

СТАН ЛІЗОСОМАЛЬНИХ МЕМБРАН ПРИ КЕРАТИТАХ ВНАСЛІДОК ТРАВМ РОГІВКИ ЗАЛІЗОВМІСНИМИ СТОРОННІМИ ТІЛАМИ

Т. М. Жмудь, аспірант

ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України»

В експерименті на 40 кроликах встановлено, що запальний процес в роговиці при наявності инородних тел приводить до значительного порушення лізосомальних мембран кліток переднього епітелія рогової оболонки. При цьому спостерігається різке підвищення активності вільних і зниження активності зв'язаних форм кислої фосфатази і катепсина Е. Порівняння ступеня цих змін при введенні різних инородних тел в роговицю показало, що залізо-змістять тіла викликають найбільш значительні порушення в стабільності мембран лізосом.

Проведене лікування експериментального кератита з допомогою комплексонів привело до нормалізації стану лізосомальних ферментів, особливо чітко вираженої при використанні цистеїна, що дозволяє розглядати отримані дані як основу для застосування цистеїна в комплексній терапії тяжких кератитів, викликаних залізо-змістять инородними тілами.

Ключові слова: травматичний кератит, сторонні тіла, лізосомальні ферменти, ЕДТА, цистеїн, експеримент.

Ключевые слова: травматический кератит, инородные тела, лизосомальные ферменты, ЭДТА, цистеин, эксперимент.

Введення. Захворювання очей, пов'язані з травмами, відносяться до широко розповсюджених і займають одне з перших місць серед звертань населення [3, 4].

Показано зокрема, що травми і опіки рогівки займають 68–70 % всіх ушкоджень і поранень очей, хворі з сторонніми тілами рогівки становлять 37 %, а ускладнення виявлені у 7 % випадків.

В даний час питання підвищення ефективності лікування хворих з травматичними кератитами, що обумовлені сторонніми металевими тілами, досить актуальні [2, 10, 19].

У цьому напрямку необхідно відзначити, що лікування травматичних кератитів, обумовлених наявністю сторонніх тіл в рогівці, спрямоване на їх видалення та попередження вторинної інфекції. При цьому, як правило, сторонні тіла являють собою суміш металів та їх сполук, великий відсоток з яких складає залізо. При дії іонів заліза відбувається пошкодження клітин шляхом блокування білків і мембранних структур органел клітин (лізосом) [5, 9, 11]. З метою блокування пошкоджуючої дії в організмі катіонів металів використовують комплексоутворюючі сполуки — це лікарські засоби, які утворюють з катіонами металів стійкі, малодисоціюючі комплекси (хелати). На цьому базується знешкоджуюча дія препаратів при захворюваннях легенів на сидероз або халькоз.

За даними Р. А. Гундорової і співавт. [3], сидероз — це патологічний процес, який спостерігається при тривалому перебуванні у тканинах ока залізовмісних сторонніх тіл. Суть процесу полягає в повільному розчиненні залізовмісного уламка, в просочуванні тканин ока неорганічними та орга-

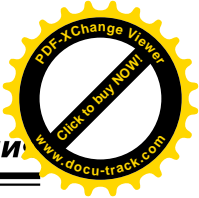
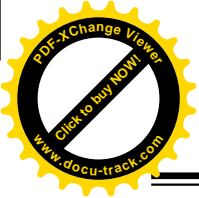
нічними солями заліза і міцному з'єднанні їх з білковими структурами клітин. Медикаментозне лікування сидероза ока дає незначний ефект [1, 3].

На сьогоднішній день відомі комплексоутворюючі препарати, які здатні зв'язувати іони заліза — пеніциламін, дефероксамін, ЕДТА, купреніл та інші [6]. Нашу увагу привернув препарат цистеїн — замінна амінокислота, яка добре розчиняється в воді, здатна до комплексоутворення завдяки наявності S-N груп (таким чином утворює комплекси з іонами заліза, міді та ін., нейтралізуючи їх негативний вплив на організм), являється антиоксидантом. В офтальмології застосовується для консервативного лікування початкових форм катаракти та як допоміжний засіб при лікуванні сидерозу ока [4, 6].

У той же час в літературі відсутні відомості про вплив залізовмісних сторонніх тіл на стан лізосомальних мембран в рогівці та можливості корекції знайдених змін за допомогою цистеїна.

У зв'язку з цим метою роботи було вивчення впливу залізовмісних сторонніх тіл на стан лізосомальних мембран в рогівці при моделюванні травматичного кератиту та можливості корекції виявлених змін.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ. Експериментальні дослідження проводилися на 40 кроликах (масою 2,2–2,8 кг). При проведенні експерименту дотримувалися всіх рекомендацій щодо досліджень на тваринах, прийнятих міжнародним співтовариством. Всі тварини досліджувалися за допомогою біомікроскопії на щільній лампі, як на етапі відбору експериментальних тварин, так і для спостережень у процесі експерименту.



Техніка операції для моделювання проникнення стороннього тіла в рогівку описана нами раніше [11].

Тварини були поділені на такі групи:

- 1 — кератит-скло;
- 2 — кератит-залізо;
- 3 — кератит-залізо+ЕДТА;
- 4 — кератит-залізо+цистеїн.

Базова терапія тварин включала інстиляції антибіотиків, мідріатиків, в четвертій групі до неї додавався 5% розчин цистеїну.

В післяопераційному періоді тварини досліджувались протягом першого тижня щоденно, а потім два рази в місяць. Строки спостережень проперованих тварин склали від двох тижнів до року.

В тканинах ізольованої рогівки, що подрібнювали в спеціальному гомогенізаторі, визначали активність ферментів кислоти фосфатази (вільна і зв'язана форма) та катепсину Е (вільна і зв'язана форми).

Визначення активності кислоти фосфатази основане на даних концентрації вільного п-нітрофенола, який утворюється в результаті гідролізу ферментом паранітрофенілфосфату [5].

Оптичну щільність досліджуваних розчинів, які в лужному середовищі мали жовтий колір, вимірювали при довжині хвилі 410 нм на спектроколориметрі «Specol-210» («Карл Цейс», Німеччина). Коефіцієнт варіації — 7,8 %. Активність фермента визначали в нкат/г тканини.

Про активність катепсина Е судили по вмісту пептидів, що утворюються в результаті гідролізу альбуміну досліджуваним ферментом, шляхом специфічної реакції амінокислот з альфа-нітросо-бета нафтолом при кип'ятінні в кислому середовищі.

Розрахунок активності катепсина Е проводили за формулою $A = E \times K$, де

A — активність ферменту нкат/г тканини або нкат/мл слюзоної рідини;

K — коефіцієнт перерахунку в нкат/мл об'єму або вага тканини з урахуванням молярного коефіцієнта екстинкції.

Коефіцієнт варіації 7,9 %.

Дані оброблялися за допомогою відповідних методів статистичного аналізу [6].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ. Вивчення активності лізосомальних ферментів в епітелії рогівки інтактних тварин показало, що в нормі активність вільної кислоти фосфатази складала 80,30 нкат/г вологої маси, її зв'язаної форми — 54,80 нкат/г вологої маси, та загальної кислоти фосфатази — 138,10 нкат/г вологої маси; активність катепсину Е: вільна форма — 11,40 нкат/г вологої маси, зв'язана — 92,10 нкат/г вологої маси, загальна — 103,50 нкат/г вологої маси (табл. 1).

При вивченні активності вільної форми кислоти фосфатази та катепсину Е в групі кератит-залізо відмічалось їх підвищення на 55,2 % та 31,9 % відповідно (124,60±4,06 та 37,20±1,29) порівняно з нормою та на 18,1 та 31,9 % в порівнянні з групою кератит-скло. При цьому ступінь достовірності досить високий $p < 0,0001$.

Вивчаючи активність зв'язаної форми кислоти фосфатази та катепсину Е виявили її зниження в

порівнянні з нормою. Так, в групі кератит-скло вона дорівнювала 105,50±3,60 (31,3 %) та 72,40±2,70, 78,6 %, в групі кератит-залізо — 85,4 % та 67,2 %, що є статистично достовірним $p = 0,0000$ (табл.1., рис. 1, 2).

Таблиця 1

Активність кислоти фосфатази та катепсину Е в рогівці очей тварин при моделюванні травматичного кератиту (нкат/г тканини)

Досліджуваний показник	Статистич. показник	Умови експерименту		
		Норма	Кератит (скло)	Кератит (залізо)
Кисла фосфатаза, вільна форма (нкат/г ткани)	n	10	10	10
	M	80,30	105,50	124,60
	m	±6,73	±3,60	±4,06
	p1	—	<0,0001	<0,0001
	%1	100,0	131,30	155,20
	p2	—	—	—
Кисла фосфатаза, зв'язана форма (нкат/г ткани)	n	10	10	10
	M	54,80	43,80	37,40
	m	±2,07	±1,78	±1,65
	p1	—	<0,0001	<0,0001
	%1	100,0	79,90	68,2
	p2	—	—	—
Катепсин Е, вільна форма (нкат/г ткани)	n	10	10	10
	M	11,40	28,20	37,20
	m	±0,69	±1,78	±1,29
	p1	—	<0,0001	<0,0001
	%1	100,0	247,4	326,3
	p2	—	—	—
Катепсин Е, зв'язана форма (нкат/г ткани)	n	10	10	10
	M	92,10	72,40	61,90
	m	±3,46	±2,70	±2,20
	p1	—	<0,0001	<0,0001
	%1	100,0	78,6	67,20
	p2	—	—	—
Катепсин Е, загальна форма (нкат/г ткани)	n	10	10	10
	M	138,10	103,50	103,50
	m	±10,0	±10,0	±10,0
	p1	—	<0,0001	<0,0001
	%1	100,0	78,6	67,20
	p2	—	—	—

Примітка: p1 — рівень значимості відмінностей даних по відношенню до норми, розрахований за допомогою t — тесту для незалежних вибірок; p2 — рівень значимості відмінностей даних при порівнянні групи «Кератит (залізо)» по відношенню до групи «Кератит (скло)», розрахований за допомогою t — тесту для незалежних вибірок.

Ці зміни свідчать про значне порушення стабільності лізосомальних мембран при травматичних кератитах, особливо тих, що зумовлені травмами рогівки залізовмісними сторонніми тілами.

При застосуванні комплексів в лікуванні запального процесу відмічено, що під впливом 3 % ЕДТА відбувається зниження активності вільних форм ферментів (кислоти фосфатази та катепсину Е на 23,1 %) та підвищення активності зв'язаних форм (кислоти фосфатази на 15,2 % та катепсину Е на 27,3 %) в порівнянні з контрольною групою, яка отримувала тільки традиційну терапію (табл.2, рис.3).

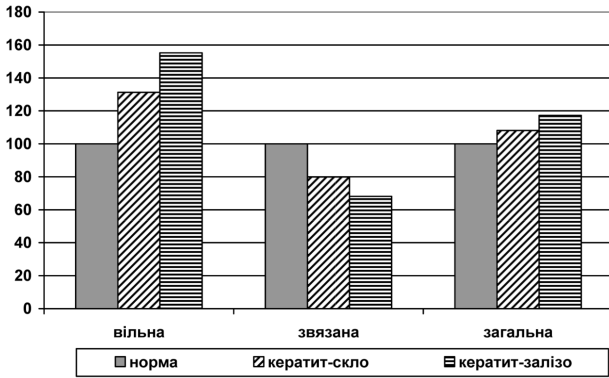


Рис. 1. Відносна активність кислій фосфатази у роївці очей кроликів при моделюванні кератиту.

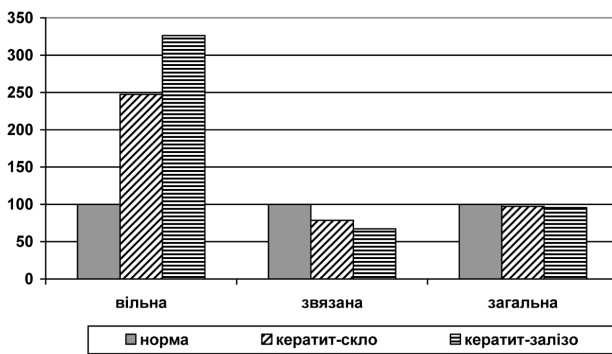


Рис. 2. Відносна активність катепсину Е у роївці очей тварин при моделюванні кератиту

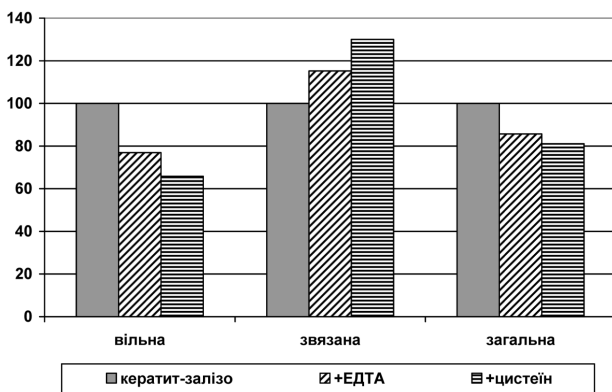


Рис. 3. Відносна активність різних форм кислій фосфатази під впливом лікування при моделюваному кератиті

При додаванні до традиційного лікування 5 % розчину цистеїну відмічається значне зниження активності вільних форм лізосомальних ферментів (кислій фосфатази на 34,2 % та катепсину Е на 39,4 %) та значне підвищення активності зв'язаних форм на 32 % та 45,4 % відповідно при порівнянні з контрольною групою.

Якщо порівнювати ефект застосування ЕДТА та цистеїну, то більш стабілізуючий вплив на лізосомальні мембрани епітелія роївки має цистеїн, про що свідчить зниження активності вільних форм фер-

ментів в 1,2 рази та підвищення активності зв'язаних форм в 1,2 рази в порівнянні з групою, яка додатково до традиційної терапії отримувала ЕДТА.

Таблиця 2

Активність лізосомальних ферментів у роївці очей тварин під впливом лікування при моделюванні кератиту

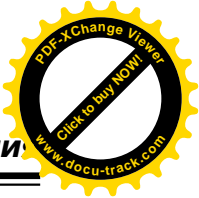
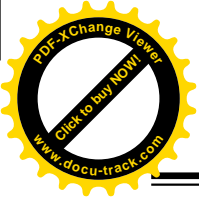
Досліджуваний показник	Статистич. показник	Умови експерименту			
		Кератит (скло)	Кератит (залізо)	+ ЕДТА	+ 5 % цистеїн
Кисла фосфатаза, вільна форма (нкат/г тканини)	n	10	10	10	10
	M	105,50	124,60	95,80	82,00
	m	3,60	4,06	3,55	2,20
	p1	—	<0,005	>0,01	>0,000
	%1	100,0	118,1	90,8	77,7
	p2	—	—	>0,000	<0,000
Кисла фосфатаза, зв'язана форма (нкат/г тканини)	n	10	10	10	10
	M	43,80	37,40	43,10	49,40
	m	1,78	1,65	1,58	1,47
	p1	—	<0,01	>0,77	>0,02
	%1	100,0	85,3	98,4	112,7
	p2	—	—	<0,02	<0,000
Катепсин Е, вільна форма (нкат/г тканини)	n	10	10	10	10
	M	11,40	28,20	22,40	17,10
	m	0,69	1,78	1,10	1,49
	p1	—	<0,000	<0,000	<0,005
	%1	100,0	247,3	196,5	150,0
	p2	—	—	<0,000	<0,000
Катепсин Е, зв'язана форма (нкат/г тканини)	n	10	10	10	10
	M	72,40	61,90	78,80	90,00
	m	2,70	2,20	3,07	3,72
	p1	—	<0,000	<0,01	>0,68
	%1	100,0	85,5	108,80	124,30
	p2	—	—	>0,13	<0,000
%2	—	100,0	127,3	145,4	

Примітка: p1 — рівень значимості відмінностей даних по відношенню до норми, розрахований за допомогою t — тесту для незалежних вибірок; p2 — рівень значимості відмінностей даних при порівнянні групи «ЕДТА або цистеїн» по відношенню до групи «Кератит (залізо)», розрахований за допомогою t — тесту для незалежних вибірок.

ВИСНОВКИ

1. При травматичному кератиті відбувається значне порушення активності лізосомальних ферментів, особливо при кератиті, зумовленому травмою роївки залізовмісними сторонніми тілами — активність вільної кислій фосфатази значно підвищена на 55,2 %, а зв'язана її форма знижена на 20,1 % в порівнянні з нормою, що свідчить про різке порушення стабільності лізосомальних мембран епітелія роївки.

2. Використання 5 % водного розчину цистеїну має більш виражений коригуючий вплив на стабілізацію лізосомальних ферментів епітелія роївки при кератитах внаслідок травм роївки залізовмісними сторонніми тілами (зниження активності вільних форм



кислой фосфатазы і катепсину Е в 1,3 рази та підвищення активності зв'язаних в 1,2 рази) в порівнянні з групою, яка додатково отримувала 3 % ЕДТА.

Дані експериментальних досліджень можуть бути підставою для використання цистеїну в комплексній терапії хворих з кератитами, що зумовлені травмами рогівки залізовмісними сторонніми тілами.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Аветисов Э. С.** Сидероз глаза / Э. С. Аветисов. Справочник по офтальмологии. — М., «Медицина», 1978, 376 с.
2. **Бабайлова О. М.** Психокоррекция при тяжелой травме органа зрения. / О. М. Бабайлова // Поражения органа зрения. Материалы юбилейной научной конференции, посвященной 190-летию основания кафедры офтальмологии Военно-медицинской академии. — Санкт-Петербург, 2008. — С. 19–20.
3. **Гундорова Р. А.** Травмы глаза [Р. А. Гундорова, В. В. Нероева, В. В. Кашникова]. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. — 560с.
4. **Дамбите Г. Р.** Металлоз глаза и его лечение. [Дамбите Г. Р.] — Москва : Медицина, 1971. — 195с.
5. **Дингл Дж.** Лизосомы. Методы исследования / Дингл Дж. — М.: Мир, 1980. — 342с.
6. **Морозов В. И.** Фармакотерапия глазных болезней [Морозов В. И., Яковлев А. А.] : Справочник. — Изд. 4-е, перераб. и доп. — М.: Медицина, 2001. — С. 100–147.
7. **Наследов А.** SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках. // Спб.: Питер, 2005. — 416 с.
8. **Прохорова М. И.** Методы биохимических исследований. — Ленинград: Изд- во Ленинградского университета. — 1982. — 272 с.
9. **Покровский А. А.** Лизосомы / А. А. Покровский, В. Н. Тутслыян // М.: Наука. — 1976. — 382с .
10. **Сухина Л. А.** Эффективность применения лечебной кератопластики аутосклерой при травматических повреждениях роговицы / Л. А. Сухина, М. Б. Перекрестов, И. В. Сухина // Поражения органа зрения. Материалы юбилейной научной конференции, посвященной 190-летию основания кафедры

- офтальмологии Военно-медицинской академии. — Санкт-Петербург, 2008. — С. 161–162.
11. **Усов В. Я., Жмудь Т. М.** Влияние железосодержащих инородных тел на окислительно-восстановительные процессы в роговице при моделировании травматического кератита // Офтальмол.журн. — 2010. — № 5. — С.66–69.
12. **Hayasaka S.** // Lysosomes in biology and pathology. Eds. Dingle J. et al. — 1984. — P. 421.
13. **Huang Y., Meek K. M.** Swelling studies on the cornea and sclera : the effects of pH and ionic strength // Invest Ophthalmol Vis Sci. — 1999. — Vol. 39. — P. 1765–1774.
14. **Liu Z, Huang A.J, Pflugfelder S. C.** Evaluation of corneal thickness and topography in normal eyes using the Orbscan corneal topography system. Br. J. Ophthalmol. — 1999. — Vol. 83. — P. 774–778.
15. **Ramos-Esteban J.** The use of Tissucol Glue in corneal surgery // Techniques in Ophthalmol. — 2006. — Vol. 4. — № 1. — P. 30–34.
16. **Kucerova R., Ou J., Lawson D., Leiper L. J.** et al. Cell Surface Glycoconjugate Abnormalities and Corneal Epithelial Wound Healing in the Pax6+/- Mouse Model of Aniridia-Related Keratopathy // Invest Ophthalmol Vis Sci. — 2006. — Vol. 47, № 12. — P. 5276–5282.
17. **Wilson S. E., Churasia S. S., Medeiros F. W.** Apoptosis in the Initiation, Modulation and Termination of the Corneal Wound Healing Response // Exp Eye Res. — 2007. — Vol. 85, № 3. — P. 305–311.
18. **Troost F. J., Saris W. H., Haenen G. R.** et al. New method to study damage and antioxidants in the human small bowel: effects of iron application. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. — 2003. — Vol.285. — P.354–359.
19. **Walter Sekundo, Peter Seifert, Berthold Seitz** et al. Long term ultrastructural changes in human corneas after tattooing with non-metallic substances. Br. J. Ophthalmol. — 1999. — Vol. 83. — P. 219–224.
20. **Xiang Ma and Haydee E. P. Bazan.** Increased Platelet-Activating Factor Receptor Gene Expression by Corneal Epithelial Wound Healing // Invest. Ophthalmol. and Vis. Sci. — 2000. — Vol. 41. — P. 1696–1702.
21. **You L., Kruse F. E., Vulker H. E.** Neurotrophic Factors in the Human Cornea // Invest Ophthalmol Vis. Sci. — 2000. — Vol. 41. — P. 692–702.

Поступила 28.03.2011.

Рецензент д-р мед. наук А. А. Путиенко

THE CONDITION OF LYSOSOMAL MEMBRANES IN KERATITIS AS A RESULT OF THE CORNEA INJURY BY IRON-CONTAINING FOREIGN BODIES

T. M. Zhmud

The researchers established that the inflammatory process in the cornea in the presence of foreign bodies leads to a considerable disturbance of the lysosomal cell membranes stability of the corneal anterior epithelium. A sharp increase of activity of free forms and decrease of the bound forms of acid phosphatase and cathepsin E are observed. Comparing the degree of activity of free forms of lysosomal enzymes in introduction of different foreign bodies into the cornea it is found that foreign bodies containing iron cause more significant disturbances of the lysosomal membrane stability.

The treatment by complexons has led to normalization of these lysosomal enzymes (cysteine showed more intense effect) that indicated the lysosomal cell membranes stability of the anterior epithelium of the cornea.

