

УДК 617.713-002:617.764-008.8-07+577.11-085

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ В СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЕРАТИТОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПИОБАКТЕРИОФАГА

В. Н. Сакович, д. м. н., проф., **Гиесми Шираз**, асп.

Днепропетровская государственная медицинская академия

Проведено дослідження активності лізосомальних ферментів в слюзній рідині при лікуванні бактеріальних кератитів із застосуванням піобактеріофагу. У слюзній рідині хворих з кератитом різко збільшується активність маркерних лізосомальних ферментів: їхні показники по відношенню до норми склали для кислоти фосфатази — (210,5 % — 214,0 %), для катепсину Е — (217,1 % — 211,0 %), для РНК-зи — (196,9 % — 201,5 %). Застосування піобактеріофагу в комплексному лікуванні хворих кератитом має виражену мембраностабілізуючу дію, про що свідчить більш низький рівень активності лізосомальних ферментів в слюзній рідині в цих умовах. Активність кислоти фосфатази, катепсину Е і РНК-зи в основній групі склала 114,7 %, 117,1 %, 112,3 %, а в групі порівняння — 140,6 %, 137,8 % і 135,4 % відповідно.

Ключевые слова: бактериальные кератиты, лечение, пиобактериофаг, лизосомальные ферменты

Ключові слова: бактеріальні кератити, лікування, піобактеріофаг, лізосомальні ферменти

Введение. В настоящее время одно из ведущих мест среди причин понижения остроты зрения и слепоты занимают воспалительные заболевания роговой оболочки. Гнойные кератиты являются тяжелой и распространенной патологией, стоят на втором месте после герпетических кератитов среди всех заболеваний роговицы. Эффективность их лечения до настоящего времени остается в значительной мере неудовлетворительной. Актуальность проблемы лечения гнойных кератитов связана с тяжестью их течения, недостаточной эффективностью применяемой антибактериальной терапии и довольно частым применением хирургических методов лечения, что травматично для больного и существенно повышает стоимость лечения [1, 2, 7, 21, 22].

В офтальмологии для лечения больных с кератитами и для терапии исходов заболевания с целью резорбции элементов инфильтрации и помутнений роговицы применяют ферменты, при этом наиболее широко используются препараты протеолитических ферментов (трипсин, химотрипсин, протолизин, папаин, лекозим и др.) [10, 12, 19].

В последнее время большое внимание уделяется также ингибиторам ферментов протеолиза, применяемым для лечения различных офтальмологических заболеваний, в том числе и кератитов. Эти препараты (гордокс, контрикал и аналогичные им), подавляя активность сериновых протеаз, ингибируют активность эндогенной коллагеназы,

уровень которой повышается при воспалительных заболеваниях, включая офтальмогерпес, химических ожогах и деструктивных процессах в роговице. Эти препараты способны подавлять коллагеновую активность и обладают противовоспалительными свойствами, предупреждают лейкоцитарную инфильтрацию и васкуляризацию роговицы, частично снижают негативное действие кортикостероидов, являющихся стимуляторами коллагеназы [7, 10].

В настоящее время очевидны серьезные негативные последствия антибактериальной терапии: развитие дисбактериоза и присоединение грибковой инфекции, рост числа антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов, развитие аллергических реакций [18, 20].

Весьма перспективное использование в качестве антимикробной терапии имеют бактериофаги, широко применявшиеся для лечения кишечных и гнойных инфекций [11, 16, 20].

В наших предыдущих исследованиях мы показали эффективность применения пиобактериофага при лечении кератитов [17].

Цель настоящей работы заключалась в изучении активности лизосомальных ферментов слезной жидкости у больных кератитами при лечении их с применением пиобактериофага для выяснения возможного мембраностабилизирующего действия данного препарата.

© В. Н. Сакович, Гиесми Шираз, 2012

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ. Под нашим наблюдением находились 58 больных (58 глаз) бактериальными кератитами в возрасте от 21 до 78 лет. Мужчин было 30, женщин — 28. Диагноз бактериального кератита был установлен на основе характерной клинической картины болезни, анамнеза и бактериологического обследования. Согласно предложенной ранее классификации бактериальных кератитов [17], нами были пролечены и обследованы больные со средней степенью тяжести (II ст.), у которых отмечалось поражение роговицы от 3 до 6 мм в диаметре с ее поверхностной гнойной инфильтрацией и гипопион до 2 мм высотой, или поражение до 3 мм в диаметре, но с захватом глубоких слоев роговицы и больные с тяжелым течением заболевания (III ст.), при котором имеется поражение роговой оболочки свыше 6 мм в диаметре и гипопион более 2 мм высотой, или поражение роговицы от 3 до 6 мм в диаметре, но с ее глубокой гнойной инфильтрацией.

Офтальмологическое обследование больных проводилось по общепринятым методикам: использовали визометрию, биомикроскопию переднего отдела глаза с помощью щелевой лампы, офтальмоскопию и флюоресциновую пробу для оценки эпителизации роговой оболочки. Бактериальный кератит был определен как гнойный инфильтрат роговицы.

Комплексная терапия всех больных включала: антибиотиков, стимуляторы регенерации роговицы, мидриатики, а также десенсибилизирующие, тканевые препараты, витамины.

Все больные были разделены на две группы: основную (28 больных, 28 глаз) и контрольную (30 больных, 30 глаз). В основной группе в комплексном лечении применяли пробиотик поливалентный пиобактериофаг по 1–2 капли 4–5 раз в день с первого дня поступления в стационар и до выздоровления. Пиобактериофаг поливалентный «Сектафаг» производства ФГУП «НПО Микроген» г. Москва. Имеется разрешение на применение данного препарата в офтальмологии. Препарат зарегистрирован в Украине (№ 163/09–300200000 от 30.10.09).

Сравнительная оценка эффективности лечения в обеих группах проводилась с учетом сроков эпителизации роговой оболочки, резорбции инфильтратов, исчезновения перикорнеальной инъекции, динамики остроты зрения и затраченных на лечение в стационаре дней.

В слезной жидкости пациентов определяли активность маркерных лизосомальных ферментов [9, 15].

Принцип метода исследования активности кислой фосфатазы основан на определении концентрации свободного *p*-нитрофенола, который образуется в результате гидролиза ферментом паранитрофенилфосфата.

Для определения активности кислой фосфатазы в пробирках последовательно смешивали 0,1 мл слезной жидкости и 1,0 мл субстратно-буферного раствора, который содержал 0,127 % раствор паранитрофенилфосфата в 0,2 М ацетатном буфере, (рН 5,0). Инкубировали на водяной бане при 37 °С на протяжении 15 мин. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 1 н раствора гидроксида натрия.

Оптическую плотность исследуемых растворов, которые в щелочной среде имели желтый цвет, измеряли при длине волны 410 нм спектрофотометре «Specol — 210» («Карл-Цейс», Германия). Коэффициент вариации — 7,8 %. От оптической плотности исследуемой пробы отнимали оптическую плотность контрольной и, используя коэффициент разведения слезной жидкости и перерасчет активно-

сти фермента в нкат/мл слезной жидкости, рассчитывали активность кислой фосфатазы.

Активность фермента выражали в нкат/мл слезной жидкости.

Методика определения активности катепсина Е основана на определении содержания пептидов, которые образуются в результате гидролиза альбумина исследуемым ферментом, путем специфической реакции аминокислот с альфа-нитрозо-бета нафтолом при кипячении в кислой среде.

В исследуемые пробирки вносили 0,1 мл 2 % раствора альбумина, приготовленного в 0,1 М ацетатном буфере (рН 5,0). Пробы инкубировали 30 мин при 37 °С на водяной бане. После инкубации в пробирки вносили 0,2 мл 8 % трихлоруксусной кислоты и помещали на водяную баню с температурой воды 0 °С на 30 мин, после чего пробирки центрифугировали при 6 тыс. об/мин на протяжении 10 минут. К 0,2 мл надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования, добавляли 0,04 мл 0,1 % раствора гидроксида натрия, после чего вносили 0,02 мл 2,5 Н раствора азотной кислоты и 0,06 мл концентрированной соляной кислоты. Пробирки встряхивали и ставили в кипящую водяную баню (100 °С). Через 2 мин пробирки охлаждали на льду в течение 15 мин. В контрольных пробирках экстракт заменяли равноценным объемом физиологического раствора. Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре «Specol — 200» при длине волны 510 нм. Расчет активности катепсина Е проводили по формуле $A = E \cdot K$, где

A — активность фермента нкат/мл слезной жидкости;

K — коэффициент перерасчета в нкат/мл объема или вес ткани с учетом молярного коэффициента экстинкции.

Коэффициент вариации — 7,9 %.

Активность РНК-азы определяли спектрофотометрически при длине волны 300 нм при добавлении слезной жидкости в реакционный раствор, содержащий ацетатный буфер (0,1М, рН 5,0) и РНК (1 мг/мл).

Полученные результаты были обработаны с применением соответствующих методов вариационной статистики [4, 13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Данные, полученные при изучении показателей активности лизосомальных ферментов в слезной жидкости больных основной и контрольной (группа сравнения) группах, представлены в табл. 1.

Как видно из представленных данных, активность кислой фосфатазы в слезной жидкости в контрольной группе до лечения была повышена до $(30,1 \pm 2,3)$ нкат/мл (210,5 %) по сравнению с нормой $(14,3 \pm 1,1)$ нкат/мл. В основной группе также отмечается значительное повышение активности фермента, что составило — $(30,6 \pm 2,4)$ нкат/мл (214,0 %) по сравнению с нормой.

После лечения в контрольной группе активность кислой фосфатазы составила $(20,1 \pm 1,7)$ нкат/мл (140,6 %), а в основной группе с применением пиобактериофага — $(16,4 \pm 1,2)$ нкат/мл (114,7 %) по сравнению с нормой.

Активность катепсина Е в слезной жидкости в контрольной группе до лечения составила $(17,8 \pm 1,4)$ нкат/мл (217,1 %), а в основной — $(17,3 \pm 1,3)$ нкат/мл (211,0 %) по сравнению с нормой $(8,2 \pm 0,6)$ нкат/мл.

Таблица 1

Активность лизосомальных ферментов в слезной жидкости больных кератитом

Исследуемые показатели	Стат. показатели	Норма	Традиционное лечение		Традиционное лечение+ПБФ	
			До	После	До	После
Кислая фосфатаза, нкат/мл	n	23	30	30	28	28
	M±m	14,3±1,1	30,1±2,3	20,1±1,7	30,6±2,4	16,4±1,2
	p1	—	<0,001	<0,05	<0,01	>0,05
	%1	100	210,5	140,6	214,0	114,7
	p2	—	—	<0,05	—	<0,01
	%2	—	100	66,8	100	53,6
Катепсин Е, нкат/мл	n	23	30	30	28	28
	M±m	8,2±0,6	17,8±1,4	11,3±0,9	17,3±1,3	9,6±0,7
	p1	—	<0,001	<0,05	<0,001	>0,05
	%1	100	217,1	137,8	211,0	117,1
	p2	—	—	<0,01	—	<0,01
	%2	—	100	63,5	100	55,5
РНК-за, нкат/мл	n	23	30	30	28	28
	M±m	6,5±0,5	12,8±0,9	8,8±0,7	13,1±1,1	7,3±0,6
	p1	—	<0,01	<0,01	<0,01	>0,05
	%1	100	196,9	135,4	201,5	112,3
	p2	—	—	<0,01	—	<0,01
	%2	—	100	68,8	100	55,7

Примечание: p1 — уровень значимости различий данных по отношению к норме, рассчитанный с помощью t — теста для независимых выборок; p2 — уровень значимости различий данных между группами до и после лечения, рассчитанный с помощью t — теста для зависимых выборок.

В контрольной группе после лечения активность катепсина Е составила — (11,3±0,9) нкат/мл (137,8 %), а в основной — (9,6±0,7) нкат/мл (117,1 %) по сравнению с нормой.

Исследование активности РНК-зы в слезной жидкости больных кератитом до лечения выявило ее повышение в контрольной группе до (12,8±0,5) нкат/мл (196,9 %), а в основной — до (13,1±1,1) нкат/мл (201,5 %) по сравнению с нормой (6,5±0,5 нкат/мл).

Изучая активность РНК-зы после лечения можно видеть, что она в контрольной группе составила — (8,8±0,7) нкат/мл (68,8 %), а в основной — (7,3±0,6) нкат/мл (112,3 %) по сравнению с нормой.

Общий анализ полученных результатов свидетельствует, что у больных с кератитом в начальный период воспалительного процесса отмечается значительная лабилизация лизосомальных структур клеточных элементов роговой оболочки. Этот фактор наряду с наблюдаемой деструкцией эпителиальных и других клеток роговицы [3, 5, 6, 8, 14] и приводит к резкому повышению активности ферментов лизосом в слезной жидкости.

После проведенного лечения кератитов у больных контрольной группы активность лизосомальных ферментов в значительной мере нормализуется, однако показатели их активности все еще достоверно превышают норму и составляют 140,6 % — кислая фосфатаза, 137,8 % — катепсин Е, 135,4 % — РНК-за.

Включение же в состав комплексного лечения пиобактериофага приводит к более выраженной нормализации мембран лизосом, при этом показате-

тели маркерных лизосомальных ферментов статистически не отличаются от нормальных величин.

ВЫВОДЫ

1. В слезной жидкости больных с кератитом резко увеличивается активность маркерных лизосомальных ферментов: их показатели по отношению к норме составили для кислой фосфатазы (210,5 % — 214,0 %), для катепсина Е — (217,1 % — 211,0 %), для РНК-зы — (196,9 % — 201,5 %).

2. Применение пиобактериофага в комплексном лечении больных кератитом оказывает выраженное мембраностабилизирующее действие, о чем свидетельствует более низкий уровень активности лизосомальных ферментов в слезной жидкости в этих условиях. Активность кислой фосфатазы, катепсина Е и РНК-зы в основной группе составила 114,7 %, 117,1 %, 112,3 %, а в группе сравнения — 140,6 %, 137,8 % и 135,4 % соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анина Е. И. Патология роговой оболочки глаз среди взрослого населения Украины / Анина Е. И., Мартопляс К. В. // 12 съезд офтальмологов Украины. — Одесса, 2010. — С. 5–7.
2. Вит В. В. Гематоофтальмологический барьер при травме глаза / Вит В. В., Дмитриев С. К. // Офтальмол. журн. — 1997. — № 2. — С. 143–148.
3. Волков О. А. Современное представление о слезной жидкости, значение ее в диагностике / Волков О. А., Мошетова Л. К. // Росс. мед. журн. — 2004. — Т. 5. — № 4. — С. 138–140.

4. **Гланц С.** Медико-биологическая статистика / Гланц С.; пер. с англ. Ю. А. Данилова; под ред. Н. Е. Бузи-кашвили, Д. В. Самойлова. — М.: Практика, 1999. — 460с.
5. **Дрожжина Г. И.** Структура патологии роговицы, показания для кератопластики с 1999 по 2009 годы / Дрожжина Г. И., Гайдамака Т. Б., Ивановская Е. В. // 12 съезд офтальмологов Украины. — Одесса, 2010. — С.14–15
6. **Дрожжина Г. И.** Состояние протеиназно-ингибитор-ной системы и стабильности мембран лизосом при решетчатой дистрофии роговицы, осложнен-ной воспалительным процессом / Дрожжина Г. И., Леус Н. Ф., Коломийчук С. Г. // Офтальмол. журн. — 2003. — № 1. — С. 29–34.
7. **Завгородская Н. Г.** Практический опыт лечения по-вреждения роговицы / Завгородская Н. Г., Исако-ва Н. С., Луценко О. А. // Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения. — Симферополь, 2010. — С. 74–76.
8. **Каменская Е. В.** Влияние препаратов «Факовит» и «Тауфон» на активность окислительно-восстанови-тельных ферментов в крови и слезной жидкости у больных поверхностным герпетическим кератитом / Каменская Е. В., Дрожжина Г. И. // Офтальмол. журн. — 2008. — № 1. — С. 27–32.
9. **Колединцев М. Н.** Современные методы анализа слез-ной жидкости / Колединцев М. Н., Майчук Н. В. // Новое в офтальмологии. — 2002. — № 4. — С. 32–37.
10. **Майчук Ю. Ф.** Фармакотерапия воспалительных за-болеваний глаз: вчера, сегодня, завтра / Майчук Ю. Ф. // Актуальные вопросы воспалительных заболеваний глаз: Материалы наук. — практ. конф. — М., 2001. — С. 7–17.
11. **Максименко О. Н.** Исследование эффективности но-вого пробиотика «А-бактерина сухого» в комплекс-ном лечении кератитов бактериального происхожде-ния. — Киев, 2004. — С. 3–10.
12. **Мартінек Н. А.** Перспективи локального застосуван-ня природного бета-каротину при патології рогівки / Мартінек Н. А. // Офтальмол. журн. — 2002. — № 4. — С. 54–58.
13. **Наследов А.** SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках. // Спб.: Питер, 2005. — 416 с.
14. **Петрович Ю. А.** Биохимия слезы и ее изменения при патологии (обзор) / Петрович Ю. А., Терехина Н. А. // Вопросы мед. химии. — 1990. — Т.36. — № 3. — С. 13.
15. **Прохорова М. И.** Методы биохимических исследова-ний. — Ленинград: Изд-во Ленинградского универси-тета. — 1982. — 272 с.
16. **Сакович В. Н.** Применение биопрепаратов в лечении воспалительных заболеваний глаз / Сакович В. Н., Шираз Гисми, Аль Кфйяли Фади Закария, Тихо-мирова В. В. // 12 съезд офтальмологов Украины. — Одесса, 2010. — С. 54–55.
17. **Сакович В. Н.** Применение пиобактериофага в лечении бактериальных кератитов / Сакович В. Н., Шираз Ги-сми // Офтальмол. журн. — 2011. — № 3. — С. 16–19.
18. **Сакович В. Н.** До питання про використання пелюїдів в комплексній терапії хворих з запальними захво-рюваннями рогової оболонки та їх наслідками / Са-кович В. Н. // Офтальмол. журн. — 2002. — № 6. — С. 63–66.
19. **Сергієнко М. М.** Екзогенні бактерійні кератити / Сергієнко М. М., Риков С. О., Лезмяков Г. Г. — Київ, 2002. — 24 с.
20. **Терещенко Ю. Н.** Эффективность комплексного лече-ния язвенных бактериальных кератитов / Терещенко Ю. Н., Мальцев Э. В., Павлюченко К. П. // Офталь-мол. журн. — 2006. — № 4. — С. 31–35.
21. **Schaefer F.** Bacterial keratitis: a prospective clinical and microbiological study / Schaefer F., Bruttin O., Zografos L. // Br. J. Ophthalmol. — 2001. — Vol. 85. — P. 842–847.
22. **Steven E. Wilson.** Corneal cells: chatty in development, homeostasis, wound healing, and disease / Steven E. Wil-son, M. Netto., R. Ambrosio // Am. J. Ophthalmol. — 2003. — Vol. 136. — P. 530–536.

Поступила 03.11.2011

Рецензент д-р мед наук Т. Б. Гайдамака

INVESTIGATION OF THE ACTIVITY OF LYSOSOMAL ENZYMES IN THE TEAR FLUID WITH PYO- BACTERIOPHAGE APPLICATION FOR THE TREATMENT OF BACTERIAL KERATITIS

Sakovich V. N., Giesmi Chiraz
Odessa, Ukraine

We investigated the activity of lysosomal enzymes in the tear fluid with pyobacteriophage application in the treatment of bacterial keratitis. In the tear fluid of patients with keratitis the activity of marker lysosomal enzymes increases dramatically: their indices in relation to the norm were the following — acid phosphatase — (210.5 % — 214.0 %), cathepsin E — (217.1 % — 211.0 %), RNA — (196.9 % — 201.5 %).

Pyobacteriophage application in complex treatment of patients with keratitis has a marked effect on membrane stabilization, as it was manifested by the lower level of activity of lysosomal enzymes in the tear fluid under these conditions. The activity of acid phosphatase, cathepsin E and RNA in the group under study was 114.7 %, 117.1 %, 112.3 %, while in the control group it was 140.6 %, 137.8 % and 135.4 % respectively.

