

## РАННЕЕ ЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ

УДК 591

### ОБНАРУЖЕНИЕ КАРОТИНОИДОВ В СТЕКЛОВИДНОМ ТЕЛЕ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА В ПРЕНАТАЛЬНОМ РАЗВИТИИ<sup>1</sup>

© 2007 г. М. А. Яковлева\*, И. Г. Панова, Т. Б. Фельдман\*, П. П. Зак\*, А. С. Татикилов\*,  
Г. Т. Сухих\*\*, М. А. Островский\*

*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН*

*119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26*

*\*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН*

*119991 ГСП-1, Москва, ул. Косыгина, д. 4*

*\*\*ГУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН*

*117997 Москва, ул. Академика Опарина, д. 4*

*E-mail: pinag@mail.ru*

Поступила в редакцию 01.11.07 г.

Окончательный вариант получен 07.02.07 г.

В плодном периоде развития человека с 15-й по 28-ю нед в стекловидном теле глаза впервые были обнаружены каротиноиды. Их максимальное содержание приходится на 16–22-ю нед. В стекловидном теле глаз 31-недельных плодов каротиноиды уже не обнаруживаются. У взрослых людей каротиноиды в стекловидном теле также не обнаружили, что соответствует литературным данным. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии было показано, что хроматографические характеристики этих каротиноидов соответствуют лютеину и зеаксантину, которые являются характерными пигментами желтого макулярного пятна сетчатки.

*Ключевые слова:* каротиноиды, макулярный пигмент, альбумин, стекловидное тело, сетчатка, хрусталик, развитие, спектрофотометрия, ВЭЖХ.

Известно, что сетчатка глаза человека содержит каротиноиды лютеин и зеаксантин – пигменты желтого цвета. Максимальная концентрация этих пигментов сосредоточена в ее макулярной области – желтом пятне (около 70% от их общего содержания в глазу). Им отводится роль светофильтра, защищающего зрительные клетки от повреждающего действия синего света, а также роль эффективных антиоксидантов (см. обзор: Трофимова и др., 2003). Помимо сетчатки лютеин и зеаксантин были найдены в цилиарном теле, радужке и хрусталике. В стекловидном теле зрелого глаза каротиноиды обнаружены не были (Bernstein et al., 2001).

Ранее в стекловидном теле у плодов человека мы обнаружили белок альбумин и показали возрастную динамику изменения его содержания на разных стадиях развития с максимальным значением во втором триместре (Панова, Татикилов, 2005; Panova et al., 2007). Функция альбумина в стекловидном теле в данный период развития остается неясной. На этих же стадиях развития

стекловидное тело, по нашим наблюдениям, имеет желтоватый цвет, что могло бы быть обусловлено присутствием каротиноидов.

Исходя из представлений о функции альбумина как переносчика биологически важных макромолекул (жирные кислоты, гормоны, металлы, аминокислоты, каротиноиды и т. д.) (Peters, 1996), мы предположили, что альбумин, обнаруживаемый в стекловидном теле глаза плодов человека, переносит в него каротиноиды, необходимые для дифференцировки сетчатки и формирования желтого пятна. Цель работы – обнаружение и исследование каротиноидов в стекловидном теле глаза человека в ходе пренатального развития.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Стекловидное тело из глаз абортивных плодов человека исследовали с 13-й по 31-ю нед беременности. Плоды поступали в Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН из лицензированных учреждений Минздрава, действующих в рамках законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан и в соответствии с утвержденным перечнем медицинских показаний. Возраст плодов определялся врачом-

<sup>1</sup> Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 05-04-49945, 05-03-32775, 05-04-48502а, 05-04-48026а) и Программой ОБН РАН “Физиологические механизмы регуляции внутренней среды и организации поведения живых систем”.

акушером. Под бинокулярной лупой МБС-9 отрезали по лимбу роговицу и вынимали стекловидное тело вместе с хрусталиком, после чего аккуратно удаляли хрусталик и очищали стекловидное тело от остатков сетчатки. Стекловидное тело взрослых людей в возрасте 21, 25 и 48 лет выделяли из кадаверных глаз после забора роговицы для пересадки. Полученные таким образом образцы хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  до проведения дальнейшего исследования.

Прозрачность стекловидного тела оценивали на микроскопических препаратах с помощью микроспектрофотометра (Говардовский, Зуева, 2000) в диапазоне длин волн 350–750 нм с пороговой чувствительностью от 0.005 единиц оптической плотности.

Для обнаружения каротиноидов в нативном стекловидном теле образцы, полученные от плодов человека, были разбиты на три возрастные группы в зависимости от степени желтизны (табл. 1). Первая – 15 нед (8 глаз), вторая – от 16 до 22 нед (12 глаз), третья – с 24-й по 28-ю нед беременности (6 глаз). В каждой возрастной группе образцы стекловидного тела для исследования были объединены между собой. Четвертую группу составило стекловидное тело 21-летнего человека (1 глаз). После предварительного взвешивания на весах ВР 310 S (“САРТОГОСМ”, Россия) измеряли спектры поглощения нативного стекловидного тела на спектрофотометре UV-1700 (“Shimadzu”, Япония) в 1-см кювете в диапазоне 370–670 нм, затем эти же образцы использовали для проведения анализа на присутствие и состав каротиноидов с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Для этого проводили экстракцию из нативного стекловидного тела в системе хлороформ : метанол : вода в соотношении 2 : 1 : 1 (по объему). Смесь центрифугировали на центрифуге MLW K 26 D (680 g, 10 мин,  $4^{\circ}\text{C}$ ), отбирали нижний хлороформный слой и упаривали его на водоструйном насосе. Осадок растворяли в 100 мкл метанола непосредственно перед проведением анализа ВЭЖХ. Для анализа использовали аликвоту 30 мкл. Для хроматографического разделения применяли хроматографическую установку (“Knauer”, Германия) и колонку Диасфер 120 C18 ( $4 \times 120$  мм, размер сорбента 5 мкм). Разделение проводили путем линейного градиентного элюирования в системе от 100%-го растворителя А (10% метанола + 90% ацетонитрила) до 100%-го растворителя В (100%-ный этилацетат) за 70 мин. Детекцию осуществляли при длине волны 430 нм с помощью детектора Knauer K-2501, в качестве стандарта использовали смесь лютеина и зеаксантина (“La Roch”, Швейцария).

Были также исследованы спектры поглощения супернатантов, полученных после центрифугирования в центрифуге Eppendorf 5417R нативного стекло-

**Таблица 1.** Визуальная характеристика стекловидного тела глаза человека в развитии

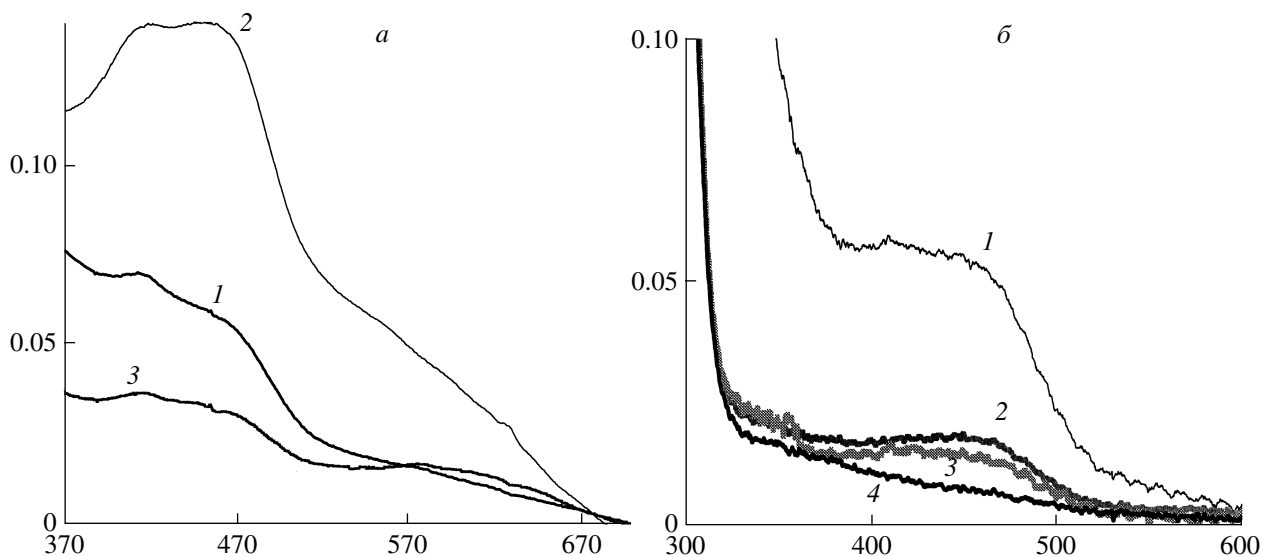
Возраст плодов, нед	Визуальная характеристика стекловидного тела
13.0	Прозрачное, бесцветное, пронизано сосудами гиалоидного кровоснабжения, заполненными кровью
14.0 15.0 15/16	Прозрачное, светло-желтое, видны сосуды, заполненные кровью
16 16/18 18/19 19	Прозрачное, желтое, иногда светло-желтое, сосудов, заполненных кровью заметно меньше, они, главным образом, в сосудистой сумке хрусталика
20/22 21/22 23.0	Прозрачное, желтое или светло-желтое, сосудов мало. Как правило, виден один сосуд главной гиалоидной артерии в области выхода глазного нерва и сосуды сосудистой сумки хрусталика
24 26/28 31	Прозрачное, практически бесцветное, сосуды, как правило, не обнаруживаются. Иногда видны лишь остатки сосудистой сумки хрусталика

видного тела (12500 об/мин,  $4^{\circ}\text{C}$ , 30 мин) на сроках 16/18, 24, 26/28, 31 нед беременности и для сравнения от взрослых людей в возрасте 25 и 48 лет. Аликвоты по 50 мкл от каждого образца измеряли на спектрофотометре UV-3101PC (“Shimadzu”, Япония) в 1-мм кювете в диапазоне 300–600 нм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Визуально и с помощью бинокулярной лупы МБС-9 выяснили, что у 13-недельных плодов стекловидное тело представляет собой прозрачный бесцветный гель, интенсивно пронизанный гиалоидными кровеносными сосудами. На сроках 14, 15 и 15/16 нед беременности оно прозрачное, уже имеет светло-желтый цвет и густую сеть гиалоидных сосудов. На сроках от 16 до 23 нед беременности отмечен желтый либо иногда светло-желтый цвет стекловидного тела. Начиная с 24-й и далее до 31-й нед стекловидное тело прозрачное, но при этом бесцветное и практически лишено сосудов. При выделении стекловидного тела вместе с хрусталиком четко просматривались передняя и задняя сосудистая сумка хрусталика (табл. 1). Стекловидное тело взрослого человека бесцветное, прозрачное и полностью лишено кровеносных сосудов.

При микроспектрофотометрических измерениях обнаружено, что желтоватый по цвету гель стекловидного тела имеет гомогенную прозрач-



**Рис. 1.** Спектральная характеристика стекловидного тела глаз плодов человека на разных сроках беременности: *а* – спектры поглощения образцов нативного стекловидного тела, объединенных на 15-й (1), 16–22-й (2) и 24–28-й (3) нед беременности; *б* – спектры поглощения супернатанта стекловидного тела плодов человека на 16/18-й (1), 24-й (2), 26/28-й (3) и 31-й (4) нед беременности. По оси абсцисс – длина волны, нм; по оси ординат – оптическая плотность.

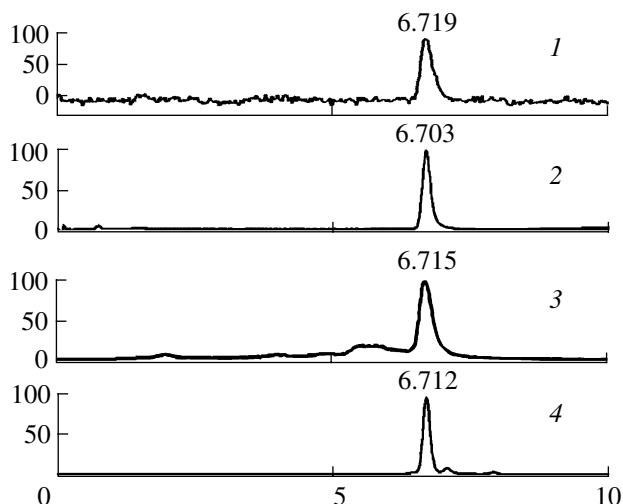
ную консистенцию. Возможные спектральные неоднородности геля оказались ниже разрешения прибора, т.е. менее 0.005 единиц оптической плотности при оптическом пути 20 мкм.

Спектры поглощения нативного стекловидного тела в возрастных группах 15, 16–22 и 24–28 нед беременности (рис. 1, *а*, 1, 2, 3), которые соответствуют разной степени желтизны стекловидного

тела (табл. 1), показывают наличие широких полос в области 450–470 нм. Такие спектры характерны для каротиноидов. У плодов разных сроков беременности содержание каротиноидов в стекловидном теле, судя по спектрам, различно. Их наибольшая концентрация приходится на 16–22-ю нед беременности (рис. 1, *а*, 2), что соответствует наибольшей желтизне стекловидного тела (табл. 1). На сроках 15 и 24–28 нед беременности (рис. 1, *а*, 1 и 3 соответственно) концентрация каротиноидов значительно ниже.

Спектральное исследование супернатантов стекловидного тела на сроках 16/18, 24, 26/28, 31 нед беременности и супернатантов от взрослых людей в возрасте 25 и 48 лет показало, что полосы поглощения в области 450–470 нм присутствовали только у 16/18, 24 и 26/28-недельных плодов, причем максимальное поглощение наблюдали на 16/18-й нед, а на стадиях 24 и 26/28 нед беременности оно последовательно снижалось (рис. 1, *б*, 1–3). На 31-й нед поглощение в этой области практически отсутствовало (рис. 1, *б*, 4).

Как в нативном стекловидном теле глаза 21-летнего человека, так и в супернатантах таковых у людей 25 и 48 лет поглощение в этой области, характерное для каротиноидов, также отсутствовало. Следует отметить, что в спектрах поглощения стекловидного тела, полученного из кадаверных глаз взрослых людей, обнаруживается полоса с максимумом поглощения при 412 нм, соот-



**Рис. 2.** Профили ВЭЖХ образцов стекловидного тела, объединенных на 15-й (1), 16–23-й (2) и 24–28-й (3) нед беременности; 4 – контроль (стандарт смеси лютеина и зеаксантина). По оси абсцисс – время, мин; по оси ординат – относит. интенсивность, относит. ед. поглощения.

ветствующая оксигемоглобину (спектры не приведены).

Исследование методом ВЭЖХ хлороформных экстрактов из проб стекловидного тела у плодов 15, 16–22 и 24–28-й нед беременности показало присутствие каротиноидов на всех этих сроках (рис. 2). При этом максимальный выход каротиноидов, обнаруживаемых в стекловидном теле, приходится на срок 16–22 нед беременности, в то время как на сроках 15 и 24–28 нед их выход значительно ниже (табл. 2).

Таким образом, в настоящем исследовании впервые показано присутствие каротиноидов (смеси лютеина и зеаксантина) в стекловидном теле у плодов человека во втором триместре беременности с максимумом на 16–22-й нед. Эти результаты хроматографического анализа (рис. 2) хорошо совпадают с визуальными наблюдениями степени желтизны стекловидного тела (табл. 1) и спектральными характеристиками (рис. 1).

Вероятно, каротиноиды поступают в стекловидное тело плодов человека в комплексе с альбумином, поскольку известно, что в организме они переносятся растворимым комплексом альбумин-каротиноиды (Bhosale et al., 2004; Sabah et al., 2005). Стекловидное тело более чем на 90% состоит из водной фракции (Hogan et al., 1971). Как следует из наших данных, во втором триместре развития плодов человека оно обогащено каротиноидами. На это указывает также совпадение наибольшего содержания альбумина (Панова, Татиколов, 2005; Panova et al., 2007) и каротиноидов на 16–22-й нед беременности (настоящее исследование). Можно предположить, что на этих стадиях развития альбумин осуществляет в стекловидном теле депонирование каротиноидов для их последующего переноса в ткани-мишени развивающегося глаза человека, в частности в сетчатку и, возможно, в хрусталик.

В зрелой сетчатке у человека и приматов лютеин и зеаксантин локализируются главным образом в области макулы в наружном плексиформном слое (так называемый волокнистый слой Генле), во внутреннем сетчатом слое, в мюллеровских клетках, а на периферии сетчатки – в наружных сегментах фоторецепторов (Bernstein et al., 2001). В раннем развитии дифференцировка сетчатки начинается в центре (области, соответствующей будущей макуле) и постепенно распространяется на периферию. Первыми (до 10 нед беременности) начинают дифференцироваться ганглиозные клетки, аксоны которых формируют слой нервных волокон, и мюллеровские клетки (Mann, 1949; Nag, Wadhwa, 2001). Признаки появления фоторецепторов начинают обнаруживаться на 10–12-й нед беременности (Hollenberg, Spira, 1973;

**Таблица 2.** Относительное содержание каротиноидов на 1 г влажного веса анализируемого стекловидного тела

Возраст плодов, нед	Суммарный вес нативного стекловидного тела, г	Площадь пика (S) каротиноидов, относит. ед.	S-пик, относит. ед/влажный вес стекловидного тела, г
15	0.11	0.148	1.34
16–22	0.99	3.080	3.11
24–28	2.18	1.340	0.61

Панова и др., 2006). На 18–19-й нед внутренние сегменты колбочек уже имеют пространственно-организованные мозаичные структуры, характерные для взрослой сетчатки (Narayanan, Wadhwa, 1998). С 11-й нед в центральной зоне сетчатки последовательно начинается активное формирование клеточных типов и синаптогенез; постепенно этот процесс распространяется на периферию. Начавшийся синаптогенез приводит к формированию внутреннего сетчатого слоя (становится видимым к 15-й нед) и наружного сетчатого слоя (после 16-й нед). В период между 16-й и 21-й нед активно формируются слои сетчатки, дифференцируются нейроны, наружные сегменты фоторецепторов и продолжают формироваться синаптические связи. В результате к 21-й нед слои и клеточные типы сетчатки сформированы и четко выражены в центральной и среднепериферической областях сетчатки. Область фовеа человека, дифференцировка которой начинается раньше всех в центральной области, продолжает свое развитие в течение первых четырех лет после рождения (Hendrickson, 1992; Nag, Wadhwa, 2001).

Каротиноиды в сетчатке начинают обнаруживаться в небольших количествах у 17–20-недельных плодов, при этом они сосредоточены в области макулы. По мере дальнейшего роста число каротиноидов постепенно увеличивается и после рождения ребенка продолжает увеличиваться до двух лет. Начиная с трех лет содержание каротиноидов в сетчатке практически не меняется. Более того, было показано, что главным каротиноидом сетчатки до двух лет является лютеин, а у взрослых людей – зеаксантин (Bone et al., 1988). В последующих работах было показано наличие в сетчатке глаза человека изомера зеаксантина – мезо-зеаксантина. Его количество у взрослых людей весьма велико и снижается от центра по направлению к периферии сетчатки, а у детей до двух лет его очень мало. В крови этот каротиноид обнаруживается лишь в следовых количествах. Это позволило авторам сделать предположение о

том, что, возможно, мезо-зеаксантин – это переходная форма для превращения лютеина в зеаксантин уже непосредственно в сетчатке (Bone et al., 1993, 1997).

Полученные в настоящем исследовании результаты по обнаружению и динамике накопления и исчезновения каротиноидов в стекловидном теле плодов человека показывают коррелятивные связи в процессах раннего становления и дифференцировки сетчатки. Максимальное содержание каротиноидов в стекловидном теле между 16-й и 22-й нед соответствует гистогенезу сетчатки, приводящему, по морфологическим признакам, к формированию дефинитивной сетчатки (Mann, 1949; Hollenberg, Spira, 1973; Narayanan, Wadhwa, 1998; Hendrickson, 1992; Nag, Wadhwa, 2001). Именно на этих сроках в сетчатке начинают обнаруживаются каротиноиды (Bone et al., 1988).

Следует отметить, что в ряде работ было показано присутствие каротиноидов в хрусталике (Yeum et al., 1995; Hammond et al., 1997). Можно предположить, что каротиноиды на ранних стадиях развития глаза могут быть необходимыми и для развития хрусталика. Альбумин, играя важную роль в переносе жирных кислот для биосинтеза хрусталиковых липидов (Sabah et al., 2005), может поставлять и каротиноиды для развивающегося хрусталика.

Таким образом, можно предположить, что присутствие каротиноидов в стекловидном теле в раннем периоде развития глаза необходимо и существенно для начальных этапов развития сетчатки и хрусталика, в частности, для формирования желтого пигмента – смеси лютеина и зеаксантина – для макулярной области (так называемого макулярного пигмента).

*Авторы выражают благодарность Р.А. Полтавцевой и И.В. Дубровиной за помощь в работе.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Говардовский В.И., Зуева Л.В. Скоростной микроспектрофотометр для изучения фотолиза зрительных пигментов в условиях *in situ* // Сенсорные системы. 2000. Т. 14. С. 288–296.
- Панова И.Г., Татиколов А.С. Обнаружение альбумина в стекловидном теле глаза человека с использованием цианинового красителя в качестве зонда // Докл. АН. 2005. Т. 402. № 5. С. 709–711.
- Панова И.Г., Подгорный О.В., Маркитантова Ю.В. и др. Экспрессия специфического белка фоторецепторов рековерина на ранних стадиях пренатального развития сетчатки человека: Иммуноцитохимическое и молекулярно-биологическое исследование // Офтальмология. 2006. Т. 3. № 1. С. 20–25.
- Трофимова Н.Н., Зак П.П., Островский М.А. Функциональная роль каротиноидов желтого пятна сетчатки глаза (обзор данных за последние 10 лет) // Сенсорные системы. 2003. Т. 17. С. 198–208.
- Bernstein P.S., Khachik F., Carvalho L.S. et al. Identification and quantitation of carotenoids and their metabolites in the tissues of the human eye // Exp. Eye Res. 2001. V. 72. P. 215–223.
- Bhosale P., Larson A.J., Frederick J.M. et al. Identification and characterization of a Pi isoform of glutathione S-transferase (GSTP1) as a zeaxanthin-binding protein in the macula of the human eye // J. Biol. Chemistry. 2004. V. 279. № 47. P. 49447–49454.
- Bone R.A., Landrum J.T., Fernandez L. et al. Analysis of the macular pigment by HPLC: retinal distribution and age study // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1988. V. 29. P. 843–849.
- Bone R.A., Landrum J.T., Hime G. et al. Stereochemistry of the human macular carotenoids // Ibid. 1993. V. 34. P. 2033–2040.
- Bone R.A., Landrum J.T., Fernandez L. et al. Distribution of lutein and zeaxanthin stereoisomers in the human retina // Exp. Eye Res. 1997. V. 64. P. 211–218.
- Hammond B.R., Jr., Wooten B.R., Snodderly D.M. Density of the human crystalline lens is related to the macular pigment carotenoids, lutein and zeaxanthin // Optom. Vis. Sci. 1997. V. 74. P. 499–504.
- Hendrickson A. A morphological comparison of foveal development in man and monkey // Eye. 1992. V. 6. P. 136–144.
- Hogan V.J., Alvarado J.A., Weddel J.E. Histology of the human eye. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1971. 687 p.
- Hollenberg M.J., Spira A.W. Human retinal development: ultrastructure of the outer retina // Am. J. Anatomy. 1973. V. 137. № 4. P. 357–386.
- Mann I. The development of the human eye. L. : Brit. Med. Assoc., 1949. 313 p.
- Nag T.C., Wadhwa S. Differential expression of syntaxin-1 and synaptophysin in the developing and adult human retina // J. Biosci. 2001. V. 26. № 2. P. 179–191.
- Narayanan K., Wadhwa S. Photoreceptor morphogenesis in the human retina: A scanning electron microscopic study // Anat. Rec. 1998. V. 252. P. 133–139.
- Panova I.G., Sharova N.P., Dmitrieva S.B. et al. The use of a cyanine dye as a probe for albumin and collagen in the extracellular matrix // Anal. Biochem. 2007. V. 361. № 2. P. 183–189.
- Peters Jr.T. All about albumin: Biochemistry, genetics, and medical application. N. Y.: Acad. Press, 1996.
- Sabah J., McConkey E., Welti R. et al. Role of albumin as fatty acid carrier for biosynthesis of lens lipids // Exp. Eye Res. 2005. V. 80. P. 31–36.
- Yeum K.J., Taylor A., Tang G. et al. 1995. Measurement of carotenoids, retinoids, and tocopherols in human lenses // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1995. V. 36. 2756–2761.

## Finding of Carotenoids in the Vitreous Body of Human Eye during Prenatal Development

© 2007 г. М. А. Yakovleva\*, I. G. Panova\*\*, T. B. Fel'dman\*, P. P. Zak\*, A. S. Tatikolov\*, G. T. Sukhikh\*\*\*, and M. A. Ostrovsky\*

\*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia

\*\*Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119991 Russia

\*\*\*Research Center of Obstetrics, Gynaecology, and Perinatology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Akademika Oparina 4, Moscow, 117997 Russia

E-mail: pinag@mail.ru

Received November 1, 2006; in final form, February 7, 2007

**Abstract**—Carotenoids were found for the first time in the vitreous body of human eye during the fetal period from week 15 until week 28. Their maximum content was timed to week 16–22. No carotenoids were found the vitreous body of 31-week fetuses, as well as adult humans, which corresponds to the published data. It was shown using HPLC that chromatographic characteristics of these carotenoids correspond to those of lutein and zeaxanthin, characteristic pigments of the retinal yellow macula.

*Key words:* carotenoids, macular pigment, albumin, vitreous body, retina, lens, development, spectrophometry, HPLC.