

**STRENGTH OF THE CHORIORETINAL ADHESION AFTER HIGH-FREQUENCY ELECTROWELDING IN COMPARISON WITH DIODE LASER COAGULATION**

Umanets N. N.

Odessa, Ukraine

Strength of the chorioretinal adhesion after high-frequency electrowelding and diode laser coagulation were studied in the experiment on 52 rabbits (104 eyes) in different periods after intervention.

As a result of the study it is established that high-frequency welding of the biological tissues with the parameters — voltage 14–16 W, current strength up to 0.1A, exposure — 1–2 sec, frequency — 66 kHz provides the increase of the chorioretinal adhesion immediately after the effect of the electric current more than 2 times compared with the control group — the effort for tearing off the retina was 224 mg while in the control group (after the influence of diode laser coagulation) it was 105 mg.



УДК 617.713–002–085:615.457.1–07+577.11

**ВЛИЯНИЕ КОНСЕРВАНТОВ ГЛАЗНЫХ КАПЕЛЬ НА ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ГЛУТАТИОНА В ТКАНЯХ ПЕРЕДНЕГО ОТДЕЛА ГЛАЗА**

**Т. Б. Гайдамака, д. м. н., В. И. Сенишин, врач-ординатор**

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова НАМН Украины»

*В експерименті на тваринах (17 кроликів) визначали рівень окисленого та відновленого глутатіона в рогівці, кон'юнктиві та слезовій рідині після інстиляцій 0,02 % розчину антисептика бензалконій хлориду (БАК), виготовленого на ізотонічному фосфатному буфері (рН 7,3–7,4). Встановлено, що цей консервант суттєво знижує рівень відновленого і підвищує рівень окисленого глутатіона в рогівці, кон'юнктиві та слезовій рідині ока. Це свідчить про порушення дезінтоксикаційної системи глутатіона, що сприяє зниженню захисних можливостей переднього відділу ока та стійкості органа зору до вірусної інфекції.*

**Ключевые слова:** передний отдел глаза, глазные капли, консерванты, восстановительный потенциал глутатиона

**Ключові слова:** передній відділ ока, очні краплі, консерванти, відновний потенціал глутатіону.

**Введение.** Воспалительные заболевания роговой оболочки являются одной из наиболее часто встречаемых групп заболеваний, приводящих к временной и стойкой утрате нетрудоспособности. До настоящего времени лечение этих заболеваний недостаточно эффективно [1, 6, 27].

Анализ многочисленных клинических наблюдений свидетельствует о выраженных побочных эффектах консервантов при применении различных офтальмологических препаратов, в первую очередь, антиглаукоматозных капель. Последние — как на основе аналогов простагландинов, так и других гипотензивных средств — наиболее часто в качестве консерванта включают антисептик бензалконий хлорид (БАК) [4, 7, 12, 18, 20, 25].

Было установлено, что значительная часть БАК накапливается в роговично-конъюнктивальном эпителии и строме, в меньшей степени — в радужной оболочке, хрусталике, сосудистой оболочке и сетчатке глаза [5, 8, 14, 21, 26].

Сравнительные исследования антиглаукоматозных капель, содержащих указанный консервант

и без такового, отчетливо показали, что именно БАК обладает выраженным негативным влиянием на поверхностные структуры органа зрения. Так, в ряде исследований выявлено действие БАК на физиологические параметры конъюнктивы, роговицы и физико-химические свойства слезной жидкости. В то же время, в офтальмологической литературе негативные и позитивные свойства БАК достаточно широко освещены, из чего следует, что не всегда благоразумно полностью отказаться от консервантов и перейти на глазные капли без таковых [15, 19, 22, 29, 31].

Имеются сообщения о том, что консерванты изменяют эластические свойства роговицы, тем самым снижая надежность измерения ВГД, хотя клиническая значимость этих данных не определена. Токсическое воздействие консервантов на поверхность роговицы намного более полно изучалось в экспериментальных условиях на животных. В одном исследовании, проведенном на кроликах,

© Т. Б. Гайдамака, В. И. Сенишин, 2012

увеличение концентрации БАК коррелировало со степенью эпителиопатии роговицы и уровнем концентрации лактатдегидрогеназы и альбумина — известных маркеров поражения роговицы, высвобождаемых в слезную жидкость. Также на кроликах исследовалось влияние консервантов на процессы заживления роговицы [13, 16, 17, 30]. Даже малые концентрации БАК (0,01 %) вызывали разрушение эпителиального барьера роговой оболочки. БАК в концентрации 0,01 % и этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) в концентрации 0,1 % приводили к задержке заживления роговицы, а БАК в концентрации 0,02 % полностью подавлял процесс заживления после экспериментальной кератэктомии на глазах кроликов [11, 25].

В исследовании, выполненном на собаках, 0,0025 % раствор БАК или 0,025 % раствор тиомеросала подавляли рост псевдоподиев эпителиальных клеток и препятствовали регенерации эпителия роговицы [26].

В клинической практике имеется несколько опубликованных наблюдений о токсическом воздействии БАК на роговицу у пациентов при ношении контактных линз, а также у пациентов в раннем послеоперационном периоде после экстракции катаракты и у лиц с синдромом «сухого глаза». Важно отметить, что симптомы воздействия у этих пациентов исчезали после отмены глазных капель, содержащих консерванты, и замены их препаратами без консервантов [4, 5].

Все вышесказанное обуславливает актуальность углубленных исследований патогенетических механизмов негативного действия офтальмоконсервантов на ткани глаза и выработки методов его коррекции.

В ряде исследований выявлена роль поверхностных структур глаза в защитно-приспособительных реакциях органа зрения. Так, в частности, выявлена новая функциональная особенность конъюнктивы, связанная с транспортом важнейшего детоксиканта — глутатиона [9, 24].

Защитная роль этого трипептида заключается не только в детоксикационных и антиоксидантных функциях, но обусловлена его ролью в регуляции воспалительных и иммунных процессов и его противовирусным действием [10, 23, 28].

Учитывая детоксикационные и мембраностабилизирующие свойства глутатиона, его уровень играет важную роль в обеспечении защитно-приспособительных механизмах роговицы глаза.

В этой связи целью настоящей работы было изучение влияния БАК на тиоловый статус роговой оболочки, конъюнктивы и слезной жидкости в эксперименте.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Для проведения эксперимента использовали 17 кроликов породы шиншилла массой 2,2–2,7 кг.

Работа с животными проводилась с учетом требований Международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с экспериментальными животными, которые были предложены на Совете международных медицинских организаций (1985 г.) «О мерах по дальнейшему совершенствованию форм работы с использованием экспериментальных животных».

Животные выведены из эксперимента с помощью летальной дозы пентобарбитола натрия (100 мг на кг вводимо в маргинальную ушную вену).

Животные были разделены на две группы: 1 группа — контрольная (8 животных), 2 группа — опытная (9 животных), получавшая инстилляцию 0,02 % раствор БАК, приготовленный на изотоническом фосфатном буфере (рН 7,3–7,4). Животные контрольной группы получали этот же раствор без БАК. Инстилляции проводили ежедневно (2 раза в день) на протяжении двух недель.

Для исследования производили забор экспериментального материала: роговицу, конъюнктиву и слезную жидкость. В полученном нейтральном экстракте из гомогенатов указанных тканей определяли тиоловый статус по содержанию восстановленного и окисленного глутатиона.

Принцип метода определения восстановленного глутатиона. В результате реакции между глутатионом и метилглиоксальем в присутствии фермента глиоксилазы происходит образование конъюгата S-лактоилглутатиона, имеющего максимум поглощения при длине волны 240 нм.

*Ход работы:* для определения содержания тиоловой формы глутатиона в кювету последовательно приливают 0,5 мл нейтрализованного экстракта, 0,15 мл 1 % раствора яичного альбумина и 0,01 мл суспензии глиоксилазы (0,6 ед/мл в кювете). Измеряют оптическую плотность раствора  $E_1$ . Добавляют 0,02 мл 0,1 М раствора метилглиоксаля и перемешивают. После окончания реакции регистрируют  $E_2$ . В кювету приливают вторично 0,02 мл 0,1 М раствора метилглиоксаля, регистрируя оптическую плотность раствора  $E_3$ .

Для проведения измерений использовали спектрофотометр СФ-26 (длина волны 240 нм). Среднее значение коэффициента вариации для тиоловой формы — 4 % [3].

Содержание восстановленного глутатиона выражали в мкмоль/г ткани.

Принцип метода определения окисленной формы глутатиона состоит в том, что в результате ферментативного восстановления глутатиона глутатионредуктазой происходит окисление восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФН<sub>2</sub>), убыль которого регистрируют спектрофотометрически при длине волны 340 нм.

*Ход работы.* После завершения определения содержания тиоловой формы глутатиона в ту же кювету добавляли 0,1 мл 11 мМ раствора НАДФН. Перемешивали и регистрировали оптическую плотность ( $E_1$ ) при длине волны 340 нм. Добавляли 0,01 мл суспензии глутатион-редуктазы (0,018 Ед/мл реакционного раствора) и регистрировали оптическую плотность раствора после окончания реакции ( $E_2$ ).

Диапазон определяемых уровней восстановленной и окисленной формы от 5 до 200 мкг/мл в исследуемом растворе. Среднее значение коэффициента вариации для определения глутатиона в указанном диапазоне восстановленной формы — 4,0 %, окисленной формы — 5,0 %. Для измерений использовали спектрофотометр СФ-26 с рабочим диапазоном по шкале «оптическая плотность» в оптимальном интервале 0,1–0,5. Содержание глутатиона выражали в мкмоль/г ткани [3].

Полученные данные подвергались статистической обработке с помощью пакета SPSS 11.0 [2].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.** Данные о влиянии инстилляций БАК на уровень восстановленного глутатиона в роговой оболочке, конъюнктиве и слезной жидкости представлены в таблице 1.

Таблица 1

**Влияние инстилляций БАК на уровень восстановленного глутатиона в роговой оболочке, конъюнктиве и слезной жидкости кроликов**

Исследуемая ткань, единицы измерения	Статистические показатели	Контрольная группа	Опытная группа
Роговая оболочка, мкмоль/г ткани	n	8	9
	M	14,38	12,33
	SD	1,65	2,21
	m	0,58	0,74
	p	—	<0,05
Конъюнктура, мкмоль/г ткани	n	8	9
	M	11,30	8,54
	SD	2,05	1,96
	m	0,72	0,65
	p	—	<0,02
Слезная жидкость, мкмоль/л	n	8	9
	M	105,45	84,58
	SD	18,60	16,22
	m	6,58	5,41
	p	—	<0,05
	%	100,0	80,2

Примечание. p — уровень значимости различий данных по отношению к контролю.

В роговой оболочке уровень восстановленного глутатиона при применении БАК был ниже, чем в контрольной группе ( $14,38 \pm 0,58$ ) мкмоль/г и составил — ( $12,33 \pm 0,74$ ) мкмоль/г, т. е. 85,7 % ( $p < 0,05$ ).

В конъюнктиве уровень восстановленного глутатиона при применении БАК составил — ( $8,54 \pm 0,65$ ) мкмоль/г, 75,6 % по сравнению с контролем — ( $11,30 \pm 0,72$ ) мкмоль/г ( $p < 0,02$ ).

Уровень восстановленного глутатиона в слезной жидкости в условиях применения БАК был снижен до ( $84,58 \pm 5,41$ ) мкмоль/л, что составило — 80,2 % по сравнению с контролем ( $105,45 \pm 6,58$ ) мкмоль/л ( $p < 0,05$ ).

Данные о влиянии инстилляций БАК на уровень окисленного глутатиона в роговой оболочке, конъюнктиве и слезной жидкости представлены в таблице 2.

Уровень окисленного глутатиона в роговой оболочке при применении БАК был повышен до ( $1,67 \pm 0,08$ ) мкмоль/г, 140,3 % по сравнению с контролем — ( $1,19 \pm 0,08$ ) мкмоль/г ( $p < 0,01$ ).

В конъюнктиве уровень окисленного глутатиона в условиях применения БАК был повышен до ( $1,27 \pm 0,09$ ) мкмоль/г, что составило 135,1 % по

сравнению с контролем — ( $0,94 \pm 0,07$ ) мкмоль/г ( $p < 0,02$ ).

Таблица 2

**Влияние инстилляций БАК на уровень окисленного глутатиона в роговой оболочке, конъюнктиве и слезной жидкости**

Исследуемая ткань, единицы измерения	Статистические показатели	Контрольная группа	Опытная группа
Роговая оболочка, мкмоль/г ткани	n	8	9
	M	1,19	1,67
	SD	0,22	0,25
	m	0,08	0,08
	p	—	<0,01
Конъюнктура, мкмоль/г ткани	n	8	9
	M	0,94	1,27
	SD	0,19	0,28
	m	0,07	0,09
	p	—	<0,02
Слезная жидкость, мкмоль/л	n	8	9
	M	31,02	46,63
	SD	5,28	6,47
	m	1,87	2,16
	p	—	<0,0001
	%	100,0	150,3

Примечание. p — уровень значимости различий данных по отношению к контролю.

В слезной жидкости уровень окисленного глутатиона при применении БАК повысился до ( $46,63 \pm 2,16$ ) мкмоль/л, что составило 150,3 % по сравнению с контролем — ( $31,02 \pm 1,87$ ) мкмоль/л ( $p < 0,0001$ ).

Таким образом, полученные нами данные выявили, что в условиях применения инстилляций БАК в ткани роговицы концентрация восстановленного глутатиона снижается в среднем на 15 %, а уровень его окисленной формы повышается на 40 %. При этом восстановительный потенциал глутатионовой системы под влиянием БАК снижается в 1,6 раза.

Снижение восстановленной формы глутатиона в роговице происходит, в первую очередь, за счет оксидативного стресса, приводящего к ускорению его окисления. Частично же в механизме снижения восстановленного глутатиона может играть роль нарушение проницаемости мембранных структур роговичного эпителия.

В целом результаты проведенных исследований свидетельствуют о снижении восстановительного потенциала роговой оболочки при использовании инстилляций БАК. Учитывая ту важную роль, которую играет глутатион в процессах детоксикации и устойчивости роговицы к различным патогенным воздействиям, в частности, герпетической инфекции, можно полагать, что этот фактор участвует в ослаблении защитно-приспособительных возможностей роговицы при длительном использовании глазных капель с изучаемым консервантом.

Анализ полученных результатов свидетельствует, что применение данного консерванта глазных капель существенно нарушает дезинтоксикационную систему глутатиона поверхностных структур глазного яблока. Такая ситуация, несомненно, снижает защитно-приспособительные возможности переднего отдела глаза. В первую очередь, учитывая роль глутатиона в антивирусной защите, можно предположить снижение устойчивости органа зрения к вирусной инфекции.

В механизме нарушения глутатионовой системы роговицы под влиянием БАК значительную роль играет снижение уровня этого трипептида в ткани слизистой оболочки, в которой, как известно, происходит интенсивный синтез глутатиона и осуществляется его секреция в слезную жидкость.

### ВЫВОДЫ

1. Установлено, что при применении инстилляций 0,02 % раствора БАК в ткани роговицы отмечается значимое снижение уровня восстановленной формы глутатиона (на 15 %) и существенное падение восстановительного потенциала тиоловой системы (в 1,6 раза). Нарушение тиолового статуса в роговице под влиянием изучаемого консерванта можно рассматривать как важное звено в механизме его патогенного действия на роговую оболочку глаза.

2. В ткани слизистой оболочки и слезной жидкости при инстилляциях 0,02 % раствора БАК снижается уровень восстановленного глутатиона (на 24,4 % и 19,8 % соответственно). Повышенное содержание окисленной формы глутатиона (на 35,1 % и 50,3 %) в конъюнктиве и слезе свидетельствуют о резком оксидативном стрессе, вызываемом инстилляциями БАК.

### ЛИТЕРАТУРА

1. **Анина Е. И.** Распространенность заболеваний роговой оболочки глаза у населения Украины / Анина Е. И., Мартопляс К. В. // Тези доп. II Міжнародної наук. конф. офтальмологів Причорномор'я. — Одеса, 2004.
2. **Наследов А.** SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках / Наследов А. — СПб.: Питер, 2005. — 416 с.
3. Новые методы биохимического анализа // Изд. Ленинградского универ. — 1991. — 395 с.
4. **Ammar D. A., Noecker R. J., Kahook M. Y.** Effects of benzalkonium chloride-preserved, polyquad-preserved, and sofZia-preserved topical glaucoma medications on human ocular epithelial cells // *Adv. Ther.* — 2010. — Vol. 27. — P. 1–9.
5. **Ayaki M., Yaguchi S., Iwasawa A.** Cytotoxicity of ophthalmic solution with and without preservatives to human corneal endothelial cells, epithelial cells and conjunctival epithelial cells // *Clin. Exp. Ophthalmol.* — 2008. — Vol. 36. — P. 553–559.

6. **Ayaki M., Shimada K., Yaguchi S.** Corneal and conjunctival toxicity of disinfectants — assessing safety for use with ophthalmic surgical instruments // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* — 2007. — Vol. 48. — P. 292–295.
7. **Barki W. H., Tahir M.** Effects of topical benzalkonium chloride on corneal epithelium // *Biomedica.* — 2007. — Vol. 23. — P. 65–70.
8. **Baudouin C., Labbe A., Liang H.** Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly // *Prog. Retin. Eye Res.* — 2010. — Vol. 29. — P. 312–334.
9. **Debbasch C., Pisella P.-J., Magda De Saint Jean.** Mitochondrial activity and glutathione injury in apoptosis induced by upreserved and preserved  $\beta$ -blockers on chong conjunctival cells // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2001. — Vol. 42. — P. 2525–2533.
10. **Dickinson D. A., Forman H. J.** Cellular glutathione and thiols metabolism // *Biochem. Pharmacol.* — 2002. — Vol. 64. — P. 1019–1026.
11. **Hopes M., Broadway D. C.** Preservative-free Treatment in Glaucoma Is a Sensible and Realistic Aim for the Future // *Europ. Ophthalmic. Review.* — 2010. — Vol. 4. — P. 23–28.
12. **Hughes E. H., Pretorius M., Eleftheriadis H.** Long-term recovery of the human corneal endothelium after toxic injury by benzalkonium chloride // *Br. J. Ophthalmol.* — 2007. — Vol. 91. — P. 1460–1463.
13. **Kahook M. Y., Ammar D. A.** In vitro toxicity of topical ocular prostaglandin analogs and preservatives on corneal epithelial cells // *J. Ocul. Pharm. Ther.* — 2010. — Vol. 26. — P. 259–263.
14. **Kahook M. Y., Noecker R. J.** Comparison of corneal and conjunctival changes after dosing of travoprost preserved with sofZia, latanoprost with 0,02 % benzalkonium chloride, and preservative-free artificial tears // *Cornea.* — 2008. — Vol. 27. — P. 339–343.
15. **Khot-Reiter S., Jessen B. A.** Evaluation of the cytotoxic effects of ophthalmic solutions containing benzalkonium chloride on corneal epithelium using an organotypic 3-D model // *BMC Ophthalmol.* — 2009. — Vol. 9. — P. 1471–1475.
16. **Kim J. R., Oh T. H., Kim H. S.** Effect of benzalkonium chloride on the ocular surface of the rabbit // *Jpn. J. Ophthalmol.* — 2011. — Vol. 55. — P. 283–293.
17. **Kozobolis V. P., Detorakis E. T., Maskaleris G.** Corneal sensitivity changes following the instillation of latanoprost, bitamoprost, and travoprost eyedrops // *Am. J. Ophthalmol.* — 2005. — Vol. 139. — P. 742–743.
18. **Leonardi A., Jose P. J., Zhan H.** Tear and mucus eotaxin-1 and eotaxin-2 in allergic keratoconjunctivitis // *Ophthalmol.* — 2003. — Vol. 110. — P. 487–492.
19. **Liang H., Baudouin C., Pauly A.** Conjunctival and corneal reactions in rabbits following short- and repeated exposure to preservative-free tafluprost, commercially available latanoprost and 0,02 % benzalkonium chloride // *Br. J. Ophthalmol.* — 2008. — Vol. 92. — P. 1275–1282.
20. **Lin Z., Liu X., Zhou T.** A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride // *Mol. Vis.* — 2011. — Vol. 17. — P. 257–264.
21. **Majumdera S., Hippalgaonkara K., Repka M. A.** Effect of chitosan, benzalkonium chloride and ethylenediaminetetraacetic acid on permeation of acyclovir across isolated rabbit cornea // *Int. J. Pharm.* — 2008. — Vol. 348. — P. 175–178.

22. **McCarey B., Edelgauser H.** In Vivo corneal epithelial permeability following treatment with prostaglandin analogues with or without benzalkonium chloride // *J. Ocul. Pharm. Ther.* — 2007. — Vol. 23. — P. 445–447.
23. **Pauly A., Meloni M., Brignole-Baudouin F.** Multiple endpoint analysis of the 3D-reconstituted corneal epithelium after treatment with benzalkonium chloride: early detection of toxic damage // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2009. — Vol. 50. — P. 1644–1652.
24. **Reim M., Weidenfeld E., Budi Santoso A. W.** Oxidized and reduced glutathione levels of the cornea in vivo // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* — 1979. — Vol. 211. — P. 165–175.
25. **Trocme S., Hwang L.-J., Bean G. W.** The role of benzalkonium chloride in the occurrence of punctate keratitis: a meta-analysis of randomized, controlled clinical trials // *Ann. Pharmacother.* — 2010. — Vol. 44. — P. 1914–1921.
26. **Whitson J. T., Cavanagh H. D., Lakshman N.** Assessment of corneal epithelial integrity after acute exposure to ocular hypotensive agents preserved with and without benzalkonium chloride // *Adv. Ther.* — 2006. — Vol. 23. — P. 663–671.
27. **Wilson F. M.** Adverse external ocular effects of topical ophthalmic therapy: an epidemiologic, laboratory, and clinical study // *Tr. Am. Ophth. Soc.* — 1983. — Vol. 19. — P. 854–858.
28. **Wu G., Fanf Y.-Z., Yang S.** Glutathione metabolism and its implication for health // *J. Nutrition.* — 2004. — Vol. 134. — P. 489–492.
29. **Xiong C., Chen D., Liu J.** A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2008. — Vol. 49. — P. 1850–1856.
30. **Ye J., Wu H., Zhang H.** Role of benzalkonium chloride in DNA strand breaks in human corneal epithelial cells // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* — 2011. — Vol. 249. — P. 1681–1687.
31. **Zhivov A., Kraak R., Bergter H.** Influence of benzalkonium chloride on langerhans cells in corneal epithelium and development of dry eye in healthy volunteers // *Curr. Eye Res.* — 2010. — Vol. 35. — P. 762–769.

Поступила 07.11.2012  
Рецензент В. Я. Усов

### INFLUENCE OF THE EYE DROP PRESERVATIVES ON THE RESTORATIVE POTENTIAL OF GLUTATHIONE IN THE TISSUES OF THE ANTERIOR SECTION OF THE EYE

Gaidamaka T. B., Senishin V. I.

Odessa, Ukraine

There was determined the level of oxidated and restored glutathione in the cornea, conjunctiva and lacrimal fluid after instillations of 0.02 % solution BAC prepared on the isotonic phosphate buffer (pH 7.3–7.4) in the experiment on the animals (17 rabbits).

It was found that the preservative under study significantly decreased the level of the restored glutathione and increased the level of oxidated glutathione, which was evidence of disorder of the disintoxication system of glutathione resulting in reduction of the protective possibilities of the anterior section of the eye resistance of the eye to viral infection.

