

УДК 617.713–002.446–085:615.457

**АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ СЛЁЗНОЙ ЖИДКОСТИ НА ФОНЕ ИНСТИЛЛЯЦИЙ БИОПЕЛОИДОВ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ТРАВМАТИЧЕСКОГО КЕРАТИТА**

**Г. С. Фесюнова**, науч. сотр., канд. биол. наук, **Т. Д. Лотош**, ст. науч. сотр., канд. биол. наук, **Е. П. Сотникова**, д-р мед. наук, проф.

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

*Наведені результати дослідження дозволили встановити, що лікувальні інстиляції біопелоїдів при експериментальному травматичному кератиті сприяють нормалізації активності ферментів у слізній рідині та підтверджують позитивну динаміку перебігу запального процесу.*

**Ключові слова:** біопелоїди, травматичний кератит, слезна рідина, активність ферментів, експеримент

**Ключевые слова:** биопелоиды, травматический кератит, слёзная жидкость, активность ферментов, эксперимент

**Введение.** В последние годы возросло число публикаций по биохимическим исследованиям слёзной жидкости (СЖ). Это связано, в первую очередь, с новыми данными о влиянии слезы на метаболизм роговицы, а также с выявлением диагностической ценности этих исследований в офтальмологии [9, 10, 11, 12].

СЖ представляет собой смесь секретов, продуцируемых различными железами (слезной, мейбомиевыми). В норме в ней содержатся неорганические электролиты ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$  и др. ионы), а также низко- и высокомолекулярные органические вещества (белки, аминокислоты, глюкоза, мочевины и др.). Большой процент составляют ферменты, участвующие в различных обменных процессах: лактатдегидрогеназа (ЛДГ), глутаматдегидрогеназа, пируваткиназа, щелочная фосфатаза (ЩФ), кислая фосфатаза (КФ) и др. [7].

Работами отечественных и зарубежных авторов показано, что при многих патологических состояниях органа зрения, в частности, при воспалительных заболеваниях конъюнктивы и роговицы, химический состав СЖ изменяется [4, 9, 11, 12, 15]. В связи с этим, изучение ферментативной активности СЖ весьма перспективно и актуально не только для вспомогательной диагностики, но и для оценки эффективности проводимого лечения, а также прогнозирования ряда патологических процессов в офтальмологической практике (заболевания конъюнктивы и роговицы, сетчатки, глаукома и др.).

Определение ЛДГ в СЖ — чувствительный метод для выявления незначительных повреждений роговицы. ЛДГ отражает степень выраженности гликолиза и состояние окислительно-восстановительных процессов в организме. Повышение активности ЛДГ свидетельствует о повреждении клеток, приводящем к цитолизу (некрозу) и утрате цито-

плазмы, а также об активации процессов с аэробным типом метаболизма. Именно этот показатель используется для прогноза рецидива герпеса роговицы при клинически нормальном ее состоянии, когда другими методами исследования он ещё не прогнозируется [7, 12].

Фермент ЩФ локализуется в основном в клеточной мембране и попадает в слезу, главным образом, из эпителиальных клеток протоков слёзных желез. При развитии патологического процесса в глазу активность ЩФ в СЖ снижается [7, 14].

Отдельную группу органоспецифических ферментов составляют лизосомальные ферменты или кислые гидролазы, которые в норме содержатся в специальных внутриклеточных органеллах — лизосомах, где происходит переваривание высокомолекулярных веществ — белков, гликопротеидов, нуклеиновых кислот и т.д. Выход лизосомальных ферментов в СЖ считается признаком глубокого повреждения клеток. КФ используется в качестве маркера лизосомальных ферментов. Увеличение ее содержания рассматривается как неспецифический признак воспаления [3].

Слёзная плёнка — первый барьер защиты тканей глаза от окислительного стресса, вызываемого факторами окружающей среды. Антиоксиданты слезы могут принимать участие в регуляции заживления роговичной раны, модуляции воспалительного ответа, а также способствовать стабильности слёзной плёнки [9, 10, 11]. Е. Н. Севастьяновым (2003) было выявлено повышение активности каталазы, пероксидазы в слезе и одновременное снижение активности супероксиддисмутазы и глутатионредуктазы при различных стадиях течения кератоконуса. У пациентов с травмой роговицы в корнеосклеральной области

© Г. С. Фесюнова, Т. Д. Лотош, Е. П. Сотникова, 2010

выявлено повышение активности супероксид-дисмутазы и каталазы [13].

Таким образом, антиоксиданты могут служить маркерами повреждения тканей и их можно использовать как неспецифический показатель для характеристики патологического процесса, протекающего в глазу.

**Целью исследований** явилось изучение влияния инстилляций биопелоидов на активность ферментов (ЛДГ, ЩФ, КФ, каталаза) в СЖ при воспроизведении травматического кератита у кроликов.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Моделирование травматического кератита проводилось согласно методическими рекомендациям Фармцентра МЗ Украины [16]. Эксперимент поставлен на 14 кроликах породы шиншилла, массой 2,5–3,5 кг, распределенных поровну на две группы: 1 — контрольная (ежедневные, трехкратные инстилляции физраствора); 2 — опытная (инстилляции биопелоидов по той же схеме) на протяжении 10 дней. Забор СЖ производили перед моделированием травматического кератита (исходный фон), в 1-й день (через 3 часа после травмы), на 3-й, 7-й и 10-й дни посттравматического кератита без использования раздражающих веществ (стимулирующих агентов и антисептиков). Под нижнее веко глаза кролика на 5 мин закладывали стерильные полоски фильтровальной бумаги (предварительно взвешенные) размером 5x10 мм, с последующей элюацией СЖ [7]. В полученном элюате СЖ определяли активность изучаемых ферментов.

Определение ЛДГ проводилось кинетическим ультраферментным методом [5]. Активность каталазы определяли по М. А. Королюк и др. [9]; активность ЩФ — по А. М. Горячковскому [2]; КФ — по В. С. Камышникову [6]. Спектрофотометрические исследования проводились на спектрофотометре СФ-46 и «Спекол-210» (Карл Цейсс, Германия).

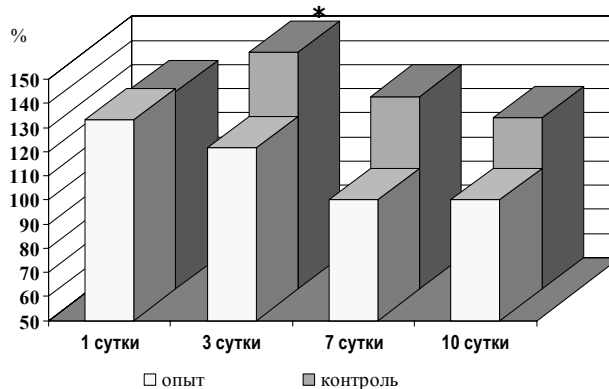
Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась с использованием критерия Стьюдента [1].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.** Полученные данные влияния инстилляций биопелоидов на активность изучаемых ферментов в СЖ при воспроизведении у кроликов травматического кератита представлены на рис. 1, 2, 3, 4.

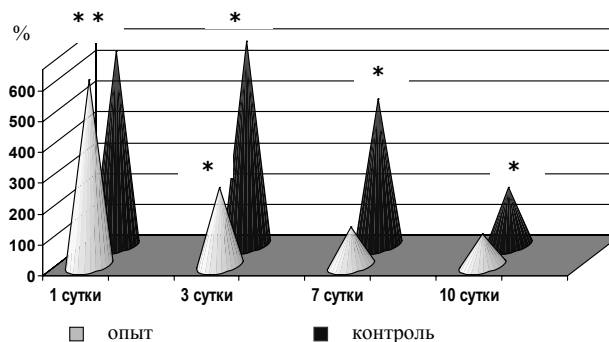
В контрольной группе на 3-й день заболевания активность ЛДГ достоверно возросла в 1,5 раза и до 10-го дня эксперимента наблюдалась тенденция к его увеличению, несмотря на исчезновение клинических признаков воспаления глаз. В опытной группе, на фоне инстилляций биопелоидов, достоверного повышения активности ЛДГ в СЖ не наблюдалось, тенденция к его повышению отмечена лишь в первые три дня. На 7-й день травмы активность фермента соответствовала исходным данным (рис. 1).

В контрольной группе в первый день моделирования травматического кератита наблюдалось достоверное увеличение активности каталазы (в 6,3 раза выше исходных данных). На 3-й день активность фермента по-прежнему оставалась высокой (выше в 6,6 раза). С 7-го дня наблюдалось

снижение активности каталазы и к 10-му дню этот показатель превышал исходные данные в 1,9 раза. В опытной группе на фоне инстилляций биопелоидов активность фермента в первые сутки возросла в 6 раз. Через трое суток показатель превышал исходные данные в 2,5 раза, а на 7-ой день после травмы достоверных различий уже не наблюдалось (рис. 2).



**Рис. 1.** Влияние инстилляций биопелоидов на активность ЛДГ в СЖ кроликов при посттравматическом кератите \* — вероятность по отношению к исходному уровню ( $p < 0,05$ )



**Рис. 2.** Влияние инстилляций биопелоидов на активность каталазы в СЖ кроликов при посттравматическом кератите \* — вероятность по отношению к исходному фону ( $p < 0,05$ );

Таким образом, повышение активности каталазы в первые трое суток в обеих группах вызвано повреждением роговицы и проникновением фермента из её клеток в СЖ. Повышение активности фермента в контрольной группе на 7-е и 10-е сутки на стадии практически полного рубцевания, по-видимому, является компенсаторной реакцией, направленной на снижение свободнорадикального окисления. Тем более, что клинические наблюдения показали, что на 7-е сутки на глазах двух кроликов воспалительный процесс и наличие инфильтрации в зоне травмы сохранялись, что объясняет повышение активности каталазы в СЖ, связанное с развитием локального окислительного стресса. В опытной группе на 7-й и 10 дни наблюдений показатели активности каталазы статистически не от-

личались от исходного фона, что свидетельствует о регулирующем влиянии биопелоидов на антиоксидантную систему. Подтверждением этому служит клиническая картина заживления роговицы. Уже на 4 сутки наблюдалось положительное влияние биопелоидов на репаративные процессы в роговице, что характеризовалось отсутствием гиперемии, отёка, увеличением площади прозрачной роговицы и отсутствием интенсивного помутнения по сравнению с контролем.

При воспроизведении травматического кератита активность ЩФ в СЖ в первый день снижалась как в контрольной группе, так и в опытной — на 34,2% и 32,1% соответственно. К третьему дню в контрольной группе активность фермента снизилась на 59,3 % относительно исходного фона, а в опытной — только на 35,2 %. На 7-й день опыта в контрольной группе сохранялось достоверное снижение активности ЩФ в СЖ на 26,4 % ( $p < 0,05$ ). На 10-й день активность фермента в СЖ опытной группы восстановилась до исходного фона, в то время, как в контрольной группе оставалась сниженной на 19,3 % ( $p > 0,05$ ) — рис. 3.

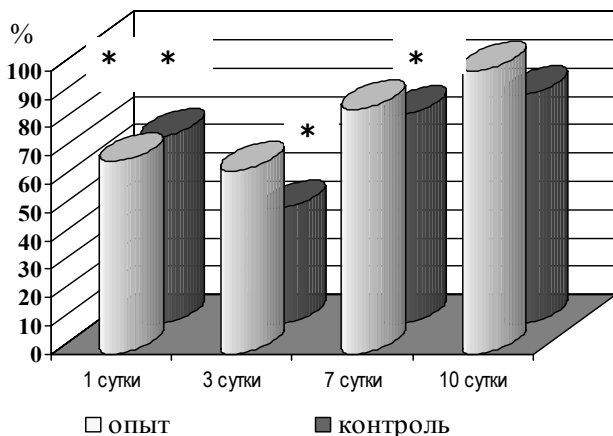


Рис. 3. Влияние инстилляций биопелоидов на активность ЩФ в СЖ кроликов при посттравматическом кератите \* — вероятность по отношению к исходному фону ( $p < 0,05$ )

На фоне травматического кератита в СЖ наблюдается значительное увеличение активности КФ как в контрольной, так и в опытной группах в 2,4 и 2,5 раза, соответственно. На 3-й день инстилляций в контрольной группе показатель активности КФ сохранялся на прежнем уровне, в то время как в опытной группе он практически соответствовал исходным значениям. На 7-й день в контрольной группе сохранялась тенденция к увеличению активности КФ. В опытной группе активность фермента нормализовалась, что свидетельствует о стабилизации лизосомальных мембран тканей глаза и ускорении сроков регенерации под влиянием биопелоидов. Полученные данные подтверждаются и клинической картиной течения посттравматического кератита — рис. 4.

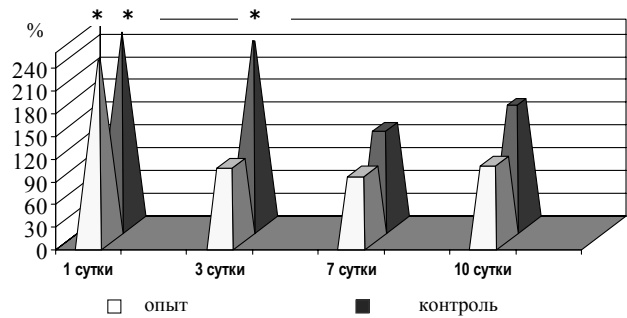


Рис. 4. Влияние инстилляций биопелоидов на активность КФ в СЖ кроликов при посттравматическом кератите \* — вероятность по отношению к исходному фону ( $p < 0,05$ )

## ВЫВОДЫ

1. Установлено, что инстилляций биопелоидов при травматическом кератите приводят к снижению активности ферментов ЛДГ, каталазы, ЩФ и КФ в СЖ практически до уровня исходных данных, что способствует ускорению репаративных процессов.

2. Определение активности ЛДГ, каталазы, ЩФ и КФ в СЖ может быть информативным критерием оценки репаративных процессов в тканях глаза и способствовать обнаружению латентной воспалительной реакции.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика / Гланц С.; [пер. с англ. Ю. А. Данилова]. — М.: Практика, 1999. — 459 с.
2. Горячковский А. М. Клиническая биохимия / Горячковский А. М.. — Одесса: Астропринт, 1998. — С. 269–272.
3. Дингл Дж. Лизосомы. Методы исследования / Дингл Дж. — М.: Мир, 1980. — 342 с.
4. Дрожжина Г. И. Состояние протеиназного-ингибиторной системы и стабильности мембран лизосом при решетчатой дистрофии роговицы, осложненной воспалительным процессом / Г. И. Дрожжина, Н. Ф. Леус, С. Г. Коломийчук // Офтальмол. журн. — 2003. — № 1. — С. 29–34.
5. Інструкція до набору реактивів для визначення загальної активності лактатдегідрогенази (ЛДГ) (кінетичний УФ-метод): ТУ У 24.4–24607793–017–2003. — [чинний від 2003–10–10]. — 3 с.
6. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. / В. С. Камышников. — Минск: Беларусь, 2000. — Т.1. — 495 с.
7. Колединцев М. Н. Современные методы анализа слезной жидкости / М. Н. Колединцев, Н. В. Майчук // Новое в офтальмологии. — 2002. — № 4. — С. 32–37.
8. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 16–19.
9. Макаров П. В. Изучение состояния местной антиоксидантной системы глаза при экспериментальной ожоговой травме роговицы и перспективы фармако-

- логической коррекции её показателей / П. В. Макаров, С. М. Титкова, М. В. Ануров // Вестн. офтальмол. — 2005. — № 6. — С. 40–43.
10. **Макашова Н. В.** Антиоксидантная активность слезной жидкости у больных первичной, открытоугольной глаукомой / Н. В. Макашова, И. В. Бабенкова, Ю. А. Теселкин // Вестн. офтальмол. — 1999. — № 5. — С. 3–4.
11. **Нероев В. В.** Влияние доноров оксида азота нитропруссида NA и L-аргинина на течение увеита, антиоксидантный статус и антипротеолитический потенциал слезной жидкости и крови в эксперименте / В. В. Нероев, Н. Б. Чеснокова, Г. А. Давыдова // Вестн. офтальмол. — № 3. — 2007. — С. 22–25.
12. **Петрович Ю. А.** Биохимия слезы и её изменения при патологии (обзор) / Ю. А. Петрович, Н. А. Терехина // Вопросы медицинской химии. — 1990. — Т. 36. — № 3. — С. 13.
13. **Семесько С. Г.** Клиническое значение исследования антиоксидантного статуса в офтальмологии / С. Г. Семесько // Вестн. офтальмол. — 2005. — № 3. — С. 44–47.
14. **Терехина Н. А.** Активность кислой и щелочной фосфатаз слезы и лимфоцитов периферической крови больных герпетическим кератитом / Н. А. Терехина, Н. Г. Гольдфельд, Р. А. Батуева // Офтальмол. журн. — 1991. — № 4. — С. 216–219.
15. **Чеснокова Н. Б.** Исследование протеолитических ферментов и их ингибиторов в слезной жидкости при воспалительных заболеваниях роговицы ожогового генеза / Н. Б. Чеснокова // Вестн. офтальмол. — 1994. — № 2. — С. 20–23.
16. Экспериментальное изучение безвредности и фармакологической активности глазных лекарственных средств: метод. рекомендации / [Л. А. Чайка, А. Г. Ципкун, Т. Б. Гайдамака и др.]. — К.: Авиценна, 2003. — 43 с.

*Поступила 5.02.2010*

*Рецензент д-р биол. наук, проф. И. П. Метелицына*

### ACTIVITY OF SOME ENZYMES OF THE LACRIMAL LIQUID AGAINST THE BACKGROUND OF BIOPELOIDS INSTILLATIONS IN MODELING OF TRAUMATIC KERATITIS

G. S. Fesyunova, T. D. Lotosh, E. P. Sotnikova

Odessa, Ukraine

The experimental study shows that medical instillations of biopeloids promoted normalization of the enzyme activity in the lacrimal liquid and confirmed positive dynamics of the inflammation process course.

