

УДК 617.753-76:617.713-002-617.764-008.8-07+577.11

## Стан відновного потенціалу глутатіону і пероксидації ліпідів в сльозі пацієнтів, які тривалий час користуються м'якими контактними лінзами

Т. А. Велікар, аспірант; **М. Ф. Леус**, д-р мед. наук, професор; Т. Б. Гайдамака, д-р мед. наук; І. М. Міхейцева, д-р біол. наук; С. Г. Коломійчук, науков. співроб.

ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України»;  
Одеса (Україна)

E-mail: tvelikar@gmail.com

### Ключові слова:

міопія, м'яка контактна лінза, рогівка, сльоза, глутатіон, пероксидація ліпідів, малоновий діальдегід, дієнові кон'югати

**Актуальність.** Контактна лінза є бар'єром для нормального сполучення передньої поверхні рогівки з повітрям, що пов'язано з ризиком гострої і хронічної гіпоксії і, як наслідок, ацидозом тканин [9, 23].

Носіння контактної лінзи пов'язано з мікротравматизмом епітелію рогівки і наявністю гіпоксії в тканинах переднього відділу ока, що призводить до збільшення вивільнення цитокінів, факторів росту та інших медіаторів запалення [16].

Хронічна гіпоксія, особливо при пролонгованому режимі носіння лінз, характеризується дисфункцією епітелію, яка призводить до порушення його гідратації і викликає непереносимість контактних лінз. Наявність хронічної гіпоксії в передніх відділах рогівки веде до включення адаптаційних механізмів, які можна поділити на два етапи. На першому етапі виникає стадія екстреної пристосувальної реакції, на другому етапі настає стадія стійкої довгострокової адаптації. Рогівка переходить на більш високий енергозатратний рівень метаболізму клітини. Однак при тривалому впливі несприятливого фактора відбувається виснаження енергетичних ресурсів клітин, що сприяє процесу апоптозу клітин. [6].

**Вступ.** Носіння контактної лінзи пов'язано з мікротравматизмом епітелію рогівки і наявністю гіпоксії в тканинах переднього відділу ока.

**Мета.** Вивчити показники окисно-відновного потенціалу і маркерів пероксидації ліпідів в сльозі при носінні м'яких контактних лінз.

**Матеріал та методи.** Пацієнти були розділені на дві групи. Основна група (ОГ) – 20 осіб (40 очей) – пацієнти з міопією легкого та середнього ступеня, які тривалий час користуються м'якими контактними лінзами. Контрольна група (КГ) – 13 осіб (24 ока) – пацієнти з міопією легкого та середнього ступеня, що користуються окулярами.

**Результати.** Рівень відновленого глутатіону в ОГ був на 18,3% нижче по відношенню до КГ ( $p < 0,05$ ). Рівень окисленого глутатіону в ОГ був вище на 21%, в порівнянні з показником в КГ ( $p < 0,05$ ). Рівень малонового діальдегіду в ОГ був підвищений на 27,1% по відношенню до КГ ( $p < 0,05$ ). Вміст дієнових кон'югатів в ОГ був підвищений, склав 118% відносно КГ ( $p > 0,05$ ).

**Висновок.** При тривалому носінні м'яких контактних лінз у пацієнтів порушується прооксидантно-антиоксидантна рівновага в тканинах переднього відділу ока, зокрема в рогівці. Відбувається активація вільно-радикальних процесів і зниження антиокисних резервів, що виражається в зменшенні нормального вмісту в сльозі продуктів перекисного окислення ліпідів і порушенні глутатіонового балансу. Подібні метаболічні зміни в оці вимагають застосування антиоксидантної терапії.

Jalbert I., Stapleton F., Efron N. та ін. показали, що щільність кератоцитів в рогівці людини зменшується при тривалому користуванні контактними лінзами внаслідок дисгенезу або апоптозу кератоцитів [12,15,16].

Ряд дослідників виявили в сльозі у користувачів контактними лінзами достовірне підвищення рівня оксиду азоту, що підтримує апоптоз клітин тканин переднього відділу ока [8].

Дослідження складу сльозної рідини у хворих і експериментальних тварин при кератитах і інших захворюваннях дозволило встановити істотний взаємозв'язок між динамікою цих показників і характером клінічних проявів захворювання [3].

Відомо, що сльоза є «індикатором» порушення обмінних процесів при патології органа зору та відображає стан тканин ока, зокрема рогівки [2, 10, 13, 14, 23]. У сльозній рідині містяться різні сполуки: антиоксидантні комплекси, глутатіон, вітамін С, супероксиддисмутаза, лактоферин та інші, які захищають епітелій рогівки від впливу негативних факторів [18].

Глутатіон є основним компонентом тіолової системи, стан якої, як індикатор наявності оксидантного стресу, вивчався при різних патологіях ока [17, 21, 20].

Захисна роль глутатіону полягає в детоксикаційній, антиоксидантній, мембраностабілізуючій функції, протівірусній дії, регуляції запальних та імунних процесів [11, 19, 22].

За результатами експериментальних досліджень у тварин при розвитку кератиту і синдрому сухого ока показано істотне зниження відновного потенціалу тіолових сполук. Зниження рівня відновленої форми глутатіону в рогівці відбувається, більшою мірою, за рахунок прискорення його окислення під впливом оксидантного стресу, що викликає збільшення проникності мембранних структур клітин рогівкового епітелію [3].

Раніше ми вказували на факт підвищення лабільності клітин і клітинних структур при носінні контактних лінз за допомогою вивчення кількості внутрішньоклітинних ферментів в сльозі [1]. Так як при носінні контактних лінз має місце гіпоксія тканин, роль перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) в руйнуванні клітинних мембран вельми ймовірна.

**Мета.** Вивчити показники окисно-відновного потенціалу і маркерів пероксидації ліпідів в сльозі при тривалому носінні м'яких контактних лінз.

#### Матеріал і методи

Дослідження проведені у 33 пацієнтів (64 ока) з міопією легкого та середнього ступеня. Пацієнти були розділені на дві групи. Основна група (ОГ) – 20 осіб (40 очей) – пацієнти з міопією легкого та середнього ступеня, які тривалий час користуються м'якими контактними лінзами. Контрольна група (КГ) – 13 осіб (24 ока) – пацієнти з міопією легкого та середнього ступеня, що користуються окулярами.

Серед 20 пацієнтів основної групи було 13 (65%) жінок і 7 (35%) чоловіків. Середній вік склав 27,45 ( $\pm$ SD 1,43) років, від 17 до 49 років. Тривалість носіння м'яких КЛ склала в середньому 6,6 року ( $\pm$  SD 5,5), від 1 до 22 років. Середня гострота зору без корекції – 0,122 ( $\pm$  SD 0,020), від 0,01 до 0,5, з максимальною корекцією від 0,1 до 1,0, в середньому 0,845 ( $\pm$  SD 0,026). Всі пацієнти практично не пред'являли суб'єктивних скарг, звертались з приводу заміни м'яких контактних лінз. Всі досліджувані використовували м'які контактні лінзи, що відносяться до першої групи за класифікацією FDA – неіонні низькогідрофільні м'які контактні лінзи (до 50% вмісту води).

У контрольній групі було 13 пацієнтів, з них 10 (76,9%) жінок і 3 (23,1%) чоловіка. Середній вік склав 27,69 ( $\pm$  SD 2,0) років, від 20 до 48 років. Гострота зору без корекції в середньому 0,265 ( $\pm$  SD 0,139), від 0,01 до 0,8, з корекцією 0,963 ( $\pm$  SD 0,197), від 0,4 до 1,0.

Сльоза досліджуваних збиралась на фільтрувальний папір і містилась в пробірку Еппендорф. У сльозній рідині визначали вміст глутатіону (відновленої і окисленої форм) і продуктів перекисного окислення ліпідів (малоновий діальдегід, дієнові кон'югати).

Принцип методу визначення відновленого глутатіону. В результаті реакції між глутатіоном та метилгліоксалем в присутності ферменту гліоксілази відбувається утворення кон'югату S-лактоїлглутатіона, що має максимум поглинання при довжині хвилі 240 нм. Для вимірювання використовували спектрофотометр СФ-26 і довжину хвилі 240 нм [4].

Принцип методу визначення окисленої форми глутатіону полягає в тому, що в результаті ферментативного відновлення глутатіону глутатіонредуктазою відбувається окислення відновленої форми НАДФ (НАДФН<sub>2</sub>), зниження кількості якого реєструють спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм.

Діапазон визначеної кількості відновленої і окисленої форми складав від 5 до 200 мкг/мл в досліджуваному розчині. Середнє значення коефіцієнта варіації для визначення глутатіону в зазначеному діапазоні відновленої форми – 4,0%, окисленої форми – 5,0%. Для вимірювань використовували спектрофотометр СФ-26 з робочим діапазоном за шкалою «оптична щільність» в оптимальному інтервалі від 0,1 - 0,5. Вміст глутатіону виражали в мкмоль/л [4,7].

Принцип методу визначення вмісту малонового діальдегіду полягає в тому, що при температурі 100°C в кислому середовищі малоновий діальдегід реагує з 2-тіобарбітуровою кислотою, утворюючи забарвлений триметиновий комплекс з максимумом поглинання при довжині хвилі 532 нм.

Оптичну щільність верхньої фази вимірювали на спектроколориметрі «Specol - 210» при довжині хвилі 535 нм проти бутанола. Коефіцієнт варіації методики – 5,2% [4].

Принцип методу визначення дієнових кон'югатів полягає в тому, що при перекисному окисненні ліпідів на стадії утворення вільних радикалів в молекулах поліненасичених вищих жирних кислот виникає система сполучених подвійних зв'язків, що супроводжується появою нового максимуму в спектрі поглинання 233 нм.

Оптичну щільність досліджуваного розчину вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при 233 нм проти етилового спирту.

Вміст дієнових кон'югатів розраховували з урахуванням молярного коефіцієнта екстинкції

$$2,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$$

і виражали в мкмоль/мл [7].

Аналіз даних проведено з використанням статистичної програми за допомогою пакета SPSS 11.0. Статистичну достовірність відмінностей визначали за критерієм Стьюдента.

#### Результати та їх обговорення

Дані про вміст глутатіону, малонового діальдегіду та дієнових кон'югатів в сльозній рідині пацієнтів основної та контрольної груп представлені в таблиці 1.

Глутатіон є одним з важливих компонентів антиоксидантної системи в організмі. Він існує в окисленій і відновленій формах. Порушення балансу цих форм

глутатіону знижує відновлювальні та захисні властивості даної системи, що може призводити до посилення окислення білкових молекул в тканинах і, відповідно, до їх пошкодження.

Рівень відновленого глутатіону в основній групі (пацієнти, які тривалий час користуються контактними лінзами) становив  $(83,58 \pm 5,18)$  мкмоль/л, що на 18,3% достовірно нижче по відношенню до контрольної групи. Рівень окисленого глутатіону в основній групі був вище на 21%, в порівнянні з показником в контрольній групі ( $p < 0,05$ ).

З огляду на роль глутатіону в процесах детоксикації та стійкості рогівки до різних патологічних впливів, можна вважати, що дисбаланс даної системи призводить до ослаблення захисно-приспосувального потенціалу рогівки та інших структур переднього відділу ока при тривалому носінні м'яких контактних лінз.

Вивчення рівня продуктів пероксидації ліпідів в сльозній рідині показало посилене накопичення продуктів ПОЛ в основній групі в порівнянні з контрольною. Однак ступінь вираженості і статистичної значущості змін первинних і вторинних продуктів ліпопероксидації в сльозній рідині цих пацієнтів був різним.

Так, рівень вторинного продукту ПОЛ малонового діальдегіду в основній групі був статистично значимо підвищений в середньому до  $(6,1 \pm 0,4)$  мкмоль/мл, що склало 127,1% по відношенню до контрольної групи  $(4,8 \pm 0,4)$  мкмоль/мл ( $p < 0,05$ ). Вміст первинних продуктів ПОЛ дієнових кон'югатів в сльозній рідині пацієнтів основної групи був підвищений до  $(0,53 \pm 0,03)$  мкмоль/мл, складаючи 118% щодо контролю  $(0,45 \pm 0,04)$  мкмоль/мл, проте ці зміни не носили статистично значущого характеру ( $p > 0,05$ ). Це може бути пов'язано зі швидкою окислюваністю в сльозі дієнових кон'югатів до вторинних продуктів ліпопероксидації.

Відмічені нами патохімічні відхилення рівня метаболітів в сльозній рідині в умовах застосування контактної корекції можуть бути пов'язані з підвищенням лабільності мембранних компонентів клітини і субклітинних органел. В основі цих порушень, імовірно, лежить недостатня забезпеченість тканини рогівки киснем і утворення, внаслідок цього, недоокислених продуктів метаболізму, таких як альдегіди, кислоти та ін.

Як відомо, в цих умовах відбувається стимуляція процесів перекисного окислення ліпідів, що може призводити до пошкодження ліпідних компонентів мембранних структур. І дійсно, в наших дослідженнях показано, що в сльозній рідині хворих, що користуються контактними лінзами, значимо підвищена концентрація кінцевих продуктів перекисного окислення ліпідів – малонового діальдегіду – на 27,1%, при цьому рівень первинних продуктів ПОЛ в сльозі також має тенденцію до підвищення.

**Таблиця 1.** Вміст глутатіону, малонового діальдегіду та дієнових кон'югатів в сльозній рідині пацієнтів основної та контрольної груп

Біохімічні показники	Статистичні показники	Контрольна група	Основна група
Глутатіон відновлений мкмоль/л	n	24	40
	M	102,32	83,58
	m	6,35	5,18
	p	-	< 0,05
	%	100,0	81,7
Глутатіон окислений	n	24	40
	M	28,02	33,91
	m	2,09	1,89
	p	-	< 0,05
	%	100,0	121,0
Малоновий діальдегід, мкмоль/мл	n	24	40
	M	4,8	6,1
	m	0,4	0,4
	p	-	< 0,05
	%	100,0	127,1
Дієнові кон'югати, мкмоль/мл	n	24	40
	M	0,45	0,53
	m	0,04	0,03
	p	-	> 0,05
	%	100,0	118,0

Примітки: n – кількість обстежених очей; p – рівень значущості відмінностей даних в порівнянні з контролем.

### Висновок

Наші дослідження показали, що при тривалому носінні м'яких контактних лінз у пацієнтів порушується прооксидантно-антиоксидантна рівновага в тканинах переднього відділу ока, зокрема в рогівці. Відбувається активація вільно-радикальних процесів і зниження антиокисних резервів, що виражається в збільшенні нормального вмісту в сльозі продуктів перекисного окислення ліпідів і порушення глутатіонового балансу. Так, нами відзначено зниження в сльозній рідині рівня відновленої форми глутатіону і підвищення окисленої. Ці зміни характеризують зниження відновного статусу глутатіону, а також зниження антиоксидантного потенціалу в передньому відділі ока. Паралельно з цими змінами в оці пацієнтів, які тривалий час носили контактні лінзи, нами відзначено накопичення в сльозній рідині продуктів ПОЛ – малонового діальдегіду і дієнових кон'югатів, що свідчить про активацію в структурах переднього відділу ока процесів пероксидації ліпідів мембран клітин і субклітинних утворень – органел.

Подібні метаболічні зміни в оці вимагають корекції. Тому отримані нами результати свідчать про необхідність і доцільність застосування антиоксидантної терапії.

## Литература

1. **Великсар Т. А.** Влияние использования силикон-гидрогелевых контактных линз на стабильность мембран клеток и субклеточных структур роговичного эпителия / Великсар Т. А., Леус Н. Ф., Гайдамака Т. Б. и др. // Офтальмол. журн. – 2017. – № 6. – С. 7-10.
2. **Волков О. А.** Современное представление о слезной жидкости, значение ее в диагностике / О. А. Волков, Л. К. Мошетьева // Русский медицинский журнал. – 2004. – Т.4. – С.138-140.
3. **Гайдамака Т. Б.** Влияние наличия синдрома сухого глаза на состояние тиоловой системы при эндотоксин-индуцированном кератите в эксперименте / Т.Б. Гайдамака, С. Я. Рафалюк // Офтальмол. журн. — 2014. — № 6. — С. 72-77.
4. Новые методы биохимического анализа // Изд. Ленинградского универ. – 1991. – 395 с.
5. **Терёхина Н. А.** Диагностическая и прогностическая ценность определения активности ферментов слезы при вирусных поражениях глаз/ Н.А. Терёхина, Ю.А. Петрович, Р.А. Батуева, Г.А. Боровик, С.Э. Реук // Тезисы докладов симпозиума с международным участием "Неинвазивные методы исследования". – Москва, 1994. – С. 42-43.
6. **Федоров А. А.** Влияние многолетнего ношения контактных линз на состояние роговицы по данным конфокальной микроскопии / Вестник офтальмологии // А.А. Федоров, Г.Б. Егорова, Н.В. Бобровских // 2008. – №6. – С.25-29.
7. **Bergmeyer H. U.** Methoden der enzymatischen Analyse. – Herausgegeben von H. U. Bergmeyer. – Berlin. – 1986. – S. 2198-2203.
8. **Bhatia R.P.** Indirect evaluation of corneal apoptosis in contact lens wearers by estimation of nitric oxide and antioxidant enzymes in tears / R. P. Bhatia, Shikha Dhawan, H. D. Khanna, D. O. Amitabh // J. Ophthalmol. – 2010. – Vol. 3, №2. – P.66-69. doi: 10.4103/0974-620X.64229
9. **Cavanagh H. D.** Clinical and diagnostic use of in vivo confocal microscopy in patients with corneal disease / H.D.Cavanagh, M. Petroll, H. Alizadeh [et al.] // Ophthalmology. – 1993. – Vol. 100, №10. – P.1444-1453.
10. **Crouch R. K.** Antioxidant enzymes in human tears / R. K. Crouch, P. Goletz, A. Snyder, W. H. Coles // J. Ocul. Pharmacol. – 1991. – Vol. 7, №3. – P. 253-258.
11. **Dickinson D. A.** Cellular glutathione and thiols metabolism / D. A. Dickinson, H. J. Forman // Biochem. Pharmacol. – 2002. – Vol. 64. – P. 1019-1026.
12. **Efron N.** Confocal microscopic observations of stromal keratocytes during extended contact lens wear / N. Efron, I. Perez-Gomez, P. B. Morgan // Clin. Exp. Optom. – 2002. – Vol 85. – P. 156-60.
13. **Ichijima H.** Effect of contact-lens-induced hypoxia on lactate dehydrogenase activity and isozyme in rabbit cornea / H. Ichijima, J. Ohashi, H.D. Cavanagh // Cornea. – 1992. – Vol. 11, №2. – P. 108-113.
14. **Iskeleli G.** Comparison of tear lactate dehydrogenase activities of different types of contact lens wearers and normal control group / G. Iskeleli, Y. Karakoc, B. Akdeniz-Kayhan [et al.] // CLAO J. – 1999. – Vol. 25, №2. – P. 101-104.
15. **Jalbert I.** Effect of lens wear on corneal stroma: Preliminary finding / I. Jalbert, F. Stapleton // Aust. NZJ Ophthalmol. – 1999. – Vol. 27. – P. 211-213.
16. **Kallinikos P.** On the etiology of keratocyte loss during contact lens wear / P. Kallinikos, N. Efron // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2004. – Vol. 45. – P. 3011-3020.
17. **Marchitti S.A.** Ultraviolet radiation: cellular antioxidant response and the role of ocular aldehyde dehydrogenase enzymes / S.A. Marchitti, Y. Chen, D.C. Thompson, V. Vasiliou // Eye Contact Lens. – 2011. – Vol. 37, №4. – P. 206-213. doi: 10.1097/ICL.0b013e3182212642.
18. **Pastori V.** Lactoferrin-loaded contact lenses: eye protection against oxidative stress / V. Pastori, S. Tavazzi, M. Lecchi // Cornea. – 2015. – Vol. 34, №6. – P. 693-697. doi: 10.1097/ICO.0000000000000435.
19. **Pauly A.** Multiple endpoint analysis of the 3D-reconstituted corneal epithelium after treatment with benzalkonium chloride: early detection of toxic damage / A. Pauly, M. Meloni, F. Brignole-Baudouin // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2009. – Vol.50. – P. 1644-1652.
20. **Saijyothi A.V.** Tear fluid small molecular antioxidants profiling shows lowered glutathione in keratoconus / A.V. Saijyothi, J. Fowjana, S. Madhumathi [et al.] / Exp. Eye Res. – 2012. – Vol. 103. – P. 41-46. doi: 10.1016/j.exer.2012.07.010.
21. **Varma S. D.** Role of ultraviolet irradiation and oxidative stress in cataract formation-medical prevention by nutritional antioxidants and metabolic agonists / S. D. Varma, S. Kovtun, K. R. Hegde // Eye Contact Lens. – 2011. – Vol. 37, № 4. – P. 233-245. doi: 10.1097/ICL.0b013e31821ec4f2.
22. **Wu G.** Glutathione metabolism and its implication for health / G.Wu, Y-Z. Fanf, S. Yang // J. Nutrition. – 2004. – Vol.134. – P.489-492.
23. **Ziadi M.** Assessment of induced corneal hypoxia in diabetic patients / M. Ziadi, P. Moiroux, P. d'Athis, A. Bron, J.M. Brun, C. Creuzot-Garcher // Cornea. – 2002. – Vol. 21, №5. – P. 453-457.

Поступила 09.02.2018

## Состояние восстановительного потенциала глутатиона и пероксидации липидов в слезе пациентов, длительное время пользующихся мягкими контактными линзами

Великсар Т.А., Леус М.Ф., Гайдамака Т.Б., Михейцева И.М., Коломийчук С.Г.

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им В.П.Филатова НАМН Украины»; Одесса (Украина)

*Ношение контактной линзы связано с микротравматизацией эпителия роговицы и наличием гипоксии в тканях переднего отдела глаза.*

**Цель.** Изучить показатели окислительно-восстановительного потенциала и маркеров перекисного окисления в слезе при длительном ношении мягких контактных линз.

**Материал и методы.** Пациенты были разделены на две группы. Основная группа (ОГ) – 20 человек (40 глаз) – пациенты с миопией легкой и средней степени, длительное время пользующиеся мягкими контактными линзами. Контрольная группа (КГ) – 13 человек (24 глаза) – пациенты с миопией легкой и средней степени, пользующиеся очковой коррекцией.

**Результаты.** Уровень восстановленного глутатиона в ОГ был на 18,3% ниже по отношению к КГ ( $p < 0,05$ ). Уровень окисленного глутатиона в ОГ был выше на

21%, по сравнению с показателем в КГ ( $p < 0,05$ ). Уровень малонового диальдегида в ОГ был повышен на 27,1% по отношению к КГ ( $p < 0,05$ ). Содержание диеновых конъюгатов в ОГ было повышено, составило 118% относительно КГ ( $p > 0,05$ ).

**Заключение.** При длительном ношении мягких контактных линз у пациентов нарушается прооксидантно-антиоксидантное равновесие в тканях переднего отдела глаза, в частности в роговице. Происходит активация свободно-радикальных процессов и снижение антиокислительных резервов, что выражается в уменьшении нормального содержания в слезе продуктов перекисного окисления липидов и нарушении глутатионового баланса. Подобные метаболические изменения в глазу требуют применения антиоксидантной терапии.

**Ключевые слова:** миопия, мягкая контактная линза, роговица, слеза, глутатион, перекисное окисление липидов, малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты