процесима ћелија. Л-аскорбинска киселина је доминантан хидросолубилни антиоксиданс (у екстрацелуларној течности, цитосолу), где се налази у редукованом (аскорбинска киселина) и оксидованом облику (дехидроаскорбинска киселина). Пошто лако отпушта два водоникова атома, аскорбинска киселина има улогу снажног редокс система. Хидроксилне групе на  $\text{C}_2$  и  $\text{C}_3$  молекулу аскорбинске киселине способне су да отпуштају и примају водоник. У присуству оксидишућих средстава, Л-аскорбинска киселина се оксидује у дехидроаскорбинску киселину, која може поново да се редукује у енолни облик Л-аскорбинске киселине. Ова реверзибилна реакција (редокс систем витамина Ц) обезбеђује значајну улогу аскорбинској киселини у оксидо-редукционим реакцијама у организму.

Међутим, витамин Ц се лако разграђује и смањује своју биолошку вредност при високој температури, у алкалној средини, у присуству тешких метала, ултраљубичастог зрачења и атмосферског кисеоника.

Редукциона способност аскорбинске киселине са потенцијалом водоника од 0.08 V је основ њеног антиоксидационог дејства (73). Антиоксидациона способност Л-аскорбинске киселине заснована је на њеној способности да неутралише многе интермедијере и продукте слободно-радикалских процеса, при чему из ових инермедијера настају нерадикални продукти, а витамин Ц оксидацијом прелази у семидехидроаскорбинску киселину, која се даље оксидује у дехидроаскорбинску киселину (8). Витамин Ц редукује пероксил радикал ( $\text{LOO}\cdot$ ), реагује са  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{HO}_2\cdot$  и  $\text{HO}\cdot$ , као и са хипохлорном киселином ( $\text{HOCl}$ ), неутралише  $^1\text{O}_2$  (73,198) и штити  $\beta$ -каротен од оксидације (69).

Аскорбинска киселина је најбржи скевенџер кисеоничких радикала и најефикаснија је у супресији оксидације у односу на друге неензимске антиоксидансе (токоферол, каротеноиде, билирубин, мокраћну киселину, протеинске тиоле). Витамин Ц је врло ефикасан инхибитор липидне пероксидације у *in vivo* условима. Улога аскорбинске киселине је посебно детаљно испитана у антиоксидационој заштити липопротеина мале густине (LDL). Антиоксидациони ефекат витамина Ц у спречавању настанка оксидационо модификованог LDL-а се дешава у два корака, додавањем по једног електрона и то прво у аскорбил радикал, а затим у дехидроаскорбат. У овом процесу аскорбат ослобађа два атома водоника који реагују са пероксил радикалом, формирајући нерадикалски продукт – хидропероксид. „Хватање“ пероксил радикала спречава дејство овог радикала на LDL и друге липопротеине плазме.

Витамин Ц такође штити ћелијске мембране од пероксидације, тако што учествује у регенерацији витамина Е и тиме повећава његову ефикасност у прекидању ланца пероксидације липида (73). Витамин Ц обнавља  $\alpha$ -токоферол од  $\alpha$ -токоферокси радикала и на тај начин обнавља антиоксидациону способност липосолубилном витамину Е.

Аскорбат се активно секретује у очну водицу, од стране цилијарног епитела. Овај активни транспорт омогућује да концентрација аскорбата буде 10-20 пута већи у очној водици, него у плазми (82). Очна водица је главни извор аскорбинске киселине за друге структуре ока. Многе функције аскорбинске киселине у оку проистичу из њених редокс особина. Аскорбат/дехидроаскорбат систем је повезан и са хексозо-монофосфатним шантом, где доприноси одржавању нивоа редуковане форме пиридин нуклеотида, а самим тим и одржавању нивоа редукованог глутатаиона. Најважнија улога аскорбата је у заштити структура ока (нарочито сочива) од оксидационог,

односно фотооксидационог оштећења. Бројна испитивања су потврдила да дневни организми имају много веће концентрације витамина Ц у структурама ока, у односу на организме који су активни ноћу (82), што може бити значајно за адаптацију и заштиту ока од соларне радијације, јер континуирано излагање светлости генерише различите реактивне кисеоничке врсте: синглет кисеоник, супероксид анјон,  $H_2O_2$  и хидроксил радикал у интраокуларној средини (101).

У сочиву се налази аскорбат у високој концентрацији, као и у очној водици (1-2 mM), захваљујући активном транспорту из плазме, преко очне водице. Претпоставља се, да се транспортује у сочиву у оксидованој форми, као дехидроаскорбат и конвертује се у редуковану форму у сочиву, дејством аскорбат редуктазе и у присуству редукованог глутатиона. Ова редукција дехидроаскорбинске киселине у мање дифузибилну аскорбинску киселину, доприноси „задржавању“ аскорбата у сочиву, где има важну функцију антиоксиданса. У сочиву аскорбинска киселина превенира UV радијацијом изазвано оштећење катјонских пумпи и смањује фотопероксидацију мембрана.

Бројне епидемиолошке студије указују на корелацију између смањених количина аскорбинске киселине у сочиву и неких типова катаракте (218), што се налази и код старијих сочива.

Витамин Ц поседује и антиоксидационе, али и прооксидационе особине. У ком правцу ће се одвијати дејство витамина Ц зависи од концентрације самог витамина Ц, кисеоника и присуства металних јона.

Током живота у сочиву се акумулирају оксидационо измењени сочивни протеини. Ова модификација сочивних кристалина води ка формирању протеинских агрегата, велике молекулске масе, што доприноси развоју катаракте. Неке студије наводе и аскорбат као узрочни фактор ове модификације протеина (139). Аскорбат у неким условима може деловати као прооксиданс и учествовати у стварању реактивних радикала кисеоника. Овакву реакцију може изазвати сунчева светлост или може бити резултат метал-катализоване оксидације. У присуству метала (гвожђа или бакра) и кисеоника, аскорбинска киселина се оксидује у дехидроаскорбат, при чему се метал редукује и настаје  $H_2O_2$ . Водоник-пероксид даље, може реаговати са редукованим металом продукујући хидроксил радикал или друге реактивне кисеоничке радикале (82).

Реакција сочивних протеина са аскорбинском киселином у *in vitro* условима, у присуству метала (бакра или гвожђа), индукује многе протеинске модификације, које су уочене и код катарактних сочива. Аскорбат формира коваленте везе са кристалинима сочива у *in vitro* условима, што смањује растворљивост протеина (165,201). Ове везе кроз "Amadori" реаранжирање формирају браон продукте, што је нарочито карактеристично за брунесцентну катаракту.

Поменуто указује на потенцијалну улогу аскорбинске киселине у модификацији сочивних протеина током развоја катаракте. Међутим, овакве реакције настају када чиниоци који доводе до оксидационих промена (оштећења), превазиђу капацитет антиоксидационих механизма, код измењеног метаболизма метала или када је механизам одржавања редуковане форме аскорбинске киселине компримован. Код старијих и катарактних сочива смањује се активност ензима аскорбат редуктазе и количина редукованог глутатиона, па је последично смањена и редукција витамина Ц до аскорбинске киселине.

У условима хроничног оксидационог стреса (као што је дијабетес мелитус, хронична изложеност UV зрачењу, старење), повећана је количина дехидроаскорбата у сочиву (218), јер нема могућности редукције у аскорбинску киселину због смањене количине редукованог глутатиона, нарочито у нуклеусу сочива због формирања неке

врсте транспортне баријере (207). Други разлог за смањену количину редукованог глутатиона у сочиву је и мањак хексозо-монофосфатног шанта, неопходног за синтезу  $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$ , који је неопходно потребан за функцију глутатаион редуктазе (88). Могуће је да низак ниво редукованог глутатиона у нуклеусу сочива доводи до повећања деградационих продуката аскорбинске киселине (дехидроаскорбинске киселине (ДХА), 2,3-дикетоглуконске киселине (ДКГ), Л-ксилосона (L-xylulose) и Л-треозе (L-threose)). Ови интермедијери су много потентнији гликациони агенси и могу модификовати протеине сочива много брже од глукозе (133). Аскорбатом изазвана модификација кристалина сочива може довести до њихове агрегације и преципитације (139).

## 2.14. Промене у сочиву изазване процесом старења

Сочиво је ектодермалног порекла и током читавог живота ствара нове ћелије (67). Али, сочиво своје старе, неживе ћелије не одбацује, већ их задржава унутар капсуле читавог живота и због тога непрекидно расте. Међутим, током живота сочивне структуре истовремено подлежу и променама карактеристичним за процес старења. Многа испитивања везана за ову проблематику показују да су бројне промене сочива током старења последица његових оксидационих оштећења.

Процес старења утиче на сочиво и доводи до специфичних промена у свим његовим структурама. Централне епителне ћелије подлежу ограниченом броју митоза, па се њихов број смањује с годинама (67). Ове ћелије постају шире, плоснате и показују већу електронску густину, због промена у органелама. Сочивни ензими показују велику лабилност с годинама, нарочито у кортикалном делу, где долази до повећања њихових инактивних форми. Смањује се број нуклеарних ензима, као и њихова активност. Активност епителне глутатион-редуктазе, важне за регенерацију редуковане форме глутатиона, је смањена у старијем сочиву. Такође, у хуманом сочиву се смањује концентрација редукованог глутатиона с годинама, због смањења активности ензима  $\gamma$ -глутамил-цистеин синтетазе (37).

Ниво глутатиона је нижи у нуклеусу адултног сочива у поређењу с кортексом (142). Смањује се и активност ензима неопходних за регенерацију редукованог глутатиона. Уопштено, смањује се антиоксидациони капацитет, а повећавају последице оксидационог оштећења сочивних компоненета.

У сенесцентном сочиву је смањена и активност супероксид дизмутазе.

Експериментална оксидација сочивних мембранских тиола узрокује повећање мембранске пропустљивости, што се дешава и са старењем сочива, а и веома је изражено код кортикалне катаракте (37). У хуманом сочиву доказана је оксидација мембранских тиола, која се јавља са старењем и код катаракте.

Капсула сочива постаје дебља током живота (245), а смањује се и њена еластичност.

Фотооксидациони процеси постепено оштећују компоненте липопротеинских мембрана сочивних влакана и последично настају промене у цитоскелету мембрана и липидном слоју. Оксидациони процеси оштећују мембранске липиде (15,155). Повећава се садржај холестерола у односу на фосфолипиде. Смањују се мембрански потенцијал и отпор, а повећава се концентрација  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{++}$  у ћелијама.

С годинама се повећава садржај суве масе у сочиву, сочивна влакна се слажу врло густо у нуклеусу, максимално редукујући екстрацелуларни простор (177). На овај начин се одржава интегритет и провидност сочива. Ове промене узрокују да сочиво после 40. године живота постане тврђе (клинички нуклеарна склероза) (190), смањује му се еластичност и слаби способност акомодације (102).

Промет протеина у нуклеусу сочива се смањује с годинама и веома је смањен у адултном сочиву. Такође, дешавају се промене у структури кристалина, које мењају растворљивост кристалина и утичу на формирање протеинских агрегата. Повећава се ниво у води нерастворљивих кристалина уз образовање растворљивих и нерастворљивих агрегата сочивних кристалина, велике молекулске масе (HMW) (36). С годинама се смањује количина  $\gamma$ -кристалина у нуклеусу сочива. Бројне студије су показале да с годинама протеини хуманог сочива подлежу бројним молекуларним и макромолекуларним променама, укључујући рацемизацију, деаминацију и оксидацију аминокиселина, акумулацију ковалентно везаних флуоресцентних компоненета, као и агрегацију и инсолубилизацију (232).

После 65. године живота у сочиву расте дијапазон и количина селективне апсорпције светла (36). Апсорпција плаве светлости сунчевог спектра настаје због сакупљања оксидационог производа триптофана – жутог пигмента N-формил кинуренина и још неких продуката неензимске гликооксидације протеина (105,190). С годинама јавља се потреба за светлом већег интензитета за стимулацију фоторецептора.

## 2.15. Сенилна катаракта

Дисфункција сочива изазвана замућењем назива се катаракта. Термин сенилна или *age related* катаракта се користи за замућено сочиво код људи после 45. године живота, без познатог узрока, као што су траума, инфламација, лекови, наслеђе и друго.

Епидемиолошки, катаракта је најчешћи узрок излечивог слепила код људи у читавом свету. "Age related" катаракта је узрочник 42% случајева слепила уопште, а епидемиолошка испитивања говоре да данас у свету од катаркте болује око 50 милиона људи.

На развој катаракте утичу бројни фактори. Један од њих је гликационо оштећење сочивних протеина, кроз продукцију реактивних радикала кисеоника. Бројна истраживања потврђују да слободни радикали кисеоника доприносе оштећењу сочивних протеина. Претпоставља се да сочивни пигменти у присуству UV светлости могу продуковати реактивне кисеоничке врсте. Сматра се да кумулативни и удружени ефекат сунчевих зрака и реактивних кисеоничких врста има великог значаја у појави и развоју катаркте.

### 2.15.1. Типови катаракти

Постоји неколико система за градирање катаракти. Они се заснивају на процени степена густине, локализацији и интензитету замућености, као и боје нуклеарне и субкапсуларне катаракте. Један од новијих система класификације опациитета сочива и опште прихваћен, је систем LOCS I и II (*Lens Opacities Classification Systems*) (50), мада постоје и други: јапанске епидемиолошке студијске групе, *Oxfordski*, *Wilmerov*, *Wisconsin* и други.

Обично се на основу локације замућења класификују као: кортикална, нуклеарна, постериорна субкапсуларна и мултипла (мешовита) катаракта.

#### 2.15.1.1. Кортикална катаракта

Кортикална катаракта се карактерише појавом клинастих замућења у кортексу сочива, која се са периферије пружају према центру, односно према предњем и задњем



сочивном полу. Временом опациности постају бројнији, већи и спајају се међусобно. Даље, повећава се садржај воде у сочивним влакнима кортекса, што доводи до њиховог бубрења и међусобног одвајања. Настаје и тзв. ламеларна сепарација, тј. одвајају се слојеви влакана међу собом. Влакна подлежу протеолизи и читав кортекс је размекшан.

Уколико се не екстрахује, кортикална катаракта временом подлеже ликвефакцији.

Кортикална и мешовита катаракта су типови који се чешће јављају код дијабетичара. Појава кортикалне катаркате се везује и за појачану експозицију UV зрацима (53,59,154). Неке студије указују да UVB зраци, који имају мању таласну дужину од UVA зрака, али садрже већу количину енергије доводе до интензивнијих оштећења структура ока, док други истраживачи сматрају да хронично излагање UVA зрацима доводи до продукције реактивних кисеоничких радикала и оштећења сочивних структура. Протеини сенесцентног хуманог сочива апсорбују више UVA зрака, него UVB, што указује да UVA зраци могу допринети у патогенези кортикалне катаракте (63).

Да већа доза UV зрачења носи ризик за појаву и развој кортикалне и задње субкапсуларне катаракте потврђено је и код експерименталних животиња, код којих је катаракта изазвана UV зрачењем (203).

#### *2.15.1.2. Нуклеарна катаракта*

Замућеност сочива је код нуклеарне катаракте локализовано централно. Иницијални опациности се јављају у ембрионалном нуклеусу, затим се даље проширују, захватају све једарне делове, а временом и околни кортекс. Карактеристика ове катаракте је да баланс воде у сочиву остаје непромењен, али се повећава количина инсолубилних протеина.

Нуклеарну катаркту карактерише тврд сочивни нуклеус и најчешће пигментован (црвенкаста, браон или готово црна боја) (230). Права природа хромофора још увек није позната, мада већина истраживача сматра да у појави хромофора и обојености нуклеуса сочива имају значаја продукти гликозилације, као и рацемизације неких аминокиселина. Неке студије наводе да се нуклеарна катаракта чешће јавља код пушача (96).

Утицај оксидационог стреса у патогенези нуклеарне катаракте испитиван је код пацијената који су били на терапији хипербаричним кисеоником. Ова студија је испитивала 25 пацијената, где су се код свих, после терапије хипербаричним кисеоником, развиле миопијске промене, а код петнаесторо пацијената дијагностикована је нуклеарна катаракта са редукованим визусом (175).

Заморчићи који су вишеструко излагани 100% кисеонику, показали су бржу матурацију катаракте од оних који нису били изложени овом стресу (29).

#### *2.15.1.3. Задња субкапсуларна катаракта*

Формирање задње субкапсуларне катаракте започиње дисплазијом сочивних ћелија у подручју екватора сочива. Током диференцијације у сочивна влакна, ове ћелије добијају неправилан облик и показују неправилну ротацију и елонгацију. На задњем полу се проширују у овалне, мехурасте или Wedl-ове ћелије. У подручјима замућења запажају се зоне ликвефакције, које уз друге, структурне промене указују на покушаје репарације насталих оштећења. Нека истраживања указују да појаву задње

субкапсуларне катаракте може индуковати UV зрачење (59), јонизујуће зрачење и кортикостероиди (Italian-American cataract study group, 134). Задња субкапсуларна катаракта је често пигментована.

#### 2.15.1.4. Предња субкапсуларна катаракта

Предња субкапсуларна катаракта настаје метаплазијом централне зоне епителних ћелија сочива у вретенасте ћелије, сличне миофибробластима. Временом се од ових ћелија и њиховог екстрацелуларног матрикса богатог колагеном, као и сопствене базалне мембране, формира плоча између сочивне капсуле и епитела.

Структура промена и процеси који се дешавају сугеришу да предња субкапсуларна катаракта представља одговор сочива на трауматско или метаболичко оштећење.

## 2.16. Биохемијске промене у сочиву током развоја катаракте

Старење сочива је значајан фактор ризика у развоју катаракте. Промене се дешавају у сочиву које стари, одигравају се и током катарактогенезе, али интензивније.

Губитак транспаренције катарактног сочива је последица дезорганизације сочивних влакана, односно њихових ћелијских мембрана, сепарације сочивних влакана, као и настајања протеинских агрегата велике молекулске масе. Овоме доприноси и хидролиза молекула протеина због уласка воде у ћелије сочива (203). У сочивним влакнима се појављују густе инклузије, везикулизација и гранулираност цитоплазме.

"Age related" катаракту карактерише интензивна модификација сочивних протеина, која укључије обојеност, оксидацију, инсолубилизацију, образовање ковалентних веза, формирање протеинских агрегата и њихово везивање за мембране сочивних влакана. Нерастворљивост протеина у катарактном сочиву је последица денатурације и агрегације. Инсолубилни протеини су богати ковалентним везама и представљају половину укупних нуклеарних протеина код узнапредовале катаракте. Ковалентне везе су резултат оксидације сулфхидрилних група и реакције карбонила са аминокиселинским групама протеина. Око 90% протеинских тиол група нестаје код узнапредовале катаракте и више од пола метионинских резидуа у нуклеарним протеинима сочива је оксидовано у метионин-сулфоксид. Гама ( $\gamma$ ) кристалини на површини својих подјединица имају сулфхидрилне групе, које подлежу оксидацији и формирању протеинских агрегата, стварањем дисулфидних веза (37). Бројна испитивања су показала да реактивне кисеоничке врсте, а нарочито хидроксил радикал, изазивају оксидацију кристалина у хуманом катарактном сочиву (55,79). Утврђено је да 3-ОН кинуренин може допринети оксидацији аминокиселинских резидуа метионина и триптофана у кристалинима (120). Резидуе триптофана у  $\alpha$  и  $\beta$  кристалинима се у хидрофилном окружењу лако оксидишу. У хидрофобној средини до њих допиру  $H_2O_2$  и супероксид анјон. У протеинима између њих се стварају дисулфидне везе, као и са глутатионом и цистеином. На тај начин се мења терцијерна структура протеина и настају протеински агрегати. Они узрокују расипање светлости и смањење видне оштрине (245). Последица оксидационих оштећења је и инактивација ензима (137).

Такође, током катарактогенезе образује се нека врста транспортне баријере између нуклеуса и кортекса сочива (223).

"Age related" нуклеарну катаракту карактерише неколико степена обојености нуклеуса сочива: жута, браон, па чак и црна. Ова пигментација је узрокована протеинском модификацијом.

Смањена концентрација глутатиона у нуклеусу сочива је такође веома важан фактор у развоју "age related" катаракте.

Пермеабилност сочивне капсуле се мења код катарактног сочива и у корелацији је са садржајем воде у сочиву.

Ниво натријума и калцијума расте у ћелијама код кортикалне катаракте, док се њихова дистрибуција не мења код нуклеарне катаракте.

Катаракта узрокована хипербаричним кисеоником у експерименталним условима на животињама карактерише се описаним променама, губитком редукованог глутатиона и формирањем нерастворљивих протеина (77).

Лентикуларни, редокс активни метални јони, бакар и гвожђе, су важни у развоју "age related" нуклеарне катаракте, због могуће реакције са водоник пероксидом у Фентоновој реакцији (84) и формирања хидроксил радикала. Подаци који потврђују да је ниво јона гвожђа и бакра нижи у некатарактном сочиву, указују да метални јони, који посредују у продукцији  $\text{HO}\cdot$ , имају улогу у развоју сенилне нуклеарне катаракте (83). Први пут је 1998. године показан директан утицај хидроксил радикала у развоју "age related" нуклеарне катаракте (79).

Епидемиолошка и лабораторијска истраживања указују да је настанак катаракте у вези са фотооксидативним стресом (91,203,222). Протеини сочива који чине највећи део његове солидне масе имају дуг животни век и током старења долази до њиховог оштећења под дејством светлости, тачније ултраљубичастих зрака (79,192).

### 3. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Досадашња испитивања указују да оксидациона оштећења биомолекула односно процес липидне пероксидације, као и оксидационо оштећење протеина сочива, заузимају значајно место у патогенези сенилне катаракте. Ипак, постоји још непознаница о динамици овог процеса у зависности од етиолошких фактора, као и о улози појединих елемената антиоксидационе заштите у току развоја катаракте.

Имајући у виду наведено, поставили смо следеће циљеве испитивања:

- Испитивање интензитета липидне пероксидације у плазми и сочиву пацијената оболелих од катаракте, квантитативним одређивањем продуката оксидационог оштећења липида (коњугованих диена, липидних хидропероксида, малондиалдехида, као и испитивањем флуоресцентних (липо- и хидросолубилних) продуката липидне пероксидације).
- Испитивање статуса ензимског прооксиданса - ксантин оксидазе у плазми испитаника оболелих од сенилне катаракте.
- Испитивање ензимског механизма уклањања липидних хидропероксида одређивањем активности ензима глутатион пероксидазе и каталазе.
- Испитивање неензимског антиоксидационог капацитета плазме и сочива пацијената оболелих од сенилне катаракте, одређивањем концентрације непротеинских тиол једињења и концентрације протеинских тиол група, као и одређивањем концентрације аскорбинске киселине.
- Испитивање актуелног редокс стања пара аскорбат/дехидроаскорбат.
- Испитивање ензимског антиоксидационог капацитета плазме и сочива пацијената оболелих од сенилне катаракте, одређивањем каталитичке активности супероксид дизмутазе, глутатион пероксидазе, глутатион редуктазе и каталазе.
- Испитивање антиоксидационог капацитета плазме и сочива пацијената оболелих од сенилне катаракте одређивањем фериредуктивне способности узорка.
- На основу добијених налаза о интензитету процеса липидне пероксидације и промена ензимског и неензимског антиоксидационог статуса пацијената оболелих од катаракте, донети закључке о утицају оксидационих промена биомолекула и промена антиоксидационог статуса на развој сенилне катаракте.

## 4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА

### 4.1. Испитивани болесници

У презентованом раду испитиване су пацијенти (N=101) оболели од сенилне катаракте, хоспитализовани на одељењу за очне болести, болничког центра у Косовској Миртовици. Испитивање је вршено у периоду од септембра 2006. до јуна 2008 године.

Клиничко испитивање и лечење је обављено на одељењу за очне болести, болничког центра у Косовској Миртовици. Пре хирушке интервенције, испитаницима је урађен стандардни офталмолошки преглед оба ока. При томе је око са почетном катарактом било контрола, на основу кога смо одредили форму почетка матурне (тоталне) катаракте на другом оку.

Болесници (N=101) су подељени на основу матуритета катаракте у две групе. Прву групу су чинили пацијенти са почетном сенилном катарактом (N=41), а другу групу су чинили пацијенти (N=60) са дијагнозом матурне сенилне катаракте.

Међу пацијентима са почетном сенилном катарактом (N=41), 23 пацијента је имало почетну субкапсуларну катаракту, 9 пацијента почетну мешовито субкапсуларно-нуклеарну катаракту и 9 болесника је било са дијагнозом почетне мешовито нуклеарно-корикалне катаракте.

У групи са матурном сенилном катарактом (N=60), 19 пацијента је имало матурну катаракту која је почела као субкапсуларна, 15 пацијента матурну почелу као мешовито субкапсуларно-нуклеарна катаракта, 16 болесника је било са дијагнозом матурне катаракте, започелом као мешовито нуклеарно-кортикална и 10 пацијента је имало матурну, која је почела као кортикална катаракта.

Сваки пацијент је подвргнут хирушкој интервенцији екстракапсуларне екстракције са уградњом интраокуларног сочива на једном оку, у току које је узето сочиво и узорак очне воде (150 $\mu$ l). Одмах након екстракције, сочиво је урађано у Хартманов раствор, замрзавано и чувано на  $-20^{\circ}\text{C}$  до анализирања. Узорци очне воде су такође, одмах након узимања, замрзавани и чувани на  $-20^{\circ}\text{C}$  до испитивања.

У току хоспитализације, а пре хирушке интервенције, пацијентима је венепункцијом узимана крв у хепаринизованим епруветама (2 mg хепарина /10ml крви). Плазма је одвајана након центрифугирања на 3500 obrt/min у току 10 минута, замрзавана и чувана на  $-20^{\circ}\text{C}$  до испитивања.

### 4.2. Биохемијске анализе испитиваног материјала

Биохемијска испитивања плазме, хомогената сочива и очне воде обављена су на Институту за биохемију, Медицинског факултета Приштина, са седиштем у Косовској Миртовици. Све хемикалије коришћене за прављење раствора биле су квалитета pro analysi степена чистоће.

#### 4.2.1. Припрема хомогената сочива за анализе

Најпре је измерена сува тежина сочива (изражено у грамима ткива). Затим су сочива хомогенизована у калијум-фосфатном пуферу (KPi) 0.02 mol/L, pH 7.4 са 0.134 mol/L KCl. Хомогенат је центрифугиран у току 10 минута на 3500 obrt/min, а бистар супернатант је коришћен за анализе.

#### 4.2.2. Одређивање концентрације протеина сочива и очне водице

За одређивање концентрације протеина у сочиву и очној водици коришћена је Lowry-ева метода, модификација по Reider-у (143), уз хумани албумин концентрације 1.0 g/L као стандард.

Folin-Ciocalteu-ов фенолни реагенс, фирме МОЛ Београд, је пре рада разређиван дестилованом водом на основу претходне титрације концентрованог реагенса. Апсорбанса насталог обојеног производа мерена је на  $\lambda = 700 \text{ nm}$  и пропорционална је концентрацији протеина до 1.30 g/L. Узорци са већом концентрацијом протеина разређивани су физиолошким раствором NaCl и поступак је понављан, а разређење је увођено у формулу за израчунавање концентрације. Концентрација укупних протеина рачуната је по формули:

$$\text{proteini (g/L)} = \frac{A \text{ analize}}{A \text{ standarda}} \times 1.0 \text{ g/L}$$

#### 4.2.3. Одређивање производа липидне пероксидације

У циљу истраживања интензитета процеса липидне пероксидације у испитиваном материјалу, одређивана је концентрација малондиалдехида (МДА), концентрација коњугованих диена и испитивани су липосолубилни и хидросолубилни, флуоресцентни производи липидне пероксидације.

##### 4.2.3.1. Одређивање концентрације коњугованих диена

Коњуговани диени настају издвајањем атома водоника из несатурисаних липида и укључени су у формирање и пропагацију липидних радикала. Реаранжирање двогубих веза у полинесатурисаним масним киселинама, резултира формирањем коњугованих диена, чија је карактеристика интензивна апсорпција близу 233 nm.

Одређивање концентрације коњугованих диена вршено је спектрофотометријски (181,212) у циљу истраживања интензитета процеса липидне пероксидације.

Мешавини (1.5 ml) етанол/етра = 3:1 додавана је одговарајућа запремина узорка, 0.5 mL хомогената сочива односно 0.05 ml плазме. Садржај је вортексиран 1 минут на Вортекс мешалици, а затим центрифугиран 10 минута на 3000 обрт/мин. Слој органског раствора је пребачен у кварцне кивете. Апсорбанса етанол/етар фракције је читана спектрофотометријски на 233 nm, према слепој проби (етанол/етар = 3:1), а количина коњугованих диена је израчунавана на основу моларног апсорпционог коефицијента, који на таласној дужини 233 nm износи  $2.8 \times 10^4 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  (14). Резултати су изражени су у nmol/ml плазме односно nmol/g ткива сочива.

##### 4.2.3.2. Одређивање концентрације липидних хидропероксида

Тест са тиобарбитурном киселином је једна од метода коришћена за детекцију оксидованих липида. Липидни хидропероксиди не могу бити издвојени комплетно од секундарних продуката липидне пероксидације током једноставне ТБА реакције. За одређивање липидних хидропероксида, потребно је одвојити их од секундарних продуката, загревањем и додавањем одређеног катализатора. Јони гвожђа су ефикасни катализатори у процесу раздвајања хидропероксида (9). Из тог разлога, за одређивање липидних хидропероксида ТБА тестом или тзв. концентрације  $\text{Fe}^{+2}$ -индукованог

малондиалдехида као катализатор је коришћен  $1\mu\text{mol Fe}^{+2}$ , употребом 20  $\mu\text{l}$  дневно свежег воденог раствора  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , концентрације 50  $\text{mmol/L}$ .

Узорак је инкубиран 15 минута на  $37^\circ\text{C}$  са раствором феро соли (9), а затим је изведена обојена реакција помоћу тиобарбитурне киселине (130). Интензитет насталог реакционог продукта очитан је на  $\lambda = 532\text{ nm}$ . Концентрација липидних хидропероксида израчунавана на основу моларног апсорпционог коефицијента реакционог продукта који на таласној дужини од 532  $\text{nm}$  износи  $1.56 \times 10^5\text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ . Резултати су изражени као  $\mu\text{mol/L}$  плазме, односно  $\text{nmol/gr}$  ткива сочива.

#### 4.2.3.3. Одређивање концентрације малондиалдехида (МДА)

Малондиалдехид (МДА) је релативно стабилан нискомолекулски продукт липидне пероксидације, те се његова концентрација најчешће и одређује у циљу истарживања процеса липидне пероксидације у ткивима и телесним течностима.

Концентрација МДА одређивана је колориметријском реакцијом, помоћу тиобарбитурне киселине (2-тиобарбитурна киселина, Sigma Chemical USA) по методи Ledwozyw-a и сарадника (130).

При повишеној температури, у киселој средини, један молекул малондиалдехида (МДА) реагује са два молекула 2-тиобарбитурне киселине (ТБА) и гради црвено обојен МДА – ТБА комплекс. Настали триметински комплекс има максимум апсорбансе на  $\lambda = 532\text{ nm}$ . Моларни апсорпционм коефицијент за МДА–ТБА комплекс на таласној дужини од 532  $\text{nm}$  износи  $1.56 \times 10^5\text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

Концентрација МДА у узорку је израчунавана на основу моларног апсорпционог коефицијента и услова у реакционој смеси, а изражавана је као  $\mu\text{mol/L}$  плазме, односно  $\text{nmol/gr}$  ткива сочива.

#### 4.2.3.4. Процент $\text{Fe}^{+2}$ -индукованог малондиалдехида узорка

Израчунаван је по формули:

$$\% \text{индукције МДА} = \frac{\text{индуковани МДА} - \text{неиндуковани МДА}}{\text{индуковани МДА}} \times 100\%$$

#### 4.2.3.5. Одређивање флуоресцентних продуката липидне пероксидације

У реакцији продуката липидне пероксидације, малондиалдехида са аминок групама протеина, слободним аминок киселинама или нуклеинским базама, продукују се флуоресцентни продукти липидне пероксидације, познати као коњуговане Schiff-ове базе са  $\text{RN}=\text{CHCH}=\text{CHNHR}'$  (N,N' – 1-амино-3-иминопропени) (213). Када се ови продукти ексцитирају на 360  $\text{nm}$  максимум флуоресценције постижу између 430-440  $\text{nm}$ .

Флуоресцентни продукти липидне пероксидације (липосолубилни и хидросолубилни) формирану током пероксидационих промена биолошких мембрана одређивани су спектрофлуорометријском анализом (61,197).

#### 4.2.3.5.1. Одређивање липосолубилних флуоресцентних продуката липидне пероксидације

Поступак одређивања липосолубилних флуоресцентних продуката се наставља на описани поступак одређивања концентрације коњугованих диена, тако што се органском екстракту додаје 2 ml етанол/етра = 3 : 1, садржај се вортексира 1 минут, а затим центрифугира 10 минута на 3000 обрт/мин. Етанол/етар фракција (1.5 ml) се пипетира у кварчне кивете и читава се интензитет флуоресценце на спектрофлуориметру, на таласној дужини 360/430 (ексцитација/емисија) nm. Флуоресценца липосолубилних продуката је изражена релативним јединицама флуоресценце (FI) на милилитар плазме (FI/ ml).

#### 4.2.3.5.2. Одређивање хидросолубилних флуоресцентних продуката липидне пероксидације

Поступак одређивања хидросолубилних флуоресцентних продуката се наставља на описани поступак одређивања концентрације коњугованих диена, тако што се талогу, након одвајања етанол/етар фракције за одређивање коњугованих диена и липосолубилних флуоресцентних продуката, додаје 2.0 ml 1.5% SDS-PBS-а (PBS је 0.17 mol/L фосфатни пуфер рН 7.4 и физиолошки раствор у запреминском односу 3:1, у коме је растворен SDS (содиум додецил сулфат; C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>OSO<sub>3</sub>Na). Садржај се вортексира 5 минута, а затим центрифугира 10 минута на 3000 обрт/мин. Бистар супернатант (1.5 ml) се пипетира у кварчне кивете и читава се интензитет флуоресценције на спектрофлуориметру, на таласној дужини 360/430 (ексцитација/емисија) nm. Флуоресценца хидросолубилних продуката је изражена релативним јединицама флуоресценце (FI) на милилитар плазме (FI/ ml).

#### 4.2.4. Одређивање активности прооксидационог ензима - ксантин оксидазе

Активност ксантин оксидазе (EC 1.17.3.2) одређивана је спектрофотометријски, на основу промене апсорбансе на 293 nm, при прелазу хипоксантина у мокраћну киселину (26).

Реакциона мешавина садржи 1000 µL супстрат/пуферног раствора (0.05 mol/L калијум-фосфатни пуфер рН 7.5 у коме се налази хипоксантин (C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O) у концентрацији 1 mol/L) и 50 µL узорка. Након инкубације узорака 10 минута на 37°C, реакција се прекида додавањем 1000 µL 2 mol/L HClO<sub>4</sub> и узорци се центрифугирају на 3000 обрт/мин у току 10 минута. Мери се апсорбанса реакционог продукта (мокраћне киселине) на 293 nm.

Активност ксантин оксидазе израчунавана је на основу моларног апсорпционог коефицијента продукта реакције на 293 nm ( $1.26 \times 10^4 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) и услова у реакционој смеси, а изражена је као U/L за плазму и у специфичним јединицама активности на mg протеина сочива.

#### 4.2.5. Одређивање неензимских и ензимских антиоксиданаса

##### 4.2.5.1. Одређивање концентрације аскорбинске киселине

Концентрација укупног витамина Ц одређивана је методом са 2,4-динитрофенилхидразином (208), који у киселој средини гради обојени бис-2,4-динитрофенилхидразон аскорбинске киселине. Овом методом одређује се



концентрација укупног витамина Ц, у форми аскорбата и дехидроаскорбата, а затим се у обојеној реакцији истовремено одређују како већ постојећи тако и накнадно формиран дехидроаскорбат.

Протеини узорка се уклањају додавањем четвороструког волумена 0.61 mol/L трихлорсирћетне киселине, а обојена реакција изводи са 1.2 ml супернатанта у присуству 0.4 ml DTBS реагенса (32.85 mmol/L тиоуреје, 1.88 mmol/L бакар сулфата, 90 mmol/L 2,4-динитрофенилхидразина и 4.5 mol/L сумпорне киселине).

Након инкубације од 180 минута на 37°C, узорци се охладе 10 минута на леду, дода им се по 2 ml 12 mol/L сумпорне киселине, а апсорбанса обојеног продукта прочита на  $\lambda = 520$  nm према слепој проби реагенса, која уместо супернатанта узорка садржи трихлорсирћетну киселину. На исти начин обрађивани су и стандарди витамина Ц (свеже припремани водени раствори аскорбинске киселине концентрације 180 - 240  $\mu\text{mol/L}$ ). Концентрација укупног витамина Ц рачуната је по формули:

$$\text{Укупни витамин Ц } (\mu\text{mol/L}) = \frac{A \text{ analize}}{A \text{ standarda}} \times C \text{ standarda}$$

Концентрација дехидроаскорбата у узорку одређивана је истом методом, уз изостављање раствора бакар сулфата у DTBS реагенсу, а из разлика израчунавана концентрација аскорбата.

#### 4.2.5.2. Одређивање концентрације укупних непротеинских тиол једињења

Концентрација укупних непротеинских тиол једињења у узорку одређивана је у реакцији [5.5' – дитиобис – (2-нитро-бензоеве киселине)] (ДТНБ) (Елманов реагенс), након уклањања протеина перхлорном киселином (54).

Принцип ове методе је заснован на реакцији ДТНБ и СХ група ГСХ, при чему настаје обојени продукт дианјон 2-нитро-5-тиобензоева киселина.

Метода заснована на овом принципу модификована од стране Sedlak-а и Lindsay-а (194) користи се за одређивање ГСХ у ткивима.

Анализираном узорку (0.2 ml) додавана је иста запремина 1 mol/L перхлорне киселине у 2 mmol/L динатријум ЕДТА-ту, а исталожени протеини уклањани су центрифугирањем 15 минута на 3000 обрт/мин. Супернатанту (0.2 ml) додати су 0.8 ml 0.3 mol/L динатријумхидроген фосфата и 0.2 ml Елмановог реагенса (1 mmol/L [5.5' – дитиобис – 2-нитро-бензоева киселина] у 34 mmol/L натријум цитрату). Апсорбанса насталог продукта очитана је одмах на спектрофотометру на  $\lambda = 412$  nm уз слепу пробу реагенса.

Концентрација непротеинских тиол једињења изражавана је у  $\mu\text{mol/L}$  и израчунавана је на основу моларног апсорпционог коефицијента насталог 5-тио-2-нитробензоата, који на  $\lambda = 412$  nm износи  $\epsilon = 1.36 \times 10^4 \times L \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  (54).

#### 4.2.5.3. Одређивање концентрације протеинских тиол група

Употребом Елман-овог реагенса (ДТНБ) спектрофотометријски је одређивана концентрација протеинских тиол једињења (113).

Протеинске тиол групе (П-СХ) редукују ДТНБ [5.5' – дитиобис – (2-нитро-бензоева киселина)], стварајући жуто обојен ањон 5-тио-2-нитробензоеве киселине (TNB<sup>-</sup>) (реакција 1):



Моларни апсорпциони коефицијент анјона 5-тио-2-нитробензојеве киселине на таласној дужини од 412 nm износи  $\epsilon = 1.36 \times 10^4 \times \text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

Поступак је извођен као за одређивање концентрације укупних непротеинских тиол једињења (тачка 4.2.5.2. Материјал и методе) описан за супернатант, без претходне депротеинизације узорка.

Концентрација протеинских тиол једињења изражавана је у  $\mu\text{mol/L}$  и израчунавана је на основу моларног апсорпционог коефицијента насталог 5-тио-2-нитробензоата, који на  $\lambda = 412 \text{ nm}$  износи  $\epsilon = 1.36 \times 10^4 \times \text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  (54).

#### 4.2.5.4. Одређивање каталитичке активности супероксид дизмутазе

Активност супероксид дизмутазе (EC 1.15.1.1) одређивана је спектрофотометријски, по методи Misra i Fridovich-a (160).

Ова метода за одређивање активности супероксид дизмутазе (СОД) се базира на инхибицији стварања адренохрома у току спонтане оксидације адреналина у базној средини.

Иницирајући догађај којим започиње ланчана реакција је једновалентна оксидација анјона адреналина изазвана металним катјоном или супероксид анјоном. Редуковани метални катјон, настао у току иницијације ланчане реакције може бити оксидован помоћу молекулског кисеоника, при чему такође настаје супероксид анјон.

Супероксид дизмутаза уклањањем супероксид анјона прекида ланчану реакцију аутооксидације адреналина и тиме стварање адренохрома. При томе је степен инхибиције стварања адренохрома сразмеран активности ензима.

Брзина стварања адренохрома се прати спектрофотометријски на  $\lambda = 480 \text{ nm}$ , на којој је моларни апсорпциони коефицијент за адренохром  $4.02 \times 10^3 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

Додавањем 200  $\mu\text{L}$  адреналина (Л-адреналин Д-хидрогентагтарат ( $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$ ) 7 mmol/L, водени раствор) реакционој мешавини, која се састојала од 1000  $\mu\text{L}$  пуфера (0.05 mol/L глицински пуфер (0.2 mol/L глицина и 0.2 mol/L NaOH) рН 10.2) и 20  $\mu\text{L}$  узорка, започета је реакција инхибиције спонтане оксидације адреналина. Реакција се одвијала на температур од 25°C. Брзина стварања адренохрома је праћена спектрофотометријски на  $\lambda = 480 \text{ nm}$  у трајању од 3 минута. Инхибиција спонтане оксидације адреналина је одређена у односу на вредност промене апсорбансе исте реакционе мешавине у коју је уместо плазме додавана дестилована вода (контрола).

Јединица активности супероксид дизмутазе (U) је дефинисана, као количина ензима која за 50% инхибира спонтану оксидацију адреналина у минути, у наведеним условима. Активност супероксид дизмутазе изражена је као  $U \times 10^3/\text{L}$  плазме, и у специфичним јединицама активности на mg протеина сочива.

#### 4.2.5.5. Одређивање каталитичке активности глутатион пероксидазе

Активност глутатион пероксидазе (GSH-Px) (EC 1.11.1.9) је одређивана помоћу кумолхидропероксида, као супстрата, методом Chin-a и сарадника (47).

Узорак (0.05 ml) помешан је са 0.75 ml 50 mmol/L TRIS-HCL пуфера, рН 7.6 (пуфер I) и термостатиран 5 минута на 37°C. У контролу је затим додато 0.1 ml GSH (0.006 g у 10 ml пуфера I), а у узорак 0.1 ml GSH и 0.1 ml кумолхидропероксида (0.05 ml у 10 ml метанола) и узорци поново термостатирани на 37°C, 5 минута.

Затим, је и у узорак и у контролу додато по 1 ml трихлорсирћетне киселине (ТСА 0.61 mol/L) и у контролу још 0.1 ml кумолхидропероксида. Охлађени узорци су центрифугирани на 3000 обрт/мин 10 минута.

Од обе пробе узето је по 1ml супернатанта и додато по 2 ml 0.4 mol/L TRIS-HCL пуфера рН 8.9 (пуфер II), 0.1 ml 5.5' – дитиобис – 2-нитро-бензоеве киселине (0.02 g DTNB у 5 ml пуфера II).

Апсорбанса реакционог продукта је мерена на 412 nm. Активност глутатион пероксидазе израчунавана је на основу моларног апсорпционог коефицијента продукта реакције ( $\epsilon = 1.36 \times 10^4 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) (194) и услова у реакционој смеси, а изражена је као U/L за плазму и у специфичним јединицама активности на mg протеина сочива.

#### 4.2.5.6. Одређивање каталитичке активности каталазе

Каталитичка активност каталазе (EC 1.11.1.6) одређивана је спектрофотометријски, UV методом по Аebi-у (2), помоћу  $\text{H}_2\text{O}_2$  као супстрата.

Одређивање је засновано на мерењу апсорбансе  $\text{H}_2\text{O}_2$  у UV – области између 230 и 250 nm. Дејством каталазе, водоник пероксид се разграђује, а активност каталазе је пропорционална смањењу апсорбансе с временом (22,146,169).

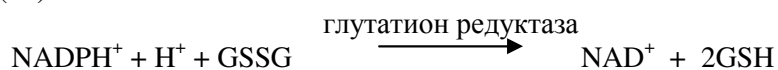
Супстрату 3.0 ml (калијум-фосфатни пуфер 50 mmol/L рН 7.0 и 0.175 ml 30 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  у 50 ml калијум-фосфатног пуфера) додато је 20  $\mu\text{L}$  узорка и мерена је апсорбанса на 240 nm.

Јединица активности каталазе (U) је дефинисан као количина ензима која каталише реакцију у којој се разлаже један  $\mu\text{mol}$  водоник пероксида у минути, на 25°C.

Активност каталазе израчунавана је на основу моларног апсорпционог коефицијента за  $\text{H}_2\text{O}_2$  на 240 nm ( $\epsilon = 4.36 \times 10^4 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) и услова у реакционој смеси, а изражена је као  $U \times 10^3/\text{L}$  плазме, и у специфичним јединицама активности на mg протеина сочива.

#### 4.2.5.7. Одређивање каталитичке активности глутатион редуктазе

Активност глутатион редуктазе (EC 1.6.4.2) одређивана је по методи Glatzle-а и сарадника (90).



По овој методи глутатион редуктаза катализује редукцију оксидованог глутатиона (GSSG) у присуству  $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$ . Оксидација  $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$  се прати мерењем промене апсорбансе на 340 nm.

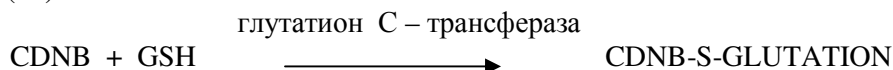
Реакција започиње додавањем одговарајуће запремине узорка (0.03 ml плазме, односно 0.05 ml хомогената сочива) реакционој мешавини (KPi 1 mol/L рН 7.6 који садржи 0.15% (w/V) BSA + 1 mmol/L NADPH + 2 mmol/L GS-SG). Прати се промена апсорбансе на 340 nm у току 3 минута. Каталитичка активност глутатион редуктазе је пропорционална смањењу апсорбансе NADPH мерене на 340 nm (146).

Јединица активности глутатион редуктазе (U) је дефинисан као активност ензима која каталише реакцију у којој се разлаже један  $\mu\text{mol}$   $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$  у минути.

Активност глутатион редуктазе израчунавана је на основу моларног апсорпционог коефицијента за  $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$  на 340 nm ( $6.22 \times 10^3 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) (38) и услова у реакционој смеси, а изражена је као U/L за плазму и у специфичним јединицама активности на mg протеина сочива.

#### 4.2.5.8. Одређивање каталитичке активности глутатион С – трансферазе

Активност глутатион С–трансферазе одређивана је праћењем брзине формирања коњугата глутатиона и 1-хлор-2,4-динитробензена (CDNB), спектрофотометријски на 340 nm (92).



У реакционој мешавини се налазило 0.5 ml фосфатног пуфера (KPi 0.5 mol/L pH 6.5), 0.1 ml 5 mmol/L CDNB, 0.1 ml 1 mmol/L GSH у KPi. Ензимска реакција започиње додавањем одговарајуће запремине узорка (100  $\mu\text{L}$  плазме, односно 25  $\mu\text{L}$  хомогената сочива) и прати се промена апсорбансе на 340 nm у току 3 минута. Мерена је и брзина реакције у одсуству узорка (контрола), јер и спонтано долази до коњугације између GSH и CDNB.

Активност глутатион С–трансферазе израчунавана је на основу моларног апсорпционог коефицијента за продукт реакције S-2,4-динитрофенилглутатион на 340 nm ( $9.6 \times 10^3 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) и услова у реакционој смеси, а изражена је као U/L за плазму и у специфичним јединицама активности на mg протеина сочива.

Јединица ензимске активности (U) је дефинисана као количина ензима која каталише формирање 1  $\mu\text{mol}$  коњугата S-2,4-динитрофенилглутатиона у минути.

#### 4.2.5.9. Одређивање фери-редуктивне способности плазме - *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP)*

Анализа ФРАП је колориметријска метода за испитивање скевенџерске способности антиоксиданаса. Базира се на способности антиоксиданаса да редукују  $\text{Fe}^{+3}$  из комплекса 2,4,6-фери-трипиридил-С-триазин (ТРТЗ) у  $\text{Fe}^{+2}$  (25).

ФРАП анализа је у ствари, метода за мерење фери редуктивне способности плазме, где се при ниском pH  $\text{Fe}^{+3}$  – ТРТЗ редукује у  $\text{Fe}^{+2}$  – ТРТЗ, при чему се формира интензивно плава боја са максимумом апсорпције на 593 nm.

За одређивање фериредуктивне способности испитиваног узорка користи се 1 ml радног ФРАП реагенса (припрема се мешањем 25 ml ацетатног пуфера (300 mmol/L pH 3.6), 2.5 ml раствора ТРТЗ (2,4,6-фери-трипиридил-С-триазин (ТРТЗ) 10 mmol/L у 40 mmol/L HCl) и 2.5 ml раствора  $\text{FeCl}_3$  (20 mmol/L) коме се дода одговарајућа запремина узорка (0.05 ml плазме, односно хомогената сочива или 0.02 ml очне воде). Реакциона мешавина се инкубира 6 минута на 25°C, затим се прочита апсорбанса на 593 nm, према слепој проби која садржи радни ФРАП реагенс.

Резултати редуктивне способности испитиваног узорка се изражавају у  $\mu\text{mol}$  према калибратору (калибратор  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  у распону од 100-2000  $\mu\text{L}$  у метаноу).

### 4.3. Статистичка обрада података

У обради резултата коришћени су дескриптивни статистички параметри: аритметичка средина и стандардна девијација (СД).

Тестирање статистичке значајности разлика између средњих вредности вршено је Студентовим т-тестом и АНОВА тестом. Критеријум за статистичку значајност је био  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ . За израчунавање корелација коришћене су методе за линеарну корелацију.

За статистичку обраду резултата коришћени су софтверски програми: SPSS и INSTAT.

## 5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Презентовани рад је обухватио испитивање показатеља активности слободних радикала и антиоксидационог капацитета 73 крвних плазми, 101 кортико-нуклеарног блока сочива и 18 очних водица болесника са сенилном катарактом (тачка 4.1. Испитивани болесници, Материјал и методе). Обрађени су подаци о општим (године, пол) и посебним (присуство других болести и навике) карактеристикама поменутих болесника из историја болести.

### 5.1. Учесталост других обољења код пацијената са сенилном катарактом

По претпоставци истраживања одређене хроничне болести могу бити од утицаја за настанак сенилне катаракте. Анализирањем постојања других болести код испитаника са сенилном катарактом, утврђено је 14 оболелих од дијабетес мелитуса, 82 оболелих од артеријске хипертензије и 47 пацијената са дијагнозом кардиомиопатије.

Табела 1. Учесталост системских обољења код болесника са сенилном катарактом

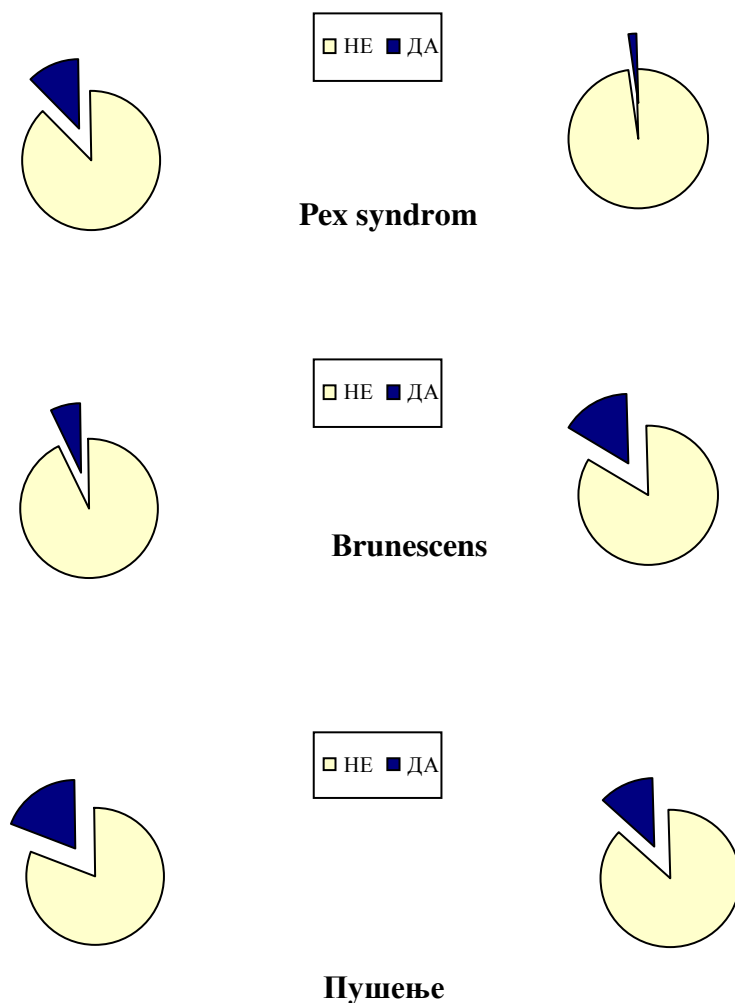
Системска обољења	група			
	почетна катаракта		матурна катаракта	
	N	%	N	%
<b>Дијабетес мелитус</b>				
НЕ	<b>36</b>	<b>87.8</b>	<b>51</b>	<b>85</b>
ДА	5	12.2	9	15
<b>Хипертензија</b>				
НЕ	12	29.3	19	31.7
ДА	<b>29</b>	<b>70.7</b>	<b>41</b>	<b>68.3</b>
<b>Кардиомиопатија</b>				
НЕ	<b>28</b>	<b>68.3</b>	<b>36</b>	<b>60</b>
ДА	13	31.7	24	40

На Табели 1, приказана је расподела одсуства и присуства дијабетес мелитуса код пацијената са почетном и матурном сенилном катарактом. Из података се јасно уочава, да са сигнификантном вероватноћом од 87.8% код болесника са почетном и 85.0% код болесника са матурном сенилном катарактом није присутан дијабетес мелитус. Упоредивањем болесника са почетном сенилном катарактом са пацијентима са матурном катарактом није добијена значајана разлика ( $\chi^2=0.160$ ,  $DF=1$ ,  $p=0.689$ ) учесталости обољевања од дијабетес мелитуса.

Другачији резултат је добијен посматрањем присуства артеријске хипертензије (табела 1) међу оболелим од сенилне катаракте. Код пацијената са почетном, у 70.7% случајева, односно матурном сенилном катарактом, у 68.3% случајева присутна је хипертензија. Применом статистичке процедуре доказано је да су обе групе, по питању присуства артеријске хипертензије, сличне ( $\chi^2=0.66$ ,  $DF=1$ ,  $p=0.797$ ).

По претпоставци истраживања и кардиомиопатија је обољење у чијем присуству постоје услови за настанак катаракте. На табели 1, приказана је расподела одсуства и присуства кардиомиопатије код пацијената са почетном, односно матурном сенилном катарактом. Применом статистичке процедуре доказано је да не постоји сигнификантна разлика између група ( $\chi^2=0.722$ ,  $DF=1$ ,  $p=0.396$ ) у фреквенци појаве кардиомиопатије.

Када се статистичка процедура за тестирање значајности разлика спроведе у оквиру групе пацијента са матурном катарактом добија се резултат по коме нема сигнификантне разлике у присуству или одсуству кардиомиопатије (60% не - 40% да, Студентов т тест  $p=0.056$ ). Резултат т теста ( $p=0.056$ ), "близак" је усвојеној граничној вредности сигнификантности ( $p<0.05$ ). Из овога следи да резултат за матурну катаракту није довољно убедљив и може се узети условно.



Графикон 1. Дистрибуција псеудоексфолијационог синдрома, брунесцентног замућења сочива и пушења код болесника са сенилном катарактом.

На графикону 1, приказано је присуство Pex syndrom-а, brunescens-е и конзумирања дувана – пушења код испитаника са сенилном катарактом.

Применом статистичке процедуре утврђена је значајно већа учесталост Pex syndrom-а ( $\chi^2=4.832$ ,  $DF=1$ ,  $p<0.05$ ) код болесника са почетном сенилном катарактом у односу на пацијенте са матурном катарактом, док се фреквенца појаве пигментоване (brunescens) катаракте ( $\chi^2=1.899$ ,  $DF=1$ ,  $p=0.168$ ), као ни учесталост пушења ( $\chi^2=0.697$ ,  $DF=1$ ,  $p=0.404$ ) нису разликовали зависно од степена матуриитета катаракте.

## 5.2. Резултати биохемијских испитивања плазме пацијената оболелих од сенилне катаракте

Презентовани рад је обухватио биохемијско испитивање крвне плазме 73 пацијената са сенилном катарактом и то 28 пацијената са дијагнозом почетне сенилне катаракте и 45 пацијената са матурном сенилном катарактом. Међу испитаницима код којих је урађено биохемијско испитивање плазме биле су 32 особе женског пола и 41 особа мушког пола. Просечна старост испитиване групе износила је 72.6 године ( $SD \pm 7.49$ ).

Табела 2. Старостна структура пацијената са сенилном катарактом

Група	Број	Ср $\pm$ СД	Доња граница	Горња граница
Почетна катаракта	28	72.64 $\pm$ 7.47	69.75	75.54
Матурна катаракта	45	72.49 $\pm$ 7.59	70.21	74.77

Просечна старосна доб пацијената по испитиваним групама, без обзира на пол, приказана је на табели 2. Применом Студентовог т-теста утврђено је да не постоји сигнификантна разлика између просечне старости пацијената са почетном (72.7 година), односно матурном (72.5 година) сенилном катарактом ( $t = 0.085$ ,  $DF=71$ ,  $p=0.933$ ).

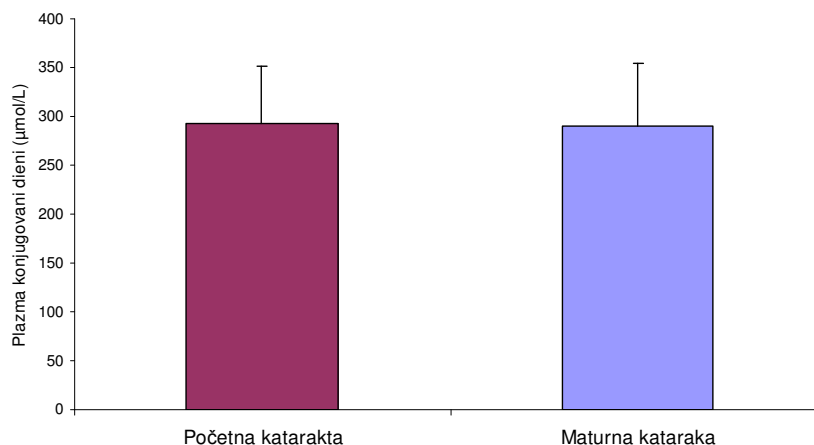
Табела 3. Полна структура испитаника са сенилном катарактом

	Почетна катаракта		Матурна катаракта		Укупно	
	Број	%	Број	%	Број	%
Женски	13	46.4	19	42.2	32	43.8
Мушки	15	53.6	26	57.8	41	56.2
Укупно	28	100	45	100	73	100

Структура испитаника по полу, унутар испитиваних група, приказана је на табели 3. Применом статистичке процедуре доказано је, да се групе са почетном и матурном сенилном катарактом, у односу на пол, сигнификантно не разликују на усвојеном нивоу поузданости  $p < 0.05$ , како унутар групе тако и између себе ( $\chi^2=0.124$ ,  $DF=1$ ,  $p=0.725$ ). Према добијеном резултату закључак је да су испитиване групе равноправне између себе, са сличном заступљеношћу мушког и женског пола.

### 5.2.1. Продукти липидне пероксидације у плазми пацијената са сенилном катарактом

У циљу испитивања процеса липидне пероксидације у плазми пацијената са сенилном катарактом одређивана је концентрација примарних продуката пероксидације липида (коњугованих диена), липидних хидропероксида, као секундарних продуката, затим концентрација малондиалдехида (МДА), једног од крајњих и релативно стабилних продуката пероксидације незасићених масних киселина и флуоресцентних продуката (липосолубилних и хидросолубилних иминипропена).



Графикон 2. Концентрација коњугованих диена (nmol/ml) у плазми болесника са сенилном катарактом.

На графикону 2 приказане су просечне концентрације коњугованих диена у плазми болесника са сенилном катарактом. Применом Студентовог т-теста за тестирање значајности разлика просечних концентрација коњугованих диена (nmol/ml) у плазми пацијената са почетном и матурном сенилном катарактом није утврђена значајна разлика ( $t=0.238$ ,  $DF=71$ ,  $p=0.812$ ).

Табела 3. Концентрација малондиалдехида у плазми болесника са сенилном катарактом

	Cataracta senilis incipiens (N=28)	Cataracta senilis matura (N=45)
MDAi (µmol/L)	7.06 ± 1.61	7.57 ± 1.09
MDAo (µmol/L)	5.21 ± 1.45	6.05 ± 1.06*
% MDA	26.43 ± 8.39	20.04 ± 7.51**

\* $p<0.01$ , \*\* $p<0.001$

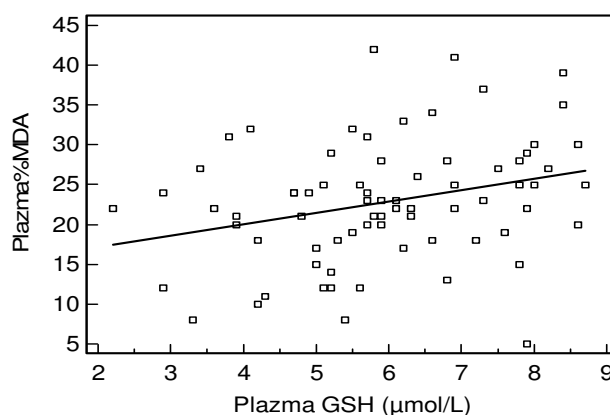
Измерене просечне концентрације липидних хидропероксида и малондиалдехида у плазми болесника са почетном и матурном сенилном катарактом представљене су у табели 3. Јони гвожђа, као ефикасни катализатори, у процесу



раздвајања липидних хидропероксида од секундарних продуката пероксидације липида (9), коришћени су за одређивање концентрације хидропероксида ( $\text{Fe}^{+2}$ -индукованог малондиалдехида) ТБА тестом.

Применом Студентовог т-теста за тестирање значајности разлика добијених концентрација липидних хидропероксида (МДАи) у плазми пацијената са почетном и матурном сенилном катарактом није утврђена значајна разлика ( $t=-1.620$ ,  $DF=71$ ,  $p=0.110$ ). Сигнификантна разлика је утврђена тестирањем просечних концентрација малондиалдехида (МДАо) ( $\mu\text{mol/L}$ ) ( $t=-2.829$ ,  $DF=71$ ,  $p<0.01$ ). Концентрација МДАо је значајно већа у плазми пацијената са матурном катарактом ( $p<0.01$ ) у односу на пацијенате са почетном катарактом. Процена индукције МДА гвожђем добијена је израчунавањем процентуалног удела  $\text{Fe}^{+2}$ -индукованог малондиалдехида. Процент индукције МДА је значајно већи у плазми пацијената са почетном катарактом ( $t=3.376$ ,  $DF=71$ ,  $p<0.001$ ) у односу на плазму пацијената са матурном катарактом.

Испитивањем међусобне зависности између % индукције МДА и концентрације непротеинских тиол једињења у плазми болесника са сенилном катарактом добијена је значајна позитивна повезаност ( $r=0.288$ ,  $p<0.05$ ) (графикон 3).



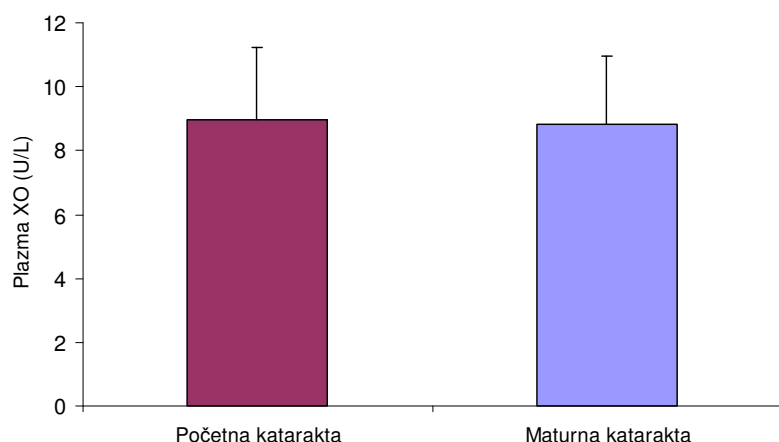
Графикон 3. Међусобни однос % индукованог малондиалдехида и концентрације непротеинских тиол једињења ( $\mu\text{mol/L}$ ) у плазми болесника са сенилном катарактом ( $y = 58.19 + 0.8 x$ ).

Табела 4. Флуоресцентни продукти пероксидације липида у плазми болесника са сенилном катарактом

Fl/ml	Cataracta senilis incipiens (N=28)	Cataracta senilis matura (N=45)
Liposolubilni iminopropeni	165.16 ± 60.33	154.35 ± 54.73
Hidrosolubilni iminopropeni	146.94 ± 36.14	141.68 ± 44.41

У табели 4 приказане су просечне измерене флуоресценце продуката пероксидације липида. Применом Студентовог т-теста није утврђена сигнификантна разлика у флуоресценцији ( $\lambda_{\text{ex}}=365 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{em}}=438 \text{ nm}$ ) како липосолубилних иминопропена ( $t=0.789$ ,  $DF=71$ ,  $p=0.433$ ), тако ни хидросолубилних иминопропена ( $t=0.527$ ,  $DF=71$ ,  $p=0.600$ ) у плазми пацијената са почетном и матурном сенилном катарактом.

### 5.2.2. Активности прооксидационог ензима, ксантин оксидазе, у плазми пацијената оболелих од сенилне катаракте



Графикон 4. Активност ксантин оксидазе (U/L) у плазми болесника са сенилном катарактом.

У плазми пацијената са сенилном катарактом одређивана је каталитичка активност прооксидационог ензима ксантин оксидазе (ХО). Упоредивањем добијених активности ксантин оксидазе није добијена значајна разлика ( $t=0.286$ ,  $DF=71$ ,  $p=0.776$ ) у плазми пацијената са почетном у односу на пацијенте са матурном сенилном катарактом.

Табела 5. Активност ксантин оксидазе у плазми пацијената са сенилном катарактом у зависности од присутности хроничних кардиоваскуларних болести

Кардиоваскуларне болести				
	Сенилна катаракта		Ксантин оксидаза	
	N	%	Ср	СД
<b>Кардиомиопатија</b>				
НЕ	47	64.4	8.17	2.16
ДА	26	35.6	10.12*	1.64
<b>Хипертензија</b>				
НЕ	20	27.4	6.61	2.26
ДА	53	72.6	9.72*	1.44

\* $p<0.001$

Анализирањем активности ксантин оксидазе у плазми пацијената са сенилном катарактом који су имали и дијагнозу кардиомиопатије и пацијената са сенилном катарактом без дијагнозе кардиомиопатије утврђена је сигнификантна разлика ( $t=-4.003$ ,  $DF=71$ ,  $p<0.001$ ). Болесници са сенилном катарактом и кардиомиопатијом имали су значајно већу активност ксантин оксидазе у плазми ( $p<0.001$ ) у односу на пацијенте без кардиомиопатије. Такође, у плазми пацијената са артеријском хипертензијом и код почетне и матурне катаракте постоји сигнификантно већа активност ксантин оксидазе у односу на пацијенте без хипертензије ( $t=-6.988$ ,  $DF=71$ ,  $p<0.001$ ).

### 5.2.3. Неензимски чиниоци антиоксидационе заштите у плазми пацијента оболелих од сенилне катаракте

У плазми пацијената са катарактом, у циљу процене антиоксидационог статуса, одређивана је концентрација неензимских чиниоца антиоксидационог капацитета плазме и то непротеинских тиол једињења, протеинских тиола, концентрација витамина Ц и испитиван је укупни антиоксидациони капацитет плазме помоћу ФРАП анализе.

#### 5.2.3.1. Концентрација непротеинских и протеинских тиола у плазми пацијената са сенилном катарактом

Анализом интензитета липидне пероксидације и капацитета антиоксидационе заштите у плазми болесника испитивано је колико дисбаланс у продукцији слободних радикала и антиоксидационе одбране у плазми утиче на генезу сенилне катаракте.

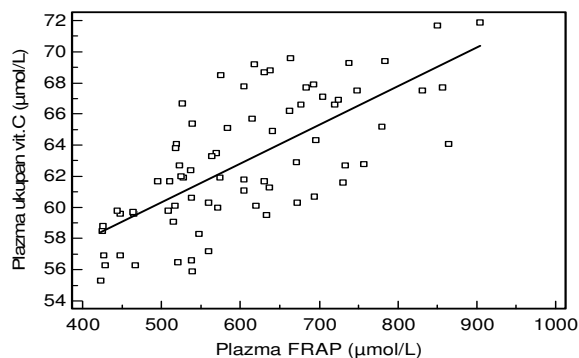
Табела 6. Неензимски антиоксиданси у плазми болесника са сенилном катарактом

$\mu\text{mol/L}$	Cataracta senilis incipiens (N=28)	Cataracta senilis matura (N=45)
Непротеинске тиол групе	5.87 ± 1.68	6.00 ± 1.49
Протеинска тиол јединjenja	373.01 ± 65.11	343.29 ± 71.30
ФРАП	633.34 ± 100.15	652.19 ± 142.37

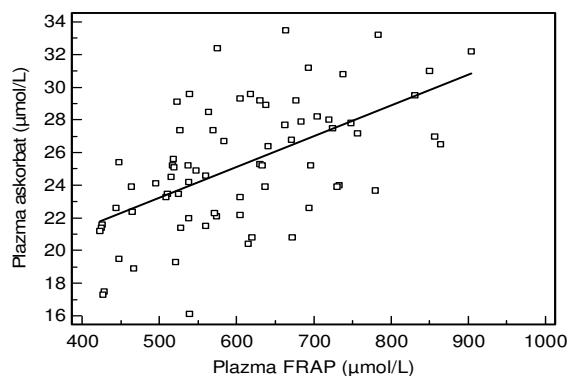
Концентрације непротеинских и протеинских тиол једињења у плазми пацијената са сенилном катарактом приказане су у табели 6. Анализирањем просечних концентрација непротеинских ( $t=-0.363$ ,  $DF=71$ ,  $p=0.718$ ) као и протеинских тиола ( $t=1.789$ ,  $DF=71$ ,  $p=0.078$ ) у плазми болесника са сенилном катарактом није утврђена значајна разлика, зависно од степена матуриитета катаракте.

За процену укупне антиоксидационе способности плазме пацијената са сенилном катарактом примењена је ФРАП анализа. Анализа ФРАП показује фериредуктивну способност испитиваног узорка и базира се на способности антиоксиданса да редукује  $\text{Fe}^{+3}$  у  $\text{Fe}^{+2}$ . Упоредивањем добијених вредности ФРАП анализе у плазми пацијената са почетном катарактом у односу на плазму пацијената са матурном катарактом није утврђена значајна разлика ( $t=-0.612$ ,  $DF=71$ ,  $p=0.543$ ).

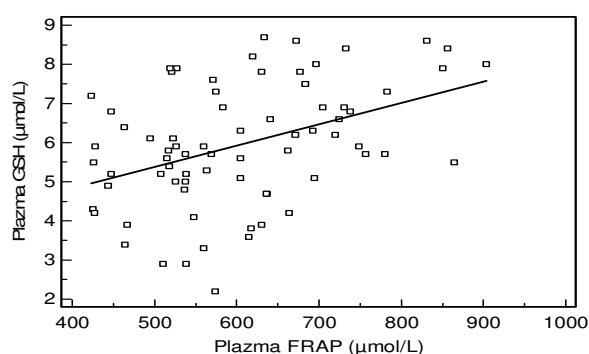
Испитивањем међусобне зависности концентрације укупног витамина Ц и вредности ФРАП анализе у плазми болесника са сенилном катарактом утврђена је значајна позитивна повезаност ( $r=0.703$ ,  $p<0.001$ ) (графикон 5),



Графикон 5. Међусобни однос концентрације укупног витамина Ц ( $\mu\text{mol/L}$ ) и ФРАП анализе ( $\mu\text{mol/L}$ ) у плазми болесника са сенилном катарактом ( $y = 47.89 + 0.02 x$ ).



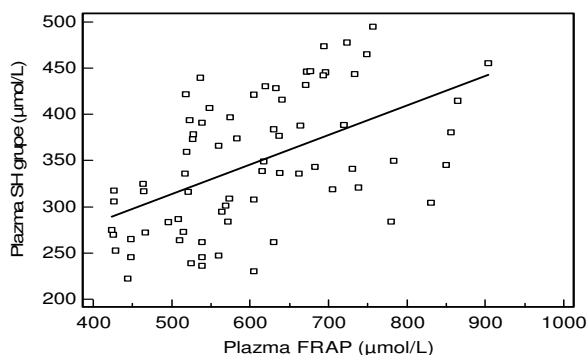
Графикон 6. Међусобни однос концентрације аскорбата ( $\mu\text{mol/L}$ ) и ФРАП анализе ( $\mu\text{mol/L}$ ) у плазми болесника са сенилном катарактом ( $y = 13.86 + 0.02 x$ ).



Графикон 7. Међусобни однос концентрације непротеинских тиол једињења ( $\mu\text{mol/L}$ ) и ФРАП анализе ( $\mu\text{mol/L}$ ) у плазми болесника са сенилном катарактом ( $y = 2.66 + 0.01 x$ ).

затим између концентрације аскорбата и вредности ФРАП анализе у плазми ( $r=0.574$ ,  $p<0.001$ ) (графикон 6), између концентрације непротеинских тиол једињења и

вредности ФРАП анализе у плазми ( $r=0.414$ ,  $p<0.001$ ) (графикон 7) и позитивна корелативна веза је утврђена између концентрације протеинских тиола и вредности ФРАП анализе у плазми болесника са сенилном катарактом ( $r=0.523$ ,  $p<0.001$ ) (графикон 8).



Графикон 8. Међусобни однос концентрације протеинских тиол једињења ( $\mu\text{mol/L}$ ) и ФРАП анализе ( $\mu\text{mol/L}$ ) у плазми болесника са сенилном катарактом ( $y = 154.57 + 0.32 x$ )

### 5.2.3.2. Концентрације витамина Ц у плазми пацијената са катарактом

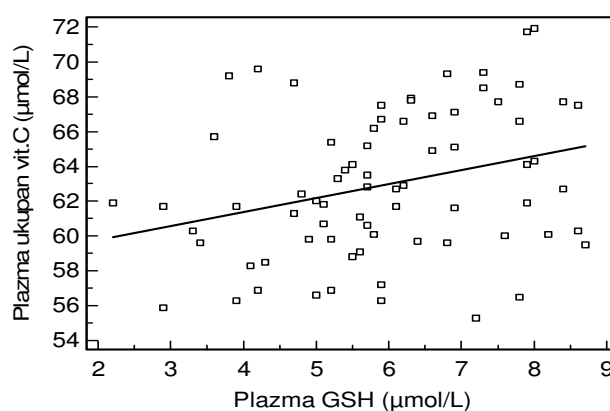
Концентрација витамина Ц одређивана је као збир аскорбинске и дехидроаскорбинске киселине у плазми. У истим узорцима, посебно је одређивана концентрација дехидроаскорбинске киселине, а затим је на основу разлике измерене концентрације витамина Ц и дехидроаскорбата израчунавана концентрација аскорбата у узорцима.

Табела 7. Концентрација витамина Ц у плазми болесника са сенилном катарактом

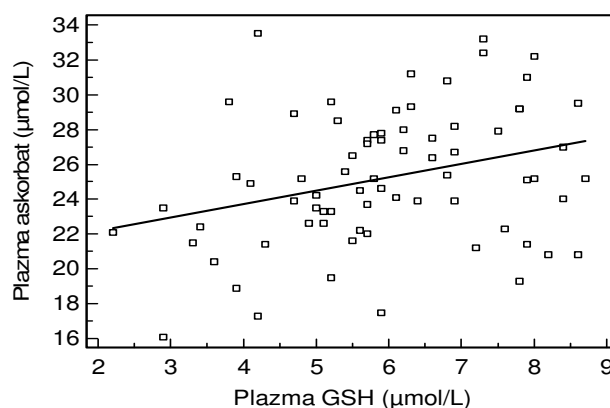
$\mu\text{mol/L}$	Cataracta senilis incipiens (N=28)	Cataracta senilis matura (N=45)
Ukupni vitamin C	$63.56 \pm 3.86$	$62.58 \pm 4.38$
Dehidroaskorbat	$37.76 \pm 1.98$	$37.74 \pm 2.31$
Askorbat	$25.81 \pm 3.76$	$24.85 \pm 3.93$
D/A	$1.49 \pm 0.25$	$1.56 \pm 0.31$

У табели 7 приказане су просечне измерене концентрације укупног витамина Ц и дехидроаскорбата у плазми пацијената са сенилном катарактом, у зависности од матуритета катаракте. Из података се јасно уочава да су просечне концентрације укупног витамина Ц и дехидроаскорбата у плазми пацијената са почетном и матурном сенилном катарактом врло сличне, што је потврђено применом Студентовог т-теста за тестирање значајности разлика. Утврђено је да нема сигнификантне разлике у

просечним концентрацијама укупног витамина Ц ( $t=0.978$ ,  $DF=71$ ,  $p=0.332$ ) и дехидроаскорбата ( $t=0.028$ ,  $DF=71$ ,  $p=0.978$ ) у плазми пацијената са почетном и матурном сенилном катарактом. На основу разлике измерене концентрације укупног витамина Ц и концентрације дехидроаскорбата у плазми испитаника израчунавана је концентрација аскорбата у узорцима. Добијена просечна концентрација аскорбата у плазми пацијената са почетном катарактом није значајно различита у односу на пацијенате са матурном катарактом ( $t=1.035$ ,  $DF=71$ ,  $p=0.304$ ). У плазми пацијената са сенилном катарактом већи део укупног витамина Ц чини дехидроаскорбат, тако да је просечни нађени концентрациони однос Д/А плазме пацијената са почетном катарактом био 1.49, а пацијената са матурном катарактом 1.56. Упоредивањем добијених вредности концентрационог односа дехидроаскорбат/аскорбат (Д/А) није утврђена значајна разлика у плазми пацијената са почетном катарактом у односу на пацијенате са матурном катарактом ( $t=-0.979$ ,  $DF=71$ ,  $p=0.331$ ).



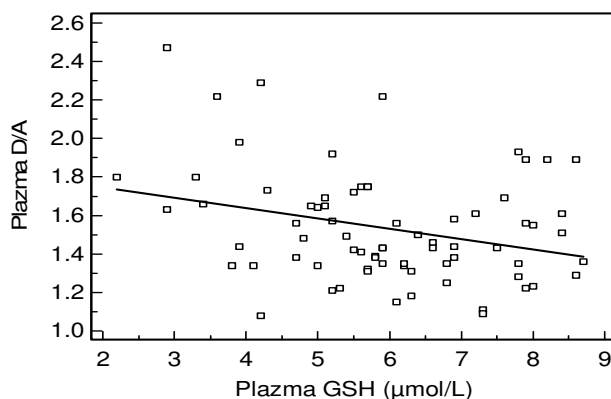
Графикон 9. Међусобни однос концентрација укупног витамина Ц ( $\mu\text{mol/L}$ ) и непротеинских тиол једињења ( $\mu\text{mol/L}$ ) у плазми болесника са сенилном катарактом ( $y = 58.19 + 0.8 x$ ).



Графикон 10. Међусобни однос концентрација аскорбата ( $\mu\text{mol/L}$ ) и непротеинских тиол једињења ( $\mu\text{mol/L}$ ) у плазми болесника са сенилном катарактом ( $y = 20.65 + 0.77 x$ ).

У плазми болесника са сенилном катарактом утврђена је значајна корелативна веза између концентрација укупног витамина Ц и непротеинских тиол једињења

( $r=0.297$ ,  $p<0.05$ ) (графикон 9), затим између концентрација аскорбата и непротеинских тиол једињења ( $r=0.308$ ,  $p<0.01$ ) (графикон 10), као и значајна негативна корелативна веза између концентрационог односа дехидроаскорбат/аскорбат и непротеинских тиол једињења ( $r=-0.293$ ,  $p<0.05$ ) (графикон 11).



Графикон 11. Међусобни однос концентрационог односа Д/А и концентрације непротеинских тиол једињења ( $\mu\text{mol/L}$ ) у плазми болесника са сенилном катарактом ( $y = 1.86 + -0.05 x$ ).

#### 5.2.4. Ензимски чиниоци антиоксидационе заштите у плазми пацијента оболелих од сенилне катаракте

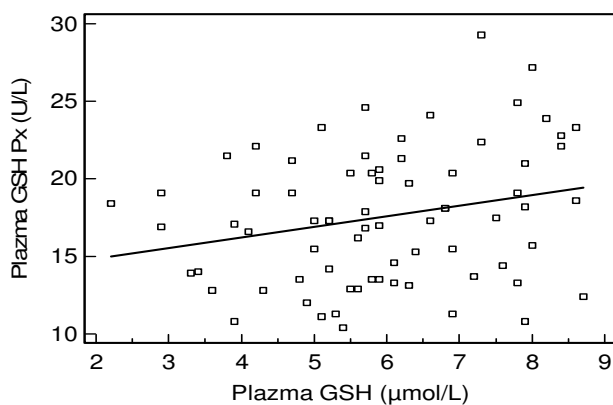
Табела 8. Каталитичка активност антиоксидационих ензима у плазми пацијената са сенилном катарактом

<i>Enzim</i>	Cataracta senilis incipiens (N=28)	Cataracta senilis matura (N=45)
Superoksid dismutaza (kU/L)	21.71 ± 1.98	21.15 ± 2.14
Glutation peroksidaza (U/L)	24.34 ± 3.27	23.29 ± 2.69
Glutation reduktaza (U/L)	23.63 ± 3.52*	21.69 ± 3.72
Glutation S-transferaza (U/L)	32.65 ± 3.76	31.35 ± 4.40
Katalaza (kU/L)	20.35 ± 3.17	20.83 ± 2.23

\* $p<0.05$

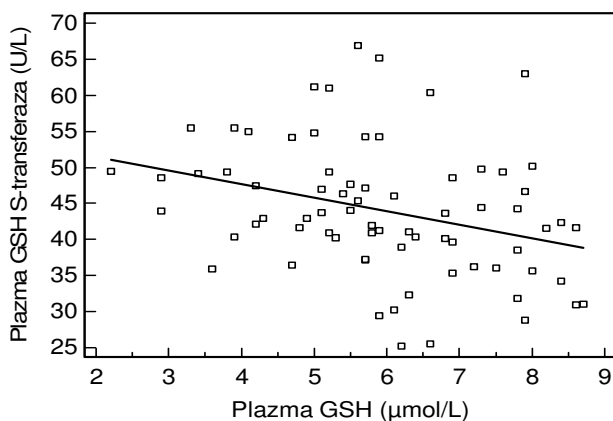
У плазми пацијената са сенилном катарактом одређивана је каталитичка активност антиоксидационих ензима супероксид дизмутазе, глутатион пероксидазе, глутатион редуктазе, глутатион С-трансферазе и каталазе. Просечне измерене активности испитиваних ензима представљене су у табели 8. Одређивањем сигнификантности разлика, активности поменутих ензимских параметара антиоксидационе заштите, није утврђена значајна разлика у плазми пацијената са почетном катарактом у односу на плазму пацијената са матурном катарактом, за супероксид дисмутазау ( $t=1.132$ ,  $DF=72$ ,  $p=0.261$ ), глутатион пероксидазу ( $t=1.475$ ,  $DF=71$ ,

$p=0.145$ ), глутатион С-трансферазу ( $t=1.292$ ,  $DF=71$ ,  $p=0.200$ ), као ни за активност каталазе ( $t=-0.572$ ,  $DF=42$ ,  $p=0.571$ ). Сигнификантна разлика је утврђена једино за активност глутатион редуктазе у плазми болесника са сенилном катарактом. Тачније, у плазми пацијената са почетном катарактом значајно је већа активност глутатион редуктазе у односу на плазму пацијената са матурном сенилном катарактом ( $t=2.217$ ,  $DF=71$ ,  $p<0.05$ ).



Графикон 12. Међусобни однос активности глутатион пероксидазе (U/L) и концентрације непротеинских тиол једињења ( $\mu\text{mol/L}$ ) у плазми болесника са катарактом ( $y = 13.45 + 0.69 x$ ).

Сложеност механизма деловања антиоксидационих ензима, наметнула је потребу да се испита узајамна повезаност активности ензима глутатион пероксидазе, односно глутатион С-трансферазе и концентрације непротеинских тиола у плазми. Значајна позитивна повезаност утврђена је између активности глутатион пероксидазе и концентрације непротеинских тиола у плазми болесника са сенилном катарактом ( $r=0.250$ ,  $p<0.05$ ) (графикон 12), док је, између активности глутатион С-трансферазе и концентрације непротеинских тиола у плазми утврђена значајна негативна повезаност ( $r=-0.318$ ,  $p<0.01$ ) (графикон 13).



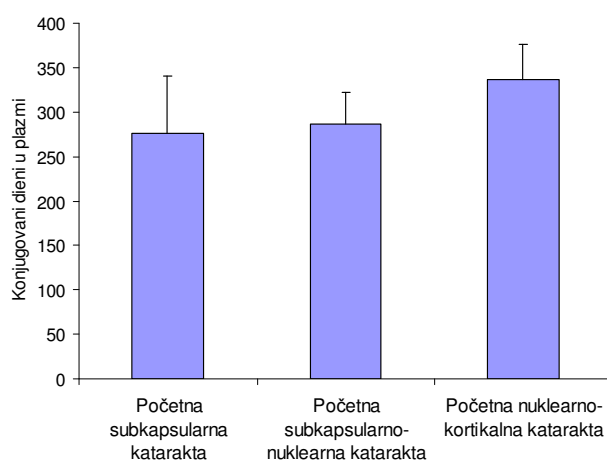
Графикон 13. Међусобни однос активности глутатион С-трансферазе (U/L) и концентрације непротеинских тиол једињења ( $\mu\text{mol/L}$ ) у плазми болесника са сенилном катарактом ( $y = 55.17 + -1.88 x$ ).



### 5.3. Резултати биохемијских испитивања плазме пацијената са почетном сенилном катарактом

Биохемијско испитивање плазме обухватило је 28 болесника са почетном сенилном катарактом, од којих је 15 имало дијагнозу почетне субкапсуларне катаракте, 6 пацијената је имало дијагнозу мешовито субкапсуларно-нуклеарне и 7 болесника је било са дијагнозом мешовито нуклеарно-кортикалне катаракте.

#### 5.3.1. Продукти липидне пероксидације у плазми пацијената са почетном сенилном катарактом



Графикон 14. Концентрације коњугованих диена (pmo/ml) у плазми пацијената са почетном сенилном катарактом у зависности од типа катаракте

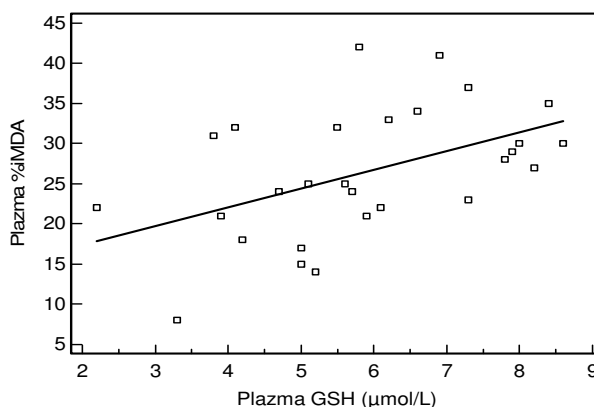
Просечне измерене концентрације коњугованих диена у плазми пацијената са различитим типовима почетне катаракте приказане су на графикону 14. Анализом података, није утврђена значајна разлика концентрација коњугованих диена ( $F=3.070$ ,  $df=2/27$ ,  $p=0.064$ ) у плазми болесника са различитим типовима почетне катаракте.

Табела 9. Концентрација малондиалдехида у плазми пацијената са почетном катарактом, у зависности од типа катаракте

$\mu\text{mol/L}$	Početna subkapsularna katarakta	Početna, mešovito subkapsularno-nuklearna katarakta	Početna, mešovito nuklearno-kortikalna katarakta
MDAi	$6.57 \pm 1.78$	$7.85 \pm 1.37$	$7.44 \pm 1.14$
MDAo	$4.63 \pm 1.55$	$5.92 \pm 1.12$	$5.86 \pm 1.01$
%MDA	$29.8 \pm 8.04$	$24.33 \pm 6.95$	$21 \pm 7.66$

У табели 9, приказане су просечне концентрације липидних хидропероксида ( $\text{Fe}^{+2}$ -индукованог малондиалдехида) и малондиалдехида у плазми пацијената са различитим типовима почетне катаракте, као и проценат индукције МДА гвожђем, добијен израчунавањем процентуалног удела  $\text{Fe}^{+2}$ -индукованог малондиалдехида. Применом анализе варијансе није утврђена значајна разлика просечних концентрација липидних хидропероксида ( $F=1.699$ ,  $df=2/27$ ,  $p=0.203$ ) и малондиалдехида ( $F=2.964$ ,  $df=2/27$ ,  $p=0.07$ ) у плазми пацијената, зависно од типа почетне катаракте, као ни разлика у проценту  $\text{Fe}^{+2}$ -индукованог МДА ( $F=5.211$ ,  $df=2/27$ ,  $p=0.051$ ).

Утврђена је значајна позитивна повезаност ( $r=0.485$ ,  $p<0.01$ ) између процента индукције малондиалдехида и концентрације непротеинских тиол једињења у плазми болесника са почетном катарактом (графикон 15).



Графикон 15. Међусобни однос % индукције МДА и концентрације непротеинских тиола ( $\mu\text{mol/L}$ ) у плазми болесника са почетном сенилном катарактом ( $y = 12.69 + 2.34 x$ ).

Табела 10. Флуоресцентни производи липидне пероксидације у плазми пацијената са почетном катарактом, у зависности од типа катаракте

FI/ml	Početna subkapsularna katarakta	Početna, mešovito subkapsularno-nuklearna katarakta	Početna, mešovito nuklearno-kortikalna katarakta
Liposolubilni iminopropeni	$156.38 \pm 72.86$	$162.35 \pm 57.38$	$186.37 \pm 22.95$
Hidrosolubilni iminopropeni	$135.73 \pm 35.42$	$133.42 \pm 31.08$	$182.54 \pm 12.99^*$

\* $p<0.01$

Из података приказаних у табели 10, уочава се да су сличне просечне измерене флуоресценце (FI/ml) ( $\lambda_{\text{ex}}=365 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{em}}=438 \text{ nm}$ ) липосолубилних производа пероксидације у плазми болесника са различитим типовима почетне катаракте, што је и потврђено статистичким тестирањем резултата ( $F=0.579$ ,  $df=2/27$ ,  $p=0.568$ ).

Док је анализирањем измерених флуоресценци ( $\lambda_{\text{ex}}=365 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{em}}=438 \text{ nm}$ ) хидросолубилних иминопропена у плазми болесника са различитим типовима почетне катаракте утврђена значајна разлика ( $F=6.329$ ,  $df=2/27$ ,  $p<0.01$ ). Флуоресценца хидросолубилних иминопропена значајно је већа у плазми пацијената са почетном мешовитом нуклеарно-кортикалном катарактом у односу на плазму пацијената са

почетном субкапсуларно-нуклеарном катарактом ( $p < 0.01$ ) и у плазми пацијената са почетном мешовитом нуклеарно-кортикалном катарактом у односу на плазму пацијената са почетном субкапсуларном катарактом ( $p < 0.01$ ) (табела 10).

### 5.3.2. Неензимски чиниоци антиоксидационе заштите у плазми пацијента са почетном сенилном катарактом

Испитивање антиоксидационог капацитета плазме пацијената са почетном сенилном катарактом вршено је мерењем концентрација ендогених (непротеинска и протеинска тиол једињења) и егзогених неензимских антиоксиданаса (витамин Ц).

Табела 11. Неензимски антиоксиданси у плазми пацијената са почетном катарактом, у зависности од типа катаракте

$\mu\text{mol/L}$	Početna subkapsularna katarakta	Početna, mešovito subkapsularno-nuklearna katarakta	Početna, mešovito nuklearno-kortikalna katarakta
GSH	$6.52 \pm 1.59$	$5.47 \pm 1.92$	$4.81 \pm 1.06$
SH grupe	$389.89 \pm 50.68$	$355.5 \pm 56.79$	$351.86 \pm 94.11$
FRAP	$654.23 \pm 90.23$	$613.97 \pm 151.51$	$605.2 \pm 67.92$

У табели 11, приказане су просечне концентрације непротеинских и протеинских тиола у плазми пацијената са различитим типовима почетне катаракте. Анализирањем измерених концентрација, утврђено је да се у плазми болесника са различитим типовима почетне катаракте, просечне концентрације укупних непротеинских ( $F=3.111$ ,  $df=2/27$ ,  $p=0.062$ ) и протеинских ( $F=1.098$ ,  $df=2/27$ ,  $p=0.349$ ) тиол једињења значајно не разликују.

Укупна антиоксидациона активност плазме пацијената са почетном сенилном катарактом испитивана је применом ФРАП анализе. Просечне добијене вредности ФРАП анализе приказане су у табели 11, а тестирањем значајности разлика није утврђена сигнификантност ( $F=0.699$ ,  $df=2/27$ ,  $p=0.507$ ) зависно од начина почетка катаракте.

#### 5.3.2.1. Концентрација витамина Ц у плазми пацијената са почетном сенилном катарактом

Од егзогених антиоксиданаса у плазми пацијената са почетном катарактом одређивана је концентрација укупног витамина Ц и дехидроаскорбинске киселине, израчунавана је концентрација аскорбата, као разлика укупног витамина Ц и дехидроаскорбата и концентрациони однос дехироаскорбат/аскорбат. Просечне измерене концентрације приказане су у табели 12.

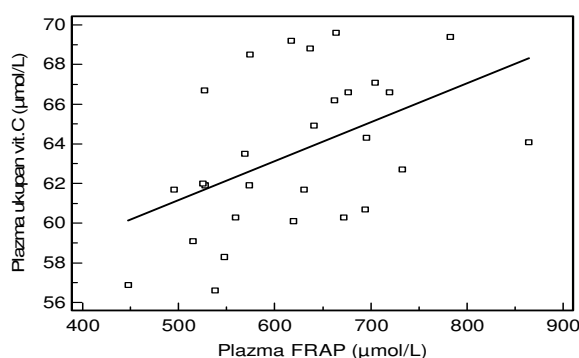
Анализом варијансе утврђено је да у плазми пацијената са почетном сенилном катарактом постоји сигнификантна разлика концентрације укупног витамина Ц зависно од начина почетка катаракте ( $F=6.464$ ,  $df=2/27$ ,  $p < 0.01$ ). Концентрација укупног витамина

Ц у плазми, значајно је већа код пацијената са почетном субкапсуларном катарактом у односу на пацијенате са почетном мешовито субкапсуларно-нуклерном катарактом ( $p < 0.05$ ) и у плазми пацијената са почетном субкапсуларном катарактом у односу на пацијенате са почетном мешовито нуклеарно-кортикалном катарактом ( $p < 0.01$ ). Анализирањем добијених концентрација дехидроаскорбата у плазми пацијената са почетном катарактом није нађена значајна разлика ( $F=2.125$ ,  $df=2/27$ ,  $p=0.141$ ) зависно од типа почетне катаракте. Просечне концентрације аскорбата у плазми пацијената са почетном сенилном катарактом су различите, зависно од начина на који је катаракта почела ( $F=3.390$ ,  $df=2/27$ ,  $p < 0.05$ ). Тачније, концентрација аскорбата је значајно већа у плазми пацијената са почетном субкапсуларном катарактом у односу на пацијенате са почетном мешовито субкапсуларно-нуклерном катарактом ( $p < 0.05$ ). У плазми пацијената са почетном катарактом не постоји значајна разлика ( $F=1.658$ ,  $df=2/27$ ,  $p=0.211$ ) вредности односа дехидроаскорбат/аскорбат (Д/А) зависно од начина почетка катаракте.

Табела 12. Концентрације витамина Ц у плазми пацијената са почетном катарактом, зависно од типа катаракте

$\mu\text{mol/L}$	Поčetна subkapsularna katarakta	Поčetна, mešovito subkapsularno-nuklearna katarakta	Поčetна, mešovito nuklearno-kortikalna katarakta
Укупни витамин С	$65.61 \pm 3.39$	$61.48 \pm 4.1^{**}$	$60.94 \pm 1.81^*$
Дехидроаскорбат	$38.26 \pm 1.29$	$37.98 \pm 2.94$	$36.49 \pm 1.99$
Аскорбат	$27.37 \pm 4.09$	$23.5 \pm 3.05^{**}$	$24.46 \pm 1.79$
Д/А	$1.43 \pm 0.26$	$1.64 \pm 0.26$	$1.5 \pm 0.17$

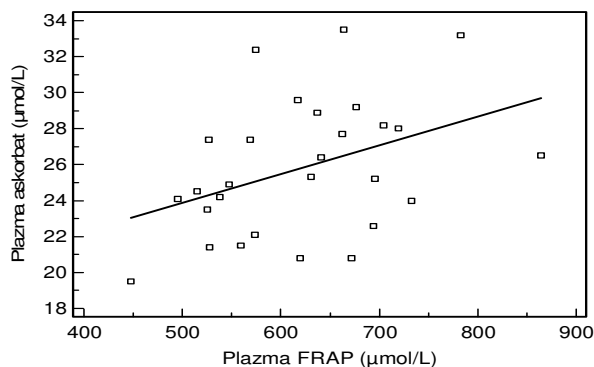
\*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.05$



Графикон 16. Међусобни однос концентрације укупног витамина Ц ( $\mu\text{mol/L}$ ) и ФРАП анализе ( $\mu\text{mol/L}$ ) у плазми болесника са почетном сенилном катарактом ( $y = 51.37 + 0.02x$ ).

Аскорбинска киселина је важан чинилац укупног антиоксидационог капацитета плазме, што је потврђено позитивном корелативном везом између концентрације

укупног витамина Ц и вредности ФРАП анализе у плазми болесника са почетном сенилном катарактом ( $r=0.482$ ,  $p<0.01$ ) (графикон 16), као и између концентрације аскорбата и вредности ФРАП анализе у плазми ( $r=0.402$ ,  $p<0.05$ ) (графикон 17).



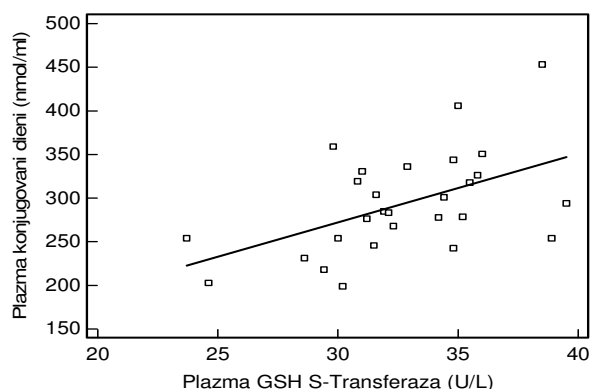
Графикон 17. Међусобни однос концентрације аскорбата ( $\mu\text{mol/L}$ ) и ФРАП анализе ( $\mu\text{mol/L}$ ) у плазми болесника са почетном сенилном катарактом ( $y = 15.89 + 0.02 x$ ).

### 5.3.3. Ензимски чиниоци антиоксидационе заштите у плазми пацијената са почетном сенилном катарактом

Табела 13. Каталитичка активност антиоксидационих ензима у плазми пацијената са почетном катарактом, зависно од типа катаракте

<i>Enzim</i>	Početna subkapsularna katarakta	Početna, mešovito subkapsularno-nuklearna katarakta	Početna, mešovito nuklearno-kortikalna katarakta
Superoksid dismutaza (kU/L)	22.35 ± 1.99	20.83 ± 1.7	21.2 ± 1.97
Glutation peroksidaza (U/L)	25.45 ± 2.77	23.70 ± 3.65	22.49 ± 3.42
Glutation reduktaza (U/L)	24.21 ± 1.56	22.98 ± 6.09	22.96 ± 4.15
Glutation S-transferaza (U/L)	31.47 ± 4.19	33.55 ± 3.64	34.46 ± 1.77
Katalaza (kU/L)	20.57 ± 3.54	20.16 ± 3.83	19.99 ± 0.66

Ензимска антиоксидациона заштита плазме пацијената са почетном сенилном катарактом испитивана је мерењем каталитичких активности супероксид дисмутазе, глутатион пероксидазе, глутатион редуктазе, глутатион С-трансферазе и каталазе (табела 13). Тестирањем разлика ензимске активности у плазми пацијената са различитим типовима почетне катаракте није утврђена значајна разлика ни за један од поменутих ензима и то за супероксид дисмутазу ( $F=1.820$ ,  $df=2/28$ ,  $p=0.182$ ), глутатион пероксидазу ( $F=2.309$ ,  $df=2/27$ ,  $p=0.120$ ), глутатион редуктазу ( $F=0.412$ ,  $df=2/27$ ,  $p=0.667$ ), глутатион С-трансферазу ( $F=1.864$ ,  $df=2/27$ ,  $p=0.176$ ) и каталазу ( $F=0.031$ ,  $df=2/12$ ,  $p=0.969$ ).



Графикон 18. Међусобни однос концентрације коњугованих диена (nmol/ml) и активности глутатион С-трансферазе (U/L) у плазми болесника са почетном сенилном катарактом ( $y = 36.83 + 7.86x$ ).

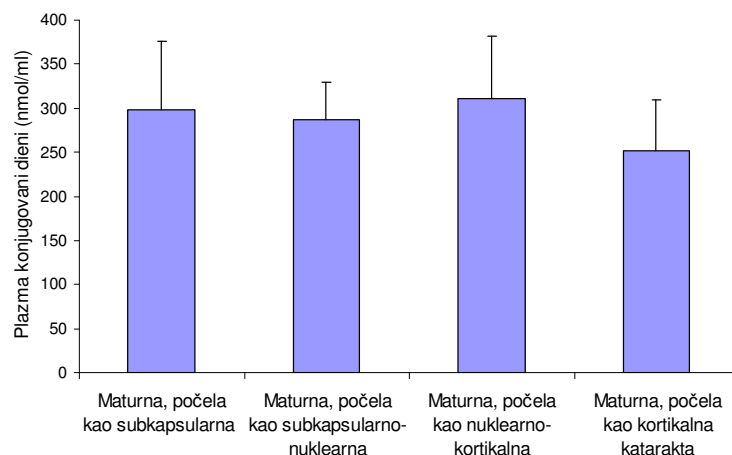
Чињеница, да је активност глутатион С-трансферазе усмерена ка разградњи продуката пероксидације липида, навела је на испитивање односа између концентрације коњугованих диена и активности ензима глутатион С-трансферазе у плазми болесника са почетном катарактом, при чему је утврђена значајна позитивна повезаност ( $r=0.506$ ,  $p<0.01$ ) (графикон 18).

#### 5.4. Резултати биохемијских испитивања плазме пацијената са матурном катарактом

Биохемијским испитивањем плазме обухваћено је 45 болесника са матурном сенилном катарактом, где је код 8 болесника катаракта почела као субкапсуларна, код 13 пацијената је почела као мешовито субкапсуларно-нуклеарна, код 7 болесника катаракта је почела као мешовито нуклеарно-кортикална и код 9 пацијената катаракта је почела као кортикална.

##### 5.4.1. Продукти липидне пероксидације у плазми пацијента са матурном сенилном катарактом

Интензитет липидне пероксидације у плазми пацијената са матурном катарактом, која је почела на различите начине, испитиван је мерењем примарних продуката пероксидације липида. Просечне концентрације коњугованих диена у плазми приказане на графикону 19. Тестирањем значајности разлика просечних концентрација плазматских коњугованих диена, утврђено је да су испитиване групе пацијената са матурном катарактом међусобно сличне, без обзира на начин почетка катаракте ( $F=1.741$ ,  $df=3/44$ ,  $p=0.174$ ).



Графикон 19. Концентрације коњугованих диена (nmol/ml) у плазми пацијената са матурном сенилном катарактом у зависности од начина на који је процес почео

У плазми пацијената са матурном катарактом процес липидне пероксидације је даље испитиван мерењем секундарних (липидних хидропероксида) и крајњих продуката (малондиалдехида) (табела 14).

Табела 14. Концентрација малондиалдехида у плазми пацијената са матурном сенилном катарактом, у зависности од начина на који је процес почео

$\mu\text{mol/L}$	Maturna, počela kao subkapsularna katarakta	Maturna, počela kao subkapsularno-nuklearna katarakta	Maturna, počela kao nuklearno-kortikalna katarakta	Maturna, počela kao kortikalna katarakta
MDAi	$7.45 \pm 1.02$	$7.5 \pm 0.96$	$7.99 \pm 0.91$	$7.11 \pm 1.5$
MDAo	$5.88 \pm 0.85$	$6.08 \pm 0.87$	$6.55 \pm 1.01^*$	$5.32 \pm 1.24$
%MDA	$20.88 \pm 6.64$	$18.92 \pm 4.89$	$17.8 \pm 7.56$	$24.67 \pm 9.98$

\* $p < 0.01$

Упоређивањем добијених концентрација липидних хидропероксида ( $\text{Fe}^{+2}$ -индукованог малондиалдехида) у плазми пацијената са матурном сенилном катарактом није утврђена значајна разлика ( $F=1.335$ ,  $df=3/44$ ,  $p=0.276$ ) зависно од начина на који је катаракта почела. Сигнификантност је утврђена анализирањем концентрација малондиалдехида ( $F=2.951$ ,  $df=3/44$ ,  $p < 0.01$ ) и то концентрација МДАо је значајно већа у плазми пацијената код којих је катаракта почела као мешовито нуклеарно-кортикална у односу на пацијенате код којих је катаракта почела као кортикална ( $p < 0.01$ ).

Тестирањем разлика просечних вредности процента  $\text{Fe}^{+2}$ -индукованог малондиалдехида у плазми пацијената са матурном катарактом није добијена значајна разлика ( $F=0.161$ ,  $df=3/44$ ,  $p=0.161$ ) зависно од начина на који је катаракта започела.

Табела 15. Флуоресцентни производи пероксидације липида у плазми пацијената са матурном сенилном катарактом, у зависно од начина на који је процес почео

FI/ml	Maturna, počela kao subkapsularna katarakta	Maturna, počela kao subkapsularno-nuklearna katarakta	Maturna, počela kao nuklearno-kortikalna katarakta	Maturna, počela kao kortikalna katarakta
Liposolubilni iminopropeni	138.95 ± 53.62	177.47 ± 51.88	148.08 ± 46.4	145.1 ± 69.83
Hidrosolubilni iminopropeni	130.57 ± 57.3	153.79 ± 39.93	143.15 ± 33.49	131.63 ± 56.04

FI ( $\lambda_{ex}$  =365 nm  $\lambda_{em}$  =438 nm)

Просечне измерене флуоресценце липосолубилних и хидросолубилних иминопропена у плазми пацијената са матурном катарактом, која је почела на различите начине приказане су у табели 15. Анализом варијансе је утврђено да у плазми пацијената са матурном катарактом не постоји значајна разлика флуоресценци липосолубилних ( $F=1.147$ ,  $df=3/44$ ,  $p=0.342$ ), као ни хидросолубилних иминопропена ( $F=0.963$ ,  $df=3/44$ ,  $p=0.419$ ), без обзира на начин почетка катаракте.

Анализом интензитета липидне пероксидације и испитивањем капацитета антиоксидационе заштите у плазми пацијената испитивано је колико дисбаланс у продукцији слободних радикала и антиоксидационе одбране у плазми утиче на развој матурне катаракте. У плазми пацијената са матурном катарактом одређивани су неензимски (табела 16) и ензимски (табела 17) чиниоци антиоксидационе заштите.

#### 5.4.2. Неензимски чиниоци антиоксидационе заштите у плазми пацијената са матурном сенилном катарактом

Табела 16. Неензимски чиниоци антиоксидационе заштите у плазми пацијената са матурном сенилном катарактом, у зависности од начина на који је процес почео

$\mu\text{mol/L}$	Maturna, počela kao subkapsularna katarakta	Maturna, počela kao subkapsularno-nuklearna katarakta	Maturna, počela kao nuklearno-kortikalna katarakta	Maturna, počela kao kortikalna katarakta
GSH	6.95 ± 1.3	5.38 ± 1.39*	5.5 ± 1.44*	6.91 ± 1.13*
SH grupe	387.46 ± 79.32	331.61 ± 64.25	311.22 ± 54.65*	374.34 ± 76.48*
FRAP	695.45 ± 175.34	619.45 ± 113.41	642.63 ± 123.28	676.96 ± 184.99

\* $p<0.05$

Просечне концентрације и разлике у концентрацијама неензимских антиоксидационих чиниоца у плазми пацијената са матурном катарактом, која је почела на различите начине, приказане су у табели 16. Тестирањем разлике добијених просечних концентрација непротеинских тиола плазме код пацијената са матурном сенилном катарактом утврђена је значајна разлика ( $F=4.324$ ,  $df=3/44$ ,  $p<0.05$ ) зависно од начина на који је катаракта почела. Концентрација непротеинских тиол једињења у плазми значајно је већа код пацијената са матурном катарактом, која је почела као субкапсуларна у односу на пацијенате са матурном, започелом као мешовито



субкапсуларно-нуклерна ( $p < 0.05$ ), затим у плазми пацијената са матурном, почелом као субкапсуларна катаракта у односу на пацијенате са матурном, почелом као мешовито нуклеарно-кортикална ( $p < 0.05$ ), у плазми пацијената са матурном катарактом, која је почела као кортикална катаракта у односу на пацијенате са матурном, започелом као мешовито субкапсуларно-нуклерна ( $p < 0.05$ ) и код пацијената са матурном катарактом, почелом као кортикална у односу на пацијенате са матурном, почелом као мешовито нуклеарно-кортикална катаракта ( $p < 0.05$ ).

Анализом варијансе утврђена је значајна разлика ( $F=3.112$ ,  $df=3/44$ ,  $p < 0.05$ ) у просечним концентрацијама укупних протеинских тиола у плазми пацијената са матурном сенилном катарактом, зависно од начина почетка катаракте. Концентрација протеинских тиол једињења у плазми је значајно већа код пацијената са матурном катарактом, која је почела као субкапсуларна у односу на пацијенате са матурном катарактом, која је започела као мешовито нуклеарно-кортикална ( $p < 0.05$ ) и у плазми пацијената са матурном катарактом, која је почела као кортикална у односу на пацијенате са матурном катарактом, започелом као мешовито нуклеарно-кортикална ( $p < 0.05$ ).

Анализирањем добијених вредности ФРАП анализе у плазми пацијената са матурном сенилном катарактом није утврђена значајна разлика ( $F=0.571$ ,  $df=3/44$ ,  $p=0.637$ ), зависно од начина на који је катаракта почела.

#### **5.4.2.1. Концентрације витамина Ц у плазми пацијената са матурном сенилном катарактом**

Просечне измерене концентрације укупног витамина Ц и дехидроаскорбата у плазми пацијената са матурном сенилном катарактом, која је почела на различите начине, приказане су у табели 17. Тестирањем разлика утврђена је значајна разлика просечних концентрација укупног витамина Ц у плазми пацијената са матурном сенилном катарактом, зависно од начина на који је катаракта почела ( $F=13.415$ ,  $df=3/44$ ,  $p < 0.001$ ) (табела 17). Просечна концентрација укупног витамина Ц значајно је већа у плазми пацијената са матурном катарактом, која је почела као субкапсуларна у односу на пацијенате са матурном, почелом као мешовито субкапсуларно-нуклерна катаракта ( $p < 0.001$ ), затим у плазми пацијената са матурном, започелом као субкапсуларна катаракта у односу на пацијенате са матурном катарактом, која је почела као мешовито нуклеарно-кортикална ( $p < 0.001$ ) и код пацијената са матурном, почелом као кортикална катаракта у односу на пацијенате са матурном, започелом као мешовито нуклеарно-кортикална катаракта ( $p < 0.001$ ) (табела 17).

Тестирањем просечних концентрација дехидроаскорбата у плазми пацијената са матурном катарактом, зависно од начина на који је катаракта почела, није утврђена значајна разлика ( $F=0.500$ ,  $df=3/44$ ,  $p=0.684$ ) (табела 17).

На основу разлике измерене концентрације укупног витамина Ц и концентрације дехидроаскорбата израчунавана је концентрација аскорбата у плазми (табела 17). Упоредивањем добијених концентрација аскорбата у плазми пацијената са матурном сенилном катарактом утврђена је значајна разлика ( $F=11.945$ ,  $df=3/44$ ,  $p < 0.001$ ) зависно од начина почетка катаракте. Просечна концентрација аскорбата у плазми значајно је већа у плазми пацијената са матурном катарактом, која је почела као субкапсуларна у односу на пацијенате са матурном, почелом као мешовито субкапсуларно-нуклерна катаракта ( $p < 0.001$ ), затим код пацијената са матурном катарактом, која је започела као субкапсуларна у односу на пацијенате са матурном, почелом као мешовито нуклеарно-кортикална катаракта ( $p < 0.001$ ), у плазми пацијената са матурном, почелом као

мешовито субкапсуларно-нуклерна катаракта у односу на пацијенате са матурном катарактом, почелом као мешовито нуклеарно-кортикална ( $p < 0.05$ ) и код пацијената са матурном катарактом, која је започела као кортикална у односу на пацијенате са матурном, почелом као мешовито нуклеарно-кортикална катаракта ( $p < 0.001$ ) (табела 17).

Табела 17. Концентрације витамина Ц у плазми пацијената са матурном сенилном катарактом, у зависности од начина на који је процес почео

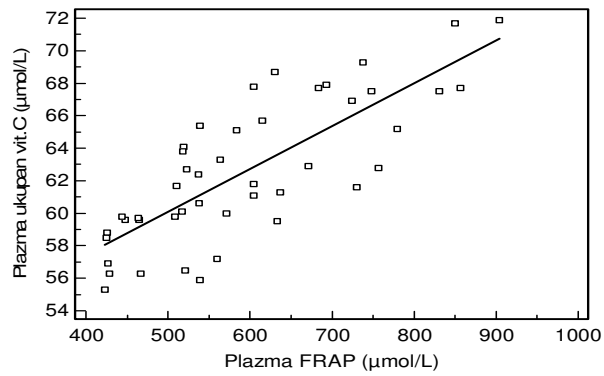
$\mu\text{mol/L}$	Maturna, počela kao subkapsularna katarakta	Maturna, počela kao subkapsularno-nuklearna katarakta	Maturna, počela kao nuklearno-kortikalna katarakta	Maturna, počela kao kortikalna katarakta
Ukupni vitamin C	$67.66 \pm 3.82$	$61.89 \pm 3.57^*$	$59.24 \pm 2.63^*$	$64.61 \pm 3.03^*$
Dehidro-askorbat	$38.63 \pm 1.92$	$37.51 \pm 2.77$	$37.45 \pm 1.92$	$37.79 \pm 2.66$
Askorbat	$29.06 \pm 2.82$	$24.38 \pm 3.62^*$	$21.83 \pm 2.84^*$	$26.82 \pm 2.11^*$
D/A	$1.33 \pm 0.14$	$1.58 \pm 0.31^{**}$	$1.75 \pm 0.32^{**}$	$1.42 \pm 0.17^{**}$

\* $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$

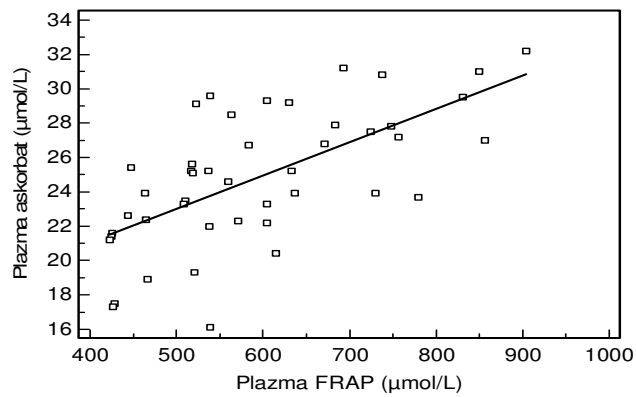
У плазми пацијената са матурном катарактом већи део укупног витамина Ц представља дехидроаскорбат, па је концентрациони однос дехидроаскорбат/аскорбат у распону од 1.15 до 2.47. Тестирањем разлике добијених концентрационих односа Д/А код пацијената са матурном катарактом добијена је значајна разлика зависно од начина почетка катаракте ( $F=5.397$ ,  $df=3/44$ ,  $p < 0.01$ ). Концентрациони однос Д/А у плазми значајно је већи код пацијената са матурном катарактом, која је почела као мешовито субкапсуларно-нуклерна у односу на плазму пацијената са матурном, почелом као субкапсуларна катаракта ( $p < 0.01$ ), затим у плазми пацијената са матурном, почелом као мешовито нуклеарно-кортикална катаракта у односу на пацијенате са матурном, која је започела као субкапсуларна катаракта ( $p < 0.01$ ) и у плазми пацијената са матурном, почелом као мешовито нуклеарно-кортикална у односу на плазму пацијената са матурном, почелом као кортикална катаракта ( $p < 0.01$ ).

Анализирањем удела концентрације укупног витамина Ц у фери редуктивној способности плазме, која је испитивана ФРАП анализом, утврђена је значајна позитивна повезаност ( $r=0.788$ ,  $p < 0.001$ ) (графикон 20), као и за учешће аскорбата у укупној антиоксидационој активности плазме ( $r=0.645$ ,  $p < 0.001$ ) (графикон 21) болесника са матурном сенилном катарактом.

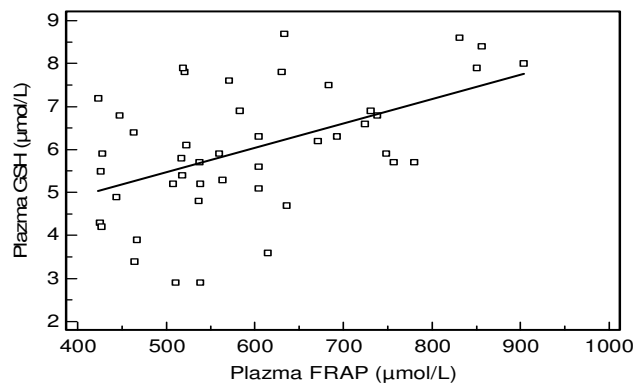
Испитивањем међусобног односа концентрације укупних непротеинских тиол једињења и вредности ФРАП анализе у плазми болесника са матурном сенилном катарактом утврђена је значајна позитивна повезаност ( $r=0.497$ ,  $p=0.001$ ) (графикон 22), као и између концентрације укупних протеинских тиол једињења и вредности ФРАП анализе у плазми истих пацијената ( $r=0.515$ ,  $p < 0.001$ ) (графикон 23).



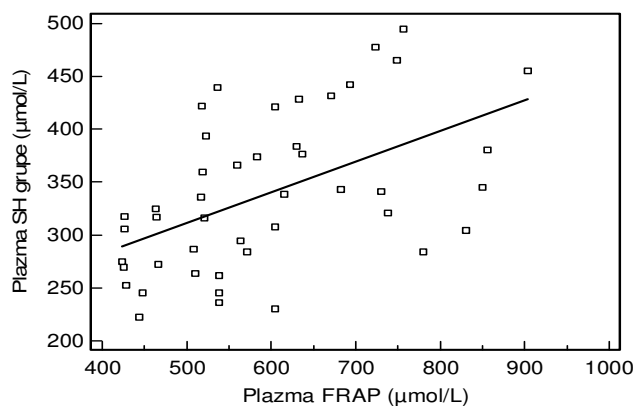
Графикон 20. Међусобна повезаност концентрације укупног витамина Ц ( $\mu\text{mol/L}$ ) и ФРАП анализе ( $\mu\text{mol/L}$ ) у плазми болесника са матурном сенилном катарактом ( $y = 46.87 + 0.03 x$ ).



Графикон 21. Међусобни однос концентрације аскорбата ( $\mu\text{mol/L}$ ) и ФРАП анализе ( $\mu\text{mol/L}$ ) у плазми болесника са матурном сенилном катарактом ( $y = 13.32 + 0.02 x$ ).



Графикон 22. Међусобни однос концентрације непротеинских тиол једињења ( $\mu\text{mol/L}$ ) и ФРАП анализе ( $\mu\text{mol/L}$ ) у плазми болесника са матурном сенилном катарактом ( $y = 2.63 + 0.01 x$ ).



Графикон 23. Међусобна повезаност концентрације укупних протеинских тиол једињења ( $\mu\text{mol/L}$ ) и вредности ФРАП анализе ( $\mu\text{mol/L}$ ) у плазми болесника са матурном сенилном катарактом ( $y = 166.79 + 0.29 x$ ).

#### 5.4.3. Ензимски чиниоци антиоксидационе заштите у плазми пацијената са матурном сенилном катарактом

Табела 18. Каталитичка активност антиоксидационих ензима у плазми пацијената са матурном сенилном катарактом, зависно од начина на који је процес почео

U/L	Maturna, počela kao subkapsularna katarakta	Maturna, počela kao subkapsularno-nuklearna katarakta	Maturna, počela kao nuklearno-kortikalna katarakta	Maturna, počela kao kortikalna katarakta
Superoksid dismutaza	$22.04 \pm 2.4$	$20.92 \pm 2.49$	$20.63 \pm 1.36$	$21.56 \pm 2.44$
Glutation peroksidaza	$24.05 \pm 3.66$	$22.72 \pm 2.09$	$22.95 \pm 2.97$	$24.06 \pm 1.99$
Glutation reduktaza	$22.58 \pm 2.83$	$21.0 \pm 3.95$	$21.57 \pm 4.33$	$22.07 \pm 3.35$
Glutation S-transferaza	$29.54 \pm 3.09$	$31.53 \pm 5.14$	$32.27 \pm 4.48$	$31.19 \pm 4.31$
Katalaza	$21.36 \pm 2.66$	$20.72 \pm 2.47$	$20.36 \pm 2.51$	$21.55 \pm 1.23$

Вредности су изражене као средња вредност  $\pm$  СД

Одређивањем каталитичке активности супероксид дизмутазе, глутатион пероксидазе, глутатион редуктазе, глутатион С-трансферазе и каталазе, испитиван је ензимски антиоксидациони капацитет плазме пацијената са матурном сенилном катарактом. Просечне измерене активности поменутих ензима и разлике у плазми пацијената са различитим почетком катаракте приказане су у табели 18. Анализом варијансе није утврђено да у плазми пацијената са матурном сенилном катарактом постоји значајна разлика у активности супероксид дизмутазе ( $F=0.914$ ,  $df=3/44$ ,  $p=0.443$ ), глутатион пероксидазе ( $F=0.722$ ,  $df=3/44$ ,  $p=0.545$ ), глутатион редуктазе ( $F=0.316$ ,  $df=3/44$ ,  $p=0.813$ ), глутатион С-трансферазе ( $F=0.664$ ,  $df=3/44$ ,  $p=0.579$ ) и каталазе ( $F=0.460$ ,  $df=3/30$ ,  $p=0.712$ ) у зависности од начина на који је процес почео.

## 5.5. Резултати биохемијских испитивања кортиконуклеарних блокова сочива болесника са сенилном катарактом

Презентовани рад је обухватио биохемијска испитивања, показатеља оксидационих промена и антиоксидационих чиниоца, 101 кортиконуклеарног блока сочива болесника са почетном (N= 41) и матурном (N= 60) сенилном катарактом (тачка 4.1. Испитивани болесници, Материјал и методе). Међу испитаницима код којих је урађено биохемијско испитивање сочива било је 46 особа женског пола и 55 особа мушког пола. Просечна старост испитиване групе износила је 72.02 године ( $SD \pm 7.98$ ).

Просечна старосна доб пацијената код којих је извршено биохемијско испитивање кортиконуклеарних блокова сочива, приказана је у табели 19. Применом Студентовог т-теста доказано је да не постоји сигнификантна разлика између просечне старосне доби пацијената са почетном (72.1 година), односно матурном сенилном катарактом (72.3 године) ( $t=-0.114$ ,  $df=99$ ,  $p=0.909$ ).

Табела 19. Старостна структура пацијената са сенилном катарактом

Група	Број	Ср ± СД	Доња граница	Горња граница
Почетна катаракта	41	72.1 ± 7.94	69.54	74.60
Матурна катаракта	60	72.3 ± 6.82	70.50	74.03

Табела 20. Полна структура испитаника са сенилном катарактом

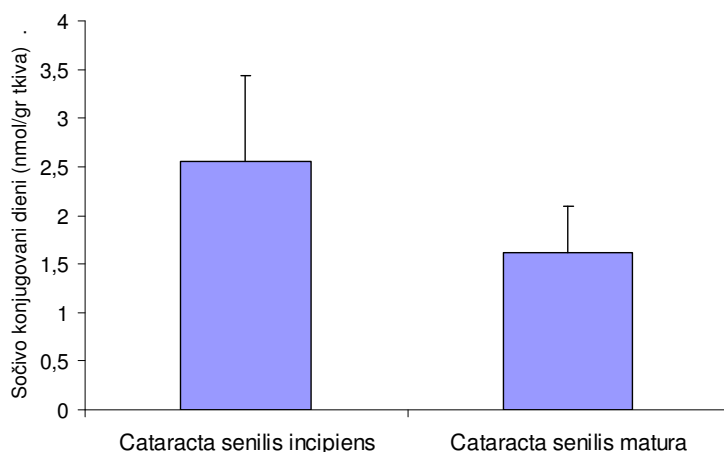
Пол	Почетна катаракта		Матурна катаракта		Укупно	
	Број	%	Број	%	Број	%
Женски	19	46.3	27	45	46	45.5
Мушки	22	53.7	33	55	55	54.5
Укупно	41	100	60	100	73	100

Структура испитаника по полу, унутар група, код којих је извршено биохемијско испитивање сочива, приказана је на табели 20. Применом статистичке процедуре доказано је да се групе са почетном и матурном сенилном катарактом у односу на пол, сигнификантно не разликују на усвојеном нивоу поузданости  $p < 0.05$  ( $\chi^2=0.018$ ,  $DF=1$ ,  $p=0.894$ ).

Према добијеном резултату закључак је да су испитиване групе равноправне између себе, са сличном заступљеношћу мушког и женског пола.

### 5.5.1. Продукти пероксидације липида у кортиконуклеарним блоковима катарактних сочива

У циљу испитивања процеса липидне пероксидације у катарактним сочивима, одређивана је концентрација примарних продуката липидне пероксидације (коњугованих диена), липидних хидропероксида, као секундарних продуката и крајњих продуката пероксидације незасићених масних киселина (малондиалдехида и флуоресцентних продуката- липосолубилних и хидросолубилних иминипропена).



Графикон 24. Концентрација коњугованих диена (nmol/gr ткива) у сочивима према степену матуритета сенилне катаракте

На графикону 24 приказане су просечне концентрације коњугованих диена у кортиконуклеарним блоковима сочива, према степену матуритета катаракте. Анализирањем измерених концентрација коњугованих диена сочива утврђена је значајна разлика у зависности од степена матуритета катаракте. У сочивима испитаника са почетном катарактом значајно је већа концентрација коњугованих диена ( $t=6.874$ ,  $DF=99$ ,  $p<0.001$ ) у односу на кортиконуклеарне блокове са матурном катарактом (графикон 24).

Табела 21. Концентрација малондиалдехида у сочивима према степену матуритета катаракте

nmol/gr	Cataracta senilis incipiens (N=41)	Cataracta senilis matura (N=60)	$p^*$
MDAi	0.03 ± 0.009	0.045 ± 0.044*	$p<0.05$
MDAo	0.02 ± 0.013	0.031 ± 0.009*	$p<0.001$
%MDA	36.59 ± 9.84*	19.9 ± 5.82	$p<0.001$

Вредности су изражене као средња вредност ± СД

За детекцију оксидованих липида кортиконуклеарних блокова катаракатних сочива коришћен је тест тиобарбитурном киселином (ТБА). Јони гвожђа, додавани током ТБА реакције, коришћени су за издвајање липидних хидропероксида од секундарних продуката липидне пероксидације (9). Тако су додавањем 1  $\mu\text{mol}$  раствора  $\text{FeSO}_4$  хомогенату сочива пре одређивања концентрације малондиалдехида добијене концентрације липидних хидропероксида ( $\text{Fe}^{+2}$ -индукованог МДА) ( $\text{nmol}/\text{gr}$  ткива). Анализирањем добијених концентрација липидних хидропероксида у сочивима пацијената са различитим степеном матуритета катаракте, утврђена је значајно већа концентрација липидних хидропероксида у сочивима испитаника са матурном катарактом ( $t=-2.134$ ,  $\text{DF}=99$ ,  $p<0.05$ ) у односу на болеснике са почетном сенилном катарактом.

У кортиконуклеарним блоковима катарактних сочива одређивана је и концентрација малондиалдехида ( $\text{nmol}/\text{gr}$  ткива), чије су просечне вредности представљене у табели 21. Утврђена је значајна разлика у концентрацији малондиалдехида у сочивима пацијената са различитим степеном матуритета катаракте. У сочивима испитаника са матурном катарактом значајно је већа концентрација МДАо ( $t=-5.198$ ,  $\text{DF}=99$ ,  $p<0.001$ ) у односу на пацијенте са почетном катарактом. Ради стварне процене индукције МДА гвожђем, израчунаван је процентуални удео  $\text{Fe}^{+2}$ -индукованог малондиалдехида. Тестирањем разлике између добијених вредности процента  $\text{Fe}^{+2}$ -индукованог МДА утврђене су значајно веће вредности ( $t=10.689$ ,  $\text{DF}=99$ ,  $p<0.001$ ) у сочивима пацијената са почетном сенилном катарактом у односу на сочива са матурном катарактом.

Табела 22. Флуоресцентни продукти пероксидације липида у сочивима, према степену матуритета катаракте

FI	Cataracta senilis incipiens (N=41)	Cataracta senilis matura (N=60)	$p^*$
Liposolubilni iminopropeni	89.49 $\pm$ 13.62*	63.86 $\pm$ 11.53	$p<0.001$
Hidrosolubilni iminopropeni	120.63 $\pm$ 16.32*	87.47 $\pm$ 11.16	$p<0.001$

FI ( $\lambda_{\text{ex}}=365 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{em}}=438 \text{ nm}$ )

Флуоресценце липосолубилних и хидросолубилних иминопропена у кортиконуклеарним блоковима сочива мерене су спектрофлуориметријски. Анализом добијених флуоресценци утврђена је значајна разлика у зависности од степена матуритета катаракте и то у сочивима испитаника са почетном катарактом значајно су веће флуоресценце липосолубилних ( $t=10.187$ ,  $\text{DF}=99$ ,  $p<0.001$ ) и хидросолубилних ( $t=12.138$ ,  $\text{DF}=99$ ,  $p<0.001$ ) иминопропена.

### 5.5.2. Нензимски чиниоци антиоксидационе заштите у сочивима пацијената са сенилном катарактом

У кортиконуклеарним блоковима катарактних сочива одређивани су нензимски чиниоци антиоксидационе заштите и то концентрација укупних непротеинских и протеинских тиола ( $\mu\text{mol}/\text{gr}$  протеина) (табела 23), концентрација укупног витамина Ц и

аскорбата (табела 24), затим активност ензима антиоксидационе заштите (табела 25) и испитивана је укупна антиоксидациона активност мерењем фери-редуктивне способности узорка ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  ткива) (табела 23).

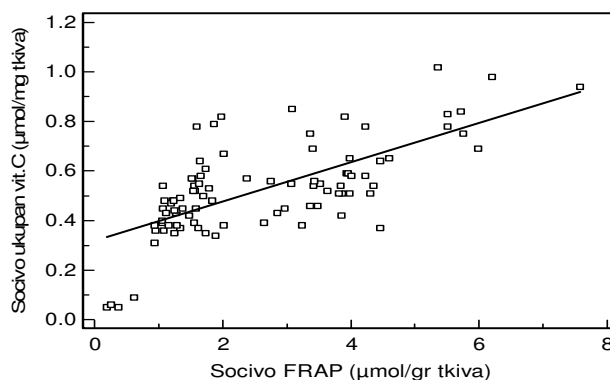
Анализирањем измерених концентрација непротеинских и протеинских тиола, утврђено је, да су значајно веће концентрације непротеинских тиол група ( $t=13.495$ ,  $DF=98$ ,  $p<0.001$ ), као и протеинских тиола ( $t=10.574$ ,  $DF=99$ ,  $p<0.001$ ) у сочивима испитаника са почетном катарактом у односу на сочива са матурном катарактом (табела 23).

Укупна антиоксидациона способност сочива пацијената са катарактом испитивана је ФРАП анализом ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  ткива сочива). Тестирањем разлике добијених вредности у испитиваним сочивима утврђена је значајно већа фери-редуктивна способност ( $t=14.864$ ,  $DF=99$ ,  $p<0.001$ ) кортиконуклеарних блокова са почетном катарактом у односу на сочива са матурном катарактом (табела 23).

Табела 23. Неензимски параметри антиоксидационе заштите у сочивима, према степену матуриитета катракте

$\mu\text{mol}/\text{gr}$	Cataracta senilis incipiens (N=41)	Cataracta senilis matura (N=60)	$p^*$
GSH	$2.55 \pm 0.9^*$	$0.88 \pm 0.27$	$p<0.001$
SH grupe	$102.45 \pm 25.54^*$	$54.81 \pm 19.68$	$p<0.001$
FRAP	$4.04 \pm 1.27^*$	$1.40 \pm 0.44$	$p<0.001$

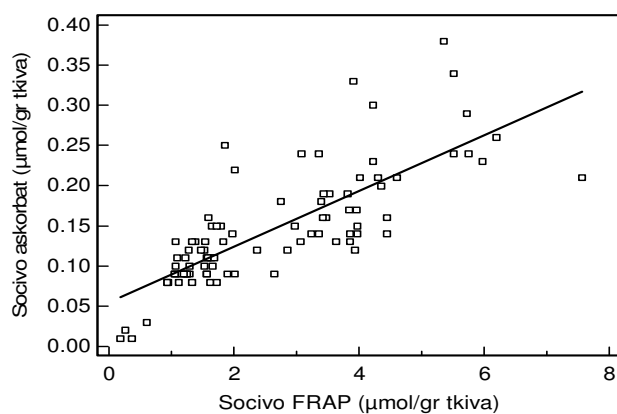
Вредности су изражене као средња вредност  $\pm$  СД



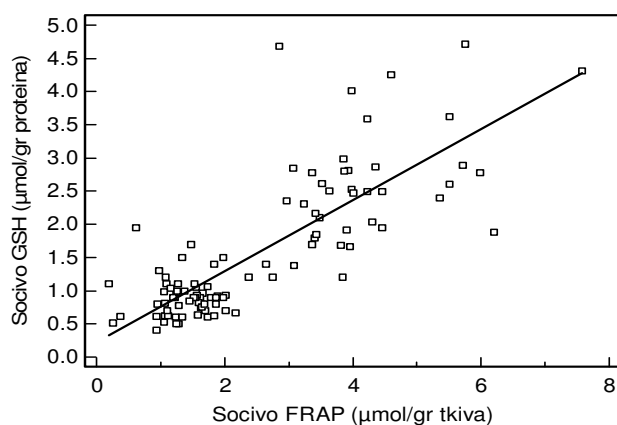
Графикон 25. Међусобни однос концентрације укупног витамина Ц ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  ткива) и вредности ФРАП анализе ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  ткива) у сочивима болесника са сенилном катарактом ( $y = 0.32 + 0.08 x$ ).

Испитивањем односа између концентрације укупног витамина Ц и фери-редуктивне способности сочива испитаника са сенилном катарактом добијена је значајна позитивна повезаност ( $r=0.683$ ,  $p<0.001$ ) (графикон 25), затим између концентрације аскорбата и фери-редуктивне способности сочива ( $r=0.780$ ,  $p<0.001$ ) (графикон 26), између концентрације непротеинских тиол група и фери-редуктивне способности сочива ( $r=0.804$ ,  $p<0.001$ ) (графикон 27), као и између протеинских тиола и фери-редуктивне способности сочива ( $r=0.726$ ,  $p<0.001$ ) (графикон 28).

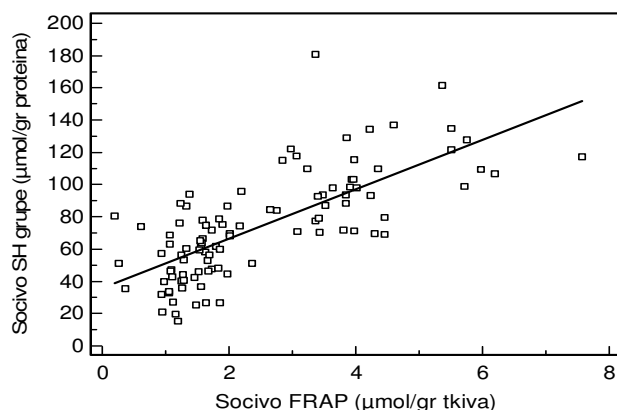




Графикон 26. Међусобни однос концентрације аскорбата ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  ткива) и вредности ФРАП анализе ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  ткива) у сочивима болесника са сенилном катарактом ( $y = 0.06 + 0.03 x$ ).



Графикон 27. Корелација између концентрације GSH ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  протеина) и вредности ФРАП у сочивима са сенилном катарактом ( $y = 0.23 + 0.53 x$ ).



Графикон 28. Међусобни однос концентрације протеинских тиол група ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  протеина) и вредности ФРАП анализе ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  ткива) у сочивима болесника са сенилном катарактом ( $y = 36.04 + 15.27 x$ ).

### 5.5.2.1. Концентрација витамина Ц у сочивима пацијента са сенилном катарактом

Концентрација укупног витамина Ц у кортиконуклеарним блоковима сочива одређивана је као збир аскорбата и дехидроаскорбата. У истим узорцима посебно је одређивана концентрација дехидроаскорбата, а затим је на основу разлике концентрације укупног витамина Ц и дехидроаскорбата израчунавана концентрација аскорбата.

Табела 24. Концентрација укупног витамина Ц у сочивима према степену матуриитета сенилне катаракте

$\mu\text{mol/mg}$	Cataracta senilis incipiens (N=41)	Cataracta senilis matura (N=49)	$p^*$
Ukupni vitamin C	$0.61 \pm 0.19^*$	$0.46 \pm 0.16$	$p < 0.001$
Dehidro-askorbat	$0.41 \pm 0.13$	$0.38 \pm 0.13$	$p = 0.250$
Askorbat	$0.19 \pm 0.07^*$	$0.11 \pm 0.04$	$p < 0.001$
D/A	$2.26 \pm 0.62$	$3.39 \pm 0.69^*$	$p < 0.001$

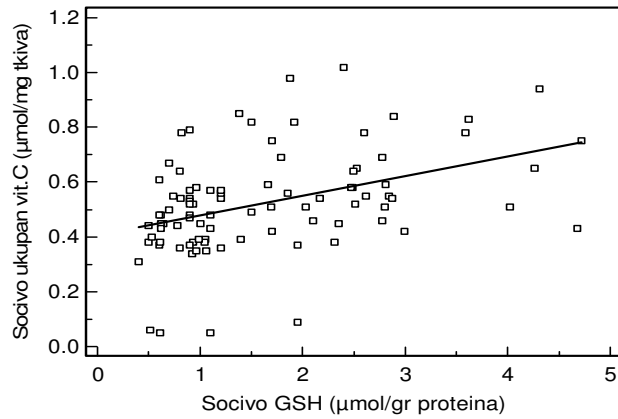
Вредности су изражене као средња вредност  $\pm$  СД

Просечне измерене концентрације укупног витамина Ц ( $\mu\text{mol/mg}$  ткива сочива) и дехидроаскорба ( $\mu\text{mol/mg}$  ткива сочива) у хомогенату катарактних сочива приказане су у табели 24. Тестирањем разлика, зависно од степена зрелости катаракте, утврђена је у сочивима испитаника са почетном катарактом значајно већа концентрација укупног витамина Ц ( $t=4.165$ ,  $DF=88$ ,  $p < 0.001$ ). Измерене концентрације дехидроаскорба ( $\mu\text{mol/mg}$  ткива сочива) у катарактним сочивима не показују значајну разлику зависно од степена матуриитета катаракте ( $t=1.159$ ,  $DF=88$ ,  $p=0.250$ ).

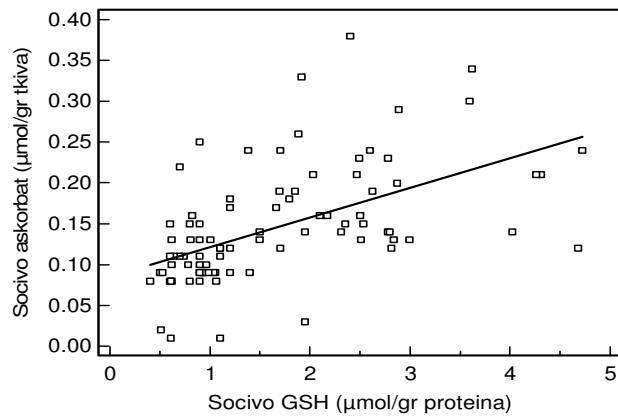
У сочивима испитаника са почетном катарактом значајно је већа концентрација аскорбата ( $t=7.242$ ,  $DF=88$ ,  $p < 0.001$ ), у односу на сочива са матурном катарактом.

У циљу процене учешћа витамина Ц у антиоксидационој заштити сочива одређиван је однос концентрација дехидроаскорбат/аскорбат. У сочивима испитаника са матурном катарактом значајно су веће вредности Д/А односа ( $t=-8.103$ ,  $DF=88$ ,  $p < 0.001$ ).

Анализирањем међусобног односа између концентрација укупног витамина Ц и непротеинских тиол група у сочиву утврђена је значајана позитивна повезаност ( $r=0.410$ ,  $p < 0.001$ ) (графикон 29), као и између концентрација аскорбата и непротеинских тиола у сочиву ( $r=0.542$ ,  $p < 0.001$ ) (графикон 30).



Графикон 29. Међусобни однос концентрације укупног витамина Ц ( $\mu\text{mol/mg}$  ткива) и непротеинских тиола ( $\mu\text{mol/mg}$  протеина) у сочивима болесника са сенилном катарактом ( $y = 0.41 + 0.07 x$ ).



Графикон 30. Међусобни однос концентрације аскорбата ( $\mu\text{mol/mg}$  ткива) и непротеинских тиола ( $\mu\text{mol/mg}$  протеина) у сочивима болесника са сенилном катарактом ( $y = 0.09 + 0.04 x$ ).

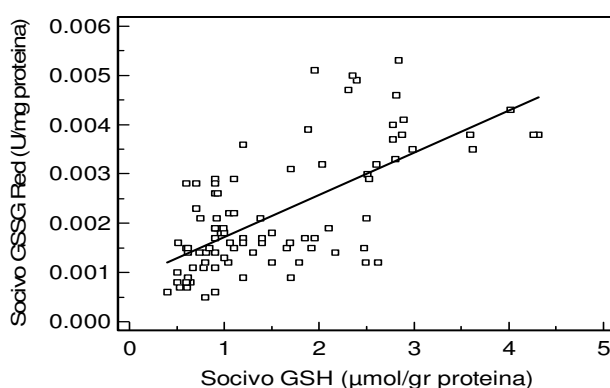
### 5.5.3. Ензимски чиниоци антиоксидационе заштите у сочивима пацијента са сенилном катарактом

Табела 25. Активност антиоксидационих ензима у сочивима према степену матуриитета сенилне катаракте

U/mg	Cataracta senilis incipiens	Cataracta senilis matura	<i>p</i> *
Superoksid dismutaza	0.0041 ± 0.0022	0.0021 ± 0.0009	<i>p</i> <0.001
Glutation peroksidaza	0.0034 ± 0.0015	0.0022 ± 0.001	<i>p</i> <0.001
Glutation reduktaza	0.003 ± 0.0013	0.0016 ± 0.0007	<i>p</i> <0.001
Glutation S-transferaza	0.0024 ± 0.0011	0.0014 ± 0.0007	<i>p</i> <0.001

Вредности су изражене као средња вредност ± СД

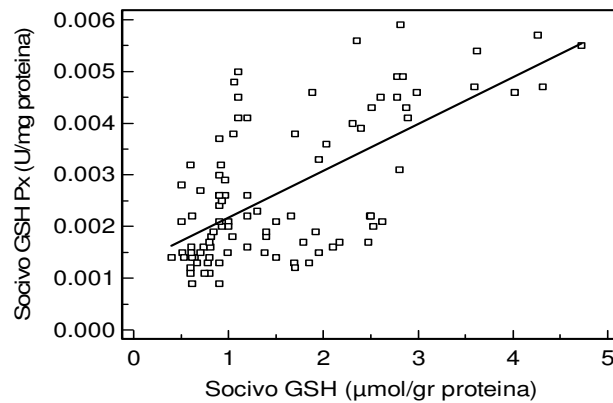
У хомогенатима кортиконуклеарних блокова сочива одређивана је активност антиоксидационих ензима и изражавана на милиграм протеина сочива (табела 25). Анализирањем добијених активности супероксид дисмутазе у сочивима, утврђена је значајно већа активност ( $t=6.170$ ,  $DF=95$ ,  $p<0.001$ ) у сочивима са почетном катарактом у односу на сочива са матурном катарактом, затим утврђена је значајно већа активност глутатион пероксидазе ( $t=4.762$ ,  $DF=94$ ,  $p<0.001$ ), глутатион редуктазе ( $t=6.645$ ,  $DF=92$ ,  $p<0.001$ ) као и глутатион С-трансферазе ( $t=4.947$ ,  $DF=90$ ,  $p<0.001$ ) у кортиконуклеарним блоковима сочива са почетном у односу на сочива са матурном сенилном катарактом.



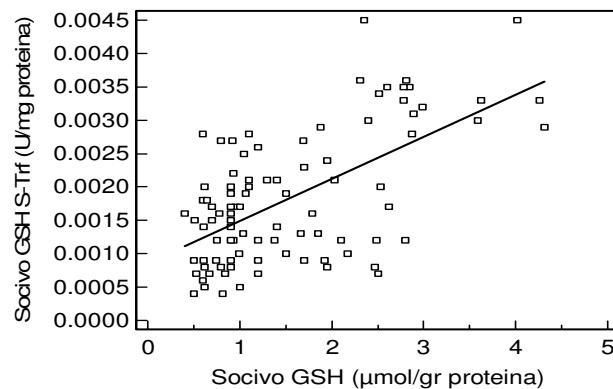
Графикон 31. Међусобни однос активности глутатион редуктазе (U/mg протеина) и концентрације непротеинских тиола ( $\mu\text{mol/g}$  протеина) у сочивима болесника са сенилном катарактом ( $y = 0.0009 + 0.0009 x$ ).

Анализирањем односа активности глутатион редуктазе и концентрације непротеинских тиола у сочивима пацијената са сенилном катарактом утврђена је значајана позитивна повезаност ( $r=0.672$ ,  $p<0.01$ ), (графикон 19), затим између активности

глутатион пероксидазе и концентрације непротеинских тиола у сочивима ( $r=0.655$ ,  $p<0.01$ ), (графикон 20), као и између активности глутатион С-трансферазе и концентрације непротеинских тиола у кортиконуклеарним блоковима сочива ( $r=0.607$ ,  $p<0.01$ ) (графикон 31).



Графикон 32. Међусобни однос активности глутатион пероксидазе (U/mg протеина) и концентрације непротеинских тиола ( $\mu\text{mol/g}$  протеина) у сочивима болесника са сенилном катарактом ( $y = 0.0013 + 0.0009 x$ ).



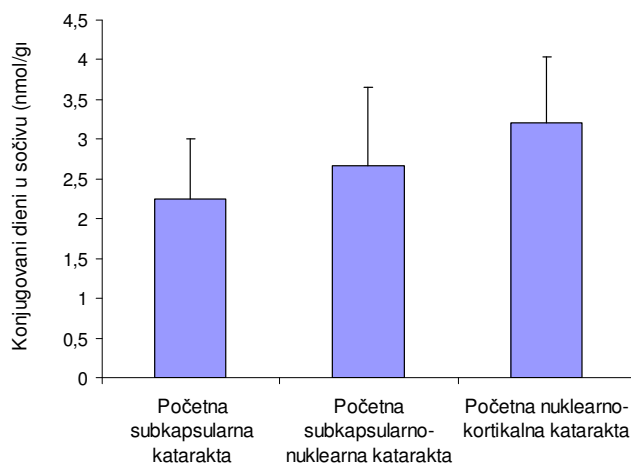
Графикон 33. Међусобни однос активности глутатион С-трансферазе (U/mg протеина) и концентрације непротеинских тиола ( $\mu\text{mol/g}$  протеина) у сочивима болесника са сенилном катарактом ( $y = 0.0009 + 0.0006 x$ ).

## 5.6. Резултати биохемијских испитивања сочива са дијагнозом почетне сенилне катаракте

Биохемијским испитивањима, оксидационих промена и антиоксидационих чиниоца, обухваћени су кортиконуклеарни блокови сочива 41 пацијента са дијагнозом почетне сенилне катаракте (*cataracta senilis incipiens*). Тачније, 23 пацијента је имало почетну субкапсуларну катаракту, 9 пацијента почетну мешовито субкапсуларно-нуклеарну катаракту и 9 болесника је било са дијагнозом почетне мешовито нуклеарно-кортикалне катаракте.

### 5.6.1. Продукти пероксидације липида у сочивима са почетном сенилном катарактом

Концентрације примарних продуката пероксидације липида у кортиконуклеарним блоковима сочива пацијента са различитим типовима почетне катаракте приказане су на графикону 34. Анализирањем добијених података утврђена је значајна разлика у концентрацији коњугованих диена у сочивима ( $F=4.403$ ,  $df=2/40$ ,  $p<0.05$ ) зависно од типа почетне катаракте. Концентрација коњугованих диена је значајно већа у сочивима пацијента са почетном мешовитом нуклеарно-кортикалном катарактом у односу на пацијенте са почетном субкапсуларном катарактом ( $p<0.05$ ) (графикон 34).



Графикон 34. Концентрација коњугованих диена (nmol/g ткива) у сочивима са почетном сенилном катарактом, у зависности од типа катаракте

Липидни хидропероксиди су у кортиконуклеарним блоковима сочива одређивани помоћу тиобарбитурне киселине, као и концентрација малондиалдехида, с тим што су липидни хидропероксиди одвајани од других продуката пероксидације липида помоћу двовалентног гвожђа. Процена индукције МДА гвожђем добијена је израчунавањем процентуалног удела  $Fe^{+2}$ -индукованог малондиалдехида.

Табела 26. Концентрација малондиалдехида у сочивима са почетном сенилном катарактом, зависно од типа катаракте

nmo/g	Početna subkapsularna katarakta (N=23)	Početna, mešovito subkapsularno-nuklearna katarakta (N=9)	Početna, mešovito nuklearno-kortikalna katarakta (N=9)
MDAi	0.029 ± 0.008	0.026 ± 0.01	0.035 ± 0.009
MDAo	0.09 ± 0.016	0.017 ± 0.007	0.024 ± 0.006
%MDA	41.0 ± 8.0	32.0 ± 12.76*	29.89 ± 3.92**

\*p<0.05, \*\*p<0.01

Додавањем раствора FeSO<sub>4</sub> хомогенату сочива пре одређивања малондиалдехида (nmol/gr ткива), тестом са тиобарбитурном киселином, одређиване су концентрације липидних хидропероксида или Fe<sup>+2</sup>-индукованог МДА (nmol/gr ткива). Анализом варијансе је утврђено да се измерене концентрације липидних хидропероксида (F=2.338, df=2/40, p=0.110) у сочивима пацијената са различитим типовима почетне катаракте не разликују значајно, као ни концентрације малондиалдехида (F=0.609, df=2/40, p=0.549) зависно од типа почетне катаракте (табела 26).

Ради процене индукције малондиалдехида гвожђем, израчунаван је процентуални удео Fe<sup>+2</sup>-индукованог малондиалдехида. Тестирањем разлике добијених вредности процента Fe<sup>+2</sup>-индукованог МДА утврђена је значајна разлика зависно од типа почетне катаракте (F=6.982, df=2/40, p<0.01). Тачније, значајно већи проценат Fe<sup>+2</sup>-индукованог МДА измерен је у сочивима са почетном субкапсуларном катарактом у односу на сочива са почетном мешовито субкапсуларно-нуклерном катарактом (p<0.05) и у сочивима пацијената са почетном субкапсуларном катарактом у односу на сочива са почетном мешовитом нуклеарно-кортикалном катарактом (p<0.01) (табела 26).

Табела 27. Флуоресцентни производи пероксидације липида у сочивима са почетном сенилном катарактом, у зависности од типа катаракте

FI	Početna subkapsularna katarakta (N=23)	Početna, mešovito subkapsularno-nuklearna katarakta (N=9)	Početna, mešovito nuklearno-kortikalna katarakta (N=9)
Liposolubilni iminopropeni	84.38 ± 12.89	95.5 ± 12.46*	96.57 ± 11.96
Hidrosolubilni iminopropeni	115.88 ± 15.97	122.07 ± 14.08*	131.33 ± 15.35

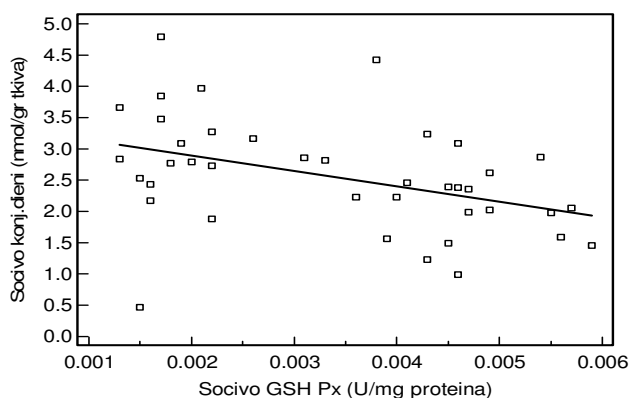
FI ( $\lambda_{ex}=365$  nm  $\lambda_{em}=438$  nm)

\*p<0.05

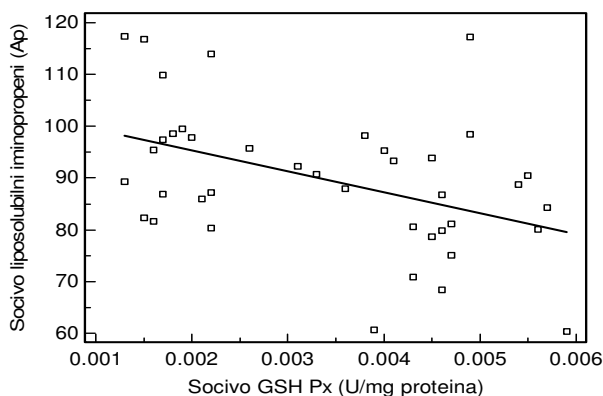
Просечне измерене флуоресценце производа липидне пероксидације у кортиконуклеарним блоковима сочива пацијената са различитим типовима почетне катаракте приказане су у табели 27. Анализом варијансе је утврђено да се сочива са различитим типовима почетне катаракте значајно разликују према флуоресценци

липосолубилних ( $F=4.331$ ,  $df=2/40$ ,  $p<0.05$ ), као и хидросолубилних иминопиперина ( $F=3.285$ ,  $df=2/40$ ,  $p<0.05$ ). Наиме, флуоресценце липосолубилних ( $p<0.05$ ) и хидросолубилних иминопиперина ( $p<0.05$ ) значајно су веће у сочивима пацијената са почетном мешовитом нуклеарно-кортикалном катарактом у односу на сочива пацијената са почетном субкапсуларном катарактом.

Полазећи од чињенице да је активност глутатион пероксидазе усмерена ка разградњи продуката пероксидације липида, испитиван је међусобни однос активности глутатион пероксидазе и концентрације коњугованих диена у сочивима пацијената са почетном катарактом, при чему је утврђена значајана негативна повезаност ( $r=-0.410$ ,  $p<0.01$ ) (графикон 35), такође, значајна негативна повезаност је утврђена између активности глутатион пероксидазе и апсорбанси липосолубилних иминопиперина ( $r=-0.440$ ,  $p<0.01$ ) (графикон 36) и између апсорбанси хидросолубилних иминопиперина и активности глутатион пероксидазе ( $r=-0.415$ ,  $p<0.01$ ) (графикон 37).

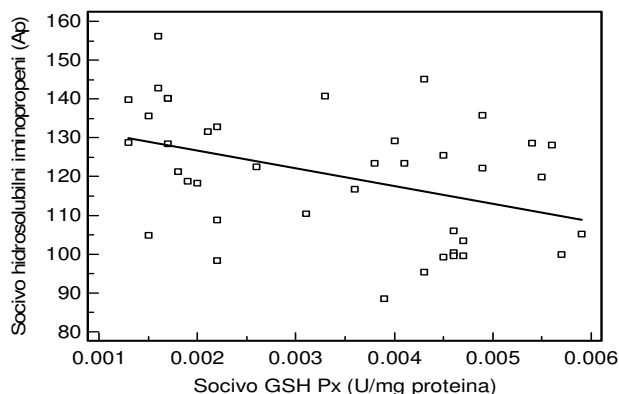


Графикон 35. Међусобни однос активности глутатион пероксидазе (U/mg протеина) и концентрације коњугованих диена (nmol/gr ткива) у сочивима болесника са почетном сенилном катарактом ( $y = 3.39 + -246.82 x$ ).



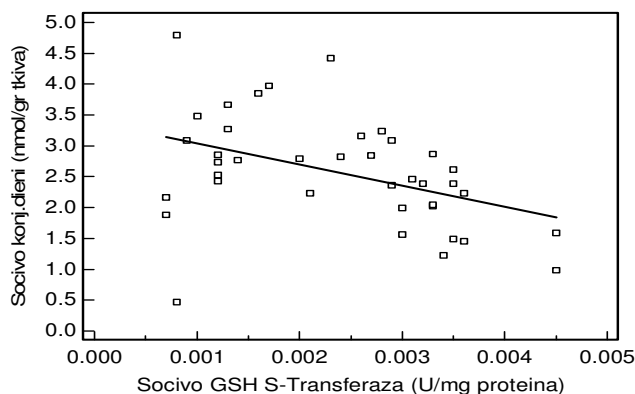
Графикон 36. Међусобни однос активности глутатион пероксидазе (U/mg протеина) и апсорбанси липосолубилних иминопиперина у сочивима болесника са почетном сенилном катарактом ( $y = 103.41 + -4035.95 x$ ).



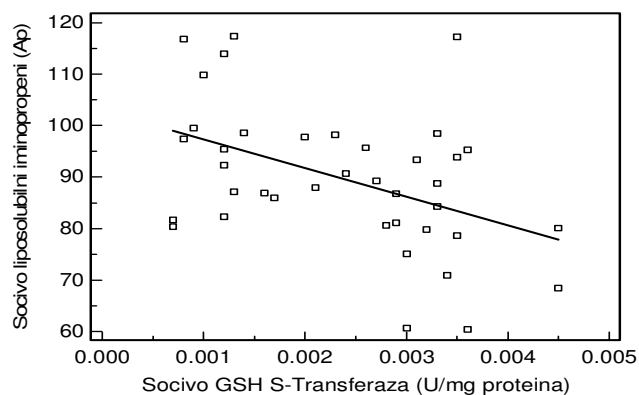


Графикон 37. Међусобни однос активности глутатион пероксидазе (U/mg протеина) и апсорбниси хидросолубилних иминопредна у сочивима болесника са почетном сенилном катарактом ( $y = 135.93 + -4576.99 x$ ).

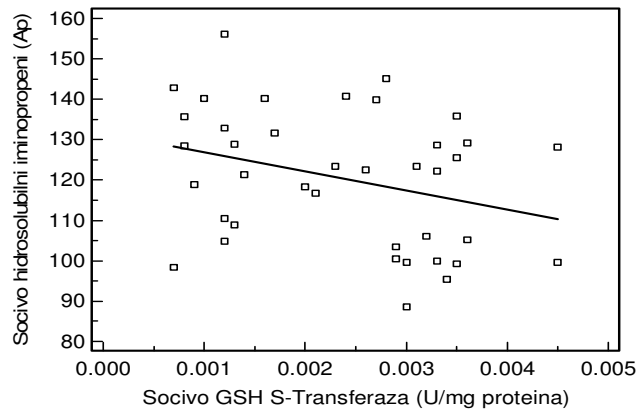
Испитивањем међусобног односа активности глутатион С-трансферазе и концентрације коњугованих диена у сочивима пацијената са почетном сенилном катарактом утврђена је значајана негативна повезаност ( $r=-0.420$ ,  $p<0.01$ ) (графикон 38), као и између активности глутатион С-трансферазе и апсорбниси липосолубилних иминопредна ( $r=-0.446$ ,  $p<0.01$ ) (графикон 39) и између апсорбниси хидросолубилних иминопредна и активности глутатион С-трансферазе у сочивима ( $r=-0.317$ ,  $p<0.05$ ) (графикон 40).



Графикон 38. Међусобни однос активности глутатион С-трансферазе (U/mg протеина) и концентрације коњугованих диена (nmol/gr tkiva) у сочивима болесника са почетном сенилном катарактом ( $y = 3.38 + -342.35 x$ ).



Графикон 39. Међусобни однос активности глутатион С-трансферазе (U/mg протеина) и апсорбниси липосолубилних иминопропена у сочивима болесника са почетном сенилном катарактом ( $y = 102.86 + -5566.35 x$ ).



Графикон 40. Међусобни однос активности глутатион С-трансферазе (U/mg протеина) и апсорбниси хидросолубилних иминопропена у сочивима болесника са почетном сенилном катарактом ( $y = 131.68 + -4762.40 x$ ).

## 5.6.2. Неензимски чиниоци антиоксидационе заштите у сочивима пацијената са почетном сенилном катарактом

Табела 28. Чиниоци антиоксидационе заштите у сочивима пацијената са почетном катарактом, зависно од типа катаракте

$\mu\text{mol/gr}$	Početna subkapsularna katarakta (N=23)	Početna, mešovito subkapsularno-nuklearna katarakta (N=9)	Početna, mešovito nuklearno-kortikalna katarakta (N=9)
GSH	$3.0 \pm 0.9$	$2.16 \pm 0.55^*$	$1.81 \pm 0.42^{**}$
SH grupe	$114.17 \pm 26.25$	$89.17 \pm 18.59^*$	$85.8 \pm 10.8^{**}$
FRAP	$4.51 \pm 1.24$	$3.58 \pm 1.15$	$3.35 \pm 0.46^*$

\* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

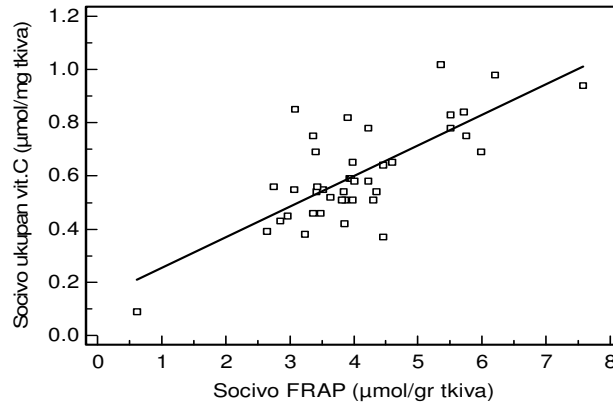
Концентрације непротеинских и протеинских тиола ( $\mu\text{mol/gr}$  протеина) у кортиконуклеарним блоковима сочивима са различитим типовима почетне катаракте представљене су у табели 28. Применом статистичке процедуре утврђена је значајна разлика концентрације непротеинских тиола ( $F=9.608$ ,  $df=2/40$ ,  $p < 0.01$ ) у сочивима зависно од типа почетне катаракте. Концентрација непротеинских тиол група је значајно већа у сочивима пацијената са почетном субкапсуларном катарактом у односу на сочива са почетном мешовито субкапсуларно-нуклерном катарактом ( $p < 0.05$ ) и у сочивима пацијената са почетном субкапсуларном катарактом у односу на сочива са почетном мешовито нуклеарно-кортикалном катарактом ( $p < 0.01$ ).

Анализом варијансе је утврђено да постоји значајна разлика и концентрације протеинских тиола у сочивима ( $F=7.301$ ,  $df=2/40$ ,  $p < 0.01$ ) пацијената са различитим типовима почетне катаракте. Наиме, у сочивима са почетном субкапсуларном катарактом концентрација протеинских тиола је значајно већа у односу на сочива са почетном мешовито субкапсуларно-нуклерном катарактом ( $p < 0.05$ ) и у сочивима пацијената са почетном субкапсуларном катарактом у односу на сочива са почетном мешовито нуклеарно-кортикалном катарактом ( $p < 0.01$ ).

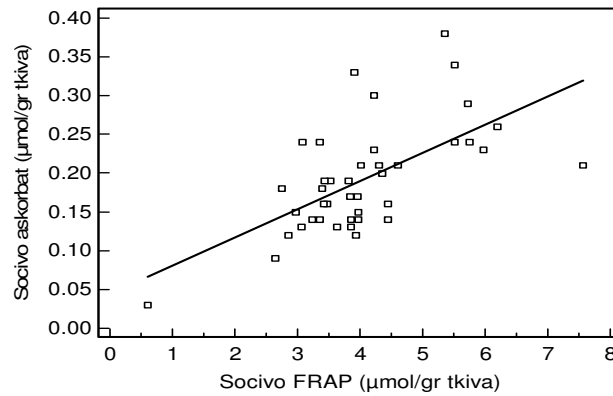
Процена укупне антиоксидационе способности кортиконуклеарних блокова сочива пацијената са почетном катарактом вршена је помоћу ФРАП анализе ( $\mu\text{mol/mg}$  ткива сочива). Тестирањем разлике добијених вредности у испитиваним сочивима, утврђена је значајно већа фери-редуктивна способност сочива испитаника са почетном субкапсуларном катарактом у односу на сочива са почетном мешовито нуклеарно-кортикалном катарактом ( $F=4.684$ ,  $df=2/40$ ,  $p < 0.05$ ) (табела 28).

Како се ФРАП анализом утврђује укупна антиоксидациона активност узорка, испитиван је међусобни однос концентрације појединих чиниоца антиоксидационе заштите и укупне антиоксидационе способности узорка. Испитивањем односа између концентрације укупног витамина Ц и вредности ФРАП анализе у сочивима пацијената са почетном катарактом утврђена је значајна позитивна повезаност ( $r=0.743$ ,  $p < 0.001$ ) (графикон 41), такође између концентрације аскорбата и вредности ФРАП анализе у сочивима ( $r=0.621$ ,  $p < 0.001$ ) (графикон 42), као и између концентрације непротеинских тиола и вредности ФРАП анализе у сочивима ( $r=0.420$ ,  $p < 0.01$ ) (графикон 43) и између

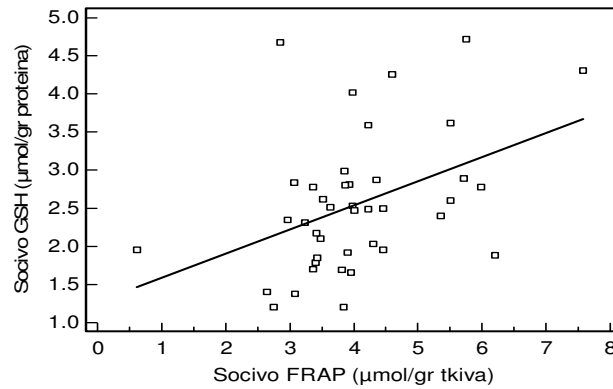
концентрације протеинских тиола и вредности ФРАП анализе у сочивима ( $r = 0.334$ ,  $p < 0.05$ ) (графикон 44) пацијената са почетном катарактом.



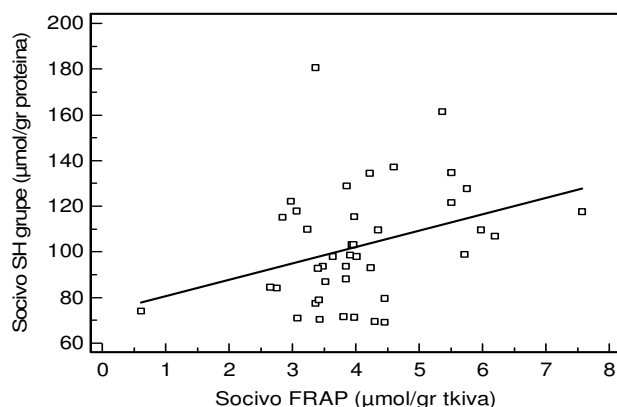
Графикон 41. Међусобни однос концентрације укупног витамина Ц ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  ткива) и вредности ФРАП анализе ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  ткива) у сочивима болесника са почетном сенилном катарактом ( $y = 0.14 + 0.12 x$ ).



Графикон 42. Међусобни однос концентрације аскорбата ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  ткива) и вредности ФРАП анализе ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  ткива) у сочивима болесника са почетном сенилном катарактом ( $y = 0.04 + 0.04 x$ ).



Графикон 43. Међусобни однос концентрације непротеинских тиола ( $\mu\text{mol}/\text{g}$  протеина) и вредности ФРАП анализе ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  ткива) у сочивима болесника са почетном сенилном катарактом ( $y = 1.27 + 0.32 x$ ).



Графикон 44. Међусобни однос концентрације протеинских тиола ( $\mu\text{mol/g}$  протеина) и вредности ФРАП анализе ( $\mu\text{mol/mg}$  ткива) у сочивима болесника са почетном сенилном катарактом ( $y = 73.53 + 7.14 x$ ).

### 5.6.2.1. Концентрација витамина Ц у сочивима пацијента са почетном сенилном катарактом

Просечне измерене концентрације укупног витамина Ц и дехидроаскорбата у кортиконуклеарним блоковима сочива са почетном катарактом представљене су у табели 29. Концентрација аскорбата у истим узорцима израчунавана је из разлике концентрација укупног витамина Ц и дехидроаскорбата, а у циљу процене учешћа витамина Ц у антиоксидационој заштити сочива са почетном сенилном катарактом одређиван је однос концентрација дехидроаскорбат/аскорбат.

Табела 29. Концентрација витамина Ц у сочивима са почетном сенилном катарактом у зависности од типа катаракте

$\mu\text{mol/mg}$	Početna subkapsularna katarakta	Početna, mešovito subkapsularno-nuklearna katarakta	Početna, mešovito nuklearno-kortikalna katarakta
Ukupni vitamin C	$0.64 \pm 0.2$	$0.52 \pm 0.17$	$0.61 \pm 0.15$
Dehidro-askorbat	$0.44 \pm 0.14$	$0.36 \pm 0.13$	$0.41 \pm 0.11$
Askorbat	$0.2 \pm 0.08$	$0.16 \pm 0.06$	$0.19 \pm 0.07$
D/A	$2.25 \pm 0.68$	$2.31 \pm 0.6$	$2.23 \pm 0.56$

Вредности су изражене као средња вредност  $\pm$  СД

Анализом варијансе тестиране су разлике добијених концентрација укупног витамина Ц, дехидроаскорбата, аскорбата ( $\mu\text{mol/mg}$  ткива) и Д/А у кортиконуклеарним блоковима сочива са различитим типовима почетне катаракте. Утврђено је да се сочива са различитим типовима почетне катаракте међусобно не разликују према концентрацији укупног витамина Ц ( $F=1.457$ ,  $df=2/40$ ,  $p=0.246$ ), дехидроаскорба ( $F=1.086$ ,  $df=2/40$ ,

p=0.348), аскорбата (F=1.369, df=2/40, p=0.267) и концентрационог односа Д/А (F=0.046, df=2/40, p=0.955) (табела 29).

### 5.6.3. Активност антиоксидационих ензима у сочивима пацијената са почетном сенилном катарактом

Табела 30. Активност антиоксидационих ензима у сочивима пацијената са почетном сенилном катарактом, зависно од типа катаракте

U/mg	Početna subkapsularna katarakta (N=22)	Početna, mešovito subkapsularno-nuklearna katarakta (N=9)	Početna, mešovito nuklearno-kortikalna katarakta (N=9)
Superoksid dismutaza	0.0058 ± 0.0012	0.0023 ± 0.0006*	0.0017 ± 0.0006*
Glutation peroksidaza	0.0046 ± 0.0007	0.0021 ± 0.0005*	0.0016 ± 0.0002*
Glutation reduktaza	0.004 ± 0.0007	0.0019 ± 0.0007*	0.0016 ± 0.0003*
Glutation S-transferaza	0.0032 ± 0.0006	0.0016 ± 0.0007*	0.0011 ± 0.0003*

\*p<0.001

Просечне измерене активности антиоксидационих ензима у кортиконуклеарним блоковима сочива пацијената са различитим типовима почетне катаракте приказане су у табели 30. Анализом варијансе тестиране су разлике активности сваког испитиваног ензима међу сочивима са различитим типовима почетне катаракте. Утврђена је значајно већа активност супероксид дисмутазе у сочивима пацијента са почетном субкапсуларном катарактом у односу на сочива са почетном мешовито субкапсуларно-нуклерном катарактом (F=72.271, df=2/39, p<0.001) и у сочивима пацијената са почетном субкапсуларном катарактом у односу на сочива са почетном мешовито нуклеарно-кортикалном катарактом (p<0.001).

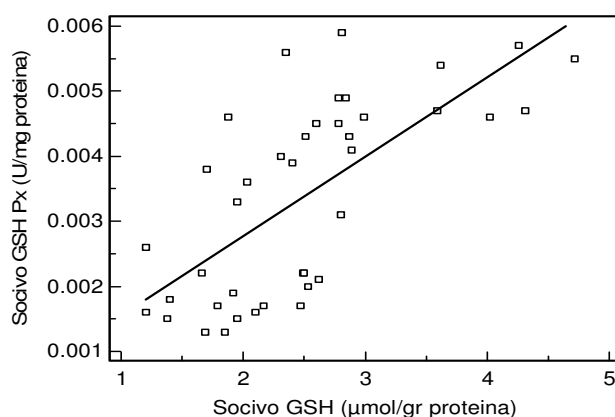
Активност глутатион пероксидазе је значајно већа у сочивима пацијената са почетном субкапсуларном катарактом у односу на сочива са почетном мешовито субкапсуларно-нуклерном катарактом (F=108.273, df=2/39, p<0.001), као и у сочивима пацијената са почетном субкапсуларном катарактом у односу на сочива са почетном мешовито нуклеарно-кортикалном катарактом (p<0.001).

У кортиконуклеарним блоковима сочива пацијената са почетном субкапсуларном катарактом, активност глутатион редуктазе значајно је већа у односу на сочива са почетном мешовито субкапсуларно-нуклерном катарактом (F=62.085, df=2/38, p<0.001), као и у сочивима пацијената са почетном субкапсуларном катарактом у односу на сочива са почетном мешовито нуклеарно-кортикалном катарактом (p<0.001).

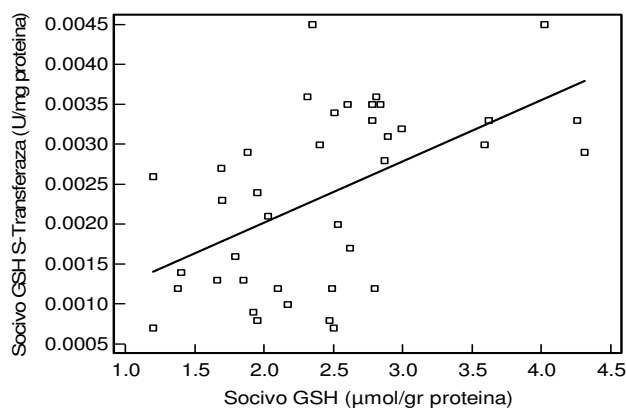
Анализом варијансе утврђено је постојање значајне разлике (F=52.234, df=2/38, p<0.001) активности глутатион С-трансферазе сочива, зависно од типа почетне катаракте, наиме, активност глутатион С-трансферазе је значајно већа у сочивима пацијента са почетном субкапсуларном катарактом у односу на сочива са почетном мешовито субкапсуларно-нуклерном катарактом (p<0.001) и у сочивима пацијената са

почетном субкапсуларном катарактом у односу на псочива са почетном мешовито нуклеарно-кортикалном катарактом ( $p < 0.001$ ).

Анализирањем односа између активности глутатион пероксидазе и концентрације непротеинских тиола у сочивима пацијента са почетном катарактом утврђена је значајна позитивна повезаност ( $r = 0.688$ ,  $p < 0.001$ ) (графикон 45), као и између активности глутатион редуктазе и концентрације непротеинских тиола ( $r = 0.507$ ,  $p < 0.01$ ) и између активности глутатион С-трансферазе и концентрације непротеинских тиол група ( $r = 0.535$ ,  $p < 0.001$ ) (графикон 46).



Графикон 45. Међусобни однос активности глутатион пероксидазе (U/mg протеина) и концентрације непротеинских тиола ( $\mu\text{mol/g}$  протеина) у сочивима болесника са почетном сенилном катарактом ( $y = 0.0003 + 0.001 x$ ).



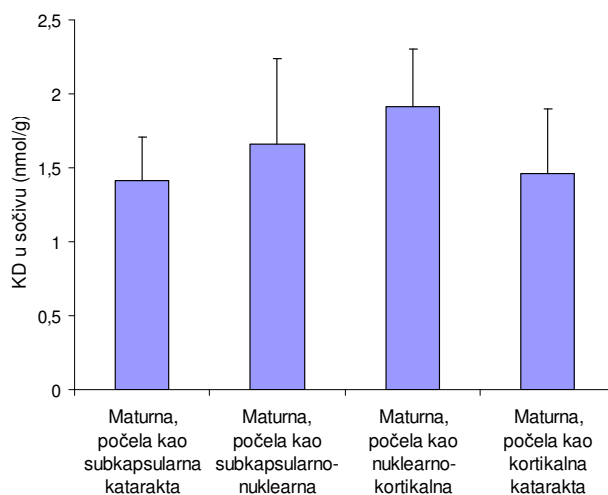
Графикон 46. Међусобни однос активности глутатион С-трансферазе (U/mg протеина) и концентрације непротеинских тиол а ( $\mu\text{mol/g}$  протеина) у сочивима болесника са почетном сенилном катарактом ( $y = 0.0005 + 0.0008 x$ ).

## 5.7. Резултати биохемјских испитивања сочива са дијагнозом матурне сенилне катаракте

Презентовани рад је биохемијским испитивањима обухватио кортиконуклеарне блокове сочива 60 пацијента са дијагнозом матурне сенилне катаракте (*cataracta senilis matura*), где је 19 пацијената имало матурну катаракту која је почела као субкапсуларна, 15 пацијената матурну почелу као мешовито субкапсуларно-нуклеарна катаракта, 16 болесника је било са дијагнозом матурне катаракте, започелом као мешовито нуклеарно-кортикална и 10 пацијената је имало матурну катаракту, која је почела као кортикална.

### 5.7.1. Продукти пероксидације липида у сочивима са матурном сенилном катарактом

На графикону 47 приказане су просечне измерене концентрације примарних продуката пероксидације липида у кортиконуклеарним блоковима сочива са дијагнозом матурне катаракте, која је почела на различите начине.



Графикон 47. Концентрација коњугованих диена (nmol/gт ткива) у сочивима пацијената са матурном сенилном катарактом у зависности од начина на који је процес почео.

Анализирањем добијених концентрација коњугованих диена у сочивима са матурном катарактом добијена је значајна разлика зависно од начина на који је катаракта почела ( $F=4.460$ ,  $df=3/59$ ,  $p<0.01$ ). Концентрација коњугованих диена је значајно већа у сочивима пацијената са матурном сенилном катарактом, која је почела као мешовито нуклеарно-кортикална у односу на пацијенте са матурном, која је почела као субкапсуларна катаракта ( $p<0.01$ ) (графикон 47).



У кортиконуклеарним блоковима сочива са матурном сенилном катарактом одређивана је концентрација липидних хидропероксида и малондиалдехида. Просечне измерене концентрације поменутих продуката липидне пероксидације, као и њихове разлике међу сочивима у којима је катаракта почела на различите начине приказане су у табели 31. Тестирањем разлика, анализом варијансе, није утврђена разлика концентрација липидних хидропероксида (или  $\text{Fe}^{+2}$ -индукованог малондиалдехида) ( $F=1.521$ ,  $df=3/59$ ,  $p=0.219$ ), као ни концентрација малондиалдехида ( $F=0.496$ ,  $df=3/59$ ,  $p=0.700$ ) у сочивима са матурном катарактом, зависно од начина на који је катаракта почела.

Табела 31. Концентрација малондиалдехида у сочивима са матурном сенилном катарактом, у зависности од начина на који је процес почео

nmol/gr	Maturna, počela kao subkapsularna katarakta (N=19)	Maturna, počela kao subkapsularno-nuklearna katarakta (N=15)	Maturna, počela kao nuklearno-kortikalna katarakta (N=16)	Maturna, počela kao kortikalna katarakta (N=10)
MDAi	0.042 ± 0.014	0.039 ± 0.014	0.036 ± 0.006	0.071 ± 0.105
MDAo	0.033 ± 0.011	0.03 ± 0.011	0.03 ± 0.005	0.03 ± 0.005
%MDA	20.84 ± 4.19	22.73 ± 6.58	15.56 ± 4.76*	20.8 ± 5.69

\* $p<0.05$

Ради стварне процене индукције малондиалдехида гвожђем, израчунаван је процентуални удео  $\text{Fe}^{+2}$ -индукованог малондиалдехида. Тестирањем разлике добијених вредности процента  $\text{Fe}^{+2}$ -индукованог малондиалдехида утврђене су значајно веће вредности у сочивима са матурном катарактом, која је започела као субкапсуларна ( $F=5.359$ ,  $df=3/59$ ,  $p<0.01$ ) у односу на сочива са матурном, започелом као мешовито нуклеарно-кортикална катаракта ( $p<0.05$ ) и у сочивима пацијената са матурном, започелом као мешовито субкапсуларно-нуклеарна ( $p<0.01$ ) у односу на сочива са матурном, почелом као мешовито нуклеарно-кортикална катаракта (табела 31).

У табели 33 приказане су просечне измерене флуоресценце ( $\lambda_{\text{ex}}=365$  nm  $\lambda_{\text{em}}=438$  nm) продуката пероксидације липида у кортиконуклеарним блоковима сочива пацијената са матурном сенилном катарактом, која је почела на различите начине. Анализирањем добијених флуоресценци, утврђено је да се сочива са матурном катарактом међусобно разликују ( $F=2.931$ ,  $df=3/59$ ,  $p<0.05$ ), зависно од начина на који је сенилна катаракта почела. Флуоресценца липосолубилних иминопиперидина је значајно већа у сочивима пацијената са матурном катарактом, која је почела као мешовито субкапсуларно-нуклеарна у односу на сочива пацијената са матурном започелом као субкапсуларна катаракта ( $p<0.05$ ) (табела 33).

Сочивима са матурном катарактом значајно се разликују ( $F=7.181$ ,  $df=3/59$ ,  $p<0.001$ ) и према вредности флуоресценци хидросолубилних иминопиперидина, зависно од типа којим је катаракта започела. Флуоресценца хидросолубилних иминопиперидина је значајно већа у сочивима пацијената са матурном катарактом, која је почела као мешовито субкапсуларно-нуклеарна у односу на сочива са матурном, започелом као субкапсуларна катаракта ( $p<0.05$ ), у сочивима пацијената са матурном, која је почела као мешовито нуклеарно-кортикална у односу на сочива са матурном, започелом као субкапсуларна катаракта ( $p<0.01$ ) и у сочивима пацијената са матурном, која је почела

као мешовито нуклеарно-кортикална у односу на сочива са матурном започелом као кортикална катаракта ( $p < 0.01$ ) (табела 33).

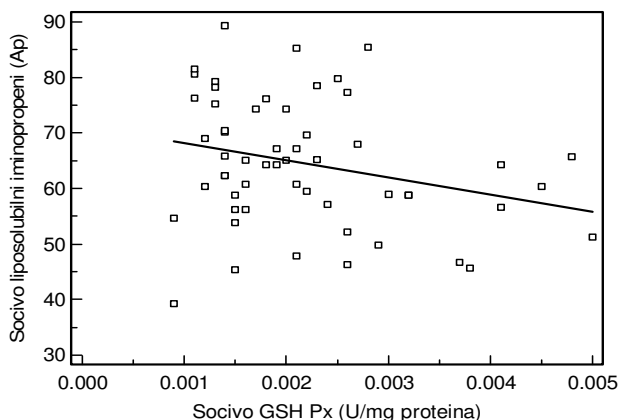
Табела 33. Флуоресцентни производи липидне пероксидације у сочивима са матурном сенилном катарактом, зависно од начина на који је процес почео

FI	Maturna, počela kao subkapsularana katarakta (N=19)	Maturna, počela kao subkapsularno-nuklearna katarakta (N=15)	Maturna, počela kao nuklearno-kortikalna katarakta (N=16)	Maturna, počela kao kortikalna katarakta (N=10)
Liposolubilni iminopropeni	58.11 ± 8.1	68.27 ± 10.8**	64.21 ± 14.69	67.64 ± 9.0
Hidrosolubilni iminopropeni	81.78 ± 8.05	91.32 ± 9.17**	94.56 ± 12.14*	81.14 ± 9.14

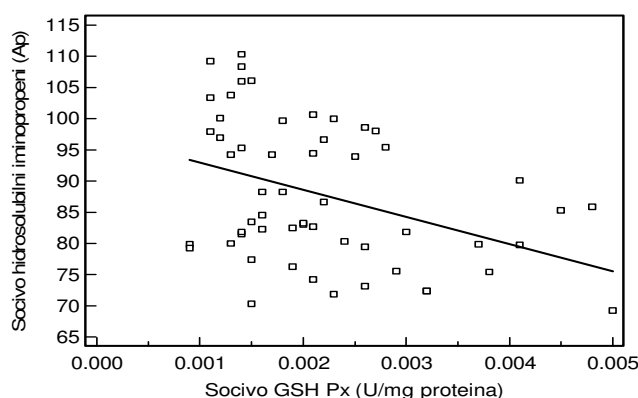
FI ( $\lambda_{ex}=365 \text{ nm}$   $\lambda_{em}=438 \text{ nm}$ )

\*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.05$

Испитивањем односа између апсорбанси липосолубилних иминопропена и активности глутатион пероксидазе у сочивима болесника са матурном катарактом утврђена је значајана негативна повезаност ( $r = -0.270$ ,  $p < 0.05$ ) (графикон 40), као и између апсорбанси хидросолубилних иминопропена и активности глутатион пероксидазе у сочивима ( $r = -0.388$ ,  $p < 0.01$ ) (графикон 41).



Графикон 40. Међусобни однос флуоресценци липосолубилних иминопропена и активности глутатион пероксидазе (U/mg протеина) у сочивима болесника са матурном сенилном катарактом ( $y = 71.24 + -3089.35 x$ ).



Графикон 41. Корелација између флуоресценци хидросолубилних иминопропена и активности глутатион пероксидазе (U/mg протеина) у сочивима болесника са матурном сенилном катарактом ( $y = 97.34 + -4354.89 x$ ).

### 5.7.2. Неензимски чиниоци антиоксидационе заштите у сочивима пацијената са матурном сенилном катарактом

Табела 34. Концентрације неензимских чиниоца антиоксидационе заштите у сочивима пацијената са матурном катарактом, зависно од начина на који је процес почео

$\mu\text{mol/gr}$	Maturna, počela kao subkapsularana katarakta (N=19)	Maturna, počela kao subkapsularno-nuklearna katarakta (N=15)	Maturna, počela kao nukleano-kortikalna katarakta (N=16)	Maturna, počela kao kortikalna katarakta (N=10)
GSH	$0.98 \pm 0.19$	$0.78 \pm 0.21$	$0.81 \pm 0.35$	$0.92 \pm 0.25$
SH grupe	$59.97 \pm 16.62$	$58.09 \pm 20.89$	$48.18 \pm 21.9$	$50.69 \pm 18.38$
FRAP	$1.60 \pm 0.46$	$1.35 \pm 0.51$	$1.21 \pm 0.22^*$	$1.6 \pm 0.39$

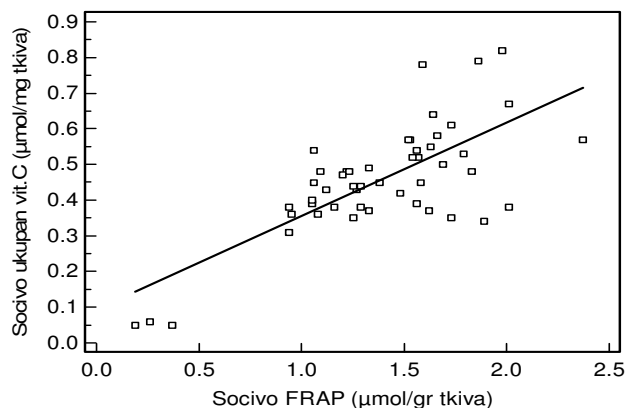
\* $p < 0.05$

Просечне измерене концентрације непротеинских и протеинских тиола ( $\mu\text{mol/gr}$  протеина), као и њихове разлике у сочивима са матурном сенилном катарактом, која је почела на различите начине приказане су у табели 34. Анализом варијансе није утврђена значајна разлика концентрација непротеинских тиол група ( $F=2.099$ ,  $df=3/58$ ,  $p=0.111$ ), као ни разлика концентрација протеинских тиола ( $F=1.350$ ,  $df=3/59$ ,  $p=0.268$ ) у сочивима са матурном сенилном катарактом, зависно од типа којим је катаракта започела.

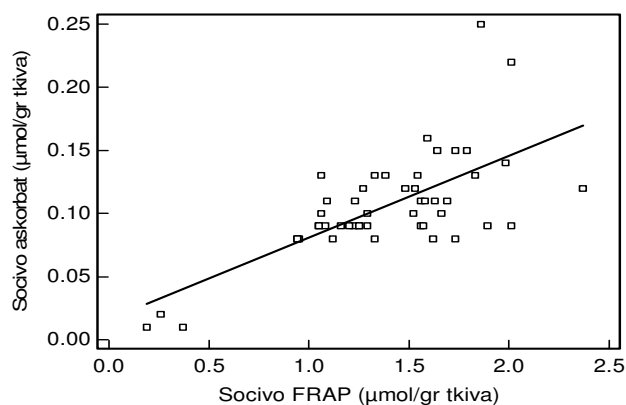
Укупна антиоксидациона способност сочива пацијената са матурном катарактом испитивана је ФРАП анализом ( $\mu\text{mol/mg}$  ткива сочива). Тестирањем разлике добијених вредности ФРАП анализе испитиваних сочива, утврђена је значајно већа фериредуктивна активност ( $F=3.269$ ,  $df=3/59$ ,  $p < 0.05$ ) у сочивима испитаника са матурном

катарактом, започелом као субкапсуларна у односу на сочива пацијената са матурном, почелом као мешовито нуклерно-кортикална катаракта ( $p < 0.05$ ).

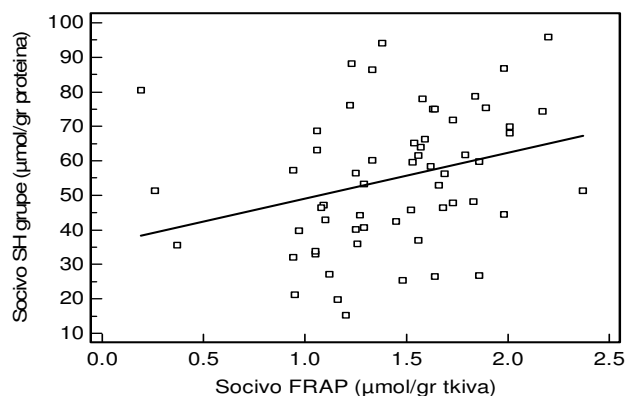
Испитивањем међусобног односа концентрације укупног витамина Ц и фери-редуктивне способности сочива испитаника са матурном катарактом, утврђена је значајна позитивна повезаност ( $r = 0.728$ ,  $p < 0.001$ ) (графикон 42), као и између концентрације аскорбата и фери-редуктивне способности сочива ( $r = 0.679$ ,  $p < 0.001$ ) (графикон 43) и између концентрације протеинских тиол група и фери-редуктивне способности сочива ( $r = 0.296$ ,  $p < 0.05$ ) (графикон 44) болесника са матурном катарактом.



Графикон 42. Корелација између концентрације укупног витамина Ц ( $\mu\text{mol/mg}$  ткива) и вредности ФРАП анализе ( $\mu\text{mol/mg}$  ткива) у сочивима болесника са матурном сенилном катарактом ( $y = 0.09 + 0.26 x$ ).



Графикон 43. Међусобни однос концентрације аскорбата ( $\mu\text{mol/mg}$  ткива) и вредности ФРАП анализе ( $\mu\text{mol/mg}$  ткива) у сочивима болесника са матурном сенилном катарактом ( $y = 0.02 + 0.06 x$ ).



Графикон 44. Међусобни однос концентрације протеинских тиола ( $\mu\text{mol/gr}$  протеина) и вредности ФРАП анализе ( $\mu\text{mol/mg}$  ткива) у сочивима болесника са матурном сенилном катарактом ( $y = 35.78 + 13.29 x$ ).

### 5.7.2.1. Концентрација витамина Ц у сочивима пацијента са матурном сенилном катарактом

Просечне измерене концентрације укупног витамина Ц и дехидроаскорбата у сочивима са матурном катарактом, као и њихове разлике међу сочивима у којима је катаракта почела на различите начине, приказане су у табели 35.

Табела 35. Концентрације витамина Ц у сочивима са матурном сенилном катарактом, у зависности од начина на који је процес почео

$\mu\text{mol/mg}$ tkiva	Maturna, počela kao subkapsularana katarakta (N=19)	Maturna, počela kao subkapsularno-nuklearna katarakta (N=14)	Maturna, počela kao nuklearno-kortikalna katarakta (N=16)
Ukupni vitamin C	$0.49 \pm 0.18$	$0.43 \pm 0.19$	$0.44 \pm 0.07$
Dehidroaskorbat	$0.37 \pm 0.14$	$0.33 \pm 0.15$	$0.44 \pm 0.07^*$
Askorbat	$0.12 \pm 0.05$	$0.1 \pm 0.04$	$0.1 \pm 0.02$
D/A	$3.35 \pm 0.77$	$3.38 \pm 0.73$	$3.45 \pm 0.58$

\* $p < 0.05$

Анализом варијансе, није утврђена значајна разлика ( $F=0.549$ ,  $df=2/48$ ,  $p=0.582$ ) концентрација укупног витамина Ц ( $\mu\text{mol/mg}$  ткива сочива) у сочивима са матурном катарактом, зависно од начина на који је катаракта почела.

У истим узорцима посебно је одређивана концентрација дехидроаскорбата, а затим је на основу разлике концентрације укупног витамина Ц и дехидроаскорбата израчунавана концентрација аскорбата.

Анализирањем измерених концентрација дехидроаскорба ( $\mu\text{mol/mg}$  ткива сочива) у сочивима са матурном сенилном катарактом, утврђена је значајна разлика ( $F=3.203$ ,  $df=2/48$ ,  $p<0.05$ ) зависно од начина почетка катаракте. Концентрација дехидроаскорбата је значајно већа у сочивима пацијената са матурном катарактом, која је почела као мешовито нуклеарно-кортикална у односу на сочива пацијената са матурном, започелом као мешовито субкапсуларно-нуклерна катаракта ( $p<0.05$ ).

Концентрација аскорбата ( $\mu\text{mol/mg}$  ткива) у хомогенату сочива са матурном катарактом израчунавана је из разлике концентрација укупног витамина Ц и дехидроаскорбата. Упоредивањем добијених концентрација аскорбата у сочивима са матурном катарактом није утврђена значајна разлика ( $F=0.943$ ,  $df=2/48$ ,  $p=0.397$ ) зависно од начина на који је катаракта почела.

У циљу процене учешћа витамина Ц у антиоксидационој заштити сочива са матурном сенилном катарактом одређиван је однос концентрација дехидроаскорбат/аскорбат. Упоредивањем вредности односа Д/А у сочивима са матурном катарактом није утврђена значајна разлика ( $F=0.092$ ,  $df=2/48$ ,  $p=0.913$ ) зависно од типа почетка катаракте.

### 5.7.3. Активност антиоксидационих ензима у сочивима пацијената са матурном сенилном катарактом

Табела 36. Активност антиоксидационих ензима у сочивима са матурном сенилном катарактом, зависно од начина на који је процес почео

U/mg	Maturna, počela kao subkapsularana katarakta	Maturna, počela kao subkapsularno-nuklearna katarakta	Maturna, počela kao nuklearno-kortikalna katarakta	Maturna, počela kao kortikalna katarakta
Superoksid dismutaza	$0.0031 \pm 0.0006$	$0.0017 \pm 0.0005^*$	$0.0012 \pm 0.0004^*$	$0.0026 \pm 0.0009^*$
Glutation peroksidaza	$0.0034 \pm 0.0009$	$0.0019 \pm 0.0006^*$	$0.0014 \pm 0.0003$	$0.0018 \pm 0.0005$
Glutation reduktaza	$0.0023 \pm 0.0006$	$0.0013 \pm 0.0005^*$	$0.0011 \pm 0.0005^*$	$0.0017 \pm 0.0005^{**}$
Glutation S-transferaza	$0.002 \pm 0.0005$	$0.0011 \pm 0.0004^*$	$0.0011 \pm 0.0005^*$	$0.0016 \pm 0.0007$

\*  $p<0.001$ , \*\* $p<0.05$

У табели 36 представљене су просечне измерене активности антиоксидационих ензима у сочивима са матурном сенилном катарактом. Анализом варијансе је утврђена значајна разлика активности супероксид дизмутазе ( $F=29.659$ ,  $df=3/56$ ,  $p<0.001$ ) у сочивима са матурном катарактом, зависно од начина почетка катаракте. Активност супероксид дизмутазе је значајно већа у сочивима пацијената са матурном катарактом, која је почела као субкапсуларна ( $N=16$ ) у односу на сочива са матурном, почелом као мешовита субкапсуларно-нуклерна катаракта ( $N=15$ ) ( $p<0.001$ ), затим у сочивима пацијената са матурном, започелом као субкапсуларна у односу на сочива са матурном, почелом као мешовито нуклеарно-кортикална катаракта ( $N=16$ ) ( $p<0.001$ ), у сочивима пацијената са матурном, започелом као мешовито субкапсуларно-нуклерна у односу на сочива са матурном, почелом као кортикална катаракта ( $N=10$ ) ( $p<0.001$ ) и у сочивима са матурном, почелом као мешовито нуклеарно-кортикална катаракта у односу на сочива са матурном, почелом као кортикална катаракта ( $p<0.001$ ).

Анализирањем активности глутатион пероксидазе у сочивима пацијената са матурном катарактом утврђена је значајна разлика ( $F=27.749$ ,  $df=3/55$ ,  $p<0.001$ ). Активност глутатион пероксидазе је значајно већа у сочивима пацијената са матурном, почелом као субкапсуларна катаракта ( $N=16$ ) у односу на сочива са матурном, почелом као мешовито субкапсуларно-нуклерна катаракта ( $N=15$ ) ( $p<0.001$ ), затим у сочивима пацијената са матурном, почелом као субкапсуларна у односу на сочива са матурном, започелом као мешовито нуклеарно-кортикална катаракта ( $N=15$ ) ( $p<0.001$ ) и у сочивима пацијената са матурном субкапсуларном катарактом у односу на сочива са матурном, почелом као кортикална катаракта ( $N=10$ ) ( $p<0.001$ ).

Испитивањем активности глутатион редуктазе утврђена је значајна разлика ( $F=15.574$ ,  $df=3/54$ ,  $p<0.001$ ) зависно од типа којим је катаракта почела. Активност глутатион редуктазе је значајно већа у сочивима пацијената са матурном катарактом, која је почела као субкапсуларна ( $N=16$ ) у односу на сочива пацијената са матурном, почелом као мешовито субкапсуларно-нуклерна катаракта ( $N=14$ ) ( $p<0.001$ ), у сочивима пацијената са матурном, започелом као субкапсуларна у односу на сочива са матурном, започелом као мешовито нуклеарно-кортикална катаракта ( $N=16$ ) ( $p<0.001$ ), затим у сочивима пацијената са матурном, почелом као субкапсуларна у односу на сочива са матурном, почелом као кортикална катаракта ( $N=9$ ) ( $p<0.05$ ) и у сочивима пацијената са матурном, започелом као мешовито нуклеарно-кортикална у односу на сочива са матурном, почелом као кортикална катаракта ( $p<0.05$ ).

Анализом варијансе је утврђено постојање значајне разлике ( $F=11.573$ ,  $df=3/52$ ,  $p<0.001$ ) активности глутатион С-трансферазе у сочивима са матурном катарактом, зависно од начина на који је катаракта почела. Активност глутатион С-трансферазе је значајно већа у сочивима пацијената са матурном катарактом, почелом као субкапсуларна ( $N=15$ ) у односу на сочива са матурном, започелом као мешовито субкапсуларно-нуклерна катаракта ( $N=13$ ) ( $p<0.001$ ) и у сочивима пацијената са матурном, почелом као субкапсуларна катаракта у односу на сочива са матурном, која је започела као мешовито нуклеарно-кортикална катаракта ( $N=16$ ) ( $p<0.001$ ).

## 5.8. Резултати биохемијског испитивања очне водике пацијената са сенилном катарактом

Презентовани рад је обухватио биохемијска испитивања, показатеља оксидационих промена и антиоксидационих чиниоца, 18 очних водика, пацијента са дијагнозом сенилне катаракте, где је 8 пацијената имало почетну, а 10 пацијената матурну сенилну катаракту.

### 5.8.1. Продукти пероксидације липида у очној водици пацијента са сенилном катарактом

У очној водици пацијената са сенилном катарактом, процес липидне пероксидације је испитиван одређивањем концентрације коњугованих диена и мерењем флуоресцентних продуката пероксидације липида (табела 37).

Табела 37. Продукти пероксидације липида у очној водици пацијената са сенилном катарактом

	Cataracta senilis incipiens	Cataracta senilis matura	<i>p</i> *
Konjugovani dieni	0.017 ± 0.003*	0.012 ± 0.02	<i>p</i> <0.01
Liposolubilni iminopropeni	62.86 ± 5.27**	54.04 ± 5.86	<i>p</i> <0.05

\**p*<0.01, \*\**p*<0.05

Анализирањем измерених концентрација коњугованих диена ( $\mu\text{mol/ml}$ ), као и флуоресценци липосолубилних иминопропена (FI) у очној водици, утврђена је значајна разлика зависно од степена матуритета катаракте. У очној водици пацијената са почетном сенилном катарактом значајно је већа концентрација коњугованих диена ( $t=3.311$ ,  $DF=10$ ,  $p<0.01$ ), као и флуоресценца липосолубилних иминопропена ( $t=2.673$ ,  $DF=10$ ,  $p<0.05$ ) у односу на пацијенте са матурном сенилном катарактом (табела 37).

### 5.8.2. Неензимски чиниоци и ензими антиоксидационе заштите у очној водици пацијента са сенилном катарактом

Антиоксидациона активност очне водике пацијената са сенилном катарактом испитивана је мерењем концентрације протеинских тиол једињења ( $\mu\text{mol/ml}$ ), испитивањем активности антиоксидационих ензима, као и анализирањем укупне антиоксидационе активности.

Тестирањем разлика измерених концентрација протеинских тиола у очној водици пацијената са сенилном катарактом, утврђена је значајна разлика зависно од степена матуритета катаракте, наиме у очној водици пацијената са почетном



катарактом значајно је већа концентрација протеинских тиола ( $t=4.781$ ,  $DF=16$ ,  $p<0.001$ ) у односу на пацијенте са матурном катарактом (табела 38).

Процена укупне антиоксидационе способности очне воде пацијената са сенилном катарактом одређивана је мерењем фери-редуктивне способности узорка, ФРАП анализом ( $\mu\text{mol/ml}$ ). Анализирањем измерених вредности ФРАП анализе испитиваних очних вода, утврђена је значајно већа фери-редуктивна способност очне воде испитаника са почетном сенилном катарактом ( $t=4.953$ ,  $DF=16$ ,  $p<0.001$ ) у односу на очну воду пацијената са матурном катарактом (табела 38).

Табела 38. Неензимски антиоксиданси у очној водици пацијената са сенилном катарактом

$\mu\text{mol/ml}$	Cataracta senilis incipiens	Cataracta senilis matura	$p^*$
SH grupe	$0.09 \pm 0.02^*$	$0.05 \pm 0.01$	$p<0.001$
FRAP	$0.51 \pm 0.15^*$	$0.26 \pm 0.06$	$p<0.001$

\* $p<0.001$

Активност антиоксидационих ензима ( $U/\text{mg}$  протеина) у очној водици пацијената са сенилном катарактом, представљена је у табели 39. Упоредивањем активности ензима глутатион редуктазе у очној водици пацијената са сенилном катарактом није утврђена значајна разлика ( $t=2.030$ ,  $DF=16$ ,  $p=0.059$ ), зависно од степена матуриитета катаракте, док је активност супероксид дизмутазе ( $t=2.488$ ,  $DF=16$ ,  $p<0.05$ ), као и каталазе ( $t=0.467$ ,  $DF=16$ ,  $p<0.05$ ) значајно већа у очној водици пацијената са почетном сенилном катарактом у односу на пацијенте са матурном катарактом (табела 39).

Табела 39. Активност антиоксидационих ензима у очној водици пацијената са сенилном катарактом

$U/\text{mg}$	Cataracta senilis incipiens	Cataracta senilis matura	$p^*$
Glutation reduktaza	$0.0093 \pm 0.0017$	$0.0076 \pm 0.0017$	$P=0.06$
Superoksid dismutaza	$0.0134 \pm 0.0032^*$	$0.0195 \pm 0.0034$	$p<0.05$
Katalaza	$0.0117 \pm 0.0037^*$	$0.0011 \pm 0.0018$	$p<0.05$

\* $p<0.05$

Испитивањем међусобног односа концентрације коњугованих диена у очној водици ( $\mu\text{mol/ml}$ ) и концентрације коњугованих диена у сочиву ( $\text{nmol/gr}$  ткива) болесника са матурном сенилном катарактом, добијена је значајна позитивна повезаност ( $r=0.763$ ,  $p<0.05$ ).

## 5.9. Корелационе анализе између концентрација продукта липидне пероксидације и параметара антиоксидационе заштите у сочивима и плазми пацијената са сенилном катарактом

Испитивана је мера узајамне зависности у променама концентрација испитиваних продукта липидне пероксидације између сочива и плазме код почетне и матурне катаракте. Код почетне катаракте постоји умерена корелативна веза (0.457 и 0.501), по којој су промене коњугованих диена у сочиву праћене истосмерном променом коњугованих диена и липосолубилних иминопиперидина у плазми и обрнуто (табела 40). Обрнута корелативна веза постоји између процента индукције малондиалдехида у сочиву и концентрације гвожђем индукованог малондиалдехида у плазми (-0.403).

Табела 40. Корелација липидних пероксиданата у плазми и сочиву код почетне катаракте

плазма		сочиво					
		КД	ЛИ	ХИ	МДА <sub>о</sub>	МДА <sub>и</sub>	%МДА
КД	кк	<b>0.501*</b>	0.235	0.132	0.135	-0.026	-0.197
	п	0.013	0.229	0.504	0.492	0.897	0.325
ЛИ	кк	<b>0.457*</b>	-0.121	-0.061	0.274	0.128	-0.278
	п	0.025	0.539	0.758	0.159	0.517	0.160
ХИ	кк	0.399	0.053	0.127	0.246	0.122	-0.233
	п	0.054	0.787	0.519	0.208	0.536	0.243
МДА <sub>о</sub>	кк	0.297	0.266	-0.001	0.135	-0.075	-0.281
	п	0.159	0.172	0.995	0.495	0.703	0.156
МДА <sub>и</sub>	кк	0.224	0.189	-0.042	0.220	-0.025	<b>-0.403*</b>
	п	0.293	0.337	0.831	0.260	0.898	0.037
%МДА	кк	-0.190	-0.272	0.002	0.077	0.129	-0.062
	п	0.373	0.162	0.992	0.696	0.514	0.759
ХО	кк	-0.018	-0.058	-0.192	0.235	0.109	-0.305
	п	0.932	0.769	0.326	0.228	0.582	0.122

кк – Pearson-ов коефицијент корелације \* п < 0.05 - сигнификантан кк

Одређивањем мере узајамне зависности у концентрацијама параметара антиоксидационе заштите у плазми и сочиву код почетне катаракте утврђено је да је она сигнификантна и са високим коефицијентом заступљена између ензимских каталитичких активности. Глутатион редуктаза (ГРЕД), глутатион пероксидаза (ГПХ), супероксид дисмутаза (СОД) из сочива су у високој, позитивној корелативној вези (од 0.660 до 0.854) према одговарајућим ензимским каталитичким активностима у плазми.

Међутим, све ензимске каталитичке активности у сочиву у обрнутој су корелативној вези са активношћу глутатион С-трансферазе у плазми, што значи да пад концентрације било ког елемента каталитичке активности у сочиву, чак и С-трансферазе у сочиву, праћен је порастом С-трансферазе у плазми и обрнуто. И ова међусобна повезаност промена у опсегу је умерене до високе негативне корелативне везе (од -0.538 до -0.774).

Остале активности у оксидационо редукционом механизму плазме и сочива код почетне катаракте значајне су и са високим позитивним коефицијентом корелације између свих елемената ензимске каталитичке активности у сочиву (ГРЕД, ГСТРФ, ГПХ, СОД) и фери-редуктивне способности плазме (ФРАП). Фери-редуктивна способност у сочиву високо је повезана позитивном везом са непротеинским тиол једињењима (ГСХ) и супероксид дисмутазом у плазми (СОД) (0.674 и 0.604).

Постоји умерена позитивна корелација између ензимске активности у сочиву и концентрације укупног витамина Ц у плазми. Промена односа дехидроаскорбат/аскорбат у сочиву обрнуто је пропорционалан концентрацијама каталазе у плазми (-0.745). (табела 41).

Табела 41. Корелација параметара антиоксидационе заштите у плазми и сочиву код почетне сенилне катаракте

сочиво		плазма											
		УВЦ	ДХА	АСК	Д/А	ФРАП	ГСХ	СХГ	ГРЕД	ГСТРФ	ГПХ	СОД	КАТ
УВЦ	кк	0.086	0.044	0.067	-0.056	0.185	<b>0.473*</b>	0.153	0.151	-0.283	0.125	<b>0.399*</b>	-0.027
	п	0.662	0.825	0.734	0.779	0.347	0.011	0.437	0.444	0.144	0.525	0.036	0.931
ДХА	кк	0.059	0.051	0.035	-0.023	0.096	<b>0.426*</b>	0.132	0.148	-0.224	0.065	0.345	-0.158
	п	0.764	0.795	0.859	0.906	0.626	0.024	0.503	0.451	0.251	0.741	0.072	0.607
АСК	кк	0.103	0.038	0.087	-0.072	0.301	0.482	0.155	0.111	-0.318	0.204	<b>0.404*</b>	0.241
	п	0.603	0.848	0.661	0.717	0.119	0.009	0.430	0.574	0.100	0.298	0.033	0.428
Д/А	кк	-0.045	-0.144	0.030	-0.081	-0.282	-0.176	-0.002	0.019	0.172	-0.265	-0.140	<b>-0.745*</b>
	п	0.822	0.463	0.880	0.682	0.145	0.369	0.993	0.922	0.381	0.174	0.477	0.003
ФРАП	кк	0.128	0.113	0.070	-0.035	0.299	<b>0.674*</b>	<b>0.433*</b>	0.335	<b>-0.381*</b>	<b>0.392*</b>	<b>0.604*</b>	0.355
	п	0.518	0.567	0.725	0.859	0.122	0.000	0.021	0.082	0.046	0.039	0.001	0.235
ГСХ	кк	0.181	0.045	0.159	-0.117	<b>0.488*</b>	0.337	0.311	<b>0.550*</b>	<b>-0.513*</b>	0.338	<b>0.502*</b>	0.534
	п	0.356	0.818	0.418	0.553	0.008	0.079	0.108	0.002	0.005	0.079	0.006	0.060
СХГ	кк	0.306	-0.138	0.384	-0.345	0.367	<b>0.437*</b>	<b>0.418*</b>	<b>0.606*</b>	-0.365	<b>0.464*</b>	<b>0.471*</b>	0.400
	п	0.113	0.483	0.044	0.072	0.055	0.020	0.027	0.001	0.056	0.013	0.011	0.175
ГРЕД	кк	<b>0.538*</b>	0.054	<b>0.524*</b>	<b>-0.386*</b>	<b>0.646*</b>	0.257	<b>0.585*</b>	<b>0.854*</b>	<b>-0.719*</b>	<b>0.693*</b>	<b>0.724*</b>	<b>0.774*</b>
	п	0.003	0.785	0.004	0.043	0.000	0.186	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
ГСТРФ	кк	<b>0.559*</b>	0.293	<b>0.419*</b>	-0.222	<b>0.579*</b>	<b>0.413*</b>	<b>0.486*</b>	<b>0.660*</b>	<b>-0.538*</b>	<b>0.720*</b>	<b>0.739*</b>	<b>0.699*</b>
	п	0.002	0.131	0.026	0.257	0.001	0.029	0.009	0.000	0.003	0.000	0.000	0.008
ГПХ	кк	<b>0.481*</b>	0.262	0.357	-0.200	<b>0.679*</b>	<b>0.466*</b>	<b>0.618*</b>	<b>0.769*</b>	<b>-0.688*</b>	<b>0.703*</b>	<b>0.767*</b>	<b>0.641*</b>
	п	0.010	0.179	0.062	0.306	0.000	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.018
СОД	кк	<b>0.431*</b>	0.180	0.348	-0.219	<b>0.734*</b>	<b>0.425*</b>	<b>0.533*</b>	<b>0.695*</b>	<b>-0.774*</b>	<b>0.616*</b>	<b>0.728*</b>	<b>0.836*</b>
	п	0.022	0.359	0.070	0.264	0.000	0.024	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

кк – Pearson-ов коефицијент корелације \*  $p < 0.05$  - сигнификантан кк

За разлику од почетне катаракте, код матурне катаракте липидна пероксидација се одвија у међусобној повезаности концентрација хидросолубилних иминопиперона у сочиву и коњугованих диена, основног малондиалдехида и индукованог малондиалдехида у плазми. Ова корелација је умерена и позитивна (од 0.425 до 0.459). У слабој, обрнуто пропорционалној корелацији налазе се проценат индукције малондиалдехида у сочиву и хидросолубилни иминопиперони у плазми (-0.364) (табела 42).

Главна карактеристика међусобне зависности параметара антиоксидационе заштите код матурне катаракте у односу на почетну је слабљење интензитета везе и броја параметара каталитичке активности у сочиву према истима у плазми, али и губљење других корелативних веза које су постојале. Углавном слаба или умерена корелација постоји у већини параметара ензимског антиоксидационог капацитета сочива и плазме, у смеру као код почетне катаракте. Параметри ензимске каталитичке активности (ГРЕД, ГСТРФ, ГПХ, СОД) у сочиву су у умереној позитивној корелацији са укупним витамином Ц у плазми. Концентрације дехидроаскорбата (ДХА) су у умереној негативној корелацији са укупним витамином Ц (УВЦ), аскорбатом (АСК) и каталазом (КАТ) у плазми (табела 43).

Табела 42. Корелација липидних пероксиданата у плазми и сочиву код матурне сенилне катаракте

плазма		сочиво					
		КД	ЛИ	ХИ	МДА <sub>о</sub>	МДА <sub>и</sub>	%МДА
КД	кк	0.253	0.190	<b>0.425*</b>	0.058	-0.116	-0.207
	п	0.093	0.210	0.004	0.705	0.448	0.182
ЛИ	кк	-0.039	-0.131	-0.007	-0.025	0.047	-0.276
	п	0.799	0.391	0.964	0.870	0.759	0.073
ХИ	кк	0.026	0.053	0.227	0.232	0.046	<b>-0.364*</b>
	п	0.866	0.730	0.133	0.126	0.765	0.016
МДА <sub>о</sub>	кк	0.133	0.066	<b>0.459*</b>	0.112	-0.002	-0.161
	п	0.384	0.669	0.002	0.462	0.990	0.301
МДА <sub>и</sub>	кк	0.089	0.078	<b>0.428*</b>	0.114	0.060	-0.076
	п	0.563	0.612	0.003	0.457	0.698	0.628
%МДА	кк	-0.208	0.009	<b>-0.307*</b>	-0.082	0.106	0.243
	п	0.171	0.954	0.040	0.591	0.489	0.116
ХО	кк	0.044	-0.250	<b>-0.302*</b>	-0.212	0.070	0.169
	п	0.773	0.097	0.044	0.162	0.646	0.279

кк – Pearson-ов коефицијент корелације \* п < 0.05 - сигнификантан кк

Табела 43. Корелација параметара антиоксидационе заштите у плазми и сочиву код матурне сенилне катаракте

сочиво		плазма											
		УВЦ	ДХА	АСК	Д/А	ФРАП	ГСХ	СХГ	ГРЕД	ГСТРФ	ГПХ	СОД	КАТ
УВЦ	кк	-0.274	-0.045	-0.281	0.220	-0.139	-0.218	-0.053	-0.037	-0.066	0.086	0.049	-0.312
	п	0.111	0.797	0.102	0.205	0.426	0.208	0.761	0.831	0.706	0.624	0.781	0.147
ДХА	кк	<b>-0.434*</b>	-0.104	<b>-0.425*</b>	0.331	-0.303	-0.212	-0.192	-0.237	0.104	-0.010	-0.022	<b>-0.435*</b>
	п	0.009	0.552	0.011	0.052	0.076	0.221	0.269	0.170	0.551	0.953	0.901	0.038
АСК	кк	-0.276	0.014	-0.312	0.255	-0.122	-0.236	-0.046	-0.019	-0.034	0.091	0.088	-0.186
	п	0.109	0.939	0.068	0.140	0.485	0.173	0.794	0.912	0.846	0.605	0.616	0.396
Д/А	кк	0.052	-0.059	0.085	-0.090	0.070	0.114	0.176	0.021	-0.180	-0.060	-0.032	-0.041
	п	0.768	0.737	0.627	0.608	0.691	0.514	0.311	0.903	0.300	0.734	0.856	0.854
ФРАП	кк	0.067	-0.026	0.090	-0.096	0.141	0.007	0.248	0.192	<b>-0.373*</b>	0.228	0.171	-0.128
	п	0.660	0.863	0.556	0.531	0.357	0.963	0.101	0.206	0.012	0.132	0.261	0.493
ГСХ	кк	0.142	-0.117	0.234	-0.236	0.204	0.138	0.218	0.054	-0.089	0.243	0.159	0.124
	п	0.359	0.448	0.126	0.123	0.184	0.370	0.155	0.727	0.564	0.111	0.303	0.513
СХГ	кк	0.107	0.004	0.119	-0.079	0.128	0.216	0.018	0.123	-0.025	0.128	0.116	-0.174
	п	0.485	0.979	0.434	0.607	0.403	0.153	0.908	0.422	0.868	0.400	0.447	0.350
ГРЕД	кк	<b>0.468*</b>	0.179	<b>0.411*</b>	<b>-0.302*</b>	<b>0.461*</b>	0.296	<b>0.370*</b>	<b>0.558*</b>	<b>-0.455*</b>	<b>0.425*</b>	<b>0.427*</b>	0.236
	п	0.002	0.250	0.006	0.049	0.002	0.054	0.015	0.000	0.002	0.004	0.004	0.210
ГСТРФ	кк	<b>0.580*</b>	0.258	<b>0.496*</b>	<b>-0.359*</b>	<b>0.579*</b>	0.314	0.179	<b>0.549*</b>	<b>-0.564*</b>	<b>0.418*</b>	<b>0.448*</b>	0.332
	п	0.000	0.099	0.001	0.020	0.000	0.043	0.257	0.000	0.000	0.006	0.003	0.079
ГПХ	кк	<b>0.576*</b>	0.120	<b>0.569*</b>	<b>-0.439*</b>	<b>0.471*</b>	0.155	<b>0.430*</b>	<b>0.444*</b>	<b>-0.376*</b>	<b>0.316*</b>	<b>0.352*</b>	0.115
	п	0.000	0.438	0.000	0.003	0.001	0.315	0.004	0.003	0.012	0.037	0.019	0.546
СОД	кк	<b>0.570*</b>	0.264	<b>0.478*</b>	<b>-0.342*</b>	<b>0.643*</b>	0.258	<b>0.454*</b>	<b>0.646*</b>	<b>-0.638*</b>	<b>0.353*</b>	<b>0.329*</b>	0.278
	п	0.000	0.080	0.001	0.021	0.000	0.087	0.002	0.000	0.000	0.017	0.028	0.130

кк – Pearson-ов коефицијент корелације \* п < 0.05 - сигнификантан кк

## 5.10. Регресиона анализа

Комплексност деловања различитих компоненти процеса липидне пероксидације и механизма ензимске и неензимске антиоксидационе заштите на нивоу плазме и сочива наметнула је потребу да се примени модел који ће од свих могућих актера процеса одабрати најзначајније. У поступку мултиваријантне регресионе анализе су сваком продукту липидне пероксидације, као зависно променљивима у регресионој једначини, "понуђени" сетови независних променљивих које су чинили параметри антиоксидационе заштите у сочиву или плазми почетне или матурне катаракте. Применом модела "корак по корак" у поступку анализе одабрани су само они параметри који су са сигнификантном вероватноћом опредељивали концентрацију продукта липидне пероксидације у односу на један или више удружених параметара антиоксидационе заштите.

### 5.10.1. Резултати регресионе анализе у сочивима са почетном катарактом

У претходно разматраној корелативној повезаности продукта липидне пероксидације и параметара антиоксидационе заштите је утврђено да у почетној катаракти постоји ензимски механизам усмерен против коњугованих диена и флуоресцентних продукта липидне пероксидације. Методом регресионе анализе и селекцијом параметара по њиховом значају показано је који су параметри антиоксидационе заштите најзначајнији (табела 45 и графикон 46). Тако је утврђено да је у механизму уклањања коњугованих диена у катарактном сочиву најзначајнија активност глутатион редуктазе, а у антиоксидационој заштити од флуоресцентних продукта липидне пероксидације најзначајнија је активност супероксид дисмутаза.

Доказана позитивна корелација дехидроаскорбата и односа дехидроаскорбат/аскорбат према индукованом и основном малондиалдехиду у сочиву потврђена је као најзначајнија у регресионом моделу. Најзначајнији параметар у утицају на проценат индукције малондиалдехида је супероксид дисмутаза.

Табела 44. Продукати липидне пероксидације у зависности од концентрација параметара антиоксидационе заштите у **сочивима са почетном катарактом** на основу регресионог модела

продукти липидне пероксидације у сочиву	параметар антиоксидационе заштите у сочиву почетне катаракте	п
коњуговани диени	глутатион редуктаза	0.005*
липосолубилни иминопипени	супероксид дисмутаза	0.001*
хидросолубилни иминопипени	дехидроаскорбат супероксид дисмутаза	0.002* 0.021*
основни малондиалдехид	однос дехидроаскорбат/аскорбат	0.000*
индуковани малондиалдехид	дехидроаскорбат	0.000*
процент индукције малондиалдехида	супероксид дисмутаза	0.000*

\*сигнификантни параметри регресионог модела( $p < 0.05$ )

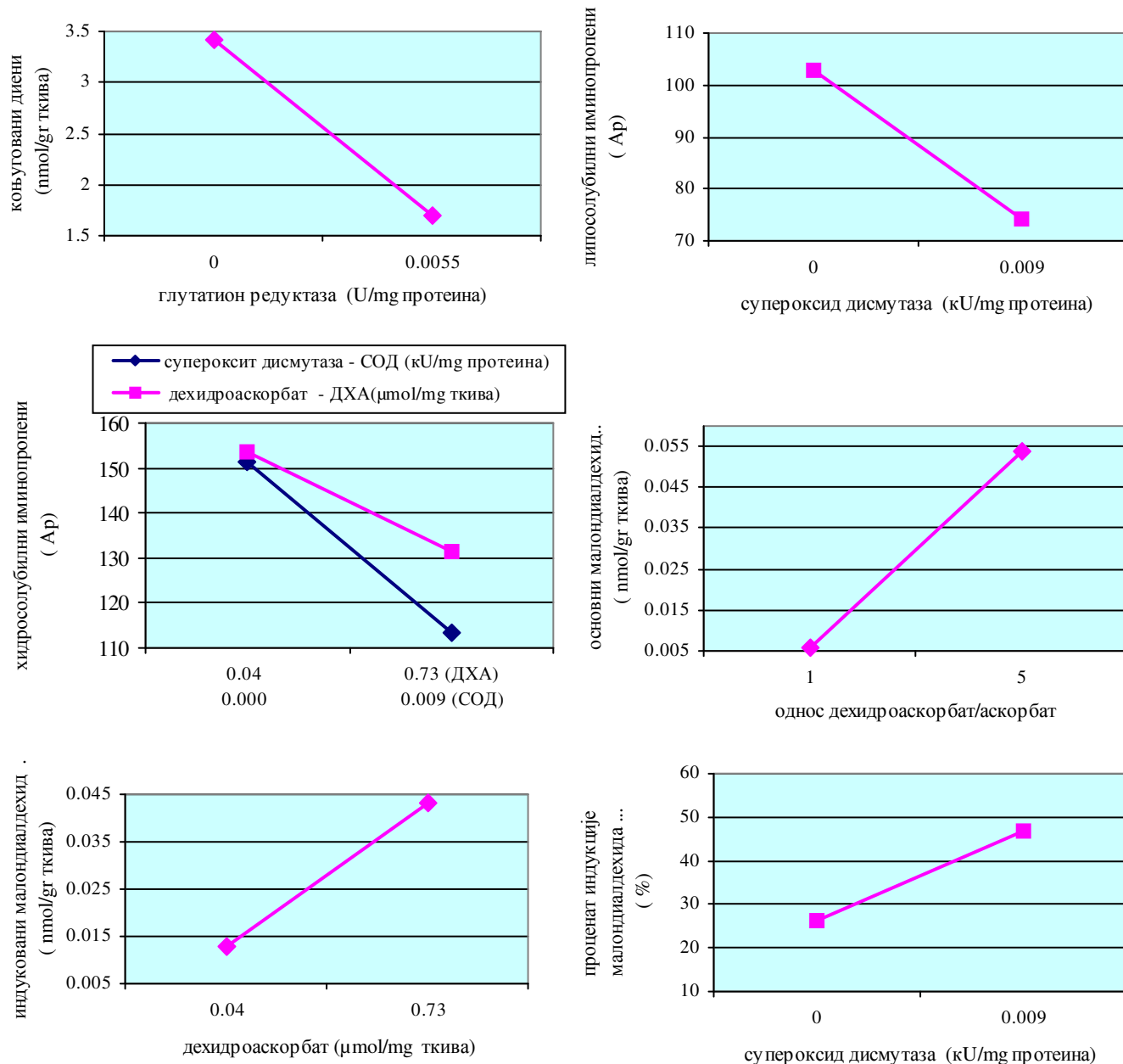


График 45. Продукти липидне пероксидације у зависности од концентрација параметара антиоксидационе заштите у **сочивима са почетном катарактом** на основу регресионог модела

### 5.10.2. Резултати регресионе анализе у сочивима са матурном катарактом

Резултат примене регресионе анализе у селекцији параметара по њиховом значају у сочиву код матурне катаракте приказан је на табели 46 и графикону 47. У антиоксидационој заштити уклањања липидних хидропероксида у сочивима са матурном катарактом најзначајнији параметар је супероксид дисмутаза, а у антиоксидационој заштити од хидросолубилних иминопропена активност глутатион пероксидазе. Корелациона анализа је показала да су концентрације основног (и индукованог малондиалдехида) у сочиву код матурне катаракте високим и позитивним коефицијентом корелације повезани са егзогеним антиоксидансом. Најзначајнији

антиоксидациони параметар који је у интеракцији са овим, крајњим и релативно стабилним, продуктом липидне пероксидације је витамин Ц. Липосолубилни иминопропени и проценат индукције малондиалдехида нису по регресионом моделу сигнификантно повезани ни са једним параметром антиоксидационе заштите у сочиву код матурне катаракте.

Табела 45. Продукти липидне пероксидације у зависности од концентрација параметара антиоксидационе заштите у **сочивима са матурном катарактом** на основу регресионог модела

продукти липидне пероксидације у сочиву	параметар антиоксидационе заштите у сочиву матурне катаракте	п
коњуговани диени	супероксид дисмутаза	0.017*
хидросолубилни иминопропени	глутатион пероксидаза	0.002*
основни малондиалдехид	укупни витамин Ц	0.000*
индуковани малондиалдехид	укупни витамин Ц	0.000*

\*сигнификантни параметри регресионог модела( $p < 0.05$ )

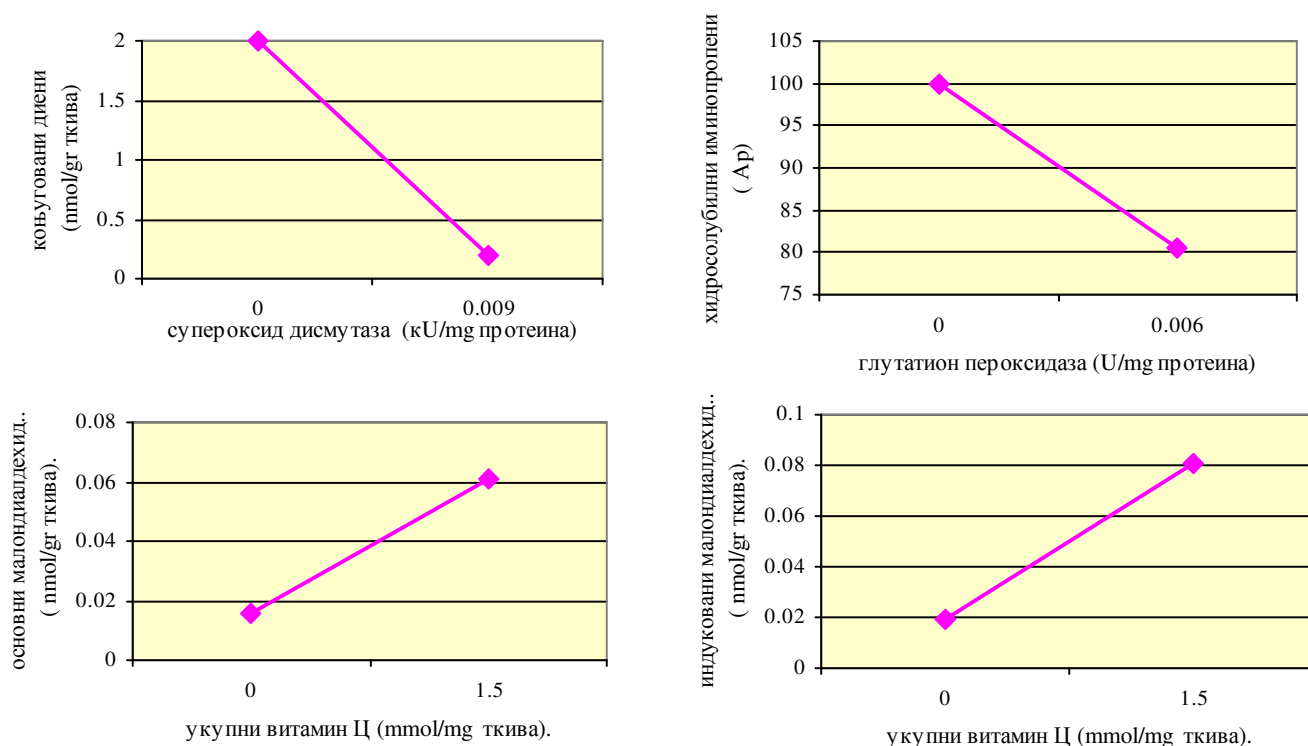


График 46. Продукти липидне пероксидације у зависности од концентрација параметара антиоксидационе заштите у **сочивима са матурном катарактом** на основу регресионог модела

### 5.10.3. Резултати регресионе анализе у плазми пацијената са почетном катарактом

На основу примене регресионе анализе и одабирања параметара на основу њихове значајности у моделу процене концентрације продукта липидне пероксидације приказани су параметри антиоксидационе заштите у плазми код почетне катаракте на табели 47 и графикону 48.

У антиоксидационој заштити уклањања коњугованих диена у плазми код почетне катаракте најзначајнији параметар је супероксид дисмутаза, а у антиоксидационој заштити од липосолубилних и хидросолубилних иминопиперидина најзначајнија је активност глутатион С-трансферазе.

Најзначајнији параметари у заједничком утицају на концентрације основног малондиалдехида су глутатион С-трансфераза и аскорбат, а у случају индукованог малондиалдехида глутатион С-трансфераза и протеинске СХ групе.

Укупни витамин Ц је параметар у плазми код почетне катаракте који је најзначајнији за проценат индукције малондиалдехида.

Како је показала претходно примењена корелативна анализа, не постоји ни један параметар антиоксидационе заштите који је у значајној корелативној вези, на усвојеном нивоу вероватноће, са ксантин оксидазом у плазми. Међутим, применом регресионог модела утврђено је да је концентрација укупног витамина Ц параметар на основу кога би се могла одредити једначина (модел) за процену овог елемента.

Табела 46. Продукати липидне пероксидације у зависности од концентрација параметара антиоксидационе заштите у плазми код почетне катаракте на основу регресионог модела

продукти липидне пероксидације у плазми	параметар антиоксидационе заштите у плазми код почетне катаракте	п
коњуговани диени	супероксид дисмутаза	0.009*
липосолубилни иминопиперидини	глутатион С-трансфераза дехидроаскорбат	0.006* 0.022*
хидросолубилни иминопиперидини	глутатион С-трансфераза дехидроаскорбат	0.006* 0.008*
основни малондиалдехид	глутатион С-трансфераза аскорбат	0.013* 0.046*
индуковани малондиалдехид	глутатион С-трансфераза протеинске СХ групе	0.001* 0.047*
процент индукције малондиалдехида	укупни витамин Ц	0.017*
ксантин оксидаза	укупни витамин Ц	0.031*

\*сигнификантни параметри регресионог модела( $p < 0.05$ )



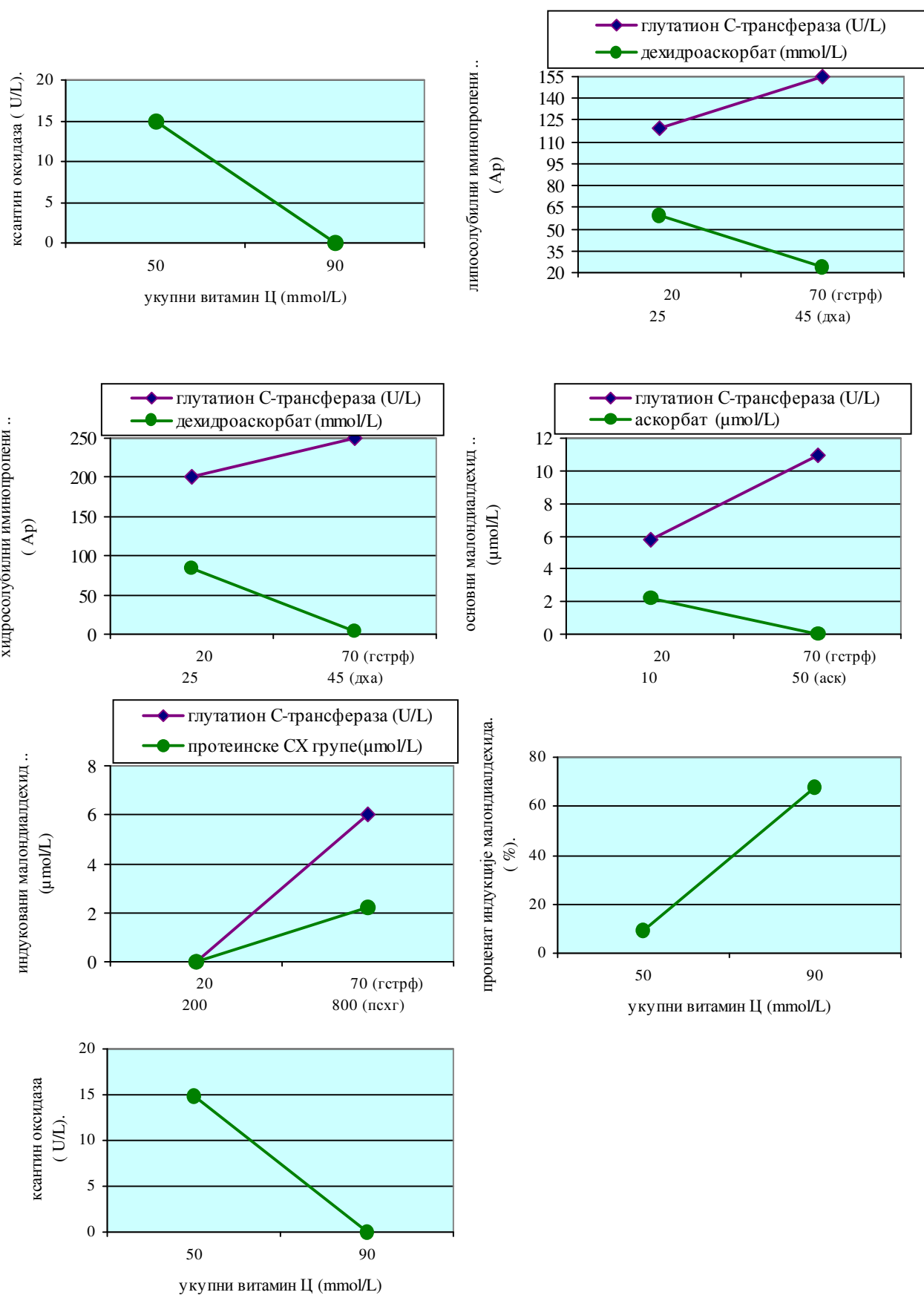


График 47. Продукати липидне пероксидације у зависности од концентрација параметара антиоксидационе заштите у **плазми код почетне катаракте** на основу регресионог модела

#### 5.10.4. Резултати регресионе анализе у плазми пацијената са матурном катарактом

На табели 35 и графикону 49 приказан је резултат примене регресионе анализе у селекцији параметара по њиховом значају, у плазми код пацијената са матурном сенилном катарактом.

У антиоксидационој заштити уклањања коњугованих диена у плазми код матурне катаракте најзначајнија је активност глутатион редуктазе.

У антиоксидационој заштити од липосолубилних иминопиперидина и индукованог малондиалдехида најзначајнија је фери-редуктивна способност у плазми. За процену концентрација хидросолубилних иминопиперидина у плазми код матурне катаракте најзначајније је деловање протеинских СХ група.

Процент индукције малондиалдехида најбоље се одређује преко активности глутатион С-трансферазе, а основни малондиалдехид најбоље је одређен истовременим активностима глутатион С-трансферазе и каталазе.

Активност ензимског прооксиданса – ксантин оксидазе, по резултатима регресионог модел, добро је опредељена односом елемената дехидроаскорбат/аскорбат у плазми код матурне катаракте.

Табела 47. Продукти липидне пероксидације у зависности од концентрација параметара антиоксидационе заштите у плазми код матурне катаракте на основу регресионог модела

продукти липидне пероксидације у плазми	параметар антиоксидационе заштите у плазми код матурне катаракте	п
коњуговани диени	однос дехидроаскорбат/аскорбат глутатион редуктаза	0.023* 0.000*
липосолубилни иминопиперидини	фери-редуктивна способност	0.043*
хидросолубилни иминопиперидини	протеинске СХ групе	0.008*
основни малондиалдехид	глутатион С-трансфераза каталаза	0.005* 0.035*
индуковани малондиалдехид	фери-редуктивна способност	0.000*
процент индукције малондиалдехида	глутатион С-трансфераза	0.028*
ксантин оксидаза	однос дехидроаскорбат/аскорбат	0.008*

\*сигнификантни параметри регресионог модела( $p < 0.05$ )

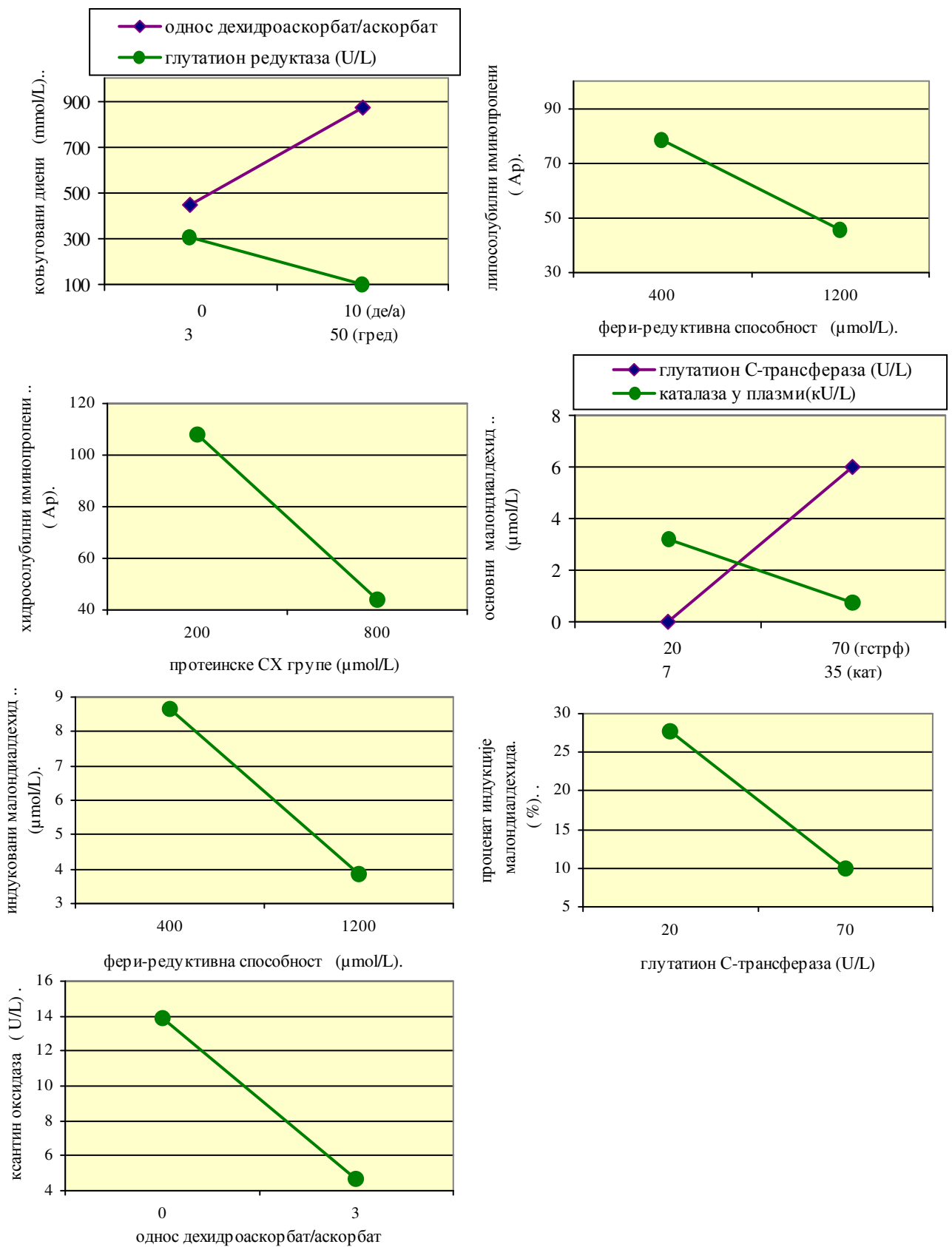


График 48. Продукати липидне пероксидације у зависности од концентрација параметара антиоксидационе заштите у плазми код матурне катаракте на основу регресионог модела

## 6. ДИСКУСИЈА

Последњих година, постоје бројна истраживања о утицају реактивних кисеоничких врста на појаву и развој катаракте. Међутим, у највећем броју ових истраживања, показатељи активности слободних кисеоничких радикала и антиоксидационог капацитета су испитивани у плазми оболелих од катаракте. Главни разлог поменутог су промене операционих метода катарактних сочива. Увођење и експанзија факоемулзификације смањили су уопште доступност и могућност директног испитивања катарактних сочива.

Коришћење аутопсијског материјала, такође носи низ препрека, посебно када је циљ испитивања антиоксидациони статус. Литературни подаци о биохемијским постморталним променама, говоре о брзом паду концентрације глутатиона у сочиву до немерљивих вредности, већ двадесетак сати од наступања смрти (177).

Испитивањем катарактних (екстрахованих) сочива, очне водице, као и плазме пацијената оболелих од катаракте покушали смо да допринесемо расветљењу процеса катарактогенезе о коме и данас постоје бројне непознанице.

Сенилна катракта се манифестује у позним годинама живота, па се процењује да би се трошкови операција смањили за 45%, уколико би се појава сенилне катаракте могла одложити за десет година (213).

Очно сочиво, је с обзиром на метаболизам, структуру, положај и функцију, првенствено подложно дегенеративним променама. Па и сама катарактогенеза је постепени, дегенеративни процес који се одиграва у сочиву.

С обзиром да је сенилна катаракта хронична, дегенеративна болест очног сочива, која се манифестује у позним годинама, узроци њене појаве су вероватно бројни и треба их тражити у ранијим периодима живота, пре саме појаве и клиничке манифестације. Циљ нашег истраживања било је испитивање утицаја оксидационих промена сочивних структура на процес катарактогенезе.

### 6.1. Фактори ризика за појаву сенилне катаракте

Већа учесталост појаве сенилне катаракте у старијем животном добу, је потврђена у бројним популационим студијама, у којима године живота фигурирају као један од основних фактора ризика за развој катаракте (10). Просечна старост наше испитиване групе, пацијената са катарактом, износила је 72.02 године, што потврђује да су године живота важан фактор ризика за појаву и развој сенилне катаракте.

Неке студије наводе да женски пол има већи ризик за појаву катаракте од мушког пола (Italian-American cataract study group). Међутим, међу нашим испитаницима оболелим од катаракте, број особа мушког пола је био већи и они су чинили 54% пацијената испитиване групе. Статистичком обрадом резултата, доказано је да се испитиване групе са почетном и матурном катарактом, у односу на пол, значајно не разликују на усвојеном нивоу поузданости  $p < 0.05$ . Већа заступљеност мушког пола уочена је и у ранијим радовима, који анализирају неке аспекте сенилне катаракте у условима нашег подручја (246).

У испитиваном узорку пацијената из овог истраживања старосна доб испитаника није повезана са већином испитиваних параметара. То показују ниски или незнатни коефицијенти корелације који при томе, у већини случајева, нису ни статистички значајни. Изузетак је концентрација ензимског прооксиданса - ксантин оксидазе у плазми испитаника за коју је утврђено да се повећава са годинама пацијента са почетном катарактом, на статистички значајном нивоу ( $p < 0.05$ ).

Применом статистичких процедура утврђено је да се просечне концентрације продуката липидне пероксидације и параметара антиоксидационе заштите у сочивима са почетном катарактом знатно не разликују по полу пацијената. Код матурне катаракте, ситуација је слична, у већини параметара изражених преко просечних вредности, нема значајне разлике, па се може закључити да се продукти липидне пероксидације и параметри антиоксидационе заштите у сочивима пацијената са почетном и матурном сенилном катарактом не разликују између испитаника мушког и женског пола.

Када се упореде статистичком процедуром концентрације продуката липидне пероксидације и параметари антиоксидационе заштите у плазми, по полу пацијената, разлике нису значајне, код почетне катаракте ни у једном параметру. У случајевима матурне катаракте разлике постоје у концентрацијама коњугованих диена у плазми, које су знатно веће код женског пола ( $p < 0.05$ ). Параметри антиоксидационе заштите, фери-редуктивна способност плазме и активност ензима глутатион редуктазе су сигнификантно већи код мушког пола ( $p < 0.05$ ). Тачније, већина показатеља оксидационог оштећења и неензимских и ензимских антиоксиданаса у плазми код почетне и матурне сенилне катаракте је слична између мушког и женског пола.

Резултати неких студија налазе повећану удруженост катаракте и артеријске хипертензије (40). У нашој испитиваној групи, оболелих од катаракте, било је 70 пацијента са дијагнозом артеријске хипертензије, што чини 69.3% пацијената испитиване групе.

Незнатне су промене у концентрацијама продуката липидне пероксидације и антиоксидационе заштите у сочиву код пацијената са артеријском хипертензијом у односу на пацијенте без тог обољења. Сигнификантно је нижа концентрација хидросолубилних иминопиперидина у сочиву у почетној форми катаракте ( $p < 0.05$ ) и концентрација укупног витамина Ц у матурној катаракти ( $p < 0.05$ ) у односу на пацијенте без хипертензије.

У плазми пацијената са артеријском хипертензијом и у почетној и матурној катаракти постоји сигнификантно повећање концентрација ксантин оксидазе и то је једина значајна разлика у концентрацијама параметара липидне пероксидације и антиоксидационе заштите у односу на пацијенте без хипертензије.

Међу нашим испитаницима 37 пацијената (36.6% од укупног броја испитаника) је имало дијагнозу кардиомиопатије, која је одраз атеросклеротичних промена на крвним судовима.

Пацијенти оболели од кардиомиопатије са почетном катарактом у сочиву имају значајно мање концентрације липосолубилних иминопиперидина, а са матурном катарактом значајно мање концентрације хидросолубилних иминопиперидина, у односу на пацијенте без овог обољења.

Идентична ситуацији са присутним обољењем артеријска хипертензија, је и у плазми болесника са кардиомиопатијом, како у почетној, тако и матурној катаракти, сигнификантно су повећане просечне концентрације ксантин оксидазе ( $p < 0.05$ ). То је једина значајна разлика у концентрацијама параметара липидне пероксидације и антиоксидационе заштите у односу на пацијенте без кардиомиопатије.

Човеку су као дневном и аеробном организму, сунчева енергија и кисеоник, неопходни за живот. Па, ипак, управо се ова два фактора, нарочито њихово кумулативно и пролонгирано дејство, сматрају значајним фактором ризика за појаву и развој катаракте Ултразубичасти део сунчевог спектра, који чини приближно 5% енергије сунчевог зрачења, носи највећи ризик за појаву неких обољења код људи, на деловима тела који су му најизложенији – очима и кожи. Међутим, пошто је окуларна доза фотодинамског дејства кумулативна и тешко се прецизно одређује, постоје бројни

проблеми спровођења популационих студија за испитивање утицаја сунчевог зрачења на појаву и развој катаракте. Оваква студијска испитивања могу допринети осветљењу поменутог проблема уколико се врше у популационим заједницама хомогеним у смислу живота и рада на одређеном простору. Неке такве студије: студија из Merlenda (215), студија италијанско-америчке студијске групе за катаракту (Italian-American cataract study group), испитивања аустралијских Абориџана, истраживања спроведена у Непалу (106) и друга слична испитивања, показују већу учесталост појаве катаракте у областима са већом годишњом дозом ултраљубичастог зрачења.

Појава кортикалне и задње субкапсуларне катаркате се везује за појачану експозицију UV зрацима (52,58,154). Да већа доза UV зрачења носи ризик за појаву и развој кортикалне и задње субкапсуларне катаракте потврђено је и код експерименталних животиња, код којих је катаракта изазвана UV зрачењем (203).

Вештачки извори ултраљубичастих зрака такође носе одређени ризик у катарактогенези (50).

Примена хипербаричног кисеоника се такође наводи као фактор ризика за катарактогенезу. Појава нуклеарне катаракте уочена је код пацијената који су третирани хипербаричном кисеонотерапијом (175).

Заморчићи који су вишеструко излагани 100% кисеонику, показали су бржу матурацију катаракте од оних који нису били изложени овом стресу (28).

Вршена су и испитивања утицаја разних медикамената и фармаколошких препарата на појаву и развој катаракте. Тако, употреба кортикостерида, *рег ос*, доприноси појави задње субкапсуларне катаракте (134).

Један од фактора ризика за појаву катаракте, нарочито нуклеарне и задње субкапсуларне је и пушење (95,217). Пушење појачава интензитет оксидационог стреса, што је доказано у лабораторијским условима помоћу кондензата дуванског дима (195). Око 3800 токсичних једињења је изоловано из дуванског дима, од којих многа испољавају мутагена својства посредована повећаним стварањем реактивних кисеоничких радикала. Пушачи имају ниже концентрације витамина Ц, Е и каротеноида у плазми од непушача (13). Ово се може објаснити појачаним оксидационим стресом и последичном потрошњом ових важних антиоксиданаса, а вероватно и смањеним уносом витамина Ц.

## 6.2. Продукти липидне пероксидације у плазми пацијената са сенилном катарактом

Једна од последица дејства реактивних форми кисеоника је пероксидација полинезасићених масних киселина. Сам процес липидне проксидације, без обзира да ли је контролисан ензимима циклооксигеназног пута арахидонске киселине или је спонтан, карактерише настајање многих краткоживећих продуката и релативно стабилних алдехида. У циљу испитивања утицаја процеса липидне пероксидације на појаву и развој сенилне катаракте одређиване су у плазми, хомогенату сочива и очној водици концентрације примарних молекуларних продуката липидне пероксидације (коњугованих диена), секундарних продуката (липидних хидропероксида), затим малондиалдехида, као крајњег и релативно стабилног нискомолекулског продукта липидне пероксидације и испитивани су флуоресцентни продукати пероксидације липида.

Анализирањем измерених концентрација коњугованих диена у плазми пацијената са почетном и матурном сенилном катарактом није утврђена значајна разлика (графикон 2). Концентрација коњугованих диена у плазми пацијената са почетном катарактом је нешто виша, али не и статистички значајно виша, у односу на

пацијенте са матурном катарактом. Упоредивањем добијених концентрација коњугованих диена у плазми пацијената са различитим типовима почетне катаракте није утврђена значајна разлика (графикон 14), као ни код пацијената са матурном катарактом, зависно од начина на који је катаракта започела (графикон 19). Неки истраживачи су објавили значајно веће концентрације продуката липидне пероксидације у плазми болесника са сенилном катарактом (135), што указује да системске оксидационе промене могу утицати на прогресију сочивне замућености тј. на појаву и развој сенилне катаракте.

У реакцији продукта липидне пероксидације, малондиалдехида са аминокиселинама, слободним аминокиселинама или нуклеинским базама, производе се флуоресцентни производи липидне пероксидације, познати као Schiff-ове базе са  $RN=CHCH=CHNHR'$  (N,N'-1-амино-3-иминопропени). Када се ови производи ексцитирају на 360 nm максимум флуоресценције постижу између 430-440 nm. Поредивањем добијених флуоресценција липосолубилних и хидросолубилних иминопропена у плазми болесника са почетном сенилном катарактом и болесника са матурном сенилном катарактом није утврђена значајна разлика (табела 4). Према флуоресценци липосолубилних и хидросолубилних иминопропена у плазми болесника са различитим типовима почетне катаракте нису значајно различите (табела 10), као ни плазме пацијената са матурном катарактом, зависно од начина на који је катаракта започела (табела 15).

Поредивањем измерених концентрација малондиалдехида у плазми пацијената са почетном и матурном сенилном катарактом утврђена је значајна разлика ( $t=-2.829$ ,  $DF=71$ ,  $p<0.01$ ) (табела 3). Наиме, у плазми болесника са матурном сенилном катарактом концентрација малондиалдехида је значајно већа ( $p<0.01$ ) у односу на плазму пацијената са почетном катарактом. Просечна измерена концентрација малондиалдехида у плазми испитаника са сенилном катарактом је  $5.63\pm 1.26$ , док је у плазми испитиване групе добровољних даваоца крви ( $N=45$ ) просечна концентрација МДА износила  $3.46\pm 0.90$   $\mu\text{mol/L}$ . Ови резултати су у сагласности са подацима других истраживача (11,27,66,239) који су такође, забележили повећање садржаја малондиалдехида у плазми болесника са сенилном катарактом.

За одређивање концентрације малондиалдехида коришћена је спектрофотометријска метода са тиобарбитурном киселином. Реакција са тиобарбитурном киселином је једна од метода за детекцију оксидованих липида која се сматра недовољно специфичном, јер могу да реагују и друге супстанце (тзв. ТБА-реагујуће супстанце), али се и даље веома често употребљава када се проучава улога оксидационог стреса у разним патолошким стањима. Суштина ТБА-теста је реакција између тиобарбитурне киселине и алдехида, секундарних продуката липидне пероксидације. Проблем код одређивања малондиалдехида и других токсичних алдехида је у њиховој нестабилности тј. брзој разградњи, што је позитивно са становишта заштите организма, јер се ради о токсичним једињењима, али представља аналитички проблем.

Упоредивањем добијених концентрација малондиалдехида у плазми пацијената са различитим типовима почетне катаракте, највећа концентрација, мада не статистички значајно виша у односу на друге типове почетне катаракте, измерена је код пацијената са мешовитом субкапсуларно-нуклеарном почетном катарактом (табела 9). Код пацијената са матурном катарактом, концентрација малондиалдехида је значајно виша ( $p<0.05$ ) у плазми пацијената код којих је катаракта почела као мешовито нуклеарно-кортикална (табела 14).

Висок садржај коњугованих диена, малондиалдехида, као и флуоресцентних продуката липидне пероксидације у плазми оболелих од сенилне катаракте, указује да у плазми ових болесника, вероватно, постоји неравнотежа између активности

прооксиданаса и антиоксиданаса и да је она померена на страну прооксиданаса. У плазми поменутих болесника са сенилном катарактом смањена је активност глутатион пероксидазе (табела 8), што вероватно, доприноси смањеној разградњи и накупљању липидних хидропероксида у плазми. Чињеница је, да је у групи пацијената оболелих од сенилне катаракте, 69.3% испитаника имало артеријску хипертензију и да је 36.6% испитаника имало и дијагнозу кардиомиопатије. Поред познатих фактора ризика за развој кардиоваскуларних болести (дислипидемија, физичка неактивност, пушење), данас се потенцијалним узроцима ових болести сматрају оксидациони стрес и инфламација. Сматра се да су за процес атеросклерозе, нарочито његову иницијалну фазу одговоране оксидационе промене у зидовима крвних судова (оксидација фосфолипида ћелијских мембрана), као и оксидација крвних липопротеина. Код наших испитаника са катарактом атеросклероза је дијагностикована клинички, кад је већ довела до промена на миокарду, у виду кардиомиопатије. Вероватно да и ове атеросклеротичне промене доприносе повећању концентрације липидних хидропероксида у плазми болесника са сенилном катарактом. Узимајући у обзир наводе из литературе (162,211) који говоре о улози витамина Ц у заштити серумских липида од пероксидације, могуће је да ниже концентрације витамина Ц измерене у плазми наших испитаника са катарактом (табела 7) могу да допринесу повећаној концентрацији продуката липидне пероксидације у плазми. Све ово указује на то да системске оксидационе промене могу утицати на прогресију сочивне замућености тј. на појаву и развој сенилне катаракте, уз постојање других фактора ризика. Непостојање значајне разлике у концентрацији продуката пероксидације липида у плазми, зависно од типа катаракте, говори нам да системске оксидационе промене могу утицати на појаву катаракте, али који ће се тип катаракте развити, зависи од локалних карактеристика ока, односно сочива поједица, као и од утицаја других фактора ризика значајних за развој катаракте. Уколико у локалном компартману, односно у оку и самом сочиву постоје одређени оксидациони поремећаји, повећано стварање слободних радикала или смањена антиоксидациона активност, најчешће катаракта започиње променама у нуклеусу сочива.

Гвожђе је у хуманом организму распоређено екстрацелуларно и интрацелуларно и скоро у потпуности је везано за протеине. У физиолошким околностима у циркулацији нема слободног гвожђа, без комплекса са транспортним протеинима. Евантуални извор гвожђа за Fenton-ову и Haber-Weiss-ову реакцију у организму су свакако протеини са гвожђем (феритин, трансферин, хемоглобин, хемосидерин). У присуству слободних јона метала са променљивом валенцом (гвожђа и/или бабра) водоник пероксид се у Fenton-овој реакцији преводи у веома реактиван хидроксил радикал, док се липидни пероксиди преводу у пероксил и алкоксил радикале. Због дужег времена полуживота у односу на алкоксил радикал, пероксил радикал је идеалан за пропагацију оксидационих ланчаних реакција, док се алкоксил радикал у присуству  $Fe^{+2}$  најчешће преводи у токсичне алдехиде: малондиалдехид и 4-хидрокси-2-ноненал.

Због наведеног, веома је важно да се јони метала са променљивом валенцом (гвожђе и/или бакар) не налазе у ћелији или ванћелијским течностима у слободном стању. Било који молекул који везује ове метале и онемогућава их да реагују са водоник пероксидом или липидним хидропероксидима, сматра се делом антиоксидационог одбрамбеног система. Протеини крвне плазме чине део овог антиоксидационог система. У циркулацији трансферин везује тровалентно гвожђе и транспортује га у ћелије. Јони гвожђа везани за трансферин не могу да стварају хидроксил радикал из водоник пероксида нити да преводу липидне пероксиде у пероксил и алкоксил радикале. Церулоплазмин је протеин који везује бакар, али својом ферооксидазном активношћу преводи  $Fe^{+2}$  у  $Fe^{+3}$  и каталише реакцију дисмутације



супероксида. Албумин крвне плазме има такође одређени антиоксидациони капацитет јер везује јоне бакра и гвожђа, смањујући тако количину слободних јона поменутих метала и спречавајући њихово укључивање у реакције настанка слободних радикала. Албумин поседује пероксидазну активност, у условима *in vitro* разлаже водоник пероксид и спречава липидну пероксидацију (42).

За детекцију липидних хидропероксида као секундарних продуката пероксидације липида, коришћен је тест са тиобарбитурном киселином (ТБА), с тим што је пре класичне ТБА реакције узорак додавано двовалентно гвожђе, које је омогућило издвајање липидних хидропероксида (9). Анализирањем измерених концентрација липидних хидропероксида ( $\text{Fe}^{+2}$ -индукованог МДА) у плазми болесника са почетном и матурном сенилном катарактом није утврђена значајна разлика (табела 3). Тестирањем разлика измерених концентрација липидних хидропероксида у плазми пацијената са различитим типовима почетне катаракте није утврђена значајна разлика (табела 9), као ни у плазми болесника са матурном сенилном катарактом, зависно од начина на који је катаракта почела (табела 14).

Вредности  $\text{Fe}^{+2}$ -индукованог малондиалдехида у плазми су нам послужиле за израчунавање процентуалног удела малондиалдехида у плазми, као показатеља накнадно одиграног процеса липидне пероксидације. Вредности процентуалног удела  $\text{Fe}^{+2}$ -индукованог малондиалдехида у плазми пацијената са почетном сенилном катарактом су значајно веће ( $t=3.376$ ,  $DF=71$ ,  $p<0.001$ ) у односу на плазму пацијената са матурном сенилном катарактом (табела 3). Испитивањем вредности процентуалног удела  $\text{Fe}^{+2}$ -индукованог малондиалдехида у плазми пацијената са различитим типовима почетне катаракте није утврђена значајна разлика (табела 9), као ни у плазми пацијената са матурном катарактом, зависно од начина на који је катаракта започела (табела 14). Мањи проценат  $\text{Fe}^{+2}$ -индукованог малондиалдехида у плазми пацијената са матурном сенилном катарактом указује да је у плазми ових болесника интензивнији процес липидне пероксидације, тј. мања је количина супстрата на који би деловале додате соли гвожђа и индуковале допунско стварање малондиалдехида. Ниже концентрације витамина Ц у плазми пацијената са сенилном катарактом, доприносе вероватно, оваквим резултатима, јер витамин Ц штити незасићене масне киселине од оксидационог оштећења. Процент  $\text{Fe}^{+2}$ -индукованог малондиалдехида, донекле, може послужити за процену укупне антиоксидационе активности плазме. У прилог ове тезе је и значајна позитивна повезаност између концентрације непротеинских тиол једињења у плазми и %иМДА ( $r=0.288$ ,  $p<0.05$ ) (графикон 3). Ако се тако посматра, онда се може закључити да је у плазми пацијенти са сенилном катарактом значајно смањена укупна антиоксидациона активност плазме, односно да у плазми постоји дисбаланс међу антиоксидационим и прооксидационим чиниоцима, у корист прооксидационих фактора.

### 6.3. Активност прооксидационг ензима - ксантин оксидазе у плазми пацијената са сенилном катарактом

У плазми болесника са сенилном катарактом испитивана је активност ензима ксантин оксидазе, као генератора слободних радикала и важног индикатора прооксидационог оштећења ћелија. Анализирањем активности ксантин оксидазе у плазми испитаника са почетном и матурном сенилном катарактом није утврђена значајна разлика (графикон 4), ни у плазми болесника са различитим типовима почетне катаракте, као ни код пацијената са матурном катарактом, без обзира на начин којим је катаракта започела.

Међу испитиваним пацијентима, 36.6% имало је атеросклеротичну миокардиопатију. Развој атеросклерозе укључује инфламаторне и имунолошке механизме, уз присуство атерогених липопротеина. Процес је лоциран на ендотелу, па се примарно даје значај његовом оштећењу. Још увек су недовољно познати сви молекуларни и целуларни механизми одговорни за настанак атеросклерозе, али бројни литературни подаци указују да одређени патогенетски стимулуси имају улогу у продукцији реактивних оксидационих молекула у ендотелној микросредини и да оксидациони стрес има важну улогу у настанку ендотелне дисфункције која је повезана са атеросклерозом (152).

Сматра се да су ендотелне ћелије главни депои ензима ксантин дехидрогеназе и њене конвертне форме ксантин оксидазе. Пошто је атеросклероза дуготрајан процес, у периоду пролонгиране исхемије, циркулишућа ксантин оксидаза, стварањем слободних радикала кисеоника, изазива директна оштећења васкуларног ендотела. Активирањем инфламаторних ћелија, које продукују токсичне радикале, ксантин оксидаза може проузроковати накнадна оксидациона оштећења у плазми. Претпоставља се да ксантин оксидаза егзистира не само у цитоплазми ћелија, већ и на површини ендотелних мембрана. Извесно је, да екстрацелуларни супероксид анјон, настао активношћу ксантин оксидазе, усмерава свој правац деловања прво на изворну ћелију и оштећује је. На тај начин се стварају услови за активирање пријемчивих неутрофила и њихову адхезију за ендотел, што даље доводи до прогресије оксидационог оштећења.

Хипоксија активира адхезивни систем у ендотелним ћелијама, омогућујући интеракцију са адхезивним молекулима ћелија, првенствено неутрофила, због чега долази до њихове акумулације у крвним судовима. Неутрофили ослобађају конверзивни фактор еластазу, који конвертује ксантин дехидрогеназу у ксантин оксидазу, што резултује продукцијом слободних кисеоничких радикала (180).

Упоредивањем активности ксантин оксидазе у плазми болесника са сенилном катарактом који су имали дијагнозу кардиомиопатије и оних који нису имали ову дијагнозу утврђена је значајно већа активност ксантин оксидазе у плазми болесника са кардиомиопатијом ( $t=-4.003$ ,  $DF=71$ ,  $p<0.001$ ) (табела 5), као и значајно већа активност ксантин оксидазе у плазми болесника са хипертензијом ( $t=-6.988$ ,  $DF=71$ ,  $p<0.001$ ) (табела 5) у односу на пацијенте без хипертензије.

#### 6.4. Промене концентрација непротеинских и протеинских тиола у плазми пацијената са сенилном катарактом

Глутатион има бројне функције у организму уопште, од којих су многе повезане са антиоксидационом заштитом. Глутатион у присуству ензима глутатион пероксидазе (EC 1.11.1.9) учествује у детоксикацији водоник пероксида, хидропероксида масних киселина и фосфолипидних хидропероксида. Глутатион има значајну улогу у регенерацији аскорбата, односно регенерација редокс стања пара аскорбат/дехидроаскорбат је ензимски процес завистан од присуства редукованог глутатиона (60).

*In vivo*, највећи део глутатиона се налази у редукованом облику (чак 95%). У самој ћелији глутатион се налази у цитосолу, митохондријама, једру и ендоплазматском ретикулуму. Унутрашњост ћелије, је у редокс смислу, претежно редукована, великим делом захваљујући високом GSH/GSSG односу, што се обезбеђује активношћу ензима глутатион редуктазе. У одређеним стањима долази до поремећаја овог односа (при интензивном оксидационом стресу), када се GSSG транспортује ван ћелије системом  $Ca^{+2}$ -зависне АТФ-азе ћелијске мембране. То води до иреверзibilног губитка

глутатиона, с обзиром да оксидовани облик глутатиона не може бити редукован екстрацелуларно, а оксидовани облик глутатиона ћелије не преузимају.

Анализирањем измерених концентрација непротеинских тиола у плазми пацијената са почетном и матурном сенилном катарактом није утврђена значајна разлика (табела 6). Код здравих добровољних даваоца крви (N=45), просечних година старости  $60.27 \pm 5.47$  добијена просечна концентрација непротеинских тиола у плазми износила је  $10.42 \pm 2.74$ . Неки истраживачи су објавили резултате значајно нижих концентрација непротеинских тиола у плазми пацијената са сенилном катарактом (66). У плазми наших испитаника са различитим типовима почетне катаракте, није утврђена значајна разлика према концентрацији непротеинских тиол група (табела 11), а најмања, али не и статистички значајно мања, измерена концентрација редукованог глутатиона је у плазми пацијената са мешовито нуклеарно-кортикалном почетном катарактом (табела 11). У плазми болесника са матурном катарактом утврђена је значајна разлика, зависно од типа којим је катаракта започела, и то концентрација непротеинских тиола значајно је нижа у плазми пацијената са матурном катарактом, која је почела као мешовито субкапсуларно-нуклеарна ( $p < 0.05$ ) и у плазми пацијената са матурном катарактом, која је почела као мешовито нуклеарно-кортикална ( $p < 0.05$ ) у односу на плазму пацијената са матурном катарактом, почелом као субкапсуларна (табела 16).

Бројни су фактори који утичу на концентрацију глутатиона у плазми. Јетра је најважнији орган у процесу синтезе и транспорта глутатиона. Око 90% глутатиона у плазми потиче из јетре, где аминокиселине (Gly, Cys, Glu) из порталног крвотока учествују у његовој синтези. Осим функције јетре, на концентрацију глутатиона у организму утиче и унос аминокиселина, с обзиром на његов аминокиселински састав. Наравно и потрошња редукованог глутатиона, с обзиром на бројне функције које има у организму. За одржавање оптималних концентрација глутатиона у организму одговорно је више ензима, а и сам глутатион је неопходан за функционисање бројних ензима. Активност глутатион редуктазе и глутатион пероксидазе непосредно зависи од концентрације глутатиона. Томе у прилог говоре резултати корелационих анализа између активности глутатион зависних ензима и концентрације редукованог глутатиона у плазми. Наиме, између активности ензима глутатион пероксидазе и концентрације редукованог глутатиона у плазми утврђена је значајна позитивна повезаност ( $r = 0.250$ ,  $p < 0.05$ ) (графикон 12), што указује да концентрација редукованог глутатиона утиче на активност глутатион пероксидазе.

Ниска концентрација редукованог глутатиона у плазми пацијената са сенилом катарактом може се објаснити тиме, што се редуковани глутатион, као главни представник непротеинских тиол једињења укључује и троши у оксидо-редукционим процесима у условима вишка оксидисаних супстрата. Ови резултати смањене концентрације редукованог глутатиона у плазми пацијената са сенилном катарактом су у складу са доказаном интензивном липидном пероксидацијом у плазми истих болесника.

Концентрација редукованог глутатиона утиче и на концентрацију укупног витамина Ц, као и аскорбата у плазми, што је и потврдила значајна позитивна корелативна веза између концентрације непротеинских тиола и укупног витамина Ц у плазми ( $r = 0.297$ ,  $p < 0.05$ ) (графикон 9), као и значајна позитивна повезаност између концентрације непротеинских тиола и концентрације аскорбата у плазми ( $r = 0.308$ ,  $p < 0.01$ ) (графикон 10). Испитивањем међусобне везе концентрације непротеинских тиол једињења у плазми и концентрационог односа Д/А утврђена је значајна негативна повезаност ( $r = -0.293$ ,  $p < 0.05$ ) (графикон 11) односно смањена концентрација редукованог глутатиона у плазми доприноси повећању концентрације дехидроаскорбата и доводи до

поремећаја односа Д/А. Пораст односа дехидроаскорбат/аскорбат у плазми указује на присуство оксидационог стреса.

Већ је описано да су у плазми оболелих од сенилне катаракте, повећане концентрације продуката липидне пероксидације, што указује да у плазми ових болесника, вероватно, постоји неравнотежа између активности прооксиданаса и антиоксиданаса и да је она померена на страну прооксиданаса. У прилог ове претпоставке говоре и резултати одређивања концентрације протеинских тиол (СХ) група у плазми оболелих од сенилне катаракте. Просечна концентрација протеинских тиола одређивана у плазми здравих добровољних даваоца крви износила је  $546.9 \pm 105.3 \mu\text{mol/L}$ , у плазми испитаника са почетном катарактом  $373.1 \pm 65.1$  и у плазми пацијената са матурном катарактом  $343.3 \pm 71.3 \mu\text{mol/L}$ . Испитивањем измерених концентрација укупних протеинских тиола у плазми болесника са сенилном катарактом није утврђена значајна разлика, зависно од степена матуритета катаракте (табела 6), као ни у плазми болесника са различитим типовима почетне катаракте (табела 11). Док, је код пацијената са матурном катарактом, значајно нижа ( $p < 0.001$ ) концентрација протеинских тиола измерена у плазми пацијената са матурном катарактом, која је почела као мешовито нуклеарно-кортикална (табела 16). Протеинске тиол групе учествују као антиоксиданси у прекидању ланчаних реакција стварања радикала у плазми, па значајно смањење њихове количине у плазми код свих пацијената са сенилном катарактом потврђује повећану прооксидациону активност у плазми ових болесника.

## 6.5. Промене концентрације витамина Ц у плазми пацијента са сенилном катарактом

Аскорбинска киселина (витамин Ц) је најефикаснији хидросолубилни антиоксиданс. Хидроксилне групе везане за С-2 и С-3 молекуле аскорбинске киселине, способне су да отпуштају и примају водоникове атоме, чиме омогућавају аскорбинској киселини улогу снажног редокс система. У присуству кисеоника и других оксидационих агенаса, Л-аскорбинска киселина се брзо оксидује и прелази у дехидроаскорбинску киселину, која може поново да се редукује у енолни облик Л-аскорбинску киселину. Већина ћелија хуманог организма има способност редукције дехидроаскорбата у аскорбат, чиме се он регенерише. Непротеински тиоли, првенствено редуковани глутатион, учествују у редукцији дехидроаскорбата (60). Антиоксидациона способност виатмина Ц базира се на његовој способности да неутралише интермедијере и продукте слободно радикалских процеса, при чему настају стабилни продукти.

Витамина Ц у плазми ефикасно спречава оксидацију липида плазме, реагујући брже од других антиоксиданаса са пероксил радикалом.

У плазми здравих особа концентрација аскорбата зависи од пероралног уноса, као и од пола и старости.

Одређивање витамина Ц у телесним течностима може да укаже на промене овог антиоксиданса у условима стварања реактивних кисеоничких радикала. Однос дехидроаскорбат/аскорбат у ткивима и телесним течностима се такође веома често користи за процену учешћа витамина Ц у антиоксидационој заштити. С тим циљем је и у нашем истраживању одређивана концентрација укупног витамина Ц, као и концентрациони однос дехидроаскорбат/аскорбат у узорцима.

Просечна измерена концентрација укупног витамина Ц у крви испитиваних пацијената са сенилном катарактом износила је  $63.07 \pm 4.12 \mu\text{mol/L}$ . Анализирањем концентрација укупног витамина Ц, дехидроаскорбата, аскорбата и односа

дехидроаскорбат/аскорбат није утврђена значајна разлика у плазми пацијената са почетном и пацијената са матурном сенилном катарактом (табела 7).

Испитивањем концентрација укупног витамина Ц у плазми пацијената са различитим типовима почетне катаракте, утврђена је значајна разлика, наиме, концентрација укупног витамина Ц значајно је нижа у плазми болесника са мешовито субкапсуларно-нуклеарном почетном катарактом ( $p < 0.01$ ), као и у плазми пацијената са мешовито нуклеарно-кортикалном почетном катарактом ( $p < 0.01$ ) у односу на плазму болесника са почетном субкапсуларном катарактом (табела 12). Анализирањем измерених концентрација укупног витамина Ц у плазми пацијената са матурном катарактом, утврђена је значајно нижа концентрација укупног витамина Ц у плазми пацијената са матурном катарактом, која је почела као мешовито нуклеарно-кортикално ( $p < 0.001$ ), као и плазми болесника са матурном, започелом као мешовито субкапсуларно-нуклеарна катаракта ( $p < 0.001$ ) у односу на плазму пацијената са матурном, започелом као субкапсуларна катаракта (табела 17).

Концентрација дехидроаскорбата није значајно различита у плазми болесника са почетном катарактом у односу на пацијенте са матурном катарактом (табела 7), ни у плазми болесника са различитим типовима почетне катаракте (табела 12), као ни у плазми пацијената са матурном катарактом, зависно од начина на који је катаракта започела (табела 17).

Концентрација аскорбата у плазми пацијената са почетном сенилном катарактом, не разликује се значајно у односу на ниво аскорбата у плазми болесника са матурном катарактом (табела 7). У плазми пацијената са почетном катарактом значајно већа концентрација аскорбата измерена је у плазми болесника са субкапсуларном катарактом ( $p < 0.05$ ) у односу на плазму пацијената са почетном мешовито субкапсуларно-нуклеарном катарактом (табела 12). Код пацијената са матурном катарактом, значајно нижа концентрација аскорбата измерена је у плазми болесника са матурном, започелом као мешовито нуклеарно-кортикална катаракта ( $p < 0.001$ ), као и у плазми пацијената са матурном, која је почела као мешовито субкапсуларно-нуклеарна катаракта ( $p < 0.001$ ) у односу на концентрацију аскорбата измерену у плазми пацијената са матурном катарактом, која је почела као субкапсуларна, односно као кортикална (табела 17).

У плазми пацијената са сенилном катарактом већи део укупног витамина Ц чини дехидроаскорбат, па просечни концентрациони однос дехидроаскорбат/аскорбат (Д/А) плазме ових болесника износи  $1.53 \pm 0.28$ . Концентрациони однос дехидроаскорбат/аскорбат је сличан у плазми пацијената са почетном и матурном сенилном катарактом (табела 7), као и у плазми пацијената са различитим типовима почетне катаракте (табела 12). Анализирањем вредности односа Д/А у плазми пацијената са матурном катарактом, зависно од типа којим је катаракта почела, утврђена је значајна разлика и то Д/А однос је значајно виши у плазми пацијената са матурном катарактом, започелом као мешовито нуклеарно-кортикална ( $p < 0.01$ ), као и у плазми болесника са матурном, започелом као мешовито субкапсуларно-нуклеарна катаракта ( $p < 0.05$ ) у односу на болеснике са матурном, започелом као субкапсуларна катаракта (табела 17). Концентрација укупног витамина Ц, дехидроаскорбата, аскорбата и однос Д/А одређиван је и код здравих добровољних даваоца крви ( $N=45$ ), просечних година старости  $60.27 \pm 5.47$ . Код ових испитаника измерена просечна концентрација укупног витамина Ц износила је  $68.89 \pm 5.65 \mu\text{mol/L}$ , при чему већи део укупног витамина Ц чини аскорбат ( $38.01 \pm 4.57 \mu\text{mol/L}$ ) у односу на дехидроаскорбат ( $31.04 \pm 2.43 \mu\text{mol/L}$ ), тако да је просечни нађени концентрациони однос дехидроаскорбат/аскорбат плазме здравих добровољних даваоца крви износио 0.83. Повећане вредности концентрационог односа Д/А у плазми болесника са сенилном

катарактом, вероватно су последица оксидације аскорбинске киселине, која прати процес липидне пероксидације, чиме се овај витамин укључује у антиоксидациону заштиту, односно високе вредности односа Д/А указују на појачано учешће аскорбата у антиоксидационој заштити плазме.

Ови резултати наших испитивања су у складу са подацима других истраживача који такође, указују на смањење концентрације витамина Ц у крви пацијената оболелих од сенилне катаракте (218).

Човек не поседује генетску информацију потребну за синтезу аскорбинске киселине, па је измерена концентрација овог витамина у крви првенствено одраз пероралног уноса. Ниске концентрације витамина Ц и аскорбата у крви пацијената оболелих од сенилне катаракте могу се оправдати већим бројем разлога. Чињенице које могу допринети објашњењу овог проблема су бројне. Најпре термин узимања крви за биохемијске анализе. То су рани јутарњи сати, односно период након ноћног поста, током кога се концентрација витамина Ц може постепено смањити. Затим, године живота пацијената. Са старењем, се смањује и унос, а вероватно и метаболичка активност аскорбинске киселине. Литературни подаци указују да концентрација витамина Ц код замораца опада са старењем, независно од његовог уноса (147). Затим, фактори стреса, тј. хоспитализација и очекивање хирушке интервенције, могу утицати на концентрацију аскорбинске киселине у крви болесника са сенилном катарактом.

Један број (36,6%) испитиваних пацијената има и атеросклеротичну миокардиопатију. Процес атеросклерозе се у савременој литератури такође повезује са реактивним радикалима кисеоника (211), што додатно утиче на смањење концентрације аскорбинске киселине, као важног хидросолубилног антиоксиданса у крви испитаника. Витамин Ц у плазми ефикасно спречава оксидацију липида плазме, реагујући брже од других антиоксиданаса са пероксил радикалом (200). Аскорбинска киселина такође, штити ћелијске мембране од липидне пероксидације појачавањем активности токоферола, важног липосолубилног антиоксиданса. Аскорбинска киселина редукује токоферол радикал, у присуству ензима NADH аскорбат редуктазе до токоферола, чиме обнавља радикал-скевенцерску активност токоферола.

Ниске концентрације витамина Ц у плазми пацијената са сенилном катарактом утичу и на концентрацију овог витамина у окуларним структурама. Најнижа концентрација укупног витамина Ц, као и аскорбата измерена је у плазми болесника код којих је катарактом захваћен нуклеарни део сочива. Код ових пацијента је измерена највиша концентрација дехидроаскорбата и последично највећи однос Д/А, што нам говори да су ови болесници имали најизраженији поремећај односа антиоксидационих компонената у плазми, који се вероватно рефлектовао и на сочиво, тачније његов нуклеарни део који је и најосетљивији на оксидационе поремећаје.

## 6.6. Укупна антиоксидациона способност плазме пацијената са сенилном катарактом

Укупни антиоксидациони капацитет плазме чине неензимски антиоксиданси (укупни протеини, албумин, церулоплазмин, трансферин, мокраћна киселина, витамини), као и активност антиоксидационих ензима. Антиоксидациона способност плазме пацијената са сенилном катарактом испитивана је мерењем фери-редуктивне способности плазме тј. способности редукције  $Fe^{+3}$  у  $Fe^{+2}$ , ФРАП анализом.

Упорђивањем добијених вредности фери-редуктивне способности плазме пацијената са сенилном катарактом није утврђена значајна разлика у плазми испитаника са почетном сенилном катарактом у односу на плазму пацијената са матурном катарактом ( $t=-0.612$ ,  $DF=71$ ,  $p=0.543$ ) (табела 6), као ни у плазми пацијената са

различитим типовима почетне сенилне катаракте (табела 11), нити у плазми пацијената са матурном катарактом, зависно од начина на који је катаракта почела (табела 16).

Целокупну антиоксидациону способност плазме чине бројни антиоксидациони чиниоци, међусобно повезани и зависни. Биолошки антиоксиданси су супстанце које супримирају продукцију реактивних оксидишућих врста и/или спречавају оксидацију супстрата. Оксидацију супстрата, антиоксиданси, спречавају способношћу да реагују са разним оксидишућим врстама, при чему антиоксиданс у ствари изврши редукцију оксиданса. Неензимски антиоксиданс, аскорбинска киселина, може се описати као редуктанс и инактиватор оксиданаса, при чему се у редокс реакцији реактивне врсте редукју, а сама аскорбинска киселина оксидује. Па се, у овом контексту антиоксидациона способност плазме може представити аналогно редукционој способности плазме, што је суштина ФРАП анализе. Тако, је за фери-редукциону способност плазме у великој мери одговоран витамин Ц односно аскорбат у плазми.

Испитивањем зависности између концентрације укупног витамина Ц и вредности ФРАП анализе у плазми болесника са сенилном катарактом утврђена је значајна позитивна повезаност ( $r=0.703$ ,  $p<0.001$ ) (графикон 5), затим између концентрације аскорбата и вредности ФРАП анализе у плазми ( $r=0.574$ ,  $p<0.001$ ) (графикон 6), између концентрације непротеинских тиола и вредности ФРАП анализе у плазми ( $r=0.414$ ,  $p<0.001$ ) (графикон 7) и позитивна повезаност ( $r=0.523$ ,  $p<0.001$ ) (графикон 8) је утврђена између концентрације протеинских тиола и вредности ФРАП анализе у плазми болесника са сенилном катарактом.

## 6.7. Активност антиоксидационих ензима у плазми пацијената са сенилном катарактом

Одређивање антиоксидационог статуса у крви, испитиваних пацијената, пре свега, мерењем специфичне активности антиоксидационих ензима, омогућава праћење модулације оксидо-редукционе равнотеже у току патогенезе сенилне катаракте.

Претпоставка, да у плазми пацијената оболелих од сенилне катаракте, постоји дисбаланс између продукције слободних радикала и антиоксидационог капацитета, је потврђена и резултатима одређивања активности антиоксидационих ензима: супероксид дисмутазе, глутатион пероксидазе, глутатион редуктазе, глутатион С-трансферазе и каталазе.

Активност екстрацелуларне супероксид дизмутазе, ензима који каталише превођење супероксид анјон радикала у водоник пероксид, у плазми пацијената са почетном сенилном катарактом није значајно различита у односу на плазму пацијената са матурном катарактом (табела 8). Измерене активности супероксид дизмутазе су сличне у плазми болесника са различитим типовима почетне катаракте (табела 13), као у плазми пацијената са матурном катарактом, без обзира на начин којим је катаракта почела (табела 18).

Податке о смањеној активности супероксид дисмутазе у плазми болесника са сенилним променама на сочиву објавили су и други истраживачи (42,150,239). Литературни подаци указују да је активност супероксид дизмутазе нижа у плазми старијих пацијената (150). Значајно повећање продуката пероксидације липида у плазми болесника са сенилном катарактом и смањење активност екстрацелуларне супероксид дизмутазе, говори у прилог претпоставци да смањена антиоксидациона одбрана организма може бити одговорна за промену системске редокс равнотеже ка оксидационом стресу, који може допринети појави сенилне катаракте. Ово смањење активности супероксид дисмутазе може бити последица оксидационе модификације

самих ензимских молекула или смањења мРНК одговорне за синтезу супероксид дизмутазе.

Смањеној активности супероксид дизмутазе у плазми наших испитаника вероватно, доприноси и животна доб. Више студија како на животињама, тако и на хуманим организмима, утврдило је, да се с годинама живота смањује како активност ћелијских изоензима супероксид дизмутазе, тако и активност екстрацелуларне супероксид дизмутазе. Наиме, испитивањем активности супероксид дизмутазе у плазми испитаника коју су чинили родитељи и њихова деца, утврђена је значајно виша активност супероксид дизмутазе у дечјој плазми, док се активност екстрацелуларне супероксид дизмутазе у крви родитеља, с повећањем броја година смањивала (1). Ово указује на то да активност екстрацелуларне супероксид дизмутазе може бити осетљив биомаркер за од година зависне (age related) промене у антиоксидационом капацитету организма.

Међутим, у току процеса старења организма, континуирана продукција реактивних кисеоничких врста, може вршити индукцију антиоксидационих ензима као адаптацију на оксидационе промене. На пример, ниво биосинтезе супероксид дизмутазе код ешерихије коли (*E. coli*) показује зависност од нивоа супероксид анјон радикала у ћелији. Вероватно је, да успешна адаптација организма на континуирану продукцију слободних радикала, резултира већом активношћу екстрацелуларне супероксид дизмутазе у плазми и заштитом од евентуалног развоја сенилне катаракте. Супротно, болесници са сенилном катарактом нису развили адаптиван систем као одговор на повећану продукцију реактивних кисеоничких врста, па је и активност супероксид дизмутазе значајно нижа у њиховој плазми. Ово може бити последица генетских или амбијенталних фактора или оба поменута. Даље, оксидационом оштећењу ензима супероксид дизмутазе, као протеина, може допринети смањена количина и других антиоксиданаса у плазми болесника са сенилном катарактом, смањена концентрација укупног витамина Ц и редукованог глутатиона.

Испитивањем измерених каталитичких активности глутатион пероксидазе, није утврђена значајна разлика у плазми пацијената оболелих од почетне сенилне катаракте у односу на плазму болесника са матурном катарактом (табела 8), као ни у плазми пацијената са различитим типовима почетне катаракте (табела 13), нити је разлика утврђена упоређивањем активности глутатион пероксидазе у плазми пацијената са матурном катарактом, која је започела на различите начине (табела 18). Сличне податке о активности глутатион пероксидазе у плазми пацијената оболелих од сенилне катаракте објавили су и други истраживачи. Наиме, Huang и сарадници (108) су објавили да је код испитаника са нуклеарном, кортикалном, субкапсуларном и мешовитом катарактом активност глутатион пероксидазе у плазми слична.

Активност глутатион пероксидазе утиче на концентрацију водоник-пероксида и других хидропероксида и може модулирати промене индуковане поменутиим компонентама. Наиме, глутатион пероксидаза има кључну улогу у разградњи водоник пероксида и детоксикацији липидних хидропероксида и у условима смањене активности поменуте пероксидазе повећава се концентрација продукта пероксидације липида у плазми (108). Ензим глутатион пероксидаза или мРНК за његову синтезу, пронађени су у многим ткивима хуманог организма, као што су бубрези, плућа, тироидеа, плазма, а претпоставља се, да су бубрези главни извор глутатион пероксидазе у плазми код човека. Такође, мРНК за синтезу овог ензима је детектована у хуманом цилијарном епителу, одакле се секретује у очну водицу (108).

Супероксид дизмутаза и глутатион пероксидаза и/или каталаза каталишу секвенцијалне реакције у којима се ствара и разлаже водоник пероксид, и њихова активност штити ћелије или ванћелијску средину од последица нагомилавања



реактивних кисеоничких врста. С обзиром да супроксид дисмутаза редукује супероксид анјон радикал у водоник пероксид, који у присуству слободних јона метала са променљивом валенцом може бити преведен у токсични хидроксил радикал, неопходно је да супроксид дисмутаза, с једне стране и глутатион пероксидаза и/или каталаза, с друге стране делују синхронизовано. У случају да је повећана активност супроксид дисмутаза у односу на активност глутатион пероксидазе и/или каталазе долази до нагомилавања водоник пероксида (57). Због своје липосолубилности и дугог времена полуживота, водоник пероксид може бити узрок оксидационог оштећења унутарћелијских и ванћелијских макромолекула. У нашем испитивању, забележено је смањење активности супроксид дисмутаза у плазми пацијената оболелих од сенилне катаракте, праћено падом активности глутатион пероксидазе и глутатион редуктазе.

Самањене активности глутатион пероксидазе у плазми пацијената оболелих од сенилне катаракте, има за последицу повећано стварање и накупљање липидних хидропероксида, које ни каталаза не разграђује. Липидни хидропероксиди и пероксил радикали могу извршити оксидацију осетљивих аминокиселина (цистеина, хистидина, метионина и триптофана) у протеинима.

Активност глутатион пероксидазе зависи и од количине расположивог редукованог глутатиона. То потврђује и значајна позитивна корелативна веза између концентрације непротеинских тиола и активности глутатион пероксидазе у плазми болесника са сенилном катарактом ( $r=0.250$ ,  $p<0.05$ ) (графикон 12). Како је концентрација редуковаог глутатиона смањена у плазми болесника са сенилном катарактом, то се одражава и на активност глутатион пероксидазе у плазми поменутих болесника.

Испитивањем зависности концентрације продукта пероксидације липида, коњугованих диена и активности глутатион пероксидазе у плазми болесника са сенилном катарактом, утврђена је негативна повезаност ( $r=-0.157$ ,  $p=0.186$ ), што указује да се са повећањем концентрације коњугованих диена троши ензим глутатион пероксидаза у реакцијама разградње поменутих продуката. Међутим, ове корелације не показују статистичку значајност, што је вероватно последица смањене концентрације редукованог глутатиона у плазми пацијената са сенилном катарактом и немогућности глутатион пероксидазе да оствари своју оптималну детоксикациону функцију.

Глутатион редуктаза катализује разградњу дисулфидне везе оксидованог (GSSG) до редукованог глутатиона (GSH). Основна улога овог ензима је одржавање концентрације редукованог глутатиона, који је неопходан за редукацију оксидованих тиол група протеина (нпр. хемоглобина и ензима). Део редуктивног потенцијала метаболизма угњених хидрата преноси се путем  $NADH^+H^+$  и  $NADPH^+H^+$  на глутатион, који има улогу антиоксиданса биолошки активних протеина.

Испитивањем измерених каталитичких активности глутатион редуктазе, утврђена је значајно нижа активност у плазми болесника са почетном сенилном катарактом ( $p<0.05$ ), у односу на плазму пацијената са матурном катарактом (табела 8). Упоредивањем активности глутатион редуктазе у плазми болесника са различитим типовима почетне катаракте није утврђена значајна разлика (табела 13), као ни у плазми пацијената са матурном катарактом зависно од типа којим је катаракта започела (табела 18).

Глутатион-С-трансфераза обухвата фамилију мултифункционалних ензима чија је најважнија улога у процесима детоксикације, коју остварују катализујући коњугацију глутатиона са великим бројем електрофилних токсина и карциногена. Детоксикациона улога глутатион С-трансферазе се огледа у њеној способности да катализује реакцију коњугације редукованог глутатиона са бројним хидрофобним и електрофилним ксенобиотицима (канцерогени, хербициди, пестициди, фармаколошки активне супстанце) (233) и ендогеним електрофилима који су најчешће продукти оксидационог

стреса укључујући ДНК, липидне хидропероксиде и крајње продукте липидне пероксидације (109). Нарочито су класе  $\alpha$ ,  $\mu$  и  $\theta$  глутатион С-трансферазе одговорне за спречавање акумулације фосфолипид хидропероксида.

Испитивањем измерених активности глутатион-С-трансферазе није утврђена значајна разлика у плазми болесника са почетном сенилном катарактом у односу на активност глутатион С-трансферазе у плазми болесника са матурном катарактом (табела 8). Ови резултати су у складу са измереним концентрацијама продуката пероксидације липида у плазми испитаника са сенилном катарактом. Наиме, концентрација липидних хидропероксида је највећа у плазми пацијената са почетном сенилном катарактом (табела 3), где је и активност глутатион С-трансферазе највећа (табела 8). Глутатион С-трансфераза као индуцибилни ензим, реагује појачаном активношћу на повећану концентрацију продуката липидне пероксидације у плазми. То потврђује и позитивна корелативна веза између концентрације коњугованих диена и активности глутатион С-трансферазе у плазми болесника са почетном сенилном катарактом ( $r=0.424$ ,  $p<0.05$ ) (графикон 18).

Редуковани глутатион је неопходан за реакције коњугације са продуктима пероксидације липида које катализује глутатион С-трансфераза, што потврђује значајна негативна корелативна веза између концентрације редукованог глутатиона и активности глутатион С-трансферазе у плазми ( $r=-0.318$ ,  $p<0.01$ ) (графикон 13), тј. са повећањем активности ензима глутатион С-трансферазе, повећава се и потрошња редукованог глутатиона, што последично смањује његову концентрацију у плазми. Коњугацијом са глутатионом смањује се токсичност електрофилних једињења, чиме се смањује њихова реактивност према нуклеофилним групама у биолошким макромолекулама (нуклеинским киселинама, протеинима, липидима).

Вероватно, да и генетске варијације и сама индуцибилност ензима глутатион С-трансферазе имају за последицу интериндивидуалне разлике у капацитету разлагања продуката пероксидације липида у организму сваког пјединца.

Основна биолошка улога каталазе је разлагање водоник пероксида. У плазми пацијената са почетном сенилном катарактом, измерена активност каталазе, се значајно не разликује у односу на активност каталазе у плазми пацијената са матурном сенилном катарактом (табела 8). Испитивањем измерених активности каталазе у плазми болесника са различитим типовима почетне катаракте није утврђена значајна разлика (табела 13), као ни у плазми болесника са матурном катарактом, зависно од начина на који је катаракта почела (табела 18). Поједини истраживачи (11) су објавили значајно ниске активности каталазе у плазми оболелих од сенилне катаракте. Нижа активност каталазе у плазми пацијената са сенилном катарактом, вероватно представља одраз смањеног капацитета антиоксидационе заштите плазме ових пацијената. Могуће је и то, да смањена активност ензима супероксид дисмутазе, који је одговоран за дисмутацију супероксид радикала у водоник пероксид, доводи до мање продукције  $H_2O_2$ . Познато је да при ниским концентрацијама водоник пероксида и оптималној концентрацији редукованог глутатиона, пероксидаза има кључну улогу у разградњи  $H_2O_2$ . Међутим, у плазми наших испитаника са сенилном катарактом, смањена је и концентрација редукованог глутатиона, што утиче на оптималну функцију глутатион пероксидазе, о чему је већ било речи.

## 6.8. Пацијенти који имају дијабетес мелитус и сенилну катаракту

Дијабетес мелитус је хроничан поремећај метаболизма, који се карактерише хипергликемијом, а настаје као резултат поремећене секреције и/или деловања инсулина. Пораст концентрације глукозе у периферној крви доводи до гликације

протеина, стимулације полиолског пута разградње глукозе, што за последицу има оксидациони стрес, као и промене у ћелијској сигнализацији посредованој специфичним производима гликације (AGEs – advanced glycation end products).

Полиолски пут разградње глукозе представља адаптивни механизам уклањања прекомерних количина глукозе, конверзијом глукозе у полихидроксилне алкоhole од којих је најзначајнији сорбитол. Концентрација сорбитола у дијабетес мелитусу је посебно повећана у очном сочиву (131), бубрезима, еритроцитима и хепатоцитима. У реакцији превођења глукозе у сорбитол учествује ензим алдозо редуктаза, која садржи коензим  $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$ . Потрошњом коензима  $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$  активношћу алдозо редуктазе, успорава се регенерација редукованог глутатиона, јер глутатион редуктаза захтева исти коензим, што доприноси појави оксидационих поремећаја. Перманентно гомилање сорбитола доводи до поремећаја осморегулације. Оксидацијом сорбитола у фруктозу повећава се концентрација  $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$  и потенцира триозо-фосфатни пут. Настаје диацилглицерол који стимулише активност протеин киназе Ц (220). Пораст фруктозе тако доводи до осмотских промена, неензиматске фруктозилације и продукције AGEs (најзначајнији су: фруктозил фураноил имидазол, карбокси метил лизин, пентозидин, метилглиоксал, 1-алкил-2-формил 3,4-дигликозипирол (69)).

Сем пута полиола, посебан биохемијски еквивалент налаза хипергликемије представља процес неензимског везивања шећера са протеинима, тзв гликација (неензимска гликозилација). Ова реакција се јавља између редукујућих шећера (алдоза и кетоза) и слободних амино група протеина (Amador-и продукти, Maillard-ова реакција). Једна од најважнијих мета за Maillard-ову реакцију су дуго-живећи протеини: колаген, ламин и протеини сочива.

Редокс статус ћелије, који се протеже преко 1000 mV, детерминисан је садржајем тиол једињења у ћелији, пре свега садржајем глутатиона. Редокс систем GSH/GSSG постаје прогресивно оксидисан у дијабетес мелитусу. Поремећај редокс потенцијала ћелије иницира активацију стрес сигналне каскаде која резултира директном активацијом специфичних киназа и фактора транскрипције (178).

Бројни истраживачи указују да је дијабетес мелитус важан фактор ризика за катарктогенезу. Детаљнија испитивања су показала да је дијабетес мелитус значајан за појаву и развој катаракте код особа млађих од 60 година. У нашој испитиваној групи, оболелих од катаракте, било је 14 пацијената са дијагнозом дијабетес мелитус, што чини 13.6% пацијената испитиване групе. Просечне године старости пацијената са дијабетес мелитусом износиле су 69.91, а просечна старост целе испитиване групе пацијената са катарактом је 72.02 године.

У плазми пацијената са дијабетес мелитусом и почетним обликом катаракте, не постоје разлике у просечним концентрацијама параметара пероксидационог процеса и антиоксидационе заштите. Код матурне катаракте у налазу плазме постоји сигнификантност појединих продуката. Коњуговани диени у плазми пацијената са дијабетес мелитусом налазе се у повећаној концентрацији ( $p < 0.05$ ) у односу на пацијенте без овог обољења. Антиоксидациона заштита у плазми је са сигнификантно мањим ( $p < 0.05$ ) концентрацијама укупног витамина Ц, аскорбата, протеинских тиол група. Код ензимских антиоксиданаса доказано је повећање активности глутатион С-трансферазе изражено повећаном активношћу у плазми у односу на пацијенте без обољења дијабетес мелитус, као и истовремено смањење активности глутатион пероксидазе.

Просечне концентрације продуката липидне пероксидације и антиоксидационих параметара у сочиву, код пацијената оболелих од дијабетес мелитуса са почетним обликом катаракте, у већини параметара се не разликују у односу на пацијенте без овог обољења. Изузетак је просечна концентрација непротеинских тиол једињења, која је у

случају присутног дијабетес мелитуса нижа ( $p < 0.05$ ) у односу на пацијенте без овог обољења. Код матурне катаракте, у случајевима са дијабетес мелитусом, проценат индукције малондиалдехида, фери-редуктивна способност и просечна активност супероксид дисмутазе у сочивима су знатно мањи ( $p < 0.05$ ) у односу на пацијенте без дијабетес мелитуса.

Уз уважавање свих промена у концентрацијама продуката липидне пероксидације и антиоксидационе заштите у сочиву и плазми оболелих од дијабетес мелитуса и сенилне катаракте, треба напоменути да се ради о релативно малом броју пацијената са овим обољењем, разврстаних по степену катаракте (5 почетне и 9 матурне). Зато резултате о активности појединих параметара треба примити са резервом и потврдити на већем узорку.

## 6.9. Оксидационе промене и антиоксидациони параметри у сочиву и очној водици пацијената са сенилном катарактом

### 6.9.1. Продукти липидне пероксидације у сочиву и очној водици пацијената са сенилном катарактом

Плазма мембране сочивних ћелија су примарно место оксидационих оштећења, тачније њихова липопротеинска структура је најосетљивија на дејство реактивних кисеоничких врста, који могу потицати како из саме ћелије, тако и из екстрацелуларних извора. Кисеонички слободни радикали и водоник пероксид могу иницирати пероксидацију мембранских липида, која је покреатач даљих ћелијских оштећења. Процес липидне пероксидације полинезасићених масних киселина карактерише настајање липидних хидропероксида, као и њихова разградња до различитих реактивних алдехида, какав је малондиалдехид и 4-хидрокси-2,3-трансноренал, који су цитотоксични (28). Аминофосфолипиди су важна структурна компонента ћелијске мембране сочива. Хроматографским испитивањем је утврђено да су у хуманом сочиву од фосфолипида најзаступљенији фосфатидилетаноламин и фосфатидилсерин, са којима настали малондиалдехид првенствено и реагује. У циљу праћења процеса липидне пероксидације и његовог утицаја на процес катарактогенезе, одређиване су у кортиконуклеарним блоковима сочива и очној водици пацијената оболелих од сенилне катаракте, концентрације примарних и секундарних молекуларних продуката липидне пероксидације (коњуговани диени и липидни хидропероксиди), затим концентрација малондиалдехида, као крајњег и релативно стабилног нискомолекуларног продукта пероксидације липида, а испитивани су и флуоресцентни производи пероксидације липида.

У сочивима испитаника са инципијентном катарактом, измерена је значајно већа концентрације коњугованих диена ( $p < 0.001$ ) у односу на сочива испитаника са матурном катарактом (графикон 24). Ово се може објаснити тиме, што је на почетку развоја катаракте најинтензивнији процес липидне пероксидације, који је или сам покретач процеса катарактогенезе или инициран стварањем реактивних кисеоничких врста, а даље својом пропагацијом утиче на промене у сочиву. У сочивима пацијената са почетном катарактом, концентрација коњугованих диена је значајно већа код мешовито нуклеарно-кортикалне катаракте у односу на сочива пацијената са почетном субкапсуларном катарактом ( $p < 0.05$ ) (графикон 34). Такође, код матурне катаракте концентрација коњугованих диена је највећа у сочивима код којих је катаракта започела као мешовито нуклеарно-кортикална (графикон 47) и значајно је већа у односу на сочива са матурном започелом као субкапсуларна катаракта ( $p < 0.05$ ).

Разлози који узрокују значајно већу концентрацију продукта пероксидације липида у сочиву код катаракте са нуклеарним почетком су вероватно бројни. Литературни подаци (223,230) указују да се током живота у сочиву развија нека врста “интерне” сочивне баријере између нуклеуса и кортикалног дела, која отежава дифузију молекула ка нуклеусу. Ова баријера спречава дифузију антиоксидационих молекула ка нуклеарном делу, тако да је центар сочива осетљивији на оксидационе процесе. Такође, могуће је да, нестабилни про-оксидациони молекули имају дужу резиденцу у центру сочива. Наиме, ендogene сочивне хромофоре: Н-формил кинуренин, кинуренинска киселина, ксантуренска киселина и рибофлавин имају одговарајућа фотосензибилишућа својства (75,189). Путем фотосензибилишућих реакција триптофански производи преносе апсорбовану енергију на кисеоник, који даље путем оксидације доводи до низа ћелијских промена. С годинама, ниво слободних компоненти UV филтера тј. триптофанских деривата у сочиву се смањује, а повећава се њихово везивање за протеине сочива (119,227). Производи триптофана подлежу не-ензимској дезаминацији, при физиолошком рН, при чему настају  $\alpha, \beta$  несатурисана реактивна карбонил једињења (216). Ова једињења се ковалентно везују са остацима аминокиселина најчешће лизина, цистеина и хистидина у протеинима хуманог сочива (227) или чак реагују са редукованим глутатионом при чему настаје GSH-3ОНКynG (85). Оваква ковалентна модификација је нарочито изражена у нуклеусу сочива који садржи старије протеине, што узрокује измењен транспорт/дифузију малих молекула у сочиву. Тачније, развија се баријера у кретању молекула између метаболички активног кортекса и инертног нуклеуса. Ово вероватно узрокује смањење концентрације редукованог глутатиона у нуклеусу сочива, па је и одговор на оксидациона оштећења у овом делу сочива смањен (207). Током живота сочивна влакна се у нуклеарном делу слажу врло компактно, уз минимално присуство екстрацелуларног простора. Нуклеарне плазма мембране подлежу оксидационим оштећењима, при чему се фосфолипидни молекули модификовани кисеоником акумулирају у липидном слоју, доводе до промена структуре и нарушавају липид-липид и протеин-липид интеракције у мембранама сочивних влакна. То вероватно, доприноси да концентрација продукта липидне пероксидације буде највећа код катаракти са нуклеарним почетком.

Типичан UV апсорпциони спектар липида има максимум на 206 nm, док липиди хумане, здраве очне водиче показују умерену апсорпцију на 230 nm и значајан апсорпциони пик око 280 nm у UV региону. Међутим, липиди у очној водици пацијената са катарактом, обично испољавају интензивну апсорпцију на 230 nm, што је карактеристично за коњуговане двогубе везе у масним киселинама (примарни производи пероксидације липида) и апсорпциони пик око 280 nm је карактеристика кетона, секундарних молекуларних продуката липидне пероксидације (15).

Сходно наведеном, концентрацију коњугованих диена одређивали смо и у очној водици болесника са сенилном катарактом. Анализирањем измерених концентрација коњугованих диена ( $\mu\text{mol/l}$ ) у очној водици утврђена је значајно веће концентрација у очној водици болесника са почетном катарактом ( $p < 0.01$ ) у односу на пацијенте са матурном катарактом (табела 37). Добијени резултати су у складу са измереним концентрацијама липидних хидропероксида у кортиконуклеарним блоковима сочива пацијената са сенилном катарактом.

У реакцији продукта липидне пероксидације, малондиалдехида са аминокиселинама, слободним аминокиселинама или нуклеинским базама, продуктују се флуоресцентни производи пероксидације липида.

Спектрофлуориметријским мерењем флуоресценци продуката липидне пероксидације у сочиву (липосолубилних и хидросолубилних иминипропена), значајно већу флуоресценцу показују сочива са почетном сенилном катарактом ( $p < 0.001$ ) у

односу на сочива са матурном катарактом (табела 22). Међу сочивима са дијагнозом почетне сенилне катаракте, значајно већу флуоресценцу показују сочива са мешовито нуклеарно-кортикалном катарактом у односу на сочива са почетном субкапсуларном катарактом ( $p < 0.05$ ) (табела 27).

Код сочива са матурном сенилном катарактом, такође највећа флуоресценца продуката липидне пероксидације измерена је у хомогенатима сочива са матурном катарактом, започелом као мешовито нуклеарно-кортикална (табела 33).

Испитивањем флуоресценци липосолубилних иминопиперона у очној водици болесника са сенилном катарактом, утврђена је значајно већа флуоресценца у очној водици пацијената са почетном катарактом ( $p < 0.001$ ) у односу на пацијенте са матурном сенилном катарактом (табела 37).

Висока концентрација продуката пероксидације липида у очној водици пацијената са сенилном катарактом је резултат липидне пероксидације околних ћелијских мембрана, као и последица дифузије оксидационих продуката из других окуларних структура, првенствено из сочива, с обзиром на појачану пропустљивост мембране катарактозног сочива. Литературни подаци говоре о повећању концентрације липидних пероксида у сочиву и очној водици (15,86) болесника са сенилном катарактом. Резултати истраживања које је вршено на сочивним мембранама изолованим из здравих хуманих сочива и сочива са сенилном катарактом, показали су да је концентрација липидних хидропероксида и малондиалдехида значајно већа у сочивним мембранама изолованим из катарактних сочива (179). Током испитивања хуманих катарактних сочива, идентификоване су у већој концентрацији у односу на здрава сочива, флуоресцентне Schiff-ове базе, настале као резултат интеракције реактивних карбонилних група малондиалдехида са аминок групама мембранских фосфолипида (28).

У предњем сегменту ока, ирис и цилијарно тело, су извор фосфолипазе  $A_2$ , Ц и арахидонске киселине, које доприносе заштитном капацитету, синтезом простагландина и других циклооксигеназних и липооксигеназних продуката у окуларној течности и ткивима, укључујући и сочивне ћелије. Својом активношћу фосфолипаза  $A_2$  разграђује неоксидоване и оксидоване фосфолипиде у субцелуларним фракцијама сочива, чиме утиче на промену липидних компоненти у сочивној мембрани повећавајући холестерол/фосфолипид однос, а такође, хидролизује фосфолипид хидропероксида, чинећи их доступним за ензимску редукују глутатион пероксидазом. Фосфолипид пероксидациони продукти су значајан фактор за развој катаракте, јер њихова дифузија у стакласто тело индукује развој постериорне субкапсуларне катаракте, са последичним смањењем концентрације редукованог глутатиона у сочиву. Као резултат липидне пероксидације, модификовани фосфолипиди у мембранама сочивних влакана повећавају хидрофилност плазма мембрана и нарушавају се липид-липид и протеин-липид мембранске интеракције. Ова модификација фосфолипида доводи до фрагментација и промена мембрана које узрокују сочивно замућење. Смањење концентрације у води растворљивих сочивних протеина ( $\gamma$ - и  $\alpha$ -кристалина) у сочиву и очној водици може допринети штетном утицају липидних хидропероксида, липид пероксид радикала и слободних радикала кисеоника на сочивне структуре код сенилне катаракте. Развој катаракте може бити последица поремећаја сочивне пропустљивости кроз ћелијске мембране узроковне фосфолипид хидропероксидима. Мембране сочивних влакана изложене оксидацији индукују преципитацију цитоплазматских протеина и евентуалну продукцију протеинских агрегата око мембранских мицела. Унакрсне везе биомолекула са карбонилним групама малондиалдехида, аминок групама аминок киселина, протеина, нуклеинских киселина и њихових база, као и фосфолипидног продукта липофусцина резултирају формирањем

молекулских агрегата велике молекулске масе и њиховим акумулирањем у катарктним сочивима, што доводи и до инактивације сочивних ензима.

Значајно већа концентрација малондиалдехида ( $p < 0.001$ ) измерена је у кортиконуклеарним блоковима сочива испитаника са матурном у односу на сочива са инципијентном катарактом (табела 21). Анализирањем концентрација малондиалдехида у сочивима са различитим типовима почетне катаракте није утврђена значајна разлика, зависно од типа катаракте (табела 26), као ни у сочивима са матурном катарактом, зависно од начина на који је катаракта започела (табела 31).

Веће концентрације малондиалдехида у сочивима са матурном, у односу на сочива са почетном катарактом се могу објаснити тиме, што се малондиалдехид као један од крајњих продуката пероксидације липида нагомилава у сочиву током процеса липидне пероксидације и развоја катаракте. Ово је у складу са трансформацијом итермедијерних липидних оксидационих продуката у стабилне крајње молекуларне продукте током пропагације пероксидације липида. Даље, малондиалдехида може реаговати са биомолекулима тј. са аминокиселинама, аминокиселинама, протеинама, нуклеинских киселина или њиховим базама, као и фосфолипидима, продукујући липофусцин и агрегате велике молекулске тежине у катарактном сочиву. Смањена активност ензима глутатион пероксидазе и глутатион С-трансферазе, који су значајни за разградњу продуката пероксидације липида, у сочивима испитаника са матурном катарактом вероватно доприноси повећању концентрације малондиалдехида у сочиву. Подаци из литературе такође указују на повећање процеса липидне пероксидације у сочиву током развоја катаракте (27,66). Резултати појединих аутора указују да је управо формирање липидних пероксида иницијални догађај у катарактогенези (14,15,203).

Концентрација липидних хидропероксида ( $Fe^{+2}$ -индукованог малондиалдехида) у сочивима пацијената оболелих од сенилне катаракте, одређивана је реакцијом са тиобарбитурном киселином, након додавања соли двовалентног гвожђа. Значајно већа концентрација липидних хидропероксида измерена је у сочивима болесника са матурном сенилном катарактом, у односу на сочива са почетном катарактом ( $p < 0.05$ ) (табела 21). Овакви резултати у складу су са измереним повећаним концентрацијама малондиалдехида у сочивима болесника са матурном сенилном катарактом. У сочивима пацијената са различитим типовима почетне катаракте измерена је слична концентрација липидних хидропероксида (табела 26), као и у сочивима болесника са матурном сенилном катарактом, која је почела на различите начине (табела 31).

Вредности  $Fe^{+2}$ -индукованог малондиалдехида у сочивима послужиле су за израчунавање процентуалног удела малондиалдехида у сочиву (%иМДА), као прецизног показатеља накнадно одиграног процеса липидне пероксидације. Процентуални удео  $Fe^{+2}$ -индукованог малондиалдехида у сочивима пацијената са почетном катарактом је значајно већи у односу на сочива пацијената са матурном катарактом ( $p < 0.001$ ) (табела 21), затим у сочивима пацијената са субкапсуларном почетном катарактом у односу на сочива са почетном мешовито субкапсуларно-нуклеарном катарактом ( $p < 0.05$ ), као и у односу на сочива са почетном мешовито нуклеарно-кортикалном почетном катарактом ( $p < 0.01$ ) (табела 26). У сочивима пацијената са матурном катарактом, процентуални удео  $Fe^{+2}$ -индукованог малондиалдехида, је значајно већи у сочивима пацијената са матурном, започелом као субкапсуларна катаракта у односу на сочива болесника са матурном, која је почела као мешовито нуклеарно-кортикална катаракта ( $p < 0.05$ ) (табела 31).

Мањи проценат  $Fe^{+2}$ -индукованог малондиалдехида у сочивима пацијената са сенилном катарактом која је захватала нуклеарни део сочива указује на интензиван процес липидне пероксидације, тј. мања је количина супстрата на који би деловале додате соли гвожђа и индуковале допунско стварање малондиалдехида. Даље, ниже

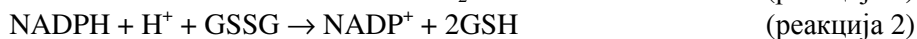
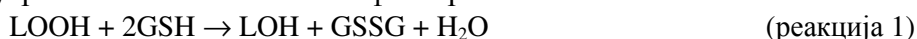
концентрације витамина Ц у сочивима пацијената са сенилном катарактом, доприносе вероватно, оваквим резултатима, јер витамин Ц штити незасићене масне киселине од оксидационог оштећења. Процент  $\text{Fe}^{+2}$ -индукованог малондиалдехида, донекле, може послужити за процену укупне антиоксидационе активности компартмана који се испитује. Ако се тако посматра, онда се може закључити да је у сочивима пацијената са сенилном катарактом, посебно у сочивима са матурном катарактом и сочивима код којих је катарактом захваћен нуклеарни део сочива значајно смањена укупна антиоксидациона активност, односно да постоји дисбаланс међу антиоксидационим и прооксидационим чиниоцима, у корист прооксидационих фактора.

Мерењем концентрације липидних пероксида у сочивима пацијената са сенилном катарактом, измерене су различите концентрације код различитих типова катаракти, што се одржало чак и код матурних катаракти, које су почеле на различите начине. То нам говори о локалном пореклу липидних пероксида и указује да интензитет липидне пероксидације, кроз количину продукованих липидних пероксида, одражава степен развоја катаракте као и тип којим катаракта почиње.

Липидни пероксиди као потенцијални узрочници појаве катаракте, доводе до промена не само ћелијске мембране, већ и цитосола. На нивоу ћелијске мембране липидни хидропероксиди индукују промене пропустљивости, промене липопротеинске структуре и промене ензима везаних за мембрану ( $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -аза), узрокују оксидациону инхибицију  $\text{Ca}^{++}\text{-ATP}$ -азе у сочиву. У цитосолу сочивних ћелија липидни пероксиди могу утицати на ДНК, доводе до смањења концентрације укупног глутатиона и утичу на промену редокс односа  $\text{GSH/GSSG}$ , доводе до стварања слабо растворљивих протеинских агрегата, велике молекулске масе. Продукти пероксидације липида индукују оксидацију ћелијских тиола узрокујући замућење сочива и последично смањење концентрације укупних тиола у сочиву.

Један од првих патофизиолошких знакова катарктогенезе је поремећај пропустљивости ћелијске мембране сочива, са смањеном способношћу активног транспорта супстанци насупрот концентрационом градијенту, што доводи до промена концентрација интраћелијских компоненти и метаболичких промена у самим ћелијама. То се касније рефлектује на смањење садржаја непротеинских тиола, АТП-а, аскорбата, као и других интраћелијских једињења и електролита. Ове промене доводе до последичне опацификације ткива и стварања слабо растворљивих протеинских агрегата, велике молекулске масе (101).

Очна водица садржи око  $4 \mu\text{g/ml}$  липопротеина велике густине, који делом учествују и у обнови липидних једињења самог сочива (15). Оксидациона модификација липопротеина у присуству метала (бабра или гвожђа) удружена са липидном пероксидацијом, доводи до повећања негативног наелектрисања, хидролизе фосфолипида и фрагментације апопротеина Б. Претпоставља се да оксидација липидних компоненти у липопротеинским партикулама може утицати на почетак катарктогенезе. Овај процес је у здравом сочиву контролисан способношћу редукованог глутатиона да детоксикује хидропероксиде помоћу ензима глутатион пероксидазе. Ензимска детоксикација липидних хидропероксида у којој глутатион-зависна селенопероксидаза сочива има главну улогу, доводи до редукције хидропероксида ( $\text{LOOH}$ ) до алкохола уз утросак редукованог глутатиона (реакција 1), који се регенерише у редуковану форму, помоћу ензима глутатион редуктазе (реакција 2), уз утросак  $\text{NADPH}^+\text{H}^+$  као кофактора:





Осим мерења продуката липидне пероксидације у катарактним сочивима, наше истраживање је обухватило и одређивање активности, односно способности сочивне глутатион пероксидазе и глутатион С-трансферазе да уклоне хидропероксида, који су посредством оксидационог стреса, вероватно, укључени у почетак катарктогенезе, односно развој зреле катаракте.

Испитивањем међусобне везе концентрације продуката пероксидације липида и активности ензима одговорних за њихову разградњу, утврђена је значајна негативна повезаност између концентрације коњугованих диена и активности глутатион пероксидазе у сочивима болесника са почетном катарактом ( $r=-0.410$ ,  $p<0.01$ ) (графикон 35), између флуоресценци липосолубилних иминопиперидина и активности глутатион пероксидазе у сочивима болесника са почетном катарактом ( $r=-0.440$ ,  $p<0.01$ ) (графикон 36), у сочивима болесника са матурном катарактом ( $r=-0.270$ ,  $p<0.05$ ) (графикон 40), као и између флуоресценци хидросолубилних иминопиперидина и активности глутатион пероксидазе у сочивима болесника са почетном катарактом ( $r=-0.415$ ,  $p<0.01$ ) (графикон 37), у сочивима болесника са матурном катарактом ( $r=-0.388$ ,  $p<0.01$ ) (графикон 41). Ово нам указује да, већа концентрација продуката липидне пероксидације доводи до потрошње ензима глутатион пероксидазе, што се одражава на смањење његове активности. Такође, испитивањем међусобног односа концентрације продуката пероксидације липида и активности ензима глутатион С-трансферазе, утврђена је значајна негативна повезаност између концентрације коњугованих диена и активности глутатион С-трансферазе ( $r=-0.420$ ,  $p<0.01$ ) (графикон 38), између флуоресценци липосолубилних иминопиперидина и активности глутатион С-трансферазе у сочивима ( $r=-0.446$ ,  $p<0.01$ ) (графикон 39), као и између флуоресценци хидросолубилних иминопиперидина и активности глутатион С-трансферазе у сочивима ( $r=-0.317$ ,  $p<0.05$ ) (графикон 40) пацијената са почетном катарактом. Вероватно је, потрошња ензима глутатион С-трансферазе у реакцијама разградње продуката пероксидације липида довела до смањења активности самог ензима. Такође, у сочивима са матурном катарактом, утврђена је негативна повезаност, мада не статистички значајна на усвојеном нивоу поузданости  $p<0.05$ , између концентрације коњугованих диена и активности глутатион С-трансферазе. Ово одсуство статистички значајне корелативне везе, може се објаснити тиме, што су концентрације коњугованих диена, као и флуоресценце продуката пероксидације липида, мање у сочивима са матурном катарактом (табела 22) у односу на сочива са почетном катарактом, а како процес катарктогенезе напредује ка матурној (тоталној), променама бивају захваћене све структуре сочива, што вероватно, доводи до промена самих ензимских молекула глутатион С-трансферазе.

### **6.9.2. Промене концентрација непротеинских и протеинских тиола у сочивима и очној водици пацијената са сенилном катарактом**

Редуковани глутатион, као непротеинско тиол једињење, у сочиву има улогу у заштити тиол група сочивних протеина (80) и као супстрат ензима глутатион пероксидазе и глутатион С-трансферазе. Протеини који садрже тиол групе су значајни за нормалну функцију епитела сочива тј. ензима Na-K-ATP-азе, чиме утичу на ћелијску пропустљивост. Однос GSH/GSSG је нормално висок у сочиву и другим окуларним ткивима, захваљујући глутатион-редокс циклусу, који је локализован у епителу сочива и површинском кортексу (88).

Анализирањем измерених концентрација непротеинских тиола у сочивима пацијената са сенилном катарактом, утврђена је значајно већа концентрација непротеинских тиола у сочивима са почетном, у односу на сочива са матурном катарактом ( $p<0.001$ ) (табела 23). Код различитих типовима почетне катаракте, значајно

већа концентрација непротеинских тиола измерена је у сочивима са дијагнозом субкапсуларне катаракте у односу на сочива са почетном мешовито субкапсуларно-нуклеарном катарактом ( $p < 0.05$ ) као и у односу на сочива са почетном мешовито нуклеарно-кортикалном катарактом ( $p < 0.01$ ) (табела 28). У сочивима са дијагнозом матурне катаракте није утврђена значајна разлика концентрације непротеинских тиола, зависно од типа којим је катракта започела (табела 34). Ови резултати су у складу са резултатима других истраживача који су показали да ниво редукованог глутатиона у сочиву опада са развојем катаракте (86,177), као и да се са напредовањем катаракте ка матурној смањује активност глутатион редуктазе и  $\text{NADPH}^+\text{H}^+$  зависних ензима пентозо-фосфатног пута. Овакве промене су вероватно, одраз израженијих оксидационих процеса, појачаних стварањем токсичних продуката (као малондиалдехида), у односу на ослабљени антиоксидациони капацитет катарактних сочива.

Због бројних ограничења испитивања окуларних структура у хуманом организму, чешће се студије врше на анималним моделима. Тако, експериментално изазвана катаракта на анималним моделима показује да се оксидациони ефекти рефлектују на смањење концентарције глутатиона у сочиву и повећање липидне пероксидације. Када се медијуму у коме се култивишу и испитују сочивне ћелије дода одређена концентрација глутатиона, то има повољно дејство на одржавање провидности сочивних ћелија. Експериментално је утврђено да аплицирање ињекција "buthionin-sulphoximina", као инхибитора синтезе редукованог глутатиона, тек рођеним пацовима, узрокује развој катаракте.

Тачан механизам смањења концентрације редукованог глутатиона у катарактном сочиву још увек није довољно познат. Нека од објашњења, су да се глутатион, као главни представник непротеинских тиол једињења укључује и троши у оксидоредукционим процесима у условима вишка оксидисаних супстрата. Резултати смањене концентрације глутатиона у сочивима пацијената са сенилном катарактом су у складу са доказаном интензивном липидном пероксидацијом у сочивима истих болесника. Могући разлог потрошње редукованог глутатиона током оксидационог стреса, је његова конверзија у оксидовани облик, који се даље коњукује са протеинским тиол групама што резултира стварање протеин-ГСХ дисулфидних веза. Ово формирање дисулфидних веза између сочивних протеина (структурних и мембранских) и глутатиона, током развоја катаракте доводи до потрошње редукованог глутатиона.

Формирање протеин-тиол дисулфидних формација је процес преко кога се протеински тиоли коњукују са непротеинским тиол групама, преко дисулфидних веза, што резултира стварањем продуката типа протеин-С-С-Р. Р може бити редуковани глутатин, цистеин или цистеамин. Овај процес се одвија неензимски и откривен је у многим ткивима хуманог организма (142). Формација типа протеин-С-С-ГСХ је прва откривена у катарактном сочиву од стране Harding-а и сарадника 1970. године, док се протеин-С-С-цистеамин најчешће налази у старијим и катарактним хуманим сочивима. Формације типа протеин-С-С-ГСХ се чешће стварају са протеинима који су у води растворљиви, док продукти протеин-С-С-цистеин настају са протеинима који нису хидросолубилни. Доказано је, да се у хуманом сочиву повећава количина протеин-С-С-ГСХ и протеин-С-С-цистеин с годинама живота. Наиме у хуманом сочиву постоји обрнут однос између количине ГСХ и протеин-С-С-ГСХ формација, тј. како се количина слободног редукованог глутатиона смањује с годинама, количина протеин-С-С-ГСХ се пропорционално повећава. Такође, количина протеин-С-С-цистеина се повећава у хуманом сочиву с годинама живота. Разлози који доводе до коњугације непротеинских тиола с протеинима су недовољно познати и у циљу њиховог упознавања рађена су бројна истраживања на анималним сочивима. Тако је излагање сочива пацова већим

концентрацијама водоник пероксида, изазвало смањење концентрације редукованог глутатиона и повећање количине протеин-С-С-ГСХ продукта. Ове промене прати и смањење концентрације хидросолубилних протеина, повећање протеина нерастворљивих у води и појава сочивне замућености (142).

Могући разлог за смањену количину редукованог глутатиона у сочивима испитаника са сенилном катарактом је и мањак хексозо-монофосфатног шанта, неопходног за синтезу  $\text{NADPH}^+\text{H}^+$ , који је неопходно потребан за функцију глутатаион редуктазе (88).

Мања концентрација редукованог глутатиона у сочивима код којих је катарактом захваћен нуклеарни део сочива може се објаснити чињеницом да је и у здравом сочиву концентрација редукованог глутатиона мања у нуклеарном делу сочива у односу на епител и кортикални део. Подаци из литературе говоре да је концентрација редукованог глутатиона 80-90% нижа у нуклеусу сочива код свиња и кунића у поређењу са кортикалним делом сочива (88), а да ова разлика постаје још израженија с годинама живота. Sweeney и сарадници (207) су први указали на формирање "старошћу индуковане" баријере у хуманом сочиву, која спречава миграцију редукованог глутатиона из кортикалног дела сочива ка нуклеусу, што може бити потенцијални иницијални фактор за појаву хумане сенилне катаракте. Такође, утврђено је, да је активност ензима хексозо-монофосфатног шанта, ензима глукозо-6-фосфат дехидрогеназе, чак 90% нижа у нуклеусу сочива кунића у односу на кортекс, док је активност глутатион редуктазе и ниво  $\text{NADPH}^+\text{H}^+$  за 50% нижи у нуклеарном делу сочива. Низак ниво антиоксидационе заштите у нуклеусу сочива чини га посебно осетљивим на оксидациона оштећења и појаву катаракте.

Испитивање осетљивости нуклеарног дела сочива на оксидациона оштећења вршена су на култури сочивних ћелија које су излагане хипербаричном кисеонику. После излагања лентикуларних ћелија 99%  $\text{O}_2$  два сата, ниво редукованог глутатиона је за 35% био нижи у нуклеусу сочива, док у суперфицијалном кортексу није било промена у концентрацији овог трипептида. И друга *in vitro* испитивања су показала да је нуклеарни регион сочива мање способан у одбрани од кисеоником индукованог стреса, у поређењу са епителом и кортикалним делом сочива. Такође, X-зраци могу индуковати развој катаракте у сочиву кунића. Наиме, седмонедељно зрачење X-зрацима довело је до развоја тоталног замућења нуклеуса сочива кунића, али не и кортекса, као и значајно повећање унакрсних-дисулфидних протеинских веза у поређењу са контролним лентикуларним ћелијама. Сва ова испитивања и добијени резултати указују да релативно ниске концентрације редукованог глутатиона у нуклеусу сочива чине нуклеарне протеине осетљивим за формирање унакрсних дисулфидних веза и развој сочивне замућености.

Претпоставља се, да се с годинама живота смањује и синтеза редукованог глутатиона у сочиву, тачније смањује се активност ензима  $\gamma$ -глутамил-цистеин синтетазе, неопходног за синтезу глутатиона, што може бити једна од предиспозиција за развој катаракте. Литературни подаци који говоре о концентрацији редукованог глутатиона у хуманом, провидном сочиву су различити, зависно од година живота, као и од примењене биохемијске методе. Али, закључак је, да се концентрација редукованог глутатиона у сочиву двоструко смањи од прве до седме деценије живота. Ово нам говори о динамичности и променљивости антиоксидационих процеса као и антиоксидационих чиниоца у сочиву током живота.

Како у провидном хуманом сочиву само око 10% тиол група припада глутатиону, главни носиоци сулфхидрилних група су сочивни протеини.

Значајно већа концентрација укупних протеинских тиол група измерена је у сочивима са почетном сенилном катарактом у односу на сочива пацијената са матурном

катарактом ( $p < 0.001$ ) (табела 23). Код пацијената са почетном сенилном катарактом, значајно већа концентрација протеинских тиол група измерена је у сочивима са дијагнозом почетне субкапсуларне катаракте у односу на сочива са мешовито субкапсуларно-нуклеарном катарактом ( $p < 0.05$ ) као и у односу на сочива са дијагнозом мешовито нуклеарно-кортикалне почетне катаракте ( $p < 0.01$ ) (табела 28). Међу сочивима са дијагнозом матурне сенилне катаракте није утврђена значајна разлика концентрације протеинских тиол једињења, зависно од начина на који је катаракта почела (табела 34).

Концентрација укупних протеинских тиола одређивана је и у очној водици болесника са сенилном катарактом. Измерена је значајно већа концентрација укупних тиола у очној водици пацијената са почетном сенилном катарактом ( $p < 0.001$ ) у односу на пацијенте са матурном катарактом (табела 38).

Током развоја сенилне катаракте прогресивно се смањује количина тиол група у кристалинима, као резултат "одвијања" ланца макромолекула протеина и последичне оксидације дисулфидних веза. Ово смањење концентрације протеинских тиол група у старијим сочивима зависи од расположивости редукованог глутатиона и ГСХ-зависних ензима. Поједини аутори су утврдили постојање значајне повезаности између мање концентрације протеинских тиол група и веће концентрације карбонила, насталих као последица оксидационог оштећења сочивних протеина, у сочивима изложеним акутном оксидационом стресу и последичној повећаној продукцији слободних радикала (32).

Мембранске протеинске тиол групе сочивних епителних ћелија, које су важне за регулацију јонског транспорта, веома су осетљиве на оксидациони атак, нарочито када је ниво интрацелуларног редукованог глутатиона смањен. Оптимална мембранска функција сочивних епителних ћелија зависи од редукованог стања протеинских тиол група. Студија на говеђим сочивним епителним ћелијама, показала је да излагање водоник-пероксиду доводи до смањења количине интрацелуларног редукованог глутатиона. Губитак мембранских тиол група и последично повећање мембранске пропустљивости, које настаје као последица оксидационог оштећења, вероватно је, укључено у развој катаркте.

### **6.9.3. Промене концентрације витамина Ц у сочиву пацијента са сенилном катарактом**

Концентрација витамина Ц у окуларним структурама је виша у поређењу са другим органима, чак је концентрација аскорбинске киселине 20 пута већа у очној водици него у плазми. Одржавање високих концентрација витамина Ц у окуларним структурама остварује се активним транспортом из плазме кроз баријеру крв-очна водица. Претпоставља се, да се витамин Ц транспортује у очну водицу у оксидованој форми, као дехидроаскорбат и да се затим конвертује у редуковану форму, дејством аскорбат редуктазе у присуству редукованог глутатиона и то највише у сочиву. Пошто епителне ћелије цилијарног тела садрже  $NADPH^+H^+$  и редуковани глутатион, који су неопходни за редукцију дехидроаскорбата, верује се да се конверзија дехидроаскорбата у аскорбат остварује и у току самог транспорта. Концентрација аскорбинске киселине виша у окуларним структурама дневних животињских врста у односу на ноћне врсте, указује на њену функцију у заштити сочива од фото-оксидационог стреса, јер континуирано излагање светлу катализује стварање различитих реактивних кисеоничких врста у интраокуларном компартману, а аскорбат је ефикасан скевенџер хидроксил и супероксид анјон радикала. Витамин Ц у окуларним структурама остварује функцију кроз аскорбат/дехидроаскорбат редокс систем, који доприноси одржавању редукованих форми пиридин нуклеотида, као и одржавању редукованог глутатиона. У

сочиву аскорбинска киселина превенира, UV радијацијом изазвано оштећење катјонских пумпи и смањује фотопероксидацију мембрана.

Анализирањем измерених концентрација укупног витамина Ц у сочивима пацијената са сенилном катарактом, утврђена је значајно већа концентрација у сочивима болесника са инципијентном сенилном катарактом ( $p < 0.001$ ) у односу на сочива пацијената са матурном катарактом (табела 24). Измерене концентрације дехидроаскорбата у сочивима пацијената са сенилном катарактом нису значајно различите зависно од степена матуритета катаракте (табела 24). Концентрација аскорбата, добијена из разлике концентрација укупног витамина Ц и дехидроаскорбата, значајно је већа у сочивима испитаника са почетном ( $p < 0.001$ ) у односу на сочива пацијената са матурном сенилном катарактом (табела 24). Испитивањем вредности концентрационог односа дехидроскорбат/аскорбат, утврђене су значајно веће вредности Д/А односа у сочивима са дијагнозом матурне сенилне катаракте ( $p < 0.001$ ) у односу на сочива са почетном катарактом (табела 24).

Испитивањем измерених концентрација укупног витамина Ц, концентрација дехидраскорбата, аскорбата, као и концентрационог односа Д/А у сочивима пацијената са различитим типовима почетне катаракте није утврђена значајна разлика (табела 29).

У сочивима пацијената са матурном катарактом, измерене концентрације укупног витамина Ц, значајно се не разликују зависно од типа којим је катаракта започела (табела 35). Значајно већа концентрација дехидроаскорбата је измерена у сочивима пацијената са матурном катарактом, почелом као мешовито нуклеарно-кортикална у односу на сочива са дијагнозом матурне, започелом као мешовито субкапсуларно-нуклеарна катаракта ( $p < 0.05$ ) (табела 35). Коцентрација аскорбата није значајно различита у сочивима пацијената са матурном катарактом, зависно од типа којим је катаракта започела (табела 35), као ни концентрациони односа Д/А (табела 35).

Бројне студије су такође, потврдиле низак ниво аскорбинске киселине у катарактним сочивима, смањење нивоа аскорбата у хуманим сочивима са узнапредовалом сенилном катарактом (108) и повећану концентрацију дехидроскорбата (139,218). Већа концентрација дехидроаскорбата у сочивима испитаника оболелих од сенилне катаракте се може објаснити немогућношћу његове редукције у аскорбинску киселину због смањене количине редукованог глутатиона, која је такође измерена у поменутих сочивима (табела 23), о чему је било речи у претходном поглављу. Могуће је да низак ниво редукованог глутатиона доводи до нагомилавања деградационих продуката аскорбинске киселине (дехидроаскорбинске киселине 2,3- дикетоглуконске киселине, Л-ксилосона (L-xylulose) и Л-треозе (L-threose) у катарактним сочивима. Постоје мишљења да су ови интермедијери потенцијални агенси модификације сочивних протеина, чак и потентнији од глукозе (133) и да модификација кристалина сочива овим продуктима доводи до њихове агрегације и преципитације (139). Експерименти на изолованим протеинима, показују да оксидациони продукти аскорбата могу стварати унакрсне везе са кристалинима сочива, продукујући молекуле велике молекулске масе, који узрокују светлосно расејање карактеристично за катаракту (165). Међутим, у условима физиолошке равнотеже прооксиднаса и антиоксиданаса, могућност да неки оксидациони продукти аскорбата учествују као катарактогени фактори је мала због њиховог кратког полуживота и брзе редукције у присуству редукованог глутатиона. Чак је недавно показано да неки деградациони продукти аскорбата, као што је метилглиоксал, појачавају активност "heat shock" протеина, какви су  $\alpha$ -кристалини, значајни за одржавање ткивних протеина у нативном облику (101).

У *in vitro* испитивањима, излагање лентикуларних ћелија хроничном оксидационом стресу (UV-зраци, дијабетес мелитус) доводи до повећања

концентрације дехидроаскорбинске киселине, јер је смањена њена редукција у аскорбинску киселину. У оваквим условима долази до гликације сочивних протеина и метал-зависне, као и метал-независне продукције супероксид анјона (44). Претпоставља се, да се слична модификација сочивних протеина дешава *in vivo* током развоја катаракте (74). Инкубација сочива пацова са дехидроаскорбинском киселином супримира редукцију глутатион дисулфида помоћу глутатион редуктазе, што последично доводи до сочивне опацификације.

Оксидација је узрок модификације сочивних протеина, који се акумулирају током живота. Ове модификације доводе до формирања молекулских агрегата велике молекулске тежине, који узрокују светлосно расејање, што је карактеристика катаракте. Постоје мишљења да аскорбат може допринети појави протеинских модификација, да може реаговати као прооксиданс и учествовати у реакцијама које генеришу радикале. Овакве реакције могу бити светлом изазване или су резултат металом катализованих оксидација. У присуству метала, посебно гвожђа или бакра, и кисеоника, аскорбинска киселина се оксидује у дехидроаскорбат, при чему настаје водоник пероксид и метал се редукује. Водоник пероксид може у реакцији са редукованом металом, генерисати хидроксил радикал и друге реактивне кисеоничке радикале. Када оваква реакција укључује бакар или гвожђе везано за протеине, радикали узрокују оксидациону модификацију аминокиселина које су у близини метала. Овакве реакције постају важне када ћелије изгубе способност уклањања метала, чинећи га доступним за реакцију и/или када ћелије изгубе способност одржавања витамина Ц у редукованом облику. Забележено је да се током старења сочива, као и у катарактном сочиву повећава концентрација бакра и гвожђа.

Поменуте реакције се дешавају у условима смањеног антиоксидационог капацитета сочива, у условима промењеног метаболизма метала или у условима када је компримован механизам одржавања редукованог облика аскорбинске киселине.

Антиоксидациони и антикатарктогени ефекат витамина Ц је потврђен у више епидемиолошких студија које су потврдиле нижу инциденцу појаве катаракте у популацији, која је узимала веће дозе витамина Ц (214). Вршена су и бројна истраживања на анималним врстама које не синтетишу витамин Ц (нпр. Wistar rat) и то код јединки које су добијале интрамускуларно витамина Ц потврђена је мања инциденца појаве експериментално изазване катаракте. У експерименталном моделу галактозом изазване катаракте код свиња, додавање аскорбинске киселине је редуковало појаву катаракте.

Чињеница да је инциденца појаве катаракте већа код популације која је више изложена сунчевом зрачењу, намеће претпоставку да се дешава фотокатализована конверзија молекулског кисеоника из основног стања у ексцитирана стања, која су јако реактивна (синглет кисеоник, супероксид анјон радикал, водоник пероксид, хидроксил радикал и други). Међутим, упркос могућности континуиране продукције поменутих реактивних молекулских врста у очној водици и сочиву услед континуиране пенетрације сунчеве светлости током процеса гледања, латентни период развоја катаракте је дуг. При томе је важна улога аскорбата, као ефективног скевенџера хидроксил радикала, као и супероксид анјона. Високе концентрације аскорбата у очној водици, претпоставља се представљају неку врсту филтера који превенира пенетрацију UV светлости у сочиво и на тај начин штити ткиво од директног штетног утицаја на протеине и нуклеинске киселине (182).

Сочивна мембрана је веома осетљива на оксидационе промене, нарочито њене сулфхидрилне и масно-киселинске резидуе. Оксидација мембранских тиол група сочива, доводи до поремећаја активног транспорта кроз мембрану, што је праћено и

интрацелуларним променама. Поремећени активни транспорт доводи до смањења количине витамина Ц у сочиву.

#### **6.9.4. Активност антиоксидационих ензима у сочивима и очној водици пацијената са сенилном катарактом**

Супероксид дисмутаза је присутна у свим структурама ока, а од свих изоензима најзаступљенија је Cu/Zn супероксид дисмутаза. Пигментни епител ретине додатно садржи висок ниво митохондријалне манган-супероксид дисмутаза. Примарна биолошка улога супероксид дисмутаза је да катализује реакцију дисмутације супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) у присуству донора водоника до водоник пероксида и молекуског кисеоника.

Испитивањем измерених активности супероксид дисмутаза у сочивима болесника са сенилном катарактом утврђена је значајно већа активност у сочивима пацијената са почетном катарактом ( $p < 0.001$ ) у односу на сочива са матурном катарактом (табела 25). Код пацијената са различитим типовима почетне катаракте, значајно већа активност супероксид дисмутаза измерена је у сочивима са почетном субкапсуларном катарактом у односу на сочива са мешовито субкапсуларно-нуклеарном катарактом ( $p < 0.001$ ) и у односу на сочива са почетном мешовито нуклеарно-кортикалном катарактом ( $p < 0.001$ ) (табела 30). Код болесника са матурном катарактом активност супероксид дисмутаза је највећа у сочивима са матурном, започелом као субкапсуларна катаракта и значајно већа у односу на активност супероксид дисмутаза у сочивима са матурном, започелом као мешовито субкапсуларно-нуклеарна катаракта ( $p < 0.001$ ), као и у сочивима са матурном, започелом као мешовито нуклеарно-кортикална катаракта ( $p < 0.001$ ) (табела 36).

У очној водици пацијената са сенилном катарактом значајно већа активност супероксид дисмутаза измерена је код болесника са почетном ( $p < 0.05$ ) у односу на пацијенте са матурном сенилном катарактом (табела 39).

Ови резултати су у складу са резултатима других истраживања, током којих је такође измерена смањена активност супероксид дисмутаза у сочивима болесника са сенилном, као и са дијабетичном катарактом (174). Смањена активност супероксид дисмутаза у сочивима са сенилном катарактом може бити последица денатурације самих ензимских молекула, и/или је последица успорене ензимске синтезе. Већа концентрација липидних хидропероксида и оксидованих липопротеина у катарактним сочивима и смањена активност супероксид дисмутаза узрокују већу продукцију реактивних кисеоничких врста, посебно хидроксил радикала у катарактним сочивима. Сочивна супероксид дисмутаза може бити гликозилисана код дијабетес мелитуса, што додатно смањује њену ензимску активност. Експериментално излагање сочивних ћелија пацова већим количинама глукозе (50 mmol) довело је до смањења нивоа мРНК за Cu/Zn супероксид дисмутаза и каталазу у лентикларним ћелијама (115).

Студија на култури сочивних ћелија где је интактним сочивним ћелијама вршена експресија ДНК за супероксид дисмутаза, показала је да су ћелије са већом активношћу супероксид дисмутаза резистентније на оксидационо оштећење, узроковано водоник пероксидом, супероксид анјон радикалом и UV радијацијом. Експресија ензима супероксид дисмутаза превенирала је зачетак катаракте у сочивним ћелијама (136). Литературни подаци указују да се у хуманом сочиву активност супероксид дисмутаза смањује с годинама живота, што може допринети развоју сенилне катаракте (23).

Редуковани глутатион и ензими чија активност зависи од поменутог трипептида припадају одбрамбеном систему, који штити окуларне структуре од хемијског и оксидационог стреса. Сочиво садржи велике концентрације редукованог глутатиона,

који одржава тиол групе у редукованој форми. Ензим глутатион редуктаза је укључен у редукцију оксидованог глутатиона и његова активност је велика у хуманом и у сочиву примата, у поређењу са другим врстама (80).

Глутатион пероксидаза и каталаза су заступљене у свим деловима ока, док је глутатион С-трансферза детектована, али њена улога у метаболизму липидних пероксида још увек није довољно испитана. Баланс између супероксид дисмутазе и каталазе, као и глутатион пероксидазе има значајну улогу у уклањању реактивних кисеоничких врста.

Глутатион пероксидазну активност показују ензими, који катализују реакцију редукције водоник пероксида или органских и липидних хидропероксида у одговарајући алкохол, користећи редуковани глутатион као донор водоника (242). У хуманом цилијарном епителу је детектована мРНК за синтезу глутатион пероксидазе, одакле се секретује у очну водицу (148). На активност селен-зависних глутатион пероксидаза утиче више фактора: расположивост селена, концентрација редукованог глутатиона, активност глутатион редуктазе, као и количина створеног  $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$  у пентозном путу.

Активност глутатион пероксидазе у сочивима испитаника оболелих од сенилне катаракте значајно је већа у сочивима пацијената са почетном катарактом ( $p < 0.001$ ) у односу на сочива болесника са матурном катарактом (табела 25). Код пацијената са инципијентном сенилном катарактом значајно већа активност глутатион пероксидазе је измерена у сочивима са почетном субкапсуларном катарактом ( $p < 0.001$ ), у односу на сочива са инципијентном мешовито субкапсуларно-нуклеарном катарактом (табела 30), као и у односу на сочива са почетном мешовито нуклеарно-кортикалном катарактом ( $p < 0.001$ ). Упоредивањем измерених активности глутатион пероксидазе у сочивима са матурном катарактом, значајно већа активност је измерена у сочивима пацијената са матурном катарактом, која је започела као субкапсуларна у односу на сочива пацијената са матурном, започелом као мешовито субкапсуларно-нуклеарна катаракта ( $p < 0.001$ ), затим у односу на сочива са матурном, почелом као мешовито нуклеарно-кортикална катаракта ( $p < 0.001$ ), као и у односу на сочива са матурном, започелом као кортикална катаракта ( $p < 0.001$ ) (табела 36).

Резултати других истраживања показују да је у хуманом сочиву са сенилном катарактом активност глутатион пероксидазе значајно редукована у поређењу са здравим сочивима (15). Кинетичка испитивања глутатион пероксидазе су показала да липидни хидропероксиди постижу сатурацију ензима већ при концентрацији око 1  $\text{mmol}$  тј. да се  $K_m$  глутатион пероксидазе постиже при концентрацији липидних хидропероксида од 0.434  $\text{mmol}$ . Због оваквих кинетичких својстава активност глутатион пероксидазе је вероватно инхибирана, код сенилне катаракте, продукцијом пероксидације липида, принципом некомпетитивне инхибиције. Смањена активност глутатион пероксидазе у катарактном сочиву може бити и последица смањене количине расположивог редукованог глутатиона или функционалне инактивације ензимских молекула, насталих као резултат структурних промена условљених липидном пероксидацијом. Сочива са сенилном катарактом садрже више липидних пероксида у очној водици и у самом сочивном ткиву због редуковане детоксикационе способности, условљене смањеном количином редукованог глутатиона и смањеном активношћу глутатион пероксидазе.

Други истраживачи (108) су такође, указали на смањену активност глутатион пероксидазе у катарактним сочивима, као и на значајно мању активност у сочивима са матурном катарактом (15) у односу на инципијентну. Липид-пероксидазна активност у сочиву је значајна у превенцији липидне пероксидације у ћелијским мембранама и има важну улогу у одржавању сочивне провидности. Експерименти на култури сочивних



ћелија су показали да је излагање здравих сочивних ћелија липидним хидропероксидима (LOOH) у концентрацији од 0.5 mmol, резултирало значајним смањењем (62%) концентрације хидропероксида, после једног сата инкубације. Сочива са почетном катарактом нису показивала значајно смањење пероксидазне активности у односу на здрава сочива, док је код сочива са матурном катарактом концентрација липидних хидропероксида смањена за само 17% после једносатне инкубације. Ово указује на значајно смањење глутатион (липо)пероксидазне активности у сочивима са матурном катарактом.

Активност глутатион пероксидазе је испитивана у сочивима експерименталних мишева, где је упоређиван степен замућености сочива, као и старост мишева са специфичном активношћу поменутог ензима. Резултати су показали значајно смањење специфичне активности глутатион пероксидазе са напредовањем степена сочивног замућења, као и значајно мању активност у сочивима старијих мишева (186).

Глутатион-С-трансфераза обухвата фамилију мултифункционалних ензима чија је најважнија улога у процесима детоксикације, коју остварују каталишући коњугацију глутатиона са продуктима оксидационог стреса укључујући липидне хидропероксиде и крајње продукте липидне пероксидације (4,217). Експресија различитих изоензима глутатион-С-трансферазе варира у зависности од врсте ћелија, а класе  $\mu$  и  $\pi$  изоензима су присутне у хуманом сочиву, с тим да је  $\pi$  класа изоензима доминантна (4). Највећа активност глутатион-С-трансферазе је у кортикалном делу сочива и то у периферном и екваторијалном делу кортекса, док је много мања активност овог ензима у нуклеусу сочива (107).

Испитивањем измерених активности глутатион-С-трансферазе у хомогенатима катарактних сочива, утврђена је значајно већа активност у сочивима са почетном сенилном катарактом ( $p < 0.001$ ) у односу на сочива пацијената са матурном катарактом (табела 25). С обзиром на функцију глутатион-С-трансферазе, да каталише реакције коњугације продукта липидне пероксидације са редукованим глутатионом, чиме се смањује токсичност електрофилних једињења и њихова реактивност према нуклеофилним групама у биолошким макромолекулама, логично је да је активност поменутог ензима већа код инципијентне катаракте, јер је и концентрација коњугованих диена значајно већа код овог степена матуритета катаракте (графикон 24). Вероватно је и то, да како процес катарактогенезе напредује, промене сочивних структура су све израженије, долази до исцрпљивања антиоксидационих компоненти, од којих је редуковани глутатион најважнији. Тиме се смањује и количина расположивог редуковани глутатион, који је неопходан за функцију ензима глутатион-С-трансферазе, па је и активност самог ензима значајно смањена код матурне катаракте. У групи пацијената са инципијентном сенилном катарактом најмања активност глутатион-С-трансферазе је измерена у сочивима са дијагнозом мешовито нуклерно-кортикалне почетне катаракте. Наиме, у сочивима са почетном катарактом, значајно већа активност глутатион-С-трансферазе измерена је у сочивима пацијената са почетном субкапсуларном катарактом у односу на сочива болесника са инципијентном мешовито субкапсуларно-нуклеарном катарактом ( $p < 0.001$ ), као и у односу на сочива болесника са почетном мешовито нуклеарно-кортикалном катарактом ( $p < 0.001$ ) (табела 30). Упоређивањем активности глутатион-С-трансферазе у сочивима пацијената са матурном катарактом, утврђена је значајно већа активност у сочивима болесника са матурном, која је почела као субкапсуларна катаракта у односу на сочива пацијената са матурном, започелом као мешовито субкапсуларно-нуклеарна катаракта ( $p < 0.001$ ) као и у односу на сочива пацијената са матурном, почелом као мешовито нуклеарно-кортикална катаракта ( $p < 0.001$ ) (табела 36).

Испитивањем активности глутатион-С-трансферазе у епителним ћелијама оперисаних катарактних сочива, група аутора је приказала да епителне ћелије сочива са кортиклном и мешовитом кортикално-нуклеарном катарактом показују потпуни губитак активности глутатион-С-трансферазе (107).

Анализирањем специфичних активности глутатион редуктазе у сочивима пацијената са сенилном катарактом, утврђена је значајно већа активност глутатион редуктазе у сочивима пацијената са почетном ( $p < 0.001$ ) у односу на сочива болесника са матурном сенилном катарактом (табела 25). У сочивима пацијената са различитим типовима почетне катаракте, значајно већа активност глутатион редуктазе је у сочивима пацијената са почетном субкапсуларном у односу на сочива пацијената са мешовито субкапсуларно-нуклеарном почетном катарактом ( $p < 0.001$ ), као и у односу на сочива са почетном мешовито нуклеарно-кортикалном катарактом ( $p < 0.001$ ) (табела 30).

У сочивима пацијената са матурном катарактом, активност глутатион редуктазе значајно је већа у сочивима са матурном, започелом као субкапсуларна катаракта у односу на сочива пацијената са матурном, започелом као мешовито субкапсуларно-нуклеарна катаракта ( $p < 0.001$ ), затим у односу на сочива пацијената са матурном, започелом као мешовито нуклеарно-кортикална катаракта ( $p < 0.001$ ) и у односу на сочива пацијената са матурном, започелом као кортикална катаракта ( $p < 0.05$ ) (табела 36). Ови резултати се слажу са подацима које су изнели други истраживачи, након упоређивања активности глутатион редуктазе у катарактним сочивима и непромењеним сочивима, старијих особа. Такође, забележена је значајно нижа активност глутатион редуктазе у катарактним у односу на здрава сочива (104). Исти аутори су објавили да је активност глутатион редуктазе значајно већа у сочивном кортексу у односу на нуклерни део, у незамућеним сочивима старијих особа.

Активности глутатион редуктазе у очној водици пацијената са сенилном катарактом не показују значајну разлику, зависно од степена зрелости катаракте (табела 39).

Глутатион редуктаза има главну улогу у одржавању тиол група у сочиву и то је вероватно најважнија улога овог ензима у одржавању сочивне транспаренције. Могуће је да нижа активност глутатион редуктазе у односу на нормалне активности, може бити један од узрока поремећаја сочивне транспаренције. У литератури је описан случај формирања билатералне катаракте код двадестдвогодишње жене, која је имала комплетно одсуство активности ензима глутатион редуктазе у еритроцитима.

Бројна испитивања о утицају UV зрака сунчевог спектра на активност антиоксидационих ензима сочива (глутатион редуктазе, глукозо-6-фосфат дехидрогеназе, глутатион пероксидазе и супероксид дисмутаза) указују да UVA зраци сунчевог спектра имају утицај на модификацију сочивних протеина и посебно на смањење специфичне активности ензима хуманог сочива (137). Смањена активност антиоксидационих ензима може бити последица директне UVA фотолизе (117), оксидације реактивним радикалима кисеоника (209) или је последица оба поменутога. У условима *in vitro* инактивацију глутатион редуктазе могу изазвати хидроксил радикал и синглет кисеоник (117,209). Linetsky и сарадници су експериментално, хумана, енуклеирана сочива (особа страости 55-75 година), излагали UVA зрацима ( $925 \text{ J/cm}^2$ ) један сат. Њихови резултати су показали да се специфична активност глутатион редуктазе смањила за чак 70%, а G3PD за 24%. Претпоставља се да се активност глутатион редуктазе смањује, јер је њен коензим ФАД (флавин аденин динуклеотид) UVA апсорбујући молекул и сам ензим глутатион редуктаза може бити UVA-одговорни сензитизер. Апсорпција UVA зрака доводи до деградације ФАД-а и настајања ФМН-а. Светлом ексцитирани ФМН може фотооксидовати бројне компоненте, укључујући и аминокиселине или узрокује везивање ФАД-а или његових

деградационих продуката са специфичним аминокиселинским резидуама близу реактивног центра глутатион редуктазе, што доводи до инактивације ензима.

Литературни подаци говоре и да се активност глутатион редуктазе смањује у старијим сочивима, што је у корелацији са смањењем концентрације слободног редукованог глутатиона у старијим хуманим сочивима и повећањем количине продукта типа протеин-С-С-ГСХ.

#### **6.9.5. Укупна антиоксидациона способност сочива и очне водице пацијената са сенилном катарактом**

Сочиво и очна водица поседују заштитни систем од слободних кисеоничких радикала и оксидационог стреса, који укључује антиоксидационе ензиме, протеине и друге хидросолубилне антиоксидансе (аскорбинска киселина, глутатион, аминокиселине цистеин и тирозин, мокраћна киселина) као и липосолубилне антиоксидансе. Цистеин је прекурзор за синтезу глутатиона. Претпоставља се да мокраћна киселина има значајну улогу у регулацији редокс односа система глутатион-аскорбинска киселина, а тирозин је скевенџер хидроксил радикала и синглет кисеоника. Антиоксидациони статус у биолошким узорцима сматра се индикатором оксидационог стреса, а смањење антиоксидационог капацитета ткива и телесних течности може бити последица интензивних оксидационих процеса.

За процену укупне антиоксидационе способности сочива и очне водице пацијената са сенилном катарактом коришћена је ФРАП анализа. Овом анализом се испитује фери-редуктивна способност узорка и базира се на способности антиоксиданса да редукује  $Fe^{+3}$  у  $Fe^{+2}$ . Значајно већу фери-редуктивну способност показују сочива пацијената са почетном сенилном катарактом ( $p < 0.001$ ) у односу на сочива са матурном катарактом (табела 23), затим сочива пацијената са почетном субкапсуларном катарактом ( $p < 0.001$ ) у односу на сочива пацијената са мешовито нуклеарно-кортикалном почетном катарактом (табела 28). У сочивима болесника са матурном сенилном катарактом значајно веће вредности ФРАП анализе измерене су у сочивима са матурном катарактом, започелом као субкапсуларна ( $p < 0.05$ ) у односу на сочива са матурном, почелом као мешовито нуклеарно-кортикална катаракта (табела 34).

У очној водици пацијената са сенилном катарактом значајно већу фери-редуктивну способност показују очне водице болесника са инципијентном сенилном катарактом ( $p < 0.001$ ) у односу на очне водице болесника са матурном катарактом (табела 38).

Ови резултати су у складу са измереним концентрацијама појединачних антиоксиданаса у сочивима и очној водици пацијената са сенилном катарактом. У сочивима болесника са матурном сенилном катарактом измерена је мања количина редукованог глутатиона (табела 34), мања концентрација протеинских тиол група (табела 34), као и мања концентрација укупног витамина Ц и аскорбата у односу на сочива болесника са почетном катарактом (табела 35). Такође, измерене су мање специфичне активности антиоксидационих ензима (супероксид дисмутаза, глутатион пероксидаза и глутатион редуктаза) у сочивима болесника са матурном сенилном катарактом (табела 36). Сходно томе, укупна антиоксидациона способност сочива пацијената са матурном сенилном катарактом је мања у односу на сочива са почетном катарактом (табела 34). Са развојем и напредовањем катаракте ка тоталној (матурној) долази до потрошње и исцрпљивања антиоксиданаса, смањује се активност антиоксидационих ензима, као последица промене структуре самих ензимских молекула, и/или последица смањене синтезе ензима, или последица смањења количине редукованог глутатиона, који је

неопходан за активност глутатион зависних ензима. Значајно мања фери-редуктивна способност сочива код којих је катаратозним променама захваћен нуклеарни део (табела 28 и 34), указују на већу осетљивост нуклеуса на оксидациона оштећења у односу на кортекс сочива, вероватно због самог положаја, структуре и физиолошке инертности у односу на епител корикалног дела.

Катарактогенеза је повезана са смањењем антиоксидационе одбране, која је и саставни део процеса старења организма. Тешко је појединачно посматрати прооксидационе и антиоксидационе компоненте, промене које настају током старења организма, утицај исхране и других амбијенталних фактора. Будуће студије су неопходне за испитивње утицаја старења ткива на промене активности антиоксидационих ензима и аскорбинске киселине, као и механизма регулације њиховог нивоа у окуларним структурама.

## 7. ЗАКЉУЧЦИ

- Сенилна катаракта је праћена појачаним интензитетом пероксидације липида у сочиву и очној водици, дакле на локалном нивоу, али и на нивоу организма, на шта указују веће концентрације продуката липидне пероксидације у плазми испитиваних пацијената.
- Интензитет локалне пероксидације липида показује одређене карактеристике зависно од степена матуритета и типа катаракте:
  - концентрација коњугованих диена и флуоресцентних продуката пероксидације липида је већа у сочивима са почетном катарактом;
  - концентрација малондиалдехида већа је у сочивима са матурном катарактом;
  - у сочивима са матурном катарактом нижи је проценат индукције додатног стварања стабилног малондиалдехида после *in vitro* додавања двовалентног гвожђа, што је знак смањене укупне антиоксидационе заштите сочива;
  - концентрација коњугованих диена и флуоресцентних продуката пероксидације липида значајно је већа у сочивима са мешовито нуклеарно-кортикалном катарактом;
  - у сочивима са мешовито нуклеарно-кортикалном катарактом нижи је проценат индукције додатног стварања стабилног малондиалдехида после *in vitro* додавања двовалентног гвожђа.
- Концентрације испитиваних продуката пероксидације липида значајно се не разликују у плазми пацијената, зависно од степена матуритета катаракте.
- Концентрације укупног витамина Ц и аскорбата значајно су веће у сочивима са почетном катарактом;
  - у сочивима са матурном катарактом значајно је већи концентрациони однос дехидроаскорбат/аскорбат;
  - промене односа редокс пара дехидроаскорбат/аскорбат у сочиву нису карактеристичне за тип катаракте.
- Концентрације укупног витамина Ц и аскорбата значајно се не разликују у плазми испитаника зависно од степена матуритета катаракте;
  - најниже концентрације укупног витамина Ц и аскорбата измерене су у плазми болесника са мешовито нуклеарно-кортикалном катарактом.
- Концентрације непротеинских и протеинских тиола значајно су веће у сочивима и очној водици болесника са почетном катарактом.
- Концентрације непротеинских и протеинских тиола значајно се не разликују у плазми болесника зависно од степена матуритета катаракте.
- Активност ензима супероксид дисмутазе, глутатион пероксидазе, глутатион редуктазе и глутатион С-трансферазе је већа у сочивима и очној водици болесника са почетном катарактом;

- најмања активност ензима супероксид дисмутазе, глутатион пероксидазе, глутатион редуктазе и глутатион С-трансферазе измерена је у сочивима болесника са мешовито нуклеарно-кортикалном катарактом.
- Активност ензима супероксид дисмутазе, глутатион пероксидазе, глутатион С-трансферазе и каталазе значајно се не разликује у плазми болесника зависно од степена матуриитета катаракте
- Укупна антиоксидациона активност сочива и очне водице изражена кроз вредности ФРАП анализе већа је у сочивима и очној водици болесника са почетном катарактом;
- сочива са дијагнозом мешовито нуклеарно-кортикалне катаракте показују најнижу укуну антиоксидациону активност.
- Вредности ФРАП анализе у плазми болесника се не разликују зависно од степена матуриитета сенилне катаракте.
- Наведени закључци указују на значајне оксидационе промене и смањену антиоксидациону заштиту код пацијената са сенилном катарактом

## 8. ЛІТЕРАТУРА

1. Adachi T, Wang J, Wang XL. Age-related change of plasma extracellular-superoxide dismutase. *Clinica Chimica Acta* 2000; 290(2): 169-178.
2. Aebi EH. Catalase, In: Bergmayer Methods of Enzymatic Analysis, Vol III, Verlag Chemie, Weinheim, 1983, 273-286.
3. Ahuja RP, Borchman D, Paterson CA, Dean WL et al. Effect of oxidation on  $Ca^{++}$ ATPase activity and membrane lipids in lens epithelial microsomes. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(1-2): 177-85.
4. Alberti G, Oguni M, Podgor M, Sperduto RD, Tomarev S, Grassi C, Williams S, Kaiser-Kupfer M, Maraini G, Hejtmancik JF. Glutathione S-Transferase M1 Genotype and Age-Related Cataracts. *Invest Ophthalm & Vis Sci* 1996; 37(6): 1167-73.
5. Antunes F, Salvador A, Pinto RE. PHGPx and phospholipase A2/GPx: Comparative importance on the reduction of hydroperoxides in rat liver mitochondria. *Free Radic Biol and Med* 1995; 19(5): 669-677.
6. Aquilina AJ, Carver J, Truscott R. Oxidation Products of 3-hydroxykynurenine Bind to Lens Proteins: Relevance for Nuclear Cataract. *Exp Eye Res* 1997; 64: 727-735.
7. Aquilina AJ, Carver J, Truscott R. Polypeptide modification and cross-linking by oxidized 3-hydroxykynurenine. *Biochemistry* 39: 16176-184.
8. Arrigoni O, De Tullio MC. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim et Biophys Acta* 2002; 1569: 1-9.
9. Asakawa T, Matsushita S. Thiobarbituric Acid Test for Detecting Lipid Peroxides. *Lipids* 1979;14(40):401-406.
10. Asbell PA, Dualan I, Mindel J, Brocks D, Ahmad M, Epstein S. Age related cataract. *The Lancet; ProQuest Nursing & Allied Health Source* 2005; 365 (9459): 599-610.
11. Ates NA, Yildirim Ö, Tamer L, Ünlü A, Ercan B, Muslu N, Kanik A et al. Plasma catalase activity and malondialdehyde level in patients with cataract. *Eye* 2004; 18: 785-788.
12. Ayala MN, Michael R, Söderberg PG. Influence of Exposure Time for UV Radiation – Induced Cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 3534-3543.
13. Ayaori M, Hisada T, Suzukawa M, Yoshida H, Nishiwaki M, Ito T et al. Plasma Levels and Redox Status of Ascorbic Acid and Levels of Lipid Peroxidation products in Active and Passive Smokers. *Environ Health Perspect* 2000; 108:105-108.
14. Babizhayev MA, Costa BE. Lipid peroxide and reactive oxygen species generating systems of the crystalline lens. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1225: 326-7.
15. Babizhayev MA. Failure to withstand oxidative stress induced by phospholipid hydroperoxides as a possible cause of the lens opacities in systemic diseases and ageing. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1315(2): 87-99.
16. Balasubramanian D. Ultraviolet radiation and cataract. *J Ocul Pharmacol Ther* 2000; 16: 285-297.
17. Bani D, Masini D, Bello MG, Bigazzi M, Sacchi Bani T. Relaxin Protects Against Myocardial Injury Caused by Ischemia and Reperfusion in Rat Heart. *Americ Journ of Pathol* 1998; 152 (5): 1367-406.
18. Basu S. Lipid peroxidation: a linkage between non-enzymatic and enzymatic oxidation. *Toxicology* 2003; 189: 113-127.

19. Battelli MG, Abbondanza A, Musiani S, Buonamici L, Strocchi P, Tazzari PL et al. Determination of xanthine oxidase in human serum by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chimica Acta* 1999; 281: 147-158.
20. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48:1-9.
21. Baynes JW. The role of AGEs in aging: causation or correlation. *Exp Gerontol* 2001; 36: 1527-37.
22. Beers RF Jr, Sizer JW. A spectrophotometric method for measuring the break down at hydrogen peroxide by Catalase. *J Biol Chem* 1952; 195: 133-140.
23. Behnding A, Svensson B, Marklund SL, Karlsson K. Superoxide Dismutase Isoenzymes in the Human Eye. *Invest Ophthalmol & Vis Sci* 1998; 39(3):471-475.
24. Belcastro N, Arthur GD, Albisser TA, Raj DA. Heart liver and skeletal muscle myeloperoxidase activity during exercise. *J Appl Physiol* 1996; 80 (4): 1331-335.
25. Benzie FFI, Strain J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytic Biochem* 1996; 239: 70-76.
26. Bergmayer UH. *Methoden Der Enzymatischen Analyse*. Verlag Chemies, Weinheim 1970; 483-484.
27. Bhatia RP, Rai R, Rao GRK. Role of malondialdehyde and superoxide dismutase in cataractogenesis. *Ann of Ophthalmol* 2000; 38(2): 103-106.
28. Bhuyan DK, Ravidatt WP, Bhuyan KC. Crosslinking of aminophospholipids in cellular membranes of lens by oxidative stress in vitro. *Biochim et Biophys Acta* 1996: 21-28.
29. Borchman D, Giblin FJ, Leverenz VR, Reddy VN, Lin LR, Yappert MC, Tang D, Li L. Impact of aging and hyperbaric oxygen in vivo on guinea pig lens lipids and nuclear light scatter. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(10): 3061-73.
30. Borchman D, Yappert MC. Age related Lipid Oxidation in Human Lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 1053-1058.
31. Borregaard N, Schwartz JH, Tauber AI. Proton secretion by stimulated neutrophils. Significance of hexose monophosphate shunt activity as source of electrons and protons for the respiratory burst. *J Clin Invest* 1984; 74 (2): 455-459.
32. Boscia F, Grattagliano I, Vendemiale G, Micelli-Ferrari T, Altomare E. Protein Oxidation and Lens Opacity in Humans. *Invest Ophthalmol and Vis Sci* 2000; 41: 2461-65.
33. Bova LM, Sweeney M, Jamie J, Truscott R. Major Changes in Human Ocular UV Protection with Age. *Invest Ophthalmol & Vis Sci* 2001; 42 (1): 200-205.
34. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982; 78: 206-209.
35. Brinkmann Frye E, Degenhardt TP, Thorpe R, Baynes JW. Role of the Maillard Reaction in Aging of Tissue Proteins. *The Journ of Biol Chem* 1998; 273(30): 18714-719.
36. Bron AJ, Vrensen GF, Koretz J, Maraini G, Harding JJ. The ageing lens. *Ophthalmologica* 2000; 214: 86-104.
37. Brown NP, Bron AJ. *Lens disorders. A clinical manual of cataract diagnosis*. Butterworth Heinemann, Oxford 1996.
38. Bukowska B. 2,4,5-T and 2,4,5-TCP induced oxidative damage in human erythrocytes; the role of glutathione. *Cell Biol Internation* 2004; 28: 557-563.
39. Burcham PC. Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA-damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis* 1998; 13: 287-305.



40. Burgess CA, Sowers M. Systemic hypertension and senile cataract: an epidemiological study. *Optom Vis Sci* 1992; 69(4): 320-4.
41. Cadenas E, Davies KJA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol & Med* 2000; 29(3/4): 220-230.
42. Cha MK, Kim IH. Glutathione-linked thiol peroxidase activity of human serum albumin: A possible antioxidant role of serum albumin in blood plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 222: 619-25.
43. Chakraborty I, Kunti S, Bandyopadhyay M, Dasgupta A, Chattopadhyay GD, Chakraborty S. Evaluation of serum zinc level and plasma SOD activity in senile cataract patients under oxidative stress. *Indian Jour of Clin Biochem* 2007; 22(2):109-113.
44. Cheng R, Feng Q, Ortwerth BJ. LC-MS display of the total modified amino acids in cataract lens proteins and in lens proteins glycosylated by ascorbic acid in vitro. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1762:533-543.
45. Cheng R, Lin B, Lee KW, Ortwerth BJ. Similarity of the yellow chromophores isolated from human cataracts with those from ascorbic acid-modified calf lens proteins: evidence for ascorbic acid glycation during cataract formation. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1537(1): 14-26.
46. Cheng R, Lin B, Ortwerth BJ. Rate of formation of AGEs during ascorbate glycation and during aging in human lens tissue. *Biochim et Biophys Acta* 2002; 1587: 65-74.
47. Chin PTY, Stults FH, Tapell AL. Purification of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Acta* 1976; 445: 558-666.
48. Chiricolo M, Tazzari PL, Abbondanza A, Dinota A, Battelli MG. Cytotoxicity of, and DNA damage by, active oxygen species produced by xanthine oxidase. *FEBS* 1991; 291(2): 173-176.
49. Choudhary S, Srivastava S, Xiao T, Andley UP, Srivastava SK, Ansari NH. Metabolism of lipid derived aldehyde, 4-hydroxynonenal in human lens epithelial cells and rat lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(6): 2675-82.
50. Chylack LT Jr, Leske C, Sperduto R, Khu P, Mc Carthy D. Lens Opacities Classification System. *Arch Ophthalmol* 1988; 106: 330-4.
51. Costagliola C, Balestrieri P, Fioretti F, Fumzio C, Rinaldi M, et al. ArF 193 nm excimer laser corneal surgery as a possible risk factor in cataractogenesis. *Exp Eye Res* 1994; 58(4): 453-7
52. Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY. Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; 89: 10405-409.
53. Cruickshanks KJ, Klein BEK, Klein R. Ultraviolet light exposure and lens opacities: the Beaver Dam Eye Study. *Am J Pub Health* 1992; 82: 1658-47.
54. Dacie JV, Lewis SM, 1984, *Practical Haematology: Estimation of reduced glutathione (GSH)*, London: Churchill Livingstone, 6 th ed, pp 168-170.
55. Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 67-101.
56. Davies MJ, Truscott RJ. Photo-oxidation of protein and its role in cataractogenesis. *Journ Photochem Photobiol* 2001; B 63: 114-125.
57. Davies MJ. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem and Biophys Res Commun* 2003; 305: 761-770.
58. De Haan JB, Cristiano F, Iannello R et al. Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence

- and this effect is mediated by hydrogen peroxide. *Human Molecular Genetics* 1996; 5(2): 283-292.
59. Delcourt C, Carriere I, Ponton-Sanchez A, Lacroux A, Covacho MJ, Papoz L. Light exposure and risk of cortical, nuclear and posterior subcapsular cataracts: the Pathologies Oculaires Liees a l'Age (POLA) study. *Arch Ophthalmol* 2000; 118(3): 385-92.
  60. Deutsch JC. Dehydroascorbic acid. *Jour of Chromatography A* 2000; 881: 299-307.
  61. Dillard CJ, Tappel AL.  $\beta$  Fluorescent damage products of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1984; 105, 337-41.
  62. Dillon J, Wang RH, Atherton SJ. Photochemical and photophysical studies on human lens constituents. *Photochem and Photobiol* 1990; 52(4): 849-854.
  63. Dillon J, Zheng L, Merriam JC, Gaillard ER. The optical properties of the anterior segment of the eye: implications for cortical cataract. *Exp Eye Res* 1999; 68: 785-795.
  64. Dillon J, Ortwerth BJ, Chignell CF, Reszka KJ. Elektron paramagnetic resonance and spin trapping investigations of the photoreactivity of human lens proteins. *Photochem photobiol* 1999; 69: 259-264.
  65. Dolin PJ. Ultraviolet radiation and cataract: a review of the epidemiological evidence. *Br J Ophthalmol* 1994; 78: 478-482.
  66. Donma O, Yorulmaz E, Pekel H, Suyugül N. Blood and lens lipid peroxidation and antioxidation status in normal individuals, senile and diabetic cataractous patients. *Curr Eye Res* 2002; 25(1): 9-16.
  67. Duncan G, Wormstone IM, Davies PD. The aging human lens: structure, growth, and physiological behaviour. *Brit Journ of Ophthalmol* 1997; 81: 818-823.
  68. Dyer GD, Blackledge JA, Thorpe SR, Baynes JW. Formation of pentosidine during Nonenzymatic Browning of Proteins by Glucose. *The Journ of Biol Chem* 1991; 266(18): 11654-660.
  69. Đorđević V, Pavlović D, Kocić G. *Biohemija slobodnih radikala* 2000. Medicinski fakultet Niš.
  70. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad Biol Med* 1991; 11: 81-128.
  71. Esterbauer H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 779S-86S.
  72. Esworthy RS, Chu FF, Geiger P, Girotti AW, Doroshow JH. Reactivity of plasma glutathione peroxidase with hydroperoxide substrates and glutathione. *Arch Biochem Biophys* 1993; 307: 29-34.
  73. Etsuo N. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 1119S-24S.
  74. Fan X, Reneker LW, Obrenovich ME, Strauch C, Cheng R, Jarvis SM, Ortwerth BJ, Monnier VM. Vitamin C mediates aging of lens crystallins by the Maillard reaction in a humanized mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:16912-16917.
  75. Finley EL, Dillon J, Crouch RK, Schey KL. Identification of tryptophan oxidation products in bovine alpha-crystallin. *Protein Sci* 1998; 7(11): 2391-7.
  76. Foote CS. Definition of Type I and Type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol* 1991; 54: 695-72.
  77. Freel CD, Gilliland KO, Mekeel HE, Giblin FJ, Costello MJ. Ultrastructural characterization and Fourier analysis of fiber cell cytoplasm in the hyperbaric oxygen treated guinea pig lens opacification model. *Exp Eye Res* 2003; 76: 405-415.

78. Fridovich J. Superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), superoxide dismutases and related matters. *J Biol Chem* 1997; 272: 18515-517.
79. Fu S, Dean R, Southan M, Truscott RJ. The hydroxyl radikal in lens nuclear cataractogenesis. *J Biol Chem* 1998; 273: 28603-609.
80. Ganea E, Harding JJ. Glutathione-related enzymes and the eye. *Cur Eye Res* 2006; 31(1): 1-11.
81. Garland D. Role of site-specific, metal-catalyzed oxidation in lens aging and cataract: a hypothesis. *Exp Eye Res* 1990; 50: 677-82.
82. Garland DL. Ascorbic acid and the eye. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 1198S-1202S.
83. Garner B, Davies MJ, Truscott RJ. Formation of hydroxyl radicals in the human lens is related to the severity of nuclear cataract. *Exp Eye Res* 2000; 70(1): 81-8.
84. Garner B, Roberg K, Qian M, Eaton JW, Truscot RJ. Distribution of ferritin and redox-active transition metals in normal and catarctous human lenses. *Exp Eye Res* 2000; 71: 599-607.
85. Garner B, Vazquez S, Griffith R, Lindner RA, Carver JA, Truscott RJ. Identification of glutathionyl-3-hydroksykynurenine glukoside as a novel fluorophore associated with aging of the human lens. *J Biol Chem* 1999; 274: 20847-20854.
86. Gartaganis SP, Georgakopoulos CD, Patsoukis NE, Gotsis SS, Gartaganis VS, Georgiou CD. Glutathione and Lipid Peroxide Changes in Pseudoexfoliation Syndrome. *Curr Eye Res* 2005; 30:647-651.
87. Giblin FJ, Leverenz VR, Padgaonkar VA, Unakar NJ, Dang L, Lin LR, Lou MJ et al. UV-a light in vivo reaches the nucleus of the guinea pig lens and produces deleterious oxidative effects. *Exp Eye Res* 2002; 75: 445-458.
88. Giblin FJ. Glutathione: a vital lens antioxidant. *J Ocular Pharmacol Ther* 2000; 16: 121-135.
89. Gil P, Farinas F, Casado A, Lopez-Fernandez E. Malondialdehyde: A possible Marker of Ageing. *Gerontology* 2002; 48: 209-214.
90. Glatzle D, Vuillenmir JP, Weber F, Decker K. Glutathione reductase test with whole blood – a convenient procedure for the assesment of the riboflavine status in humans. *Experientia* 1974; 30(6): 565-638.
91. Goswani S, Sheets NL, Zavadil J, Chauhan BK, Bottinger EP, Reddy VN, Kantorow M, Cvekl A. Spectrum and range of oxidative stress responses of human lens epithelial cells to  $H_2O_2$  insult. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(5): 2084-93.
92. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione-S-transferases. *J Biol Chem* 1974; 249: 7130-7134.
93. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 715S-25S.
94. Halliwell B, Gutteridge JMC. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. *FEBS Lett* 1992; 307: 108-112.
95. Halliwell B. Free radicals and antioxidants. *Nutr Rev* 1994; 52: 253-265.
96. Hankinson SE, Willet WC, Colditz GA et al. A prospective study of cigarette smoking and risk of cataract surgery in women. *JAMA* 1992; 268(8): 994-8.
97. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 11: 298-300.
98. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Ann Rev of Pharmacol and Toxicol* 2005; 45: 51-88.
99. Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Rad Res* 1999; 31(4): 273-300.

100. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione-S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995; 30: 445-600.
101. Hegde KR, Varma SD. Protective effect of ascorbate against oxidative stress in the mouse lens. *Biochim et Biophys Acta* 2004; 1670: 12-18.
102. Heys KR, Cram SL, Truscott RJW. Massive increase in the stiffness of the human lens nucleus with age: the basis for presbyopia? *Mol Vis* 2004; 10: 956-963.
103. Hightower KR. A review of evidence that ultraviolet irradiation is a risk factor in cataractogenesis. *Doc Ophthalmologica* 2004; 88(3-4): 205-220.
104. Hong Y, Harding JJ, Kuiyi X, Lou MF. Revival of Glutathione in Human Cataractous and Clear Lens Extracts by Thioredoxin and Thioredoxin Reductase, in Conjunction with  $\alpha$ -Crystallin or Thioltransferase. *Curr Eye Res* 2007; 32(5): 455-463.
105. Hood BD, Garner B, Truscott RJ. Human lens Coloration and Aging. Evidence for crystallin modification by the major ultraviolet filter, 3-Hydroxy-Kynurenine O- $\beta$ -D-Glucoside. *The Journ of Biolog Chem* 1999; 274(46): 32547-550.
106. Hu TS, Zhen Q, Sperduto RD et al. Age-related cataract in the Tibet study. *Arch Ophthalmol* 1989; 107: 666-78.
107. Huang QL, Lou MF, Straatsma BR, Horwitz J. Distribution and activity of glutathione-S-transferase in normal human lenses and in cataractous human epithelia. *Curr Eye Res* 1993; 12(5): 433-437.
108. Huang W, Koralewska-Makar A, Bauer B, Akesson B. Extracellular glutathione peroxidase and ascorbic acid in aqueous humor and serum of patients operated on for cataract. *Clin Chim Acta* 1997; 261: 117-130.
109. Hurst R, Bao Y, Jemth P, Mannervik B, Williamson G. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases. *Biochem Journ* 1998; 332(1): 97-100.
110. Imai H, Nakagawa Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* 2003; 34(2): 146-169.
111. Italian-American cataract study group. Risk factors for age-related cortical, nuclear and posterior subcapsular cataracts. *Am J Epidemiol* 1991; 133(6): 541-52.
112. Jacobson MD. Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem Sci* 1996; 243(21): 81-119.
113. Jocelyn PC. Spectrophotometric assay of thiols. *Methods Enzymol* 1987; 143: 44-67.
114. Kador PF. Biochemistry of the lens: intermediary metabolism and sugar cataract formation. In Albert & Jakobiec. *Basic Sciences. Principles and practice of ophthalmology*. WB Saunders Co. Philadelphia. 1994: 146-67.
115. Khanna P, Wang L, Ansari NH. Semi-quantitation of mRNA by polymerase chain reaction. Levels of oxidative defence enzymes and aldose reductase in rat lenses cultured in hyperglycemic or oxidative medium. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1996; 92:3-18.
116. Kikugawa K, Kato T, Beppu M, Haysaka A. Development of fluorescence and cross-links in eye lens by interaction with lipid peroxy radicals. *Biochem Biophys Acta* 1991; 1096: 108-14.
117. Kliukiene R, Marozienė A, Cenas N, Becker N, Blanchard JS. Photoinactivation of trypanothione reductase and glutathione reductase by Al-phthalocyanine tetrasulfonate and hematoporphyrin. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 218:629-632.

118. Komives T, Gullner G, Kiraly Z. Role of Glutathione and Glutathione-Related Enzymes in Response of Plants to Environmental Stress. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 851(1): 251-258.
119. Korlimbinis A, Aquilina JA, Truscott RJ. Protein-bound UV filters in normal human lenses: the concentration of bound UV filters equals that of free UV filters in the center of older lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 1718-1723.
120. Korlimbinis A, Hains PG, Truscott RJ, Aquilina JA. 3-Hydroxykynurenine oxidizes – alpha-crystallin: potencial role in cataractogenesis. *Biochemistry* 2006; 45(6): 1852-60.
121. Kregel KC, Zhang HJ. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2007; 292: 18-36.
122. Kretzschmar M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Exp Toxicol Pathol* 1996; 48: 439-446.
123. Krishna CM, Uppulari S, Reisz P. A study of the photodynamic efficiencies of some eye lens constituents. *Photochem Photobiol* 1991; 54: 51-8.
124. Kubo E, Urakami T, Fatma N, Akagi Y, Singh DP. Polyol pathway-dependent osmotic and oxidative stresses in aldose reductase-mediated apoptosis in human lens epithelial cells: role of AOP2. *Biochem and Biophys Res Comm* 2004; 314: 1050-56.
125. Kuszak JR, Brown HG. Embriology and anatomy of the lens. In: Albert & Jakobiec. *Principles and practice of ophthalmology. Basic sciences.* WB Saunders Comp. Philadelphia. 1994: 82-96.
126. Kuszak JR, Sivak JG, Weerheim JA. Lens optical quality is a direct function of lens sutural architecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32: 2119-31.
127. Lampi KJ, Ma Z, Hanson SR, Azuma M, Shih M, Shearer TR, Smith DL, Smith JB, David LL. Age-related changes in human lens crystallins identified by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Exp Eye Res* 1998; 67: 31-43.
128. Lapko VN, Purkiss AG, Smith JB. Deamidation in human gamma S-crystallin from cataractous lenses is influenced by surface exposure. *Biochemistry* 2002a; 41: 8638-48
129. Lapko VN, Smith DL, Smith JB. S-methylated cysteines in human lens gamma S-crystallins. *Biochemistry* 2002b; 41: 14645-651.
130. Ledwozyw A, Michalak B, Stepień A, Kadziolka A. The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 1986; 155: 275-284.
131. Lee AYW, Chung SMS. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J* 1999; 13: 23-30.
132. Lee KW, Mossine V, Ortwerth BJ. The relative ability of glucose and ascorbate to glycate and crosslink lens proteins in vitro. *Exp Eye Res* 1998; 67: 95-104.
133. Lee KW, Simpson GLW, Ortwerth BJ. A systematic approach to evaluate the modification of lens proteins by glycation-induced crosslinking. *Biochim et Biophys Acta* 1999; 1453: 141-151.
134. Leske MC, Chylack LT Jr, Wu SY. The lens opacities case-control study. Risk factors for cataract. *Arch Ophthalmol* 1991; 109: 244-51.
135. Li L, Duker JS, Niki E, Rasmussen H, Rusell RM, Yeum KJ. Oxidative stress and antioxidant status in older adults with early cataract. *Eye* 2008; 1-5.
136. Lin D, Barnett M, Grauer L, Robben J, Jewell A, Takemoto L, Takemoto DJ. Expression of superoxide dismutase in whole lens prevents cataract formation. *Molecular Vision* 2005; 11: 853-8.

137. Linetsky M, Chemoganskiy VG, Hu F, Ortwerth BJ. Effect of UVA Light on the Activity of Several Aged Human Lens Enzymes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(1): 264-274.
138. Linetsky M, James HL, Ortwerth BJ. The generation of superoxide anion by the UVA irradiation of human lens proteins. *Exp Eye Res* 1996; 63: 67-74.
139. Linetsky M, Shipova E, Cheng R, Ortwerth BJ. Glycation by ascorbic acid oxidation products leads to the aggregation of lens proteins. *Biochim et Biophys Acta* 2008; 1782: 22-34.
140. Liochev S, Fridovich I. Role of  $O_2^{\cdot-}$  in the production of OH in vitro and in vivo. *Free Rad Biol Med* 1994; 16: 29-33.
141. Lookene A, Stenlund P, Tibell LA. Characterization of heparin binding of human extracellular superoxide dismutase. *Biochem* 2000; 39: 230-236.
142. Lou MF. Thiol Regulation in the lens. *Journ of Ocular Pharmacol and Therapeut* 2000; 16 (2): 137-148.
143. Lowry OH, Rosebrough NJ, Faar AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-270.
144. Lyons TJ, Silvestri G, Dunn JA. Role of glycation in modification of lens crystallins in diabetic and non-diabetic senile cataracts. *Diabetes* 1991; 40: 1010-15.
145. MacCoss MJ, McDonald WH, Saraf A, Sadygov R, Clark JM, Tasto JJ, Gould KL, Wolters D, Washburn M, et al. Shotgun identification of protein modifications from protein complexes and lens tissue. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99: 7900-05.
146. Majkić Singh N. *Klinička enzimologija* 1993. AID Praktikum, Beograd.
147. Malik A, Kojima M, Sasaki K. Morphological and biochemical changes in lens of guinea pigs after vitamin C deficient diet and UV-B radiation. *Ophthalmic Res* 1995; 27(4): 189-96.
148. Martin-Alonso JM, Ghosh S, Coca-Prados M. Cloning of the bovine plasma selenium-dependent glutathione peroxidase cDNA from the ocular ciliary epithelium: Expression of the plasma and cellular forms within the mammalian eye. *J Biochem* 1993; 114: 284-291.
149. Mates JM, Perez-Gomez C, Numez de Castro J. Antioksidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32: 595-603.
150. Maurya OPS, Mohanty L, Bhaduri G, Chadra A. Role of anti-oxidant enzymes superoxide dismutase and catalase in the development of cataract: Study of serum levels in patients with senile and diabetic cataracts. *Journ of the Indian Medical Association* 2006; 104(7): 394-397.
151. Mayer DJ, Thomas M. Characterization of rat splen prostaglandin H D isomerase as a sigma-class GSH transferase. *Biochem J* 1995; 311: 739-742.
152. Maytin M, Leopold J, Loscalzo J. Oxidant stress in the vasculature. *Curr Atheroscler Rep* 1999; 1: 156-64.
153. McCarty CA, Taylor HR. A review of the epidemiologic evidence linking ultraviolet radiation and cataracts. *Dev Ophthalmol* 2002; 35: 21-31.
154. Merriam JC. The concentracion of light in the human lens. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1996; 94: 803-918.
155. Mibu H, Nagata M, Hikida M. A study on lipid peroxide-induced lens damage in vitro. *Exp Eye Res* 1994; 58: 85-90.
156. Micelli-Ferrari T, Vendemiale G, Grattagliano I, Boscia F, Arnese L, Altomare E, Cardia L. Role of lipid peroxidation in the pathogenesis of myopic and senile cataract. *Br J Ophthalmol* 1996; 80: 840-843.
157. Michael R. Development and repair of cataract induced by ultraviolet radiation. *Ophthalmic Res* 2000; 32(1): I-44.

158. Michaeli A, Feitelson J. Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides. *Photochem Photobiol* 1994; 59: 284-289.
159. Milne GL, Porter NA. Separation and identification of phospholipid peroxidation products. *Lipids* 2001; 36(11): 1265-75.
160. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247(10): 3170-5.
161. Mizdrak J, Hains PG, Truscott RJW, Jamie FJ, Davies MJ. Tryptophan-derived ultraviolet filter compounds covalently bound to lens proteins are photosensitizers of oxidative damage. *Free Rad Biol & Med* 2008; 44: 1108-1119.
162. Montecionos V, Guzman P, Barra V, Villagran M, Munoz-Montesino C, Sotomayor K et al. Vitamin C is an Essential Antioxidant That Enhances Survival of Oxidatively Stressed Human Vascular Endothelial Cells in the Presence of a Vast Molar Excess of Glutathione. *The Journ Biolog Chem* 2007; 282(21): 15506-15.
163. Morgan PE, Dean RT, Davies MJ. Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by peptide and protein peroxides generated by singlet oxygen attack. *Eur J Biochem* 2002; 269: 1916-1925.
164. Moriwaki Y, Yamamoto T, Suda M, Nasako Y, Takahashi S, et al. Purification and immunohistochemical tissue localization of human xanthine oxidase. *Biochem and Biophys Acta* 1993; 1164(3): 327-330.
165. Nagaraj RH, Monnier VM. Protein modification by the degradation products of ascorbate: formation of a novel pyrrole from the Maillard reaction of L-threose with proteins. *Biochim et Biophys Acta* 1995; 1253(1): 75-84.
166. Nagaraj RH, Sady C. The presence of a glucose – derived Maillard reaction product in the human lens. *FEBS Lett* 1996; 382: 234-238.
167. Nagaraj RH, Sell DR, Prabhakaram M. High correlation between pentosidine protein cross-links and pigmentation implicates ascorbate in human lens senescence and cataractogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 10257-261.
168. Neale RE, Purdie JL, Hirst LW, Green AC. Sun exposure as a risk factor for nuclear cataract. *Epidemiology* 2003; 14: 707-712.
169. Nelson PD, Keisow AL: Enthalpy of Dcomposition of Hydrogen Peroxide by Catalase at 25°C (with Molar Extinction Coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Solutions in the UV). *Anal Biochem* 1972; 49: 474-478.
170. Nishikimi M, Fukuyama R, Minoshima S, Shimizu N, Yagi K. Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulono-gamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *J Biol Chem* 1994; 269(18): 13685-688.
171. Nozaik-Grayck E, Suliman HB, Piantadosi CA. Extracellular superoxide dismutase. *Intern J of Biochem & Cell Biol* 2005; 37: 2466-2471.
172. Ookhtens M, Kaplowitz N. Role of the liver in Interorgan Homeostasis of Glutathione and Cysteine. *Semin Liver Dis* 1998; 18: 313-329.
173. Oury TD, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest* 1996; 75: 615-636.
174. Ozmen B, Ozmen D, Erkin E, Habif S, Bayindir O. Lens speroxide dismutase and catalase activities in diabetic cataract. *Clin Biochem* 2002; 35(1):69-72.
175. Palmquist BM, Philipson B, Barr PO. Nuclear cataract and myopia during hyperbaric oxygen therapy. *Br J Ophthalmol* 1984; 68: 113-17.
176. Pandey NR, Kaur G, Chandra M, Sanwal GG, Misra MK. Enzymatic oxidant and antioxidants of human blood platelets in unstable angina and myocardial infarction. *Intern Journ of Cardiology* 2000; 76: 33-38.

177. 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.
178. Pavlović D, Đorđević V, Kocić G. Ćelijska signalna transdukcija - modulacija slobodnim radikalima. *Jugoslov Med Biohem* 2002; 21: 69-84.
179. Pereira P, leiria F, Fernandes R, Ramalho JS, Mota MC. Implications of membrane oxidative damage in human cataract development. *Invest Ophthalmol and Vis Sci* 1996; 37(3): 886-889.
180. Phan SH, Gannon DE, Ward PA, Karmiol S. Mechanism of neutrophil-induced xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase conversion in endothelial cells: evidence of a role for elastase. *Am J Respir mol Biol* 1992; 6: 270-278.
181. Recknagel RO, Glende EA JR. Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Methods Enzymol* 1984; 105: 371-7.
182. Reddy VN, Giblin FJ, Lin LR, Chakrapani B. The effect of aqueous humor ascorbate on ultraviolet-B-induced DNA damage in lens epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39(2): 344-350.
183. Redmond RW, Gamlin JN. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochem Photobiol* 1999; 70: 391-475.
184. Reider HP. Eine neue Modifikation der Cu-Folin-Methode zur Bestimmung des Totalproteins im Liquor cerebrospinalis; *Klin Wschr* 1966; 44: 1036-1040.
185. Retsky KL, Freeman MW, Frei B. Ascorbic Acid Oxidation Product(s) Protect Human Low Density Lipoprotein against Atherogenic Modification. *The Journ Biol Chem* 1993; 268(2): 1304-1309.
186. Rieger G, Winkler R. Changes of glutathione peroxidase activity in eye tissues of Emory mice in relation to cataract status and age. *Ophthalmologica* 1994; 208(1): 5-9.
187. Roberts JE, Finley EL, Patat AS, Schey KL. Photooxidation of lens proteins with xanthurenic acid: A putative chromophore for cataractogenesis. *Photochem and Photobiol* 2001; 74 (5): 740-5.
188. Roberts JE, Wishart JF, Martinez L, Chignell CF. Photochemical studies on xanthurenic acid. *Photochem and Photobiol* 2000; 72: 467-471.
189. Roberts JE. Ocular phototoxicity. *Journ of Photochem and Photobiol B: Biol* 2001; 64: 136-143.
190. Salvi SM, Akhtar S, Currie Z. Ageing changes in the eye. *Postgrad Med J* 2006; 82: 581-587.
191. Sau AK, Mondal MS, Mitra S. Interaction of Ca<sup>2+</sup> ion with milk xanthine oxidase. *Biochem at Biophys Acta* 2001; 1544: 89-95.
192. Schaal SH, Beiran J, Rubinstein J, Miller B, Dovrat A. Lenticular Oxygen Toxicity. *Invest Ophthalmol and Vis Sci* 2003; 44: 3476-84.
193. Schey KL, Patat S, Chignell CF, Datillo M, Wang RH, Roberts JE. Photooxidation of lens proteins by hypericin. *Photochem and Photobiol* 2000; 72: 200-207.
194. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25: 192-205.
195. Shalini VK, Luthra M, Srinivas L, Rao SH, Basti S, Reddy M, et al. Oxidative damage to the eye lens caused by cigarette smoke and fuel smoke condensates. *Indian J Biochem Biophys* 1994; 31(4): 261-6.
196. Shih M, Lampi KJ, Shearer TR, David LL. Cleavage of beta crystallins during maturation of bovine lens. *Mol Vis* 1998; 4: 4-8.
197. Shimasaki H. Assay of fluorescent lipid peroxidation products. *Methods Enzymol* 1994; 338-46.



198. Sies H, Stahl W. Vitamin E and C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* 1995; 62:1315S-21S.
199. Silva E, Landea JD, Edwards AM, Lissi E. Lysozome photo-oxidation by singlet oxygen: properties of the partially inactivated enzyme. *Journ Photochem Photobiol* 2000; B 55: 196-200.
200. Simpson GLW, Ortwerth BJ. The non-oxidative degradation of ascorbic acid at physiological conditions. *Biochim et Biophys Acta* 2000; 1501: 12-24.
201. Slight SH, Feather MS, Ortwerth BJ. Glycation of lens proteins by the oxidation products of ascorbic acid. *Biochem et Biophys Acta* 1990; 1038: 367-74.
202. Sliney DH. How light reaches the eye and its components. *Int J Toxicol* 2002; 21: 501-509.
203. Spector A, Wang GM, Wang RR, Li WC, Kleiman NJ. A brief photochemically induced photooxidative insult causes irreversible lens damage and cataract. *Exp Eye Res* 1995; 60(6): 483-93.
204. Spector A. Oxidative stress and disease. *J Ocular Pharmacol* 2000; 16: 193-201.
205. Stadtman ER, Berlett BS. Free-radical-mediated modification of proteins. *Free Rad Toxicol* 1997; 71-87.
206. Stadtman ER. Covalent Modification Reactions Are Marking Steps in Protein Turnover. *Biochem* 1990; 29(27): 6223-6331.
207. Sweeney MH, Truscot RJ. An impediment to glutathione diffusion in older normal human lenses: a possible precondition for nuclear cataract. *Exp Eye Res* 1998; 67: 587-595.
208. Štraus B: *Medicinska biokemija* 1988. JUMENA, Zagreb.
209. Tabatabaie T, Floyd RA. Susceptibility of glutathione peroxidase and glutathione reductase to oxidative damage and the protective effect of spin trapping agents. *Arch Biochem Biophys* 1994; 314: 112-119.
210. Taniguchi N, Gutteridge. *Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species* 2000. Oxford University Press.
211. Taniyama Y, Griending KK. *Reactive Oxygen Species in the Vasculature. Hypertension* 2003; 42: 1075-95.
212. Tappel AL. *Free radicals in Biology* 1980, pp. 1-47. Academic Press, NY.
213. Taylor A, Jacques PF, Epstein EM. Relations among aging, antioxidant status, and cataract. *Am J Clin Nutr* 1995; 62(6 Suppl): 1439-47.
214. Taylor A, Jacques PF, Chylack Jr. LT, Hankinson SE, Khu PM, Rogers F, Friend J, Tung W et al. Long-term intake of vitamins and carotenoids and odds of early age-related cortical and posterior subcapsular lens opacities. *Am J Clin Nutr* 2002; 75 (3): 540-549.
215. Taylor HR, West SK, Rosenthal FS, Munoz B, Newland HS, Abbey H, et al. Effects of ultraviolet radiation on cataract formation. *New Engl J Med* 1988; 319: 1429-33.
216. Taylor LM, Aquilina JA, Jamie JF, Truscott RJ. UV filter instability: consequences for the human lens. *Exp Eye Res* 2002; 75: 165-175.
217. Terada T. Role of Glutathione S-Transferases in Lens under Oxidative Stress. *Journ of Health Sci* 2005; 51(3): 263-271.
218. Tessier F, Moreaux V, Birlouez-Aragon I, Junes P, Mondon H. Decrease in vitamin C concentration in human lenses during cataract progression. *Int J Vitam Nutr Res* 1998; 68(5): 309-15.
219. Thomas EL, Grisham MB, Jefferson MM. Myeloperoxidase-dependent affect of amines on function of isolated neutrophils. *J Clin Invest* 1983; 72 (2): 441-454.
220. Tomkin GH. Diabetic vascular disease and the rising star of protein kinase C. *Diabetologia* 2001; 44: 657-658.

221. Truscott RJ, Wood AM, Carver JA, Sheil MM, Stutchbury GM, Zhu J, Kilby GW. A new UV-filter compound in human lenses. *FEBS* 1994; 348: 173-176.
222. Truscott RJW. Age-related nuclear cataract – oxidation is the key. *Exp Eye Res* 2005; 80: 709-25.
223. Truscott RJW. Age-related nuclear cataract: a lens transport problem. *Ophthalmic Res* 2000; 32: 185-194.
224. Ueda Y, Duncan MK, David LL. Lens proteomics: the accumulation of crystallin modifications in the mouse lens with age. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 205-15.
225. Usha AP. Crystallins in the eye: Function and pathology. *Prog in Ret & Eye Res* 2007; 26(1): 78-98.
226. Vaughan M. Oxidative Modification of Macromolecules. *J Biol Chem* 1997; 272 (30): 18513-517.
227. Vazquez S, Aquilina JA, Jamie JF, Sheil MM, Truscott RJ. Novel protein modification by kynurenine in human lenses. *J Biol Chem* 2002; 277: 4867-73.
228. Vetrano AM, Heck DE, Mariano ThM, Mishin V, Laskin DL, Laskin JD. Characterization of the Oxidase Activity in Mammalian Catalase. *J Biol Chem* 2005; 280(42): 35372-381.
229. Vinson JA. Oxidative stress in cataracts. *Pathophysiology* 2006; 13: 151-162.
230. Vrensen GFJM. Aging of the human eye lens – a morphological point of view. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 1995; 111: 519-532.
231. Weiss SJ, Lampert MB, Test ST. Long-lived oxidants generated by human neutrophils: characterization and bioactivity. *Science* 1983; 222 (4624): 625-8.
232. Wells-Knecht MC, Hugginst TG, Dyer GD, Thorpe SR, Baynes JW. Oxidized Amino Acids in Lens Protein with Age. *The Journ of Biol Chem* 1993; 268(17): 12348-352.
233. Whalen R, Boyer ThD. Human Glutathione S-Transferases. *Semin Liver Dis* 1998; 18:345-358.
234. Wheatley RA. Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation. *Trends in Anal Chem* 2000; 19(10):617-628.
235. Williams MR, Riach RA, Collison DJ, Duncan G. Role of the Endoplasmic Reticulum in Shaping Calcium Dynamics in Human Lens Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(5): 1009-17.
236. Wright A, Hawkins CL, Davies MJ. Singlet oxygen mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive peroxides. *Redox Rep* 2000; 5: 159-161.
237. Wu G, Willen RW, Robertson AJ, Gusta LV. Isolation chromosomal localisation, and differential expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase and chloroplastic cooper/zinc superoxide dismutase genes in wheat. *Plant Physiol* 1999; 120(4): 513-520.
238. Wulf D. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews* 2002; 82 (1): 47-95.
239. Xue AN, Cai QY, Wang SQ, Zhou AS, Li WX, Fu P, Chen XS. Antioxidant Status in Persons with and without Senile Lens Changes. *Biomed and Environment Sci* 1996; 9(2-3): 114-118.
240. Yamamoto Y, Takahashi K. Glutathione peroxidase isolated from plasma reduces phospholipid hydroperoxides. *Arch Biochem Biophys* 1993; 305: 541-545.
241. Yin H, Morrow JD, Porter NA. Identification of a novel class of endoperoxides from arachidonate autoxidation. *J Biol Chem* 2004; 279(5): 3766-76.

242. Yu H, Liu J, Lui X, Zang T, Luo G, Shen J. Kinetic studies on the glutathione peroxidase, activity of selenium – containing glutathione transferase. *Compar Bioch and Physiol* 2005; 141: 382-389.
243. Zigman S. Effect of chronic near-ultraviolet radiations on the gray squirell in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32: 1723-9.
244. Zimniak P. Detoxification reactions: Relevance to aging. *Ageing Res Rev* 2008; 7(4):281-300.
245. Žorić L, Jovanović P. Oksidacioni stres u patogenezi očnih bolesti 2006. Medicinski fakultet, Niš.
246. Žorić L. Pseudoeksfolijacioni sindrom i operacione komplikacije ekstrakapsularne ekstrakcije katarakte. *Anali KBC Priština* 1997; 5: 128-30.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а **Бојана М. Кисић**

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

**Оксидациони стрес и елементи антиоксидационе заштите у генези катаракте**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис**

У Косовској Митровици, \_\_\_\_27.02.2014.\_\_\_\_



## Прилог 2.

### Изјава о коришћењу

Овлашћујем библиотеку да у репозиторијум унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Оксидациони стрес и елементи антиоксидационе заштите у генези катаракте**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (*Creative Commons*) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис

У Косовској Митровици, \_\_\_\_\_27.02.2014.\_\_\_\_\_

