

*С.Н. Позняк, Н.И. Позняк, Е.В. Барковский, Е.С. Лобанок, Т.В. Лаврукевич*

## **Ультразвук факоэмульсификатора и состояние клеточных мембран**

*Белорусский государственный медицинский университет ИП «Новое Зрение»,  
РДУП «МТЗ Медсервис»*

Факоэмульсификационная техника удаления катаракты становится все более популярной среди офтальмохирургов. Это обусловлено щадящей, малоинвазивной техникой экстракции катаракты. Однако, нередко хирурги при выполнении оперативных вмешательств с применением ультразвуковой технологии сталкиваются с достаточно серьезным осложнением со стороны эндотелия роговицы и, как следствие, с возникающими проблемами у пациентов [1]. В настоящее время известно, что одним из факторов, вызывающих повреждение эндотелиальных клеток роговицы, выступают свободные радикалы, активно генерирующиеся в среду во время работы ультразвукового наконечника прибора [4,5,8,9,12].

Литературные данные также свидетельствуют о том, что ряд препаратов обладает ингибирующим эффектом на генерацию свободных радикалов во время факоэмульсификации и защищает эндотелий роговицы во время оперативного вмешательства [3,10]. Следует отметить, что подобная точка зрения принимается не всеми исследователями [6].

Целью нашего исследования являлось изучение влияния ультразвука на состояние клеточных мембран лимфоцитов в ирригационном сбалансированном растворе с присутствием эмоксипина и без наличия ингибитора свободных радикалов.

### **Материал и методы**

В качестве ирригационного раствора использовался сбалансированный солевой раствор с рН 7,2-7,4.

В ирригационный раствор вводили лимфоциты периферической крови человека.

Лимфоциты периферической крови человека выделяли по методу [2] с некоторыми модификациями. Свежую венозную кровь в количестве 50 мл и 10 мл консерванта выдерживали 2-3 часа при 37°C для оседания эритроцитов. Далее взвесь над слоем осевших эритроцитов отсасывали пипеткой в отдельную пробирку и разводили забуференным фосфатами физиологическим раствором в отношении 1:2. Разведенную суспензию осторожно наслаивали на 3 мл раствора фиколл-верографина с градиентом плотности 1,077 г/см (16 частей 9% раствора фиколла смешивали с 7 частями 36,17% раствора рентгеноконтрастного вещества верографин), Для разделения клеток в одноступенчатом градиенте плотности фиколл-верографина суспензию центрифугировали (400 g, 20 мин). После чего с интерфазы отбирали слой мононуклеарных клеток и отмывали 3 раза в забуференном фосфатами физиологическом растворе по 7 минут при 400g. Отмытые лимфоциты суспендировали в сбалансированном солевом растворе рН 7,2-7,4 растворе «Квинтасоль». Чистота фракции лимфоцитов обычно составляла 90-96% и жизнеспособность по тесту с трипановым синим равнялась 95%. Концентрацию клеток в суспензиях подсчитывали в камере Горяева.

Для исследования изменения микровязкости мембран лимфоцитов

периферической крови человека использовали флуоресцентный зонд пирен (SIGMA) в концентрации 10 мкм (конечная концентрация).

Измерения проводились на спектрофлуориметре "Solar" (ЗАО «Спектроскопия, оптика и лазеры – авангардные разработки», Беларусь) при длине волны возбуждения = 335 нм, диапазон длин волны регистрации – 350-500 нм, ширине щелей монохроматоров возбуждения и эмиссии – 2 нм. Степень эксимеризации вычисляли как отношение интенсивностей флуоресценции при 480 нм к 396 нм. Ультразвуковое облучение (100.0%, 35 WATT, 45 KHz) выполняли на фактоэмульсификаторе «Универсал» (Алкон) в течение 30, 60 и 90 секунд без антиоксиданта и в присутствии антиоксиданта метилэтилпиридина (эмоксипина) в конечной концентрации 0,1%.

#### Результаты и обсуждение

Как известно, пирен при добавлении к соответствующим структурам диффундирует главным образом между углеводородными цепями липидов [1]. При этом он способен образовывать долгоживущие (10-7сек) эксимеры. Реакция образования эксимера пирена лимитируется скоростью диффузии в области жирнокислотных цепей липидов, что позволяет исследовать текучесть мембран по отношению  $I_{\text{эксимер}}/I_{\text{мономер}}$ , которое зависит от гидрофобного объема доступного для пирена, а также от подвижности углеводородных цепей липидов.

На рисунке 1 представлен спектр флуоресценции пирена, встроенного в липидную фазу мембран лимфоцитов (длина волны возбуждения = 336 нм).

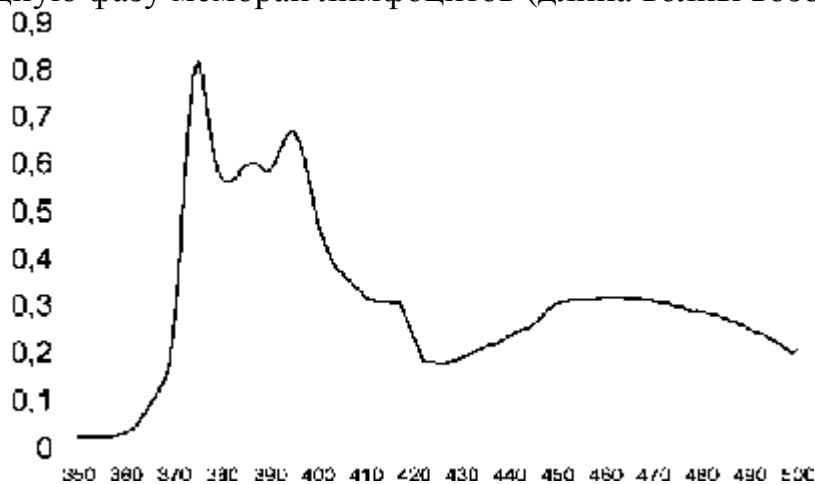


Рис.1. Спектр флуоресценции пирена в лимфоцитах в сбалансированном солевом растворе pH 7,2.

В спектре различаются три пика с положением максимумов при 375 нм, 396 нм, обусловленные флуоресценцией мономерной формы пирена [1] и пик с максимумом при 460-470 нм, появление которого связано с флуоресценцией эксимерной формы.

На рисунке 2 представлены данные, отражающие зависимость степени эксимеризации пирена в мембранах лимфоцитов периферической крови человека от длительности облучения ультразвуком в среде без эмоксипина (б) и в присутствии эмоксипина (а).

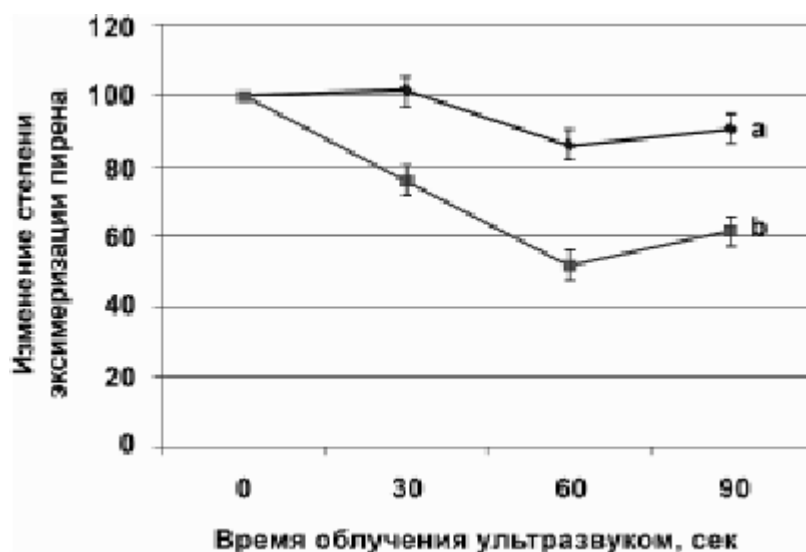


Рис.2. Зависимость степени эксимеризации пирена, встроенного в мембраны лимфоцитов периферической крови человека, от длительности облучения ультразвуком в среде без эмоксипина (б) и в присутствии эмоксипина (а).

Данные на рис.2 свидетельствуют, что при воздействии ультразвука на лимфоциты периферической крови степень эксимеризации пирена выше в лимфоцитах в среде в присутствии водорастворимого антиоксиданта эмоксипина (а), а в отсутствие эмоксипина происходит выраженное снижение степени эксимеризации пирена, встроенного в мембраны лимфоцитов (б). Представленные результаты, на наш взгляд, позволяют заключить, что в гидрофобной зоне лимфоцитов под влиянием увеличения длительности ультразвука происходит снижение текучести мембран, причем более выраженное в случае отсутствия антиоксиданта эмоксипина.

Известно, что эффективность образования эксимеров пирена в мембранах определяется не только текучестью, но и объемом жидкой фазы гидрофобной области фосфолипидного бислоя в котором растворен флуоресцентный зонд. В биологических мембранах изменение белок-липидных взаимодействий, приводящее к изменению доступного для зонда объема может привести к изменению эксимеризации зонда [1].

Сравнение колебательных полос 376/396 в спектрах флуоресценции пирена, встроенного в мембраны лимфоцитов в присутствии и отсутствии эмоксипина не различается, что указывает на отсутствие изменения полярности микроокружения зонда в мембранах лимфоцитов под влиянием ультразвука.

Сравнение спектральных характеристик пирена, отражающих степень эксимеризации (рис.2), на наш взгляд, позволяет высказать суждение о том, что в мембранах лимфоцитов при ультразвуковом облучении происходит структурная реорганизация мембран, направленная в сторону уменьшения текучести липидного бислоя, что может быть связано с действием свободных радикалов. Следует отметить, что при введении антиоксиданта эмоксипина наблюдается снижение чувствительности мембран лимфоцитов к повреждающему воздействию ультразвукового облучения.

В литературе последних лет приводятся результаты, подтверждающие появление свободных радикалов в сбалансированном солевом растворе под

влиянием ультразвука [8]. Авторы воздействовали 100% ультразвуком на раствор в течение 20 секунд и при проведении ЭПР-спектроскопии было установлено появление характерных сигналов, соответствующих гидроксильным радикалам, интенсивность образования которых ингибировалась добавлением вискоэластиков “Healon” и “Viscoat”.

В подобных исследованиях авторами [11,12] подтверждено образование свободных радикалов под влиянием ультразвука и уменьшение их концентрации под влиянием водорастворимого антиоксиданта глутатиона в концентрации 10<sup>-3</sup>-10<sup>-2</sup>М. При этом было высказано мнение, что ультразвук во время факоэмульсификации может оказывать повреждающее действие на клетки эндотелия роговицы.

Приводятся сведения о том, что аскорбиновая кислота в ирригационном растворе может защищать эндотелиальные клетки в ходе факоэмульсификационной хирургии в результате ее ингибирующего влияния на свободные радикалы [7].

Приводимые нами данные подтверждают мнение авторов о появлении в среде свободных радикалов под влиянием ультразвука [8,11,12] и характер изменений текучести мембран лимфоцитов в присутствии антиоксиданта эмоксипина, по-видимому, отражает его тормозящее влияние на генерацию свободных радикалов.

Возрастающий поток факоэмульсификационной техники экстракции катаракты ставит на повестку дня необходимость включения антиоксидантов в ирригационный раствор с целью профилактики осложнений со стороны роговицы.

Таким образом, введение антиоксиданта метиэтилпиридина (эмоксипина) в солевой сбалансированный раствор защищает мембраны клеток от повреждающего действия ультразвука.

### **Литература**

1. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран.-М.:Наука, 1980.-320 с.
2. Хейфиц Л.Б., Абалкин В.А. Выделение форменных элементов крови человека в градиенте верографин-фиколл // Лаб.дело.-1973.-№10. – С.579-581.
3. Augustin A.J., Dick H.B. Oxidative tissue damage after phacoemulsification: influence of ophthalmic viscosurgical devices// J Cataract Refract Surg.-2004.-Vol.30.-N2.-P.424-427
4. Cameron M.D., Poyer I.F., Aust S.D. Identification of free radicals produced during phacoemulsification// J Cataract Refract Surg.-2001.-Vol. 27.-N3.-P.463-470.
5. Egashira T., Takayama F. Free radicals and oxidative stress: targeted ESR measurement of free radicals// Nippon Yakurigaku Zasshi.-2002.-Vol.120.-n4.-P.229-236.
6. Puckett T.R., Peele K.A., Howard R.S, Kramer K.K. Intraocular irrigating solutions: a randomized clinical trial of balanced salt solution plus and dextrose bicarbonate lactated Ringers solution// Ophthalmology.-Vol.102.-N.3.-P.291-296.
7. Rubowitz A., Assia E.I., Rosner M., Topaz M. Antioxidant protection against corneal damage by free radicals during phacoemulsification// Invest Ophthalmol Vis Sci.-2003.-Vol.44.-N.5.-P.1866-1870.
8. Takahashi H., Sakamoto A., Takahashi R., Ohmura T., Shimmura S., Ohara K. Free radicals in phacoemulsification and aspiration procedures// Arch Ophthalmol.-2002.-Vol.120.-N10.-P.1348-1352.

9. Takahashi H. Free radical development in phacoemulsification cataract surgery// J Nippon Med Sch.-2005.-Vol.72.-N.1.-P.4-12.
10. Takashi H., Suzuki H., Shiwa T., Sakamoto A. Alteration of free radical development by ophthalmic viscosurgical devices in phcoemulsification// J Cataract Refract Surg.-2006.-Vol.32.-N.9.-P.1545-1548.
11. Topaz M., Shuster V., Assia E.I., Meyerstein D., Meyerstein N., Mazor D., Gedanken A. Acoustic cavitation in phacoemulsification and the role of antioxidants// Ultrasound Med Biol.-2005.-Vol.31.-N.8.-P.1123-1129.
12. Topaz M., Motiei M., Gedanken A., Meyerstein D., Meyerstein N. EPR analysis of radicals generated in ultrasound-assisted lipioplasty simulated environment// Ultrasound Med Biol.-2001.-Vol.27.-N.6.-P.851-859.