

# Ниво редукованог глутатиона и активност глутатион-зависних ензима у кортиконуклеарним блоковима сочива особа са сенилном катарактом

Бојана Кисић<sup>1</sup>, Дијана Мирић<sup>1</sup>, Лепша Жорић<sup>2</sup>, Александра Илић<sup>3</sup>, Илија Драгојевић<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт за биохемију, Медицински факултет, Универзитет у Приштини са седиштем у Косовској Митровици;

<sup>2</sup>Клиника за очне болести, Медицински факултет, Универзитет у Приштини са седиштем у Косовској Митровици;

<sup>3</sup>Катедра за превентивну медицину, Медицински факултет, Универзитет у Приштини са седиштем у Косовској Митровици

## КРАТАК САДРЖАЈ

**Увод** Редуковани глутатион (*GSH*) у сочиву има улогу у заштити тиол-група протеина сочива и као супстрат глутатион-пероксидазе (*GPx*) и глутатион-S-трансферазе (*GST*). 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* и његовог оксидованог облика (*GSSG*) је нормално висок у сочиву и другим ткивима ока захваљујући глутатион-редокс циклусу, који је локализован у епителу сочива и површинском кортексу.

**Циљ рада** Циљ истраживања био је испитивање неензимских чинилаца антиоксидантне заштите: непротеинских и протеинских тиола, као и одређивање активности глутатион-зависних ензима у кортиконуклеарним блоковима сочива особа са сенилном катарактом.

**Методе рада** Биохемијска испитивања извршена су на кортиконуклеарним блоковима сочива 101 болесника са дијагнозом сенилне катаракте. Према степену зрелости катаракте, испитаници су сврстани у групу са *cataracta senilis incipiens* (41 болесник) и у групу са *cataracta senilis matura* (60 болесника). Концентрација *GSH* је одређивана помоћу Елмановог (*Ellman*) реагенса, активност *GPx* помоћу кумолхидропероксида, а активност *GST* праћењем брзине стварања конјугата глутатиона и 1-хлор-2,4-динитробензена.

**Резултати** Резултати показују да је концентрација *GSH* значајно већа у кортиконуклеарним блоковима сочива с почетном катарактом у односу на зрелу катаракту ( $p < 0,001$ ). Активности ензима *GPx* и *GST* биле су значајно веће у кортиконуклеарним блоковима сочива с почетном катарактом ( $p < 0,001$ ). С напредовањем катаракте смањује се количина расположивог *GSH*, неопходног за функцију *GPx* и *GST*, па је и активност ових ензима значајно смањена код зреле катаракте.

**Закључак** Измерена мања концентрација *GSH* и активност антиоксидантних ензима у кортиконуклеарним блоковима сочива, нарочито код катаракте с нуклеарном компонентом, указују на ослабљени антиоксидантни одговор ткива сочива током развоја сенилне катаракте.

**Кључне речи:** катаракта; оксидативни стрес; глутатион; антиоксиданси

## УВОД

Главни и непосредни узрок појаве и развоја катаракте још није познат, али се оксидативна оштећења током процеса старења у савременој литератури сматрају значајним у њеној етиопатогенези [1]. Због положаја и биолошке функције, очно сочиво је током живота изложено удруженом штетном дејству сунчевог зрачења и кисеоника који узрокују морфолошке и функционалне промене (фотооксидативни стрес). Апсорпцијом дела ултраљубичастог спектра, сочиво штити дубље структуре ока од штетног дејства овог дела сунчевог зрачења, при чему временом подлеже фотодинамичким оштећењима [2].

Многа испитивања су потврдила да је оксидативна модификација протеина и липида сочива главни метаболички супстрат патолошког поремећаја код хумане катаракте ста-

ријих особа [3, 4]. Експериментално је показано на култури органа да катаракту може узроковати фотохемијски изазвано стварање супероксид-радикала, хидроксилних радикала и водоник-пероксида ( $H_2O_2$ ) [2].

Протеини, који чине 60% укупне масе сочива [5], поседују бројне сулфхидрилне (-SH) групе, које су веома осетљиве на оксидативна оштећења [3, 6]. Оксидативном модификацијом протеина сочива ремети се и њихова функција, тј. смањује се или губи активност ензима и настају агрегати протеина велике молекуларне масе. Агрегација протеина сочива у насумично расподељене молекуле велике молекуларне масе мења густину протеина у сочиву, узрокујући локалне промене у индексу рефракције и повећано светлосно расејање, као и замућење у сочиву захваћеном катарактом [6]. Висок ниво модификованих протеина код узрапредовале катаракте, у поређењу

## Correspondence to:

Bojana KISIĆ  
Kozачинског 1/4  
11000 Beograd  
Srbija  
bojanabk2002@yahoo.com

с нормалним сочивом, говори у прилог томе да су ове промене укључене у развој катаракте [7].

Пероксидација липида ћелијских мембрана, која се сматра патогенетским фактором катарактогенезе [8, 9], доводи до поремећаја баријерне функције мембране, што последично мења запремину ћелије и структуру сочива, одговорну за рефрактерне промене удружене с почетком катаракте. Подаци из литературе показују да се током развоја катаракте нагомилавају у сочиву и очној водици производи пероксидације липида конјуговани диени, малондиалдехид (*MDA*), 4-хидроксиноненал и други, при чему настали *MDA* може даље да реагује и ствара агрегате са биомолекулима, протеинима, аминокиселинама и фосфолипидима [10, 11, 12].

Трипептид-глутатион (*L*-γ-глутамил-*L*-цистеинил-глицин) се налази у високој концентрацији у сочиву (1,43 μg/g тежине), углавном у редукованом облику (*GSH*), ради заштите и одбране структура сочива од фотооксидативног оштећења [13]. Активношћу ензима глутатион-пероксидазе (*Gpx*) и глутатион-редуктазе кроз глутатион-редокс систем одржава се физиолошки однос *GSH* и његовог оксидованог облика (*GSSG*) [14]. Активност *Gpx* показују ензими, који катализују реакцију смањења  $H_2O_2$  или органских и липидних хидропероксида у одговарајући алкохол, користећи *GSH* као донор водоника [15].

## ЦИЉ РАДА

Циљ истраживања било је испитивање неензимских чинилаца антиоксидативне заштите, непротеинских и протеинских тиола, као и одређивање активности глутатион-зависних ензима у кортиконуклеарним блоковима сочива особа са сенилном катарактом.

## МЕТОДЕ РАДА

Клиничко испитивање обухватило је 101 особу оболелу од сенилне катаракте. Пре хируршке интервенције испитаници су подвргнути уобичајеном офталмолошком прегледу оба ока. При том је око с почетном катарактом било контролно, на основу којег је одређивана примарна морфологија зреле катаракте на другом оку. Сваки испитаник је подвргнут хируршкој интервенцији екстракапуларне екстракције с уградњом интраокуларног сочива на једном оку, током које је узет кортиконуклеарни блок сочива, који је одмах након екстракције урођен у Хартманов (*Hartmann*) раствор и замрзнут и чуван на  $-20^{\circ}C$  до анализирања.

Све хемикалије коришћене за прављење раствора биле су *pro analysi* степена чистоће. У хомогенатима кортиконуклеарних блокова сочива одређивани су неензимски чиниоци антиоксидативне заштите: концентрација укупних непротеинских и протеинских тиола (μmol/g тежине) и активност ензима антиоксидативне заштите (*U/g* протеина).

Прво, измерена је тежина узетог кортиконуклеарног дела сочива (изражено у грамима ткива), а потом је извршена хомогенизација у пуфери 0,02 mol/l *KPi*, pH 7,4 са 0,134 mol/l *KCl*. Хомогенат је центрифугиран десет минута на 3.500 обртаја у минути, а бистар супернатант је коришћен за анализе.

Концентрација *GSH* у узорку одређивана је у реакцији [5,5'-дитиобис-(2-нитробензојеве киселине) – *DTNB*] – Елманов (*Ellman*) реагенс, након уклањања протеина перхлорном киселином [16]. Употребом Елмановог реагенса спектрофотометријски је одређивана концентрација протеинских тиол-група [17]. Протеинске -*SH* групе редукују *DTNB*, стварајући жуто обојен анион 5-тио-2-нитробензојеве киселине (*TNB*<sup>-</sup>).

Активност *Gpx* је одређивана помоћу кумолхидропероксида, као супстрата, методом Чина (*Chin*) и сарадника [18], а активност глутатион-редуктазе (*GR*) методом Глацлеа (*Glatzle*) и сарадника [19]. По овој методи *GR* катализује редукцију *GSSG* у присуству  $NADPH^+ + H^+$ . Оксидација  $NADPH^+ + H^+$  се прати мерењем промене апсорбансе на 340 nm. Активност глутатион-S-трансферазе (*GST*) одређивана је праћењем брзине формирања конјугата глутатиона и 1-хлор-2,4-динитробензена (*CDNB*), спектрофотометријски на 340 nm [20].

У обради резултата коришћени су дескриптивни статистички параметри: аритметичка средина и стандардна девијација (*SD*). Испитивање статистичке значајности разлика између средњих вредности вршено је Студентовим *t*-тестом и тестом *ANOVA*. Критеријум за статистичку значајност биле су вредности  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  и  $p < 0,001$ . За статистичку обраду података коришћени су софтверски програми *SPSS* и *INSTAT*.

## РЕЗУЛТАТИ

Биохемијска испитивања вршена су на кортиконуклеарним блоковима сочива 101 оперисаног болесника са дијагнозом сенилне катаракте, и то 46 жена и 55 мушкараца. Просечна старост испитаника била је 72,5 година ( $SD=7,98$ ).

Према степену зрелости катаракте, болесници су сврстани у две групе: са *cataracta senilis incipiens* (41 испитаник) и са *cataracta senilis matura* (60 испитаника). У првој групи била су 23 болесника са субкапуларном катарактом, девет болесника са субкапуларно-нуклеарном катарактом и девет са дијагнозом мешовите кортиконуклеарне катаракте. У другој групи било је 19 болесника са зрелом катарактом која је почела као субкапуларна, 15 са зрелом катарактом која је почела као субкапуларно-нуклеарна, 16 са зрелом катарактом која је почела као кортиконуклеарна и 10 болесника са дијагнозом зреле катаракте која је почела као кортикална.

У кортиконуклеарним блоковима сочива испитаника с почетном сенилном катарактом измерена је значајно већа концентрација и непротеинских ( $2,6 \pm 0,9$  μmol/g;  $p < 0,001$ ), и протеинских тиол-група ( $102,5 \pm 25,5$  μmol/g;  $p < 0,001$ ), у односу на кортиконуклеарне делове

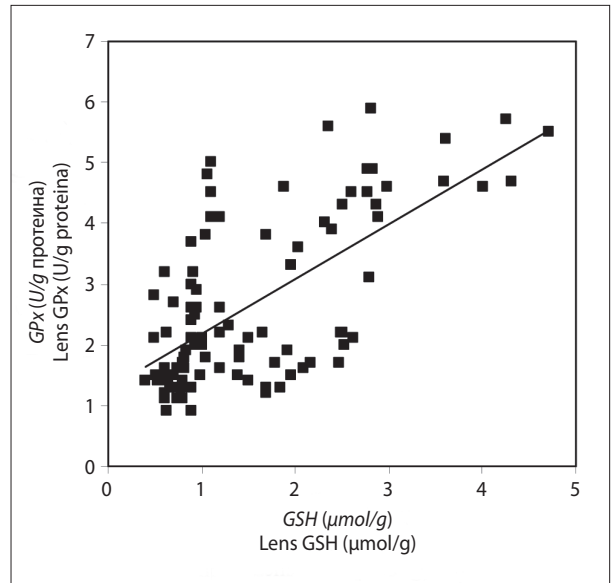
сочива са зрелом катарактом ( $0,9 \pm 0,3 \mu\text{mol/g}$ ;  $54,8 \pm 19,7 \mu\text{mol/g}$ ). Испитивањем добијених активности антиоксидантних ензима утврђена је значајно већа активност *GPx* ( $3,4 \pm 1,5 \text{ U/g}$ ;  $p < 0,001$ ), *GR* ( $3,0 \pm 1,3 \text{ U/g}$ ;  $p < 0,001$ ), као и *GST* ( $2,4 \pm 1,1 \text{ U/g}$ ;  $p < 0,001$ ) у кортиконуклеарним блоковима сочива с почетном сенилном катарактом.

Анализирањем односа концентрације непротеинских тиола и активности *GR* у кортиконуклеарним блоковима сочива пацијената са сенилном катарактом утврђена је значајна позитивна повезаност ( $r=0,672$ ;  $p < 0,01$ ) (Графикон 1). Она је утврђена и између концентрације *GSH* и активности *GPx* ( $r=0,655$ ;  $p < 0,01$ ) (Графикон 2), као и између концентрације непротеинских тиол-група и активности *GST* ( $r=0,607$ ;  $p < 0,01$ ) (Графикон 3).

Измерене концентрације непротеинских и протеинских *-SH* група у кортиконуклеарним блоковима сочива с различитим типовима почетне катаракте дате су у табели 1. Утврђена је значајна разлика концентрације *GSH* ( $p < 0,01$ ) и концентрације протеинских *-SH* група ( $p < 0,01$ ), зависно од типа почетне катаракте. Значајно већа концентрација *GSH* је измерена код почетне субкапсуларне у односу на мешовиту субкапсуларно-нуклеарну ( $p < 0,05$ ), као и у односу на кортиконуклеарни тип катаракте ( $p < 0,01$ ). Такође, у кортиконуклеарним блоковима сочива с почетном субкапсуларном катарактом, концентрација протеинских *-SH* група је била значајно већа у односу на почетну субкапсуларно-нуклеарну ( $p < 0,05$ ) и у односу на почетну мешовито-кортиконуклеарну катаракту ( $p < 0,01$ ).

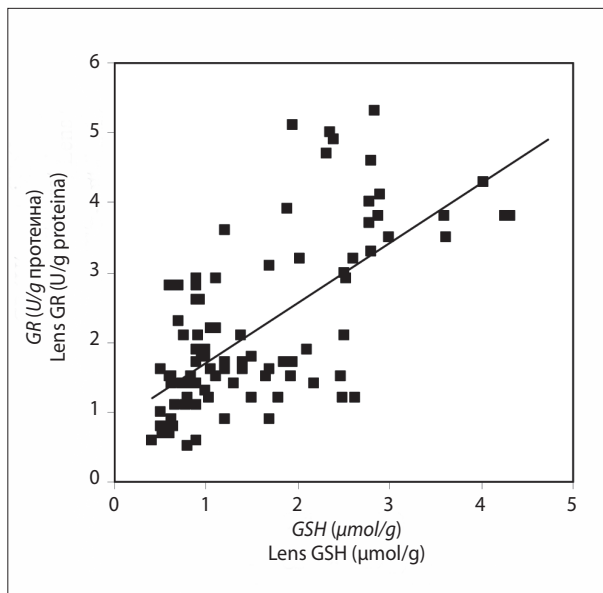
Просечне измерене активности антиоксидантних ензима у кортиконуклеарним блоковима сочива бо-

лесника с различитим типовима почетне катаракте приказане су у табели 2. Утврђена је значајно већа активност *GPx* код почетне субкапсуларне катаракте у односу на субкапсуларно-нуклеарну ( $p < 0,001$ ) и у односу на почетну мешовито-кортиконуклеарну катаракту ( $p < 0,001$ ). Такође, код почетне субкапсуларне катаракте измерене су значајно веће активности *GR* ( $p < 0,001$ ) и *GST* ( $p < 0,001$ ) у односу на почетну субкап-



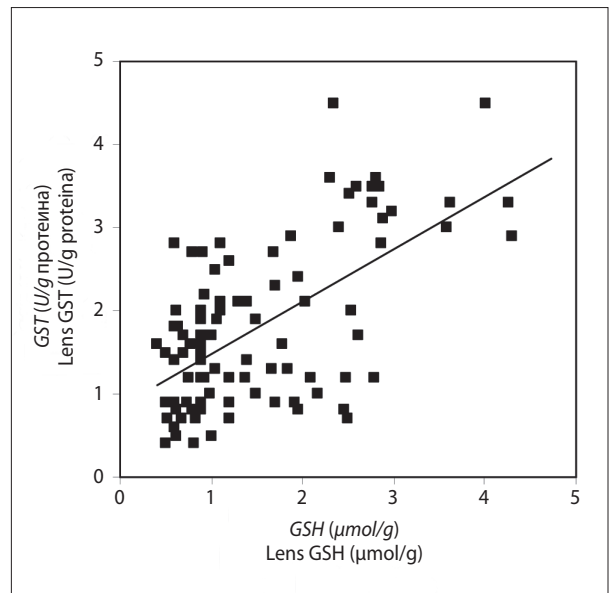
**Графикон 2.** Међусобни однос концентрације *GSH* и активности глутатион-пероксидазе (*GPx*) у кортиконуклеарним блоковима сочива са сенилном катарактом ( $y=0,0013+0,0009x$ )

**Graph 2.** Relationship of concentrations *GSH* and glutathione peroxidase (*GPx*) activities in corticonuclear lens blocks with age-related cataract ( $y=0.0013+0.0009x$ )



**Графикон 1.** Међусобни однос концентрације редукованог глутатиона (*GSH*) и активности глутатион-редуктазе (*GR*) у кортиконуклеарним блоковима сочива са сенилном катарактом ( $y=0,0009+0,0009x$ ).

**Graph 1.** Relationship of concentrations glutathione (*GSH*) and glutathione reductase (*GR*) activities in corticonuclear lens blocks with age-related cataract ( $y=0.0009+0.0009x$ ).



**Графикон 3.** Међусобни однос концентрације *GSH* и активности глутатион-S-трансферазе (*GST*) у кортиконуклеарним блоковима сочива са сенилном катарактом ( $y=0,0009+0,0006x$ )

**Graph 3.** Relationship of concentrations *GSH* and glutathione S-transferase (*GST*) activities in corticonuclear lens blocks with age-related cataract ( $y=0.0009+0.0006x$ )

**Табела 1.** Неензимски чиниоци антиоксидантне заштите у кортиконуклеарним блоковима сочива с почетном катарактом**Table 1.** Nonenzymatic antioxidative defense factors in corticonuclear lens blocks with cataract incipiens

Параметар Parameter	Почетна субкапсуларна катаракта Cataract incipiens posterior subcapsular (N=23)	Почетна субкапсуларно-нуклеарна катаракта Cataract incipiens nuclear-subcapsular (N=9)	Почетна кортиконуклеарна катаракта Cataract incipiens cortical-nuclear (N=9)
GSH ( $\mu\text{mol/g}$ )	3.0 $\pm$ 0.9	2.2 $\pm$ 0.6*	1.8 $\pm$ 0.4**
Протеинске -SH групе ( $\mu\text{mol/g}$ ) Protein -SH group ( $\mu\text{mol/g}$ )	114.2 $\pm$ 26.25	89.2 $\pm$ 18.6*	85.8 $\pm$ 10.8**

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ N – број испитаника; GSH – редуковани глутатион  
N – number of patients; GSH – glutathione reduced**Табела 2.** Активности антиоксидантних ензима у кортиконуклеарним блоковима сочива с почетном катарактом**Table 2.** Antioxidant enzymes activity in corticonuclear lens blocks with cataract incipiens

Параметар Parameter	Почетна субкапсуларна катаракта Cataract incipiens posterior subcapsular (N=22)	Почетна субкапсуларно-нуклеарна катаракта Cataract incipiens nuclear-subcapsular (N=9)	Почетна кортиконуклеарна катаракта Cataract incipiens cortical-nuclear (N=9)
GPx (U/g)	4.6 $\pm$ 0.7	2.1 $\pm$ 0.5*	1.6 $\pm$ 0.2*
GR (U/g)	4.0 $\pm$ 0.7	1.9 $\pm$ 0.7*	1.6 $\pm$ 0.3*
GST (U/g)	3.2 $\pm$ 0.6	1.6 $\pm$ 0.7*	1.1 $\pm$ 0.3*

\*  $p < 0.001$ GPx – глутатион-пероксидаза; GR – глутатион-редуктаза; GST – глутатион-S-трансфераза  
GPx – glutathione peroxidase; GR – glutathione reductase; GST – glutathione S-transferase**Табела 3.** Неензимски чиниоци антиоксидантне заштите у кортиконуклеарним блоковима сочива са зрелом катарактом**Table 3.** Nonenzymatic antioxidative defense factors in corticonuclear lens blocks with cataract matura

Параметар Parameter	Зрела катаракта која је почела као субкапсуларна Cataract matura began as posterior subcapsular (N=19)	Зрела катаракта која је почела као субкапсуларно-нуклеарна Cataract matura began as nuclear subcapsular (N=15)	Зрела катаракта која је почела као кортиконуклеарна Cataract matura began as cortical-nuclear (N=16)	Зрела катаракта која је почела као кортикална Cataract matura began as cortical (N=10)
GSH ( $\mu\text{mol/g}$ )	1.0 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.2
Протеинске -SH групе ( $\mu\text{mol/g}$ ) Protein -SH group ( $\mu\text{mol/g}$ )	59.9 $\pm$ 16.6	58.0 $\pm$ 20.8	48.2 $\pm$ 21.9	50.7 $\pm$ 18.3

**Табела 4.** Активности антиоксидантних ензима у кортиконуклеарним блоковима сочива са зрелом катарактом**Table 4.** Antioxidant enzymes activity in corticonuclear lens blocks with cataract matura

Параметар Parameter	Зрела катаракта која је почела као субкапсуларна Cataract matura began as posterior subcapsular (N=19)	Зрела катаракта која је почела као субкапсуларно-нуклеарна Cataract matura began as nuclear subcapsular (N=15)	Зрела катаракта која је почела као кортиконуклеарна Cataract matura began as cortical-nuclear (N=16)	Зрела катаракта која је почела као кортикална Cataract matura began as cortical (N=10)
GPx (U/g)	3.4 $\pm$ 0.9	1.9 $\pm$ 0.6*	1.4 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.5
GR (U/g)	2.3 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 0.5*	1.1 $\pm$ 0.5*	1.7 $\pm$ 0.5**
GST (U/g)	2.0 $\pm$ 0.5	1.1 $\pm$ 0.4*	1.1 $\pm$ 0.5*	1.6 $\pm$ 0.7

\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.05$

суларно-нуклеарну ( $p < 0,001$ ) и у односу на почетну кортиконуклеарну катаракту ( $p < 0,001$ ).

У кортиконуклеарним блоковима сочива са зрелом сенилном катарактом анализом варијансе није утврђена значајна разлика измерених концентрација непротеинских ( $p = 0,111$ ), односно протеинских тиол-група ( $p = 0,268$ ) (Табела 3).

У табели 4 су дате просечне измерене активности антиоксидантних ензима у кортиконуклеарним блоковима сочива са зрелом сенилном катарактом. Измерена је значајно већа активност  $GPx$  ( $p < 0,001$ ) и активност  $GST$  ( $p < 0,001$ ) у кортиконуклеарним блоковима сочива са зрелом катарактом, која је почела као субкапсуларна у односу на узорке код којих је катаракта почела као субкапсуларно-нуклеарна ( $p < 0,001$ ), као мешовито-кортиконуклеарна ( $p < 0,001$ ) и као кортикална ( $p < 0,001$ ).

Испитивањем активности  $GR$  утврђена је значајна разлика ( $p < 0,001$ ) у зависности од типа којим је катаракта почела. Значајно већа активност  $GR$  измерена је у кортиконуклеарним блоковима сочива са зрелом катарактом која је почела као субкапсуларна у односу на узорке где је катаракта почела као субкапсуларно-нуклеарна ( $p < 0,001$ ), као мешовито кортиконуклеарна ( $p < 0,001$ ) и као кортикална ( $p < 0,05$ ), затим у кортиконуклеарним блоковима сочива са зрелом, започетом као кортиконуклеарна, у односу на узорке код којих је катаракта почела као кортикална ( $p < 0,05$ ).

## ДИСКУСИЈА

Истраживања о утицају реактивних кисеоникових врста на појаву и развој сенилне катаракте интензивно се раде последњих неколико деценија. Сенилна катаракта се испољава у позним годинама, па се процењује да би се трошкови операција смањили за 45% уколико би се појава овог обољења могла одложити за десет година [21].

Редуковани глутатион ( $GSH$ ) у сочиву има улогу у заштити тиол-група протеина сочива и као супстрат ензима  $GPx$  и  $GST$  [13]. 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 ткивима ока захваљујући глутатион-редокс циклусу, који је локализован у епителу сочива и површинском кортексу [14]. Мембрана сочива је непропустљива за  $GSH$ , али је пропустљива за његов оксидовани облик ( $GSSG$ ), чија је концентрација у сочиву последично ниска.  $GSH$ ,  $GPx$ ,  $GR$  и  $NADPH^+H^+$  чине антиоксидантни систем глутатиона, у којем су  $GR$  и  $NADPH^+H^+$  неопходни за редукцију оксидованог глутатиона и регенерацију  $GSH$ . Анализом измерених концентрација  $GSH$  у кортиконуклеарним блоковима сочива болесника са сенилном катарактом утврђена је значајно већа концентрација код почетне ( $2,6 \pm 0,9 \mu\text{mol/g}$ ) у односу на зрелу катаракту ( $0,9 \pm 0,3 \mu\text{mol/g}$ ) ( $p < 0,001$ ). Ови резултати су у складу с налазима других

истраживача који су показали да се ниво редукованог глутатиона у сочиву смањује с развојем катаракте [22, 23], као и да се с напредовањем катаракте ка зрелој смањује активност  $GR$  и  $NADPH^+H^+$  зависних ензима пентозофосфатног пута. Овакве промене су вероватно одраз оксидационих процеса, појачаних стварањем токсичних производа липидне пероксидације [8, 9, 12], у односу на ослабљени антиоксидантни капацитет сочива захваћених катарактом. Тачан механизам смањења концентрације  $GSH$  у сочиву захваћеном катарактом још није довољно познат. Нека објашњења су да се  $GSH$ , као главни представник непротеинских тиола, укључује и троши у оксидо-редукционим процесима у условима вишка оксидисаних супстрата. Могући разлог потрошње  $GSH$  током оксидативног стреса јесте његова конверзија у оксидовани облик, који се даље конјугује с протеинским тиол-групама, што доводи до стварања протеин- $GSH$  дисулфидних веза. Ово формирање дисулфидних веза између протеина (структурних и мембранских) сочива и глутатиона током развоја катаракте доводи до потрошње  $GSH$ .

Формирање протеин-тиол дисулфидних веза је процес преко којег се протеински тиоли конјугују с непротеинским тиол-групама, преко дисулфидних веза, што доводи до стварања производа типа протеин- $S-S-R$ .  $GSH$  може бити  $R$ , цистеин или цистеамин. Овај процес се одвија неензимски и откривен је у многим ткивима људског организма [14]. Везу типа протеин- $S-S-GSH$  први је открио у катарактном сочиву Хардинг (*Harding*) са сарадницима 1970. године, док се протеин- $S-S$ -цистеамин најчешће налази у сочивима захваћеним катарактом код старијих људи. Везе типа протеин- $S-S-GSH$  се чешће стварају с протеинима који су растворљиви у води, док продукти протеин- $S-S$ -цистеин настају с протеинима који нису хидросолубилни. Разлози који доводе до конјугације непротеинских тиола с протеинима су недовољно познати и, ради њиховог упознавања, рађена су бројна истраживања на сочивима животиња. Тако је излагање сочива пацова већим концентрацијама  $H_2O_2$  изазвало смањење концентрације  $GSH$  и повећање количине протеин- $S-S-GSH$  производа. Ове промене прати и смањење концентрације хидросолубилних протеина, повећање протеина нерастворљивих у води и појава замућености сочива [14].

Могући разлог за смањену количину  $GSH$  у сочивима испитаника са сенилном катарактом је и мањак хексозомонофосфатног шанта, одговорног за синтезу  $NADPH^+H^+$ , који је нужан за функцију  $GR$  [13].

Мања концентрација  $GSH$  у сочивима код којих је катарактом захваћен нуклеарни део сочива (Табела 1) може се објаснити чињеницом да је и у здравом сочиву концентрација  $GSH$  мања у нуклеарном делу сочива у односу на епител и кортикални део. Подаци из литературе [13] говоре да је концентрација  $GSH$  око 80% нижа у нуклеусу у поређењу с кортикалним делом сочива, а да ова разлика постаје још израженија с годинама живота [24]. Свини (*Sweeney*) и сарадници [25] први су указали на стварање тзв. баријере у хуманом

сочиву изазване старошћу, која спречава миграцију *GSH* из кортикалног дела сочива ка нуклеусу, што може бити потенцијални иницијални фактор за појаву сенилне катаракте код људи. Такође, утврђено је да је активност ензима хексозомонофосфатног шанга, ензима глукозо-6-фосфат дехидрогеназе, чак 90% нижа у нуклеусу сочива у односу на кортекс, док су активност *GR* и ниво  $NADPH^+H^+$  за 50% нижи у нуклеарном делу сочива. Низак ниво антиоксидантне заштите у нуклеусу сочива чини га посебно осетљивим на оксидативна оштећења и појаву катаракте.

Претпоставља се да се с годинама живота смањује и синтеза *GSH* у сочиву, тачније смањује се активност ензима  $\gamma$ -глутамил-цистеин синтетазе, неопходног за синтезу глутатиона, што може бити једна од предиспозиција за развој катаракте [25, 26, 27].

Значајно већа концентрација укупних протеинских тиол-група измерена је у сочивима с почетном сенилном катарактом ( $102,5 \pm 25,5 \mu\text{mol/g}$ ) у односу на сочива са зрелом катарактом ( $54,8 \pm 19,7 \mu\text{mol/g}$ ) ( $p < 0,001$ ). Током развоја сенилне катаракте прогресивно се смањује количина тиол-група у кристалинима, као резултат „одвијања“ ланаца макромолекула протеина и последичне оксидације дисулфидних веза. Ово смањење концентрације протеинских *-SH* група у старијим сочивима зависи од расположивости *GSH* и *GSH*-зависних ензима. Неки аутори су утврдили значајну повезаност мање концентрације протеинских *-SH* група и веће концентрације карбонила, насталих као последица оксидативног оштећења сочивних протеина, у сочивима изложеним акутном оксидативном стресу и последичној повећаној производњи слободних радикала [6].

Мембранске протеинске тиол-групе епителних ћелија сочива, које су важне за регулацију транспорта јона, веома су осетљиве на оксидативни напад, нарочито када је ниво унутарћелијског *GSH* смањен. Оптимална мембранска функција епителних ћелија сочива зависи од редукованог стања протеинских *-SH* група. Губитак мембранских *-SH* група и последично повећање мембранске пропустљивости, које настаје као последица оксидативног оштећења, вероватно је укључено у развој катаракте.

Информациона РНК за синтезу *GPx* је откривена у хуманом цилијарном епители, одакле се лучи у очну воду [28]. Физиолошки значај овог ензима је уклањање  $H_2O_2$ , органских и фосфолипид-хидропероксида.  $H_2O_2$  може у присуству метала да изазове процес липидне пероксидације, па се сматра да *GPx* има значајну улогу у инхибицији почетног стадијума пероксидације липида ћелијских мембрана. Редукција  $H_2O_2$  у воду глутатионом катализована је глутатион-пероксидазом, а ресинтеза *GSH* из оксидованог облика је катализована глутатион-редуктазом, при чему је неопходан  $NADPH^+H^+$  настао у пентозном путу угљених хидрата [29]. Резултати других истраживања такође показују да је у сочиву особа са сенилном катарактом активност *GPx* значајно смањена у поређењу са здравим сочивима [8]. Кинетичка испитивања *GPx* показала

су да липидни хидропероксиди постижу zasiћеност ензима већ при концентрацији од око  $1 \text{ mmol}$ , тј. да се *Km GPx* постиже при концентрацији липидних хидропероксида од  $0,434 \text{ mmol}$  [8]. Због оваквих кинетичких својстава, активност *GPx* је вероватно заустављена код сенилне катаракте производима пероксидације липида принципом некомпетитивне инхибиције. Смањена активност *GPx* у катарактном сочиву може бити и последица смањене количине расположивог *GSH* 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 ткиву сочива због смањене детоксикационе способности, условљене смањеном количином *GSH* и смањеном активношћу *GPx*.

Глутатион-S-трансфераза (*GST*) обухвата породицу мултифункционалних ензима чија је најважнија улога у процесима детоксикације, коју остварују катализујући конјугацију глутатиона с великим бројем електрофилних токсина [30]. Највећа активност *GST* је у кортикалном делу здравог сочива, док је много мања активност овог ензима у нуклеусу сочива [31]. С обзиром на функцију *GST*, да каталише реакције конјугације производа липидне пероксидације са *GSH*, чиме се смањују токсичност електрофилних једињења и њихова реактивност према нуклеофилним групама у биолошким макромолекулима, логично је да је активност поменутог ензима већа код инципијентне катаракте, јер је на почетку развоја катаракте најинтензивнији процес пероксидације липида, који је или сам покретач процеса катарактогенезе, или је покренут стварањем реактивних кисеоникових врста, а даље својом пропацијом утиче на промене у сочиву. Вероватно је да су, како процес катарактогенезе напредује, промене структура сочива све израженије, долази до исцрпљивања антиоксидантних компоненти, од којих је *GSH* најважнији. Тиме се смањује и количина расположивог *GSH*, који је неопходан за функцију ензима *GST*, па је и активност самог ензима значајно смањена код зреле катаракте ( $2,4 \pm 1,1 \text{ U/g}$ ;  $1,4 \pm 0,7 \text{ U/g}$ ;  $p < 0,001$ ). Током испитивања активности *GST* у сочивима захваћеним катарактом група аутора је приказала да је активност *GST* сочива највећа у старосној групи од 60. до 64. године, а да се значајно смањује у сочивима особа старијих од 70 година [31].

Анализирањем активности *GR* утврђена је значајно већа активност у сочивима болесника с почетном ( $3,0 \pm 1,3 \text{ U/g}$ ;  $p < 0,001$ ) у односу на сочива са зрелом сенилном катарактом ( $1,6 \pm 0,7 \text{ U/g}$ ). Ови резултати су у складу с подацима које су објавили други истраживачи након упоређивања активности *GR* у катарактним сочивима и непромењеним сочивима особа старије животне доби [23]. *GR* има главну улогу у одржавању тиол-група у сочиву, што је вероватно најважнија улога овог ензима у одржавању провидности сочива. Могуће је да слабија активност *GR* у односу на нормалне активности може бити један од узрока поремећаја провидности сочива.

## ЗАКЉУЧАК

Утврђена значајна позитивна корелација између концентрације *GSH* и активности ензима глутатион-пероксидазе, глутатион-редуктазе и глутатион-*S*-трансферазе указује на значајну антиоксидантну улогу редукваног глутатиона у испитиваним кортиконуклеарним блоковима сочива. Измерена мања концентрација *GSH*, као и активност антиоксидантних ензима, нарочито код катаракте с нуклеарном компонентом, вероватно указују на одговор сочивног ткива на пове-

ћани интензитет оксидативних промена током развоја катаракте. Ово такође показује да је нарушена оксидативна равнотежа у кортиконуклеарним блоковима катарактних сочива и да *GSH* и *GSH*-зависни ензими антиоксидантног система немају способност потпуне елиминације оксидативних фактора и превенције реакција пероксидације током развоја сенилне катаракте. Добијени резултати подржавају хипотезу да смањење антиоксидантног система одбране у старијим сочивима, уз веће стварање штетних оксидативних производа, могу бити значајни током развоја сенилне катаракте.

## ЛИТЕРАТУРА

- Vinson JA. Oxidative stress in cataracts. *Pathophysiology*. 2006; 13(3):151-62.
- Spector A, Wang GM, Wang RR, Li WC, Kleiman Nj. A brief photochemically induced photooxidative insult causes irreversible lens damage and cataract. Mechanism of action. *Exp Eye Res*. 1995; 60(5):483-93.
- Davies MJ, Truscott RJ. Photo-oxidation of protein and its role in cataractogenesis. *J Photochem Photobiol B: Biology*. 2001; 63(1-3):114-25.
- Babizhayev MA, Costa BE. Lipid peroxide and reactive oxygen species generating systems of the crystalline lens. *Biochim Biophys Acta*. 1994; 1225(3):326-7.
- Andley UP. Crystallins in the eye: function and pathology. *Prog Retin Eye Res*. 2007; 26(1):78-98.
- Boscia F, Grattagliano I, Vendemiale G, Micelli-Ferrari T, Altomare E. Protein oxidation and lens opacity in humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41(9):2461-5.
- MacCoss MJ, McDonald WH, Saraf A, Sadygov R, Clark JM, Tasto JJ, et al. Shotgun identification of protein modifications from protein complexes and lens tissue. *Proc Nat Acad Sci*. 2002; 99(12):7900-5.
- 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.
- 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.
- 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.
- Žorić L. Parameters of oxidative stress in the lens, aqueous humor and blood in patients with diabetes and senile cataracts. *Srp Arh Celok Lek*. 2003; 131(3-4):137-42.
- Kisić B, Mirić D, Žorić L, Dragojević I, Stolić A. Uloga lipidne peroksidacije u patogenezi senilne katarakte. *Vojnosanit Pregl*. 2009; 66(5):371-5.
- Giblin FJ. Glutathione: a vital lens antioxidant. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2000; 16(2):121-35.
- Lou MF. Thiol regulation in the lens. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2000; 16(2):137-48.
- Yu H, Liu J, Lui X, Zang T, Luo G, Shen J. Kinetic studies on the glutathione peroxidase, activity of selenium-containing glutathione transferase. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2005; 141(3):382-9.
- Dacie JV, Lewis SM. *Practical Haematology: Estimation of Reduced Glutathione (GSH)*. 6th ed. London: Churchill Livingstone; 1984. p.168-70.
- Jocelyn PC. Spectrophotometric Assay of Thiols. *Methods Enzymol*. 1987; 143:44-67.
- Chin PTY, Stults FH, Tapell AL. Purification of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Acta*. 1976; 445:558-66.
- Glatzle D, Vuillenmir JP, Weber F, Decker K. Glutathione reductase test with whole blood – a convenient procedure for the assessment of the riboflavine status in humans. *Experientia*. 1974; 30(6):565-638.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione-S-transferases. *J Biol Chem*. 1974; 249:7130-4.
- Taylor A, Jacques PF, Epstein EM. Relations among aging, antioxidant status, and cataract. *Am J Clin Nutr*. 1995; 62(Suppl):1439-47.
- 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(8):647-51.
- Yan H, Harding JJ, Xing K, 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):455-63.
- Truscott RJW. Age-related nuclear cataract: a lens transport problem. *Ophthalmic Res*. 2000; 32:185-94.
- Sweeney MH, Truscott RJ. An impediment to glutathione diffusion in older normal human lenses: a possible precondition for nuclear cataract. *Exp Eye Res*. 1998; 67(5):587-95.
- Michael R, Bron AJ. The ageing lens and cataract: a model of normal and pathological ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2011; 366(1568):1278-92.
- Rachdan D, Lou MF, Harding JJ. Glutathione reductase from human cataract lenses can be revived by reducing agents and by a molecular chaperone,  $\alpha$ -crystallin. *Curr Eye Res*. 2005; 30(10):919-25.
- Coca-Prados M, Escribano J, Ortego J. Differential gene expression in the human ciliary epithelium. *Prog Retin Eye Res*. 1999; 18(3):403-29.
- 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):264-74.
- Wang L, Chen Y, Sternberg P, Cai J. Essential roles of the PI3 kinase/Akt pathway in regulating Nrf2-dependent antioxidant functions in the RPE. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49(4):1671-8.
- Sireesha R, Laxmi SG, Mamata M, Reddy PY, Goud PU, Rao PV, et al. Total activity of glutathione-S-transferase (GST) and polymorphisms of GSTM1 and GSTT1 genes conferring risk for the development of age related cataracts. *Exp Eye Res*. 2012; 98:67-74.

## Reduced Glutathione Level and GSH-Dependent Enzyme Activities in Corticonuclear Blocks of Lenses in Patients with Senile Cataract

Bojana Kisić<sup>1</sup>, Dijana Mirić<sup>1</sup>, Lepša Žorić<sup>2</sup>, Aleksandra Ilić<sup>3</sup>, Ilija Dragojević<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine, Priština, Settlement Kosovska Mitrovica;

<sup>2</sup>Clinic for Eye Diseases, Faculty of Medicine, Priština, Settlement Kosovska Mitrovica;

<sup>3</sup>Institute of Preventive Medicine, Faculty of Medicine, University of Priština, Settlement Kosovska Mitrovica

### SUMMARY

**Introduction** Reduced compound glutathione (GSH) in the lens has the function to protect the thiol group of lens proteins, and as a substrate of glutathione peroxidase (GPx) and glutathione S-transferase (GST). Protein containing thiol groups is significant for the normal function of lens epithelium, i.e. enzymes Na-K-ATP-ase, thus influencing cell permeability. The relationship GSH/GSSG (oxidized glutathione) is normally high in the lens and other ocular tissue owing to the glutathione-redox cycle, which is localized in the lens epithelium and cortex surface.

**Objective** The aim of the study was to investigate non-enzymic factors of the antioxidant protection of non-protein and protein thiol, as well as to determine glutathione-dependent enzyme activity in the corticonuclear blocks of lenses in patients with senile cataract.

**Methods** Biochemical studies of lens were carried on 101 patients with senile cataract. According to cataract maturity degree, the patients were classified into two groups: senile

incipient cataract (N=41) and mature senile cataract (N=60). GSH concentration was determined by Ellman's reagent. GPx activity was assayed with cumene hydroperoxide, and that of glutathione S-transferase by follow-up of glutathione conjugation and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene rates.

**Results** A significantly higher GSH concentration was found in the corticonuclear blocks of lenses with initial as related to mature cataract ( $p < 0.001$ ). The activity of enzyme GPx and GST was considerably higher in the corticonuclear blocks of lenses with initial cataract ( $p < 0.001$ ). With cataract progression, the quantity of available GSH, necessary for GPx and GST functioning, declined, so that the activity of these enzymes was also significantly decreased in mature cataract.

**Conclusion** The determined lower GSH concentration and antioxidant enzyme activity in corticonuclear blocks of lenses, particularly in cataract with a nuclear component, indicate the weakened antioxidant response of lens tissue during the development of senile cataract.

**Keywords:** cataract; oxidative stress; glutathione; antioxidants

Примљен • Received: 23/02/2011

Прихваћен • Accepted: 22/03/2011