

УДК 617.7-007.681-021.3+617.741-004.1]:617.749-073.584

## Дослідження оптичної густини внутрішньоочної рідини у пацієнтів з катарактою та первинною відкритокутовою глаукомою за допомогою спектроскопії

В. О. Мельник, канд. мед. наук

ТОВ «Клініка Візіобуд+»  
Київ (Україна)

E-mail: volo777@mail.ru

### Ключові слова:

первинна відкритокутова глаукома, катаракта, спектроскопія, оптична густина, гідродинамічний тиск внутрішньоочної рідини

*Актуальність цієї теми зумовлена стрімким зростанням кількості пацієнтів з глаукомою, а саме первинною відкритокутовою глаукомою (ПВКГ), та відсутністю єдиної теорії розвитку даного захворювання.*

*Мета дослідження.* Порівняти спектри поглинання зразків внутрішньоочної рідини у пацієнтів з діагнозом катаракти та у комбінації з ПВКГ, а також встановити існування відмінностей між параметрами спектра поглинання та наявністю глаукоми.

*Матеріали і методи.* Дослідження проводилося за участі 96 пацієнтів з катарактою та ПВКГ, у яких досліджували спектри поглинання зразків внутрішньоочної рідини (ВОР).

*Результати.* Під час проведення спектроскопії у зразках ВОР було виявлено два піки поглинання: при 202 та 267 нм. На підставі цих даних було зроблено висновки про середню оптичну гуστину ВОР та визначено, що оптична густина ВОР при 202 нм у групі пацієнтів з ПВКГ є вірогідно вищою у порівнянні з пацієнтами, у яких було діагностовано катаракту. Однак при 267 статистично значимої різниці в середній оптичній густині ВОР нм між групами пацієнтів з і без ПВКГ не спостерігається.

*Висновки.* Виявлено статистично значиму різницю оптичної густини ВОР пацієнтів з та без ПВКГ за допомогою методу спектроскопії, який може бути розглянутий як дієвий метод додаткової діагностики таких пацієнтів.

**Актуальність.** Проблема глаукоми є однією з найважливіших в сучасній офтальмології. З кожним роком кількість хворих з первинною відкритокутовою глаукомою (ПВКГ) збільшується [9]. Це може бути пов'язано і з певними демографічними змінами. Населення старішає та поширеність даного захворювання збільшується [6]. Так, у віковій групі до 60 років поширеність глаукоми складає 0,88 на 1000 населення, а у віковій групі 71 рік і старше цей показник досягає 17,4 на 1000 населення [14].

Традиційно зацікавленість офтальмологів у проблемі глаукоми обумовлена різноманіттям клінічних форм, складністю патогенезу, пошуком нових методів ранньої діагностики та лікування, а також високою медико-соціальною значимістю глаукоми [15]. Незважаючи на велику кількість проведених досліджень, в тому числі дослідження змін трабекулярної сітки та особливостей складу внутрішньоочної рідини (ВОР), дотепер не існує єдиної теорії розвитку ПВКГ [16].

Одним з нових напрямків досліджень є протеомний аналіз очної рідини [5]. Серед білків ВОР у пацієнтів з глаукомою ідентифіковано матриксні металопротеїнази [10], які здійснюють лізис базальних мембран і гідроліз всіх існуючих компонентів міжклітинного матриксу і активують пов'язані з ним ангіогенні фак-

тори росту [17]. Також у ВОР таких пацієнтів виділені ангіогенний фактор VEGF [7] та фібронектин [13]. Визначення концентрацій вищезгаданих речовин проводилося за допомогою низки аналітичних методів, в тому числі високоефективної рідинної хроматографії з електрохімічним детектуванням [11], ензиматичних [4], спектроскопічних методів [12], більшість з яких є технічно трудомісткими та потребують спеціального обладнання, або ж дають змогу визначити лише 1-2 речовини одночасно.

Деякі речовини внутрішньоочної рідини поглинають світло в УФ-спектрі в діапазоні хвиль довжиною 200-300 нм, зокрема, білки (а саме, амінокислотні залишки тирозину, триптофану та фенілаланіну), аскорбінова кислота і глутатіон і тому УФ-спектр може розглядатися як інтегральна характеристика вмісту метаболітів у ВОР [16]. Дана робота була присвячена виявленню відмінностей між спектром поглинання ВОР у пацієнтів з катарактою та її комбінацією з ПВКГ.

**Метою** роботи було порівняти спектри поглинання зразків ВОР у пацієнтів з діагнозом катаракти та її комбінацією з ПВКГ, а також встановити існування відмінностей між параметрами спектра поглинання (по-

ложенням піків на спектрі та оптичною густиною ВОР при довжинах хвиль цих піків) та наявністю глаукоми.

### Матеріал і методи

У дослідженні брали участь 96 пацієнтів (96 очей), серед них 60% (58 пацієнтів) – жінки, середній вік яких становив 66,9 роки, 40% (38 пацієнтів) – чоловіки, середній вік – 65,2 роки. Хворі були поділені на дві групи. До першої групи увійшли 60 пацієнтів (60 очей) з катарактою, котрим проводили факоемультсифікацію (ФАКО) катаракти з імплантацією інтраокулярної лінзи (ІОЛ) за стандартною методикою. Другу групу склали 36 пацієнтів (36 очей) з катарактою та ПБКГ, яким виконували комбіноване оперативне лікування: модифікована тунельна трабекулопунктура (МТТП) та ФАКО з імплантацією ІОЛ. Згідно з класифікацією Нестерова-Буніна, у 19 пацієнтів (52,7%) було діагностовано глаукому II стадії, у 7 пацієнтів (19,4%) – III стадії, у 10 пацієнтів (27,9%) – I стадії (рис.1) З нормальним внутрішньоочним тиском було 9 пацієнтів (25%), з помірно підвищеним – 16 (44,4%) та з високим – 11 (30,6%).

Хворі обох груп були оглянуті в період від 1 тижня до 1 місяця до операції. У передопераційному періоді вони отримували різні види місцевої медикаментозної гіпотензивної терапії з різною кратністю та тривалістю закапування. Також всі пацієнти для попередження розвитку інфекційних ускладнень отримували інстиляції антибактеріальних препаратів (Офтаквікс – левофлоксацин; Santen, Фінляндія) в передопераційному періоді та інстиляції препаратів для місцевої анестезії (Алкаїн – Проксиметоканін; Alcon, США) під час операції.

Відбирали ВОР об'ємом 10-200 мкл інтраопераційно перед проведенням екстракції катаракти. Відбір проводили стерильним інсуліновим шприцом з голкою 26 gauge через перший парацентез, після чого рідину переносили в стерильну пробірку Епендорф і передавали в лабораторію. Перед процедурою забору ВОР

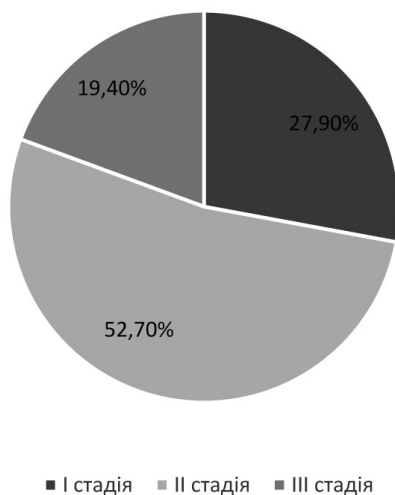


Рис. 1. Розподіл пацієнтів другої групи за стадіями глаукоми

очну поверхню промивали фізіологічним розчином та осушували за допомогою стерильного операційного матеріалу. В післяопераційному періоді у жодного з пацієнтів не було відмічено ускладнень, що могли бути пояснені інтраопераційною контамінацією.

Зразки зберігали в холодильнику при температурі +5° С без попереднього заморожування чи стерилізації. Час, що пройшов з моменту їх відбору до моменту дослідження, вимірювали та фіксували. Якщо не вказано іншого, аналіз проводили через 24 години після відбору зразків.

Спектри поглинання зразків ВОР (виражені як залежність оптичної густини розчину в безрозмірних одиницях логарифмічної шкали від довжини хвилі випромінювання в нанометрах) вимірювали в діапазоні довжин хвиль 190-1100 нм за допомогою спектрофотометра Specord 210 AnalyticJena AG (Німеччина). Порцію 10–100 мкл рідини (залежно від наявної кількості) вміщували в кварцову кювету товщиною 10 мм, об'єм доводили до 2 мл фізіологічним розчином (0,9% розчином хлориду натрію в дистильованій воді) та ретельно перемішували. Аналогічну кювету заповнювали чистим фізіологічним розчином, відносно якого вимірювали оптичну густина. Між вимірюваннями різних зразків кювету кілька разів промивали фізіологічним розчином (у спектрі чистого фізіологічного розчину в кюветі після такого промивання не спостерігалися піки, характерні для досліджуваних зразків).

Враховуючи, що точні концентрації у ВОР речовин, які поглинають, невідомі, а коефіцієнти їхньої екстинкції можуть істотно відрізнятися, для порівняння зразків оптичну густина проби перераховували на умовну оптичну густина нерозведеної ВОР, яка далі по тексту позначається як оптична густина ВОР. Оптичну густина ВОР при довжині хвилі  $\lambda$  визначали за формулою (обговорення застосованих рівнянь наведено в розділі «Результати та обговорення»):

$$A_{\lambda} = A_{\lambda, \text{розв}} V_{\text{розв}} V_{\text{проби}}$$

де  $A_{\lambda, \text{розв}}$  – оптична густина розведеної ВОР при довжині хвилі  $\lambda$ .

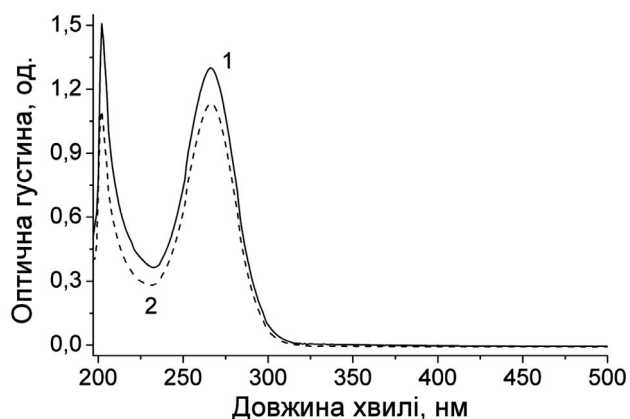
$V_{\text{розв}}$  (мкл) – об'єм розведеної рідини в кюветі (2000 мкл у всіх зразках),

$V_{\text{проби}}$  (мкл) – об'єм порції досліджуваної рідини.

Статистичну обробку значень оптичної густини ВОР проводили шляхом порівняння довірчих інтервалів ( $p < 0,05$ ) середніх значень у межах груп, а також використовуючи t-критерій Стьюдента.

### Результати

Під час проведеного дослідження було виявлено, що в електронному спектрі поглинання ВОР у пацієнтів обох груп в УФ ділянці (типовий спектр поглинання зразка ВОР наведено на рис.2) спостерігається смуга поглинання в діапазоні 230-300 нм, з максимумом поглинання при  $267 \pm 1$  нм. Між 190 та 220 нм було також відмічено наявність смуги поглинання з максимумом при  $202 \pm 1$  нм. Наявність таких смуг може по-

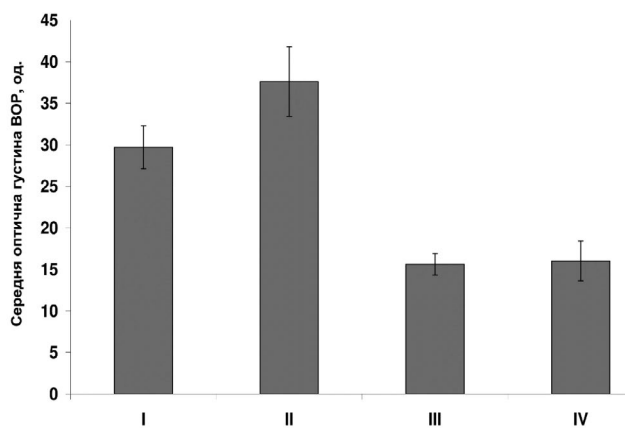


**Рис. 2.** Типові спектри поглинання досліджених зразків внутрішньоочної рідини кожної з досліджених груп (1 – пацієнти з катарактою та первинною відкритокутовою глаукомою, 2 – лише з катарактою). Зразки розведено в 20 разів

яснюватися поглинанням УФ-випромінювання ароматичними кільцями та системами спряжених подвійних зв'язків (електронні переходи типу  $\pi-\pi^*$ ) в органічних частинках [8], що є у ВОР, а також поглинанням УФ-випромінювання фрагментами органічних молекул з насиченими (переходи типу  $\sigma-\sigma^*$ ) або неспряженими подвійними зв'язками (переходи типу  $\pi-\pi^*$ ). Постійність форми спектра та положення максимумів смуг поглинання ( $202\pm 1$  і  $267\pm 1$  нм) у зразках різних пацієнтів може свідчити про якісну сталість зразків ВОР. Однак кількісні показники концентрацій складових ВОР у зразках різних пацієнтів згідно з отриманими даними – відрізняються.

Оптична густина ВОР при довжині хвилі 202 нм у пацієнтів першої групи знаходилася в межах від 10,0 до 73,1 од., другої групи – від 21,0 до 80,6 од.; при довжині хвилі 267 нм у пацієнтів першої групи – від 2,4 до 60,0 од., другої групи – від 5,4 до 30,2 од. Середнє значення оптичної густини ВОР при довжині хвилі 202 нм у пацієнтів першої групи становило  $29,7\pm 2,6$  од. (рис. 3), у пацієнтів другої групи –  $37,6\pm 4,2$  од., що на 27% більше, ніж у пацієнтів першої групи ( $p < 0,05$ ). Середнє значення оптичної густини ВОР при довжині хвилі 267 нм у пацієнтів першої групи становило  $15,6\pm 1,3$  од., у пацієнтів другої групи –  $16,0\pm 2,4$  од., тобто статистично значимої різниці середнього значення оптичної густини при 267 нм між першою та другою групами не спостерігається.

Згідно з законом Бугера-Ламберта-Бера, оптична густина розчину  $A_\lambda$  при довжині хвилі  $\lambda$  лінійно залежить від концентрації речовини, що поглинає випромінювання [8]. Різниця в середній оптичній густині ВОР при довжині хвилі максимуму піка  $202\pm 1$  нм між пацієнтами першої групи (лише катаракта) та другої (ПВКГ та катаракта) відповідає більш високому середньому вмісту органічних речовин, що поглинають



**Рис. 3.** Порівняння середніх оптичної густини внутрішньоочної рідини при довжинах хвиль максимумів піків у пацієнтів; I та III – пацієнти з катарактою (пік при 202 та 267 нм, відповідно), II та IV – пацієнти з катарактою та первинною відкритокутовою глаукомою (пік при 202 та 267 нм, відповідно)

при 202 нм, у ВОР пацієнтів, що мають діагноз ПВКГ та катаракта, порівняно з хворими лише з катарактою. Враховуючи, що ймовірною причиною підвищення ВОР при глаукомі є уповільнення відтоку рідини через трабекулу [3] (внаслідок збільшення об'єму клітин, що вистилають структури трабекулярної сітки і Шлеммового каналу [1], накопичення екстрацелюлярного матеріалу в просвітах трабекулярної сітки, а також втрати нею клітин [2]), підвищення концентрації органічних сполук у ВОР може також бути пов'язано з пониженням швидкості їхнього видалення з її відтоком при збереженні незмінної швидкості їхнього утворення.

### Обговорення

Різниця в оптичній густині ВОР при 202 нм у двох досліджуваних групах може свідчити про різну сумарну концентрацію речовин, що поглинають при цій довжині хвилі. У пацієнтів з ПВКГ виявлена достовірно вища оптична густина ВОР при 202 нм у порівнянні з групою пацієнтів без даного захворювання, що може бути обумовлено накопиченням метаболітів у ВОР пацієнтів з глаукомою та, в свою чергу, бути викликано уповільненням її відтоку у цих пацієнтів. Однак слід відмітити, що середня оптична густина ВОР при 267 нм у пацієнтів двох груп статистично значимо не відрізнялася.

Рівняння Бернуллі описує зв'язок між швидкістю течії певної рідини та її тиском. Швидкість течії рідини в певній системі трубок залежить від густини розчину, яка, як попередньо показано у проведеному дослідженні, лінійно залежить від концентрації речовин, що складають розчин. Отже, беручи до уваги вищезгадане рівняння Бернуллі та закон Бугера-Ламберта-Бера, можна зробити висновок, що підвищення густини розчину призводить до уповільнення току рідини, а отже і до підвищення гідродинамічного тиску на стінку трубки.

Враховуючи той факт, що шлях відтоку рідини очного яблука можна розглядати як систему трубок різного діаметру, де рух рідини забезпечується різницею тиску на початку і в кінці системи, залежність гідродинамічного тиску рідини від густини і швидкості її току може бути застосована для опису руху рідини в очному яблуці.

#### Висновки

В ході проведеного дослідження було виявлено дві смуги поглинання в діапазоні 190-300 нм. Форма та положення максимумів та форм даних смуг у більшості випадків була однаковою у пацієнтів обох груп. Така подібність може бути пояснена тим, що поглинання випромінювання в зразках різних пацієнтів зумовлене одними й тими ж речовинами і близькістю співвідношень їхніх концентрацій. Але слід відмітити, що середня оптична густина ВОР при 202 нм у групі пацієнтів з ПВКГ є достовірно вищою у порівнянні з пацієнтами першої групи. Однак статистично значимої різниці середньої оптичної густини ВОР при 267 нм між групами пацієнтів з і без ПВКГ не спостерігається.

Спектрофотометрію можна розглядати як дієвий інструмент для додаткової діагностики пацієнтів з патологією органу зору.

Також потрібно підкреслити, що дослідження оптичної густини ВОР та визначення концентрації високомолекулярних речовин і їхнього впливу на швидкість току ВОР і її гідродинамічного тиску є питанням, яке потребує подальших досліджень в контексті вибору оптимальної тактики лікування пацієнтів з ПВКГ.

#### Література

1. **Al-Aswad L. A., Gong H., Lee D. et al.** Effects of Na-K-2Cl cotransport regulators on outflow facility in calf and human eyes in vitro // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 1999. – Vol.40. – P.1695-1701.
2. **B'Ann True Gabelt, Paul L. Kaufman.** Changes in aqueous humor dynamics with age and glaucoma // *Progress in Retinal and Eye Res.* – 2005. – Vol.24. – P.612-37.
3. **Charles W. McLaughlin, Mike O. Karl, Sylvia Zellhuber-McMillan.** Electron probe X-ray microanalysis of intact pathway for human aqueous humor outflow // *Amer J Physiol Cell Physiol.* – 2008. – Vol.295(1). – P.1083-91.
4. **E. de Berardinis, O. Tieri, A. Polzella and N. Iuglio,** The Chemical Composition of the Human Aqueous Humour in Normal and Pathological Conditions // *Exp Eye Res.* – 1965. – Vol.4. – P.179-186.
5. **Grus D. H., Joachim S. C., Pfeiffer N.** Proteomics in ocular fluids // *Wiley-VCH.* – 2007. – Vol. 1(8). – P.876-888. doi: 10.1002/prca.200700105.
6. <http://cyberleninka.ru/article/n/neyrodegenerativnye-izmeneniya-u-bolnyh-pervichnoy-otkrytougolnoy-glaukomoy>
7. **Hu D. N., Ritch R., Liebmann J., Liu Y., et al.** Vascular endothelial growth factor is increased in aqueous humor of glaucomatous eyes // *J Glaucoma.* – 2002. – Vol.11 (5). – P.406-410. doi: 10.1097/0061198-200210000-00006
8. **O. V. Sverdlova.** Electronic spectra in organic chemistry // *L Chemistry.* – 1985. – Vol.2. – P.248 [Russian]
9. **Quigley H. A., Broman A. T.** The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020 // *Br. J. Ophthalmol.* – 2006. – Vol. 90. – P. 262-267.
10. **Scholtzer-Schrehardt U., Lommatzsch J., Kuchle M. et al.** Matrix metalloproteinases and their inhibitors in aqueous humor of patients with pseudoexfoliation syndrome/glaucoma and primary open-angle glaucoma // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2003. – Vol.44 (3). – P.1117-1125.
11. **Stuart P. Richer, Rose R. C.** Water soluble antioxidants in mammalian aqueous humor: interaction with UV B and hydrogen peroxide // *Vis Res.* – 1998. – Vol.38. – P.2881-88.
12. **Tiago dos Santos Prata, Eduardo Vitor Navajas, Luiz Alberto Soares Melo Jr. et al.** Aqueous humor protein concentration in patients with primary open-angle glaucoma under clinical treatment // *Arq Bras Ophthalmol.* – 2007. – Vol.70 (2). – P.217-20.
13. **Vesaluoma M., Mertaniemi P., Mannonen S. et al.** Cellular and plasma fibronectin in the aqueous humor of primary open-angle glaucoma, exfoliative glaucoma and cataract patients // *Eye.* – 1998. – Vol.12 (5). – P.886-890.
14. **Алексеев В. Н., Малеванная О. А.** Исследование качества жизни больных ПОУГ // *Глаукома: проблемы и решения: Всерос. науч.-практ. конф.: сб. науч. ст. – М., 2004. – С. 389-393*
15. **Егоров Е. А., Ставицкая Т. В., Налобнова Ю. В.** Электрофизиологические и психофизиологические методы исследования в ранней диагностике глаукомы // *Клин. офтальмология.* – 2003. – Т. 4. – №2. – С. 68-70.
16. **Колотілов С. В., Мельник В. О.** Порівняння спектроскопічних властивостей внутрішньоочної рідини у хворих з катарактою і первинною відкритокутовою глаукомою // *Фізіол. журнал.* – 2016. – Т. 62. - № 5. – С. 62-69.
17. **Соловьева Н. И.** Основные металлопротеиназы соединительнотканного матрикса // *Биоорганическая химия.* – 1994. – Т. 20. – № 2. – С. 143-152.

Поступила 21.03.2017

## Исследование оптической плотности внутриглазной жидкости у пациентов с катарактой и первичной открытоугольной глаукомой с помощью спектроскопии

В. О. Мельник

ООО «Клиника Визиобуд +»; Киев (Украина)

**Актуальность** темы обусловлена стремительным ростом количества пациентов с первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ), а также отсутствием единой теории развития данного заболевания.

**Цель.** Сравнить спектры поглощения образцов внутриглазной жидкости (ВГЖ) у пациентов с диагнозом катаракта и ее комбинацией с ПОУГ, а также установить существование отличий между параметрами спектров поглощения и наличием глаукомы.

**Материал и методы.** Исследование проводилось при участии 96 пациентов с катарактой и ПОУГ, у которых исследовался спектр поглощения образцов ВГЖ.

**Результаты.** Во время проведения спектроскопии в образцах ВГЖ пациентов было выявлено два пика по-

глощения: при 202 и 267 нм. На основе этих данных сделан вывод об оптической плотности ВГЖ и показано, что оптическая плотность ВГЖ при 202 нм в группе пациентов с ПОУГ является достоверно выше в сравнении с пациентами, у которых была диагностирована катаракта. Однако при 267 нм статистически значимой разницы средней оптической плотности ВГЖ между группами с и без ПОУГ выявлено не было.

**Выводы.** Определена статистически значимая разница в оптической плотности ВГЖ у пациентов с и без ПОУГ при помощи метода спектроскопии, который может рассматриваться как действенный метод дополнительной диагностики таких пациентов.

**Ключевые слова:** первичная открытоугольная глаукома, катаракта, спектроскопия, оптическая плотность, гидродинамическое давление внутриглазной жидкости