

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995  
УДК 617.713-001.17-07:617.764-008.831]-092.9

## **АКТИВНОСТЬ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА В СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ КРОЛИКОВ ПОСЛЕ ОЖОГА РОГОВИЦЫ**

**О.А.КОСТ, Н.Б.ЧЕСНОКОВА, Т.П.КУЗНЕЦОВА**

Химический факультет Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова, Московский институт глазных болезней им. Гельмгольца

В экспериментальной модели ожоговой болезни глаз у кроликов продемонстрировано наличие зависимости активности ангиотензинпревращающего фермента в слезной жидкости как от периода ожоговой болезни, так и от характера ее течения. Активность фермента в слезе кроликов с глубокими язвами роговицы существенно превышала активность фермента у кроликов с изъязвлением поверхностных слоев роговицы.

Ангиотензинпревращающий фермент (АПФ) — это цинкзависимая пептидаза, катализирующая гидролитическое отщепление дипептидов с карбоксильного кольца ряда физиологически активных олигопептидных субстратов. Фермент принимает участие в

контроле кровяного давления, способствуя образованию сильного вазопрессорного октапептида ангиотензина II из его неактивного предшественника ангиотензина I. АПФ также инактивирует вазодилаторный пептид брадикинин путем двух последовательных гидролитических реакций с отщеплением дипептида. Таким образом, через АПФ осуществляется взаимосвязь между ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой системами организма [1,2]. Фермент проявляет также пептидилтрипептидазную и эндопептидазную активность при гидролизе некоторых пептидов, таких как, например, вещество Р и нейротензин [2]. Ингибиторы АПФ успешно применяются для лечения гипертонической болезни и сердечно-сосудистой недостаточности [7,8].

АПФ широко распространен в организме, основная его масса находится в мембранно-связанном состоянии, располагаясь на люминальной поверхности эндотелиальных и эпителиальных клеток, что позволяет ферменту участвовать в реакциях циркулирующих (эндокринных) ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой систем. Однако все большее значение начинают придавать локальным (паракринным) эффектам компонентов этих систем, а также их действию внутри клеток (аутокринному) [2,5]. В частности, активность АПФ выявлена в различных тканевых структурах и жидкостях глаза. Показано присутствие этого фермента в сетчатке, сосудистой оболочке, цилиарном теле и в микрососудах сетчатки глаз человека, крупного рогатого скота, свиньи, кошки, кролика [6,7], заднем эпителии роговицы кролика, в сосудах радужки и в цилиарном эпителии крыс [9,10]. Активность АПФ обнаружена во влаге и слезе человека, причем в слезе активность фермента выше [11]. На основании изучения активности АПФ в структурах глаза, ответственных за приток и отток водянистой влаги, сделано предположение о том, что фермент вовлечен в процесс секреции влаги [12].

Изменение активности АПФ при патологических процессах в глазу изучено мало. Ряд работ посвящен изучению активности АПФ в слезной жидкости при саркоидозе. У большей части больных с глазным саркоидозом активность АПФ в слезной жидкости значительно увеличена [13], причем это относится как к общей, так и к удельной (относительной к содержанию белка) активности фермента. Высокая активность АПФ выявлена в слезе у больных с гранулематозным увеитом и во влаге больных с саркоидозным увеитом [14]. Полагают [13], что определение уровня активности АПФ в слезной жидкости можно использовать для диагностики глазного саркоидоза при нормальном уровне АПФ в сыворотке крови.

Роль АПФ при воспалительных процессах в глазу и, в частности, при ожоговой болезни глаз, сопровождающейся развитием персистирующих дефектов роговичной ткани, трудно поддающихся лечению, не изучена. Ранее при исследовании активности ряда гидролитических ферментов, в том числе калликреинов, в слезной жидкости кроликов при ожоговой болезни глаз нами была выявлена взаимосвязь между уровнем активности этих ферментов и развитием эрозий и язв роговицы [15,16]. Принимая во внимание участие АПФ в гидролитическом расщеплении ряда физиологически важных пептидов, в том числе кининов, и возможное участие фермента в различных процессах при воспалении, мы исследовали активность АПФ в слезе при экспериментальной ожоговой болезни глаз у кроликов.

**Методика.** В работе было использовано 28 кроликов породы шиншилла массой 2,5—3,5 кг при обычном способе содержания. Слезную жидкость отбирали с помощью шести кругов из фильтровальной бумаги диаметром 5 мм, которые закладывали в нижний конъюнктивальный мешок животного на 5 мин. Затем кружки вынимали и помещали в физиологический раствор (0,3 мл) на 15 мин. Активность АПФ в полученном элюате слезной жидкости определяли по гидролизу специфического синтетического субстрата — N-бензилоксикарбонил-L-фенилаланил-L-гистидил-L-лейцина ("Serva", Германия). Образующийся в результате гидролиза продукт Гис-Лей модифицировали о-фталевым альдегидом ("Koch-Light", Великобритания) для образования флюоресцентного аддукта [17]. Для измерения активности в термостатируемые при 37°C пробирки вносили по 1,8 мл буфера (0,05 М фосфатный буфер pH 7,5, содержащий 0,15 М NaCl и 1 мкМ ZnCl<sub>2</sub>) и по 0,2 мл 0,5 мм раствора субстрата в метаноле. После 10 мин термостатирования в пробирку вносили по 0,15 мл исследуемого образца (измерения активности АПФ в каждом из препаратов дублировали), пробирку закрывали и тщательно перемешивали. Пробу инкубировали при 37°C в течение 90 мин, затем вносили по 1 мл 1 н. раствора NaOH и по 0,2 мл 0,2% раствора о-фталевого альдегида в метаноле, инкубировали 15 мин для завершения образования флюоресцентного аддукта. Затем добавляли по 0,2 мл

6 н. HCl для стабилизации аддукта и регистрировали интенсивность флюоресценции на спектрофлюориметре "Hitachi MPF-4" (Япония) при длине волны возбуждения 370 нм и эмиссии 500 нм. Фоновую флюоресценцию измеряли при замене в пробах слезы на аналогичное количество физиологического раствора. Количество образовавшегося в результате ферментативной реакции продукта определяли по калибровочной кривой, построенной с помощью растворов Гис-Лей. Для этого к 1,8 мл буфера добавляли 0,2 мл 0,025—0,25 М раствора Гис-Лей ("Serva", Германия) в метаноле и проводили модификацию о-фталевым альдегидом, как описано выше. Активность АПФ выражали в мкмольх расщепленного за 1 мин субстрата, отнесенных к 1 мг белка в элюате. Концентрацию белка в элюате определяли по методу Лоури или спектрофотометрически [18]. Установлено, что активность АПФ в элюате слезы сохраняется практически неизменной в течение 2—3 дней при 4°C, допускается хранение в замороженном состоянии при -18°C в течение 3 мес.

Дозированный ожог центральной области роговицы наносили кроликам на оба глаза под общим наркозом и местной анестезией с помощью круга из хлопчатобумажной ткани (диаметр 7 мм), пропитанной 10% NaOH, через 40 сек круг удаляли и глаза тщательно промывали физиологическим раствором. Состояние глаз исследовали биомикроскопически после окрашивания роговицы 0,1% флюоресцеином. Клинические проявления ожоговой болезни оценивали в условных баллах в зависимости от их интенсивности. Оценивали глубину и площадь изъязвлений роговицы, ее отек и инфильтрацию, длину и густоту новообразованных в роговице сосудов, отек и гиперемию конъюнктивы, количество отделяемого и интенсивность инъекции глазного яблока. Измерение активности АПФ в слезной жидкости и клиническую оценку состояния глаз проводили на 1, 3, 7, 14, 21, 28 и 36-е сутки после ожога.

**Результаты и обсуждение.** После ожога роговицы на 1-е сутки наблюдали гиперемию и отек конъюнктивы, отек стромы и десквамацию эпителия роговицы. К 3 суткам дефект эпителия роговицы в большинстве случаев восстанавливался, отмечался отек конъюнктивы и стромы роговицы, а область роговицы, окружающая зону ожога, теряла прозрачность.

После 3 суток вновь образованный эпителий в зоне ожога начинал отторгаться, усиливались гнойно-слизистые выделения и инъекция роговицы, возникали язвы стромы роговицы. В этот же период отмечался интенсивный рост новообразованных сосудов со стороны лимба, и в большинстве случаев сосуды достигали обожженной области роговицы через 2 нед после травмы.

В период от 14 до 21 суток развитие язвенных дефектов роговицы достигало максимума. В половине глаз образовывались глубокие язвы роговицы вплоть до десцеметовой оболочки, в ряде случаев отмечались перфорации роговицы, в другой половине глаз процесс ограничивался изъязвлением поверхностных слоев стромы роговицы. Последующий период характеризовался новообразованием соединительной ткани и формированием рубца.

Таким образом, для ожоговой болезни глаз, вызванной воздействием щелочи на роговицу, первоначальный период преобладания пролиферативных процессов (до 3 суток) сменяется периодом усиления процессов изъязвления (7—14-е сутки), которые наиболее ярко выражены к концу 3-й недели, после чего воспалительные проявления резко стихают, и к концу 4-й недели после травмы образуется рубцовая ткань (грубая после глубоких и более нежная после поверхностных язв роговицы).

Измерение активности АПФ в слезной жидкости в различные периоды ожоговой болезни глаз показало наличие зависимости ферментативной активности как от периода ожоговой болезни, так и от характера ее течения. На рис. представлено изменение активности АПФ в слезной жидкости после щелочного ожога роговицы.

В течение 1-й недели после ожога отмечается волнообразное увеличение активности АПФ — максимумы подъема приходятся на 1-е и 7-е сутки, когда определяемая активность практически вдвое превышает исходный уровень, в то время как на 3-и сутки активность выше исходной только на 30%. На 14-е сутки активность АПФ нормализуется, но во время максимальной выраженности изъязвлений роговицы (21-е сутки) вновь возрастает в среднем на 60% и остается высокой и в период формирования рубцовой ткани.

Мы сравнили активность АПФ в слезной жидкости кроликов при различном характере течения ожоговой болезни глаз (см. таблицу). Оказалось, что в течение всего экспе-

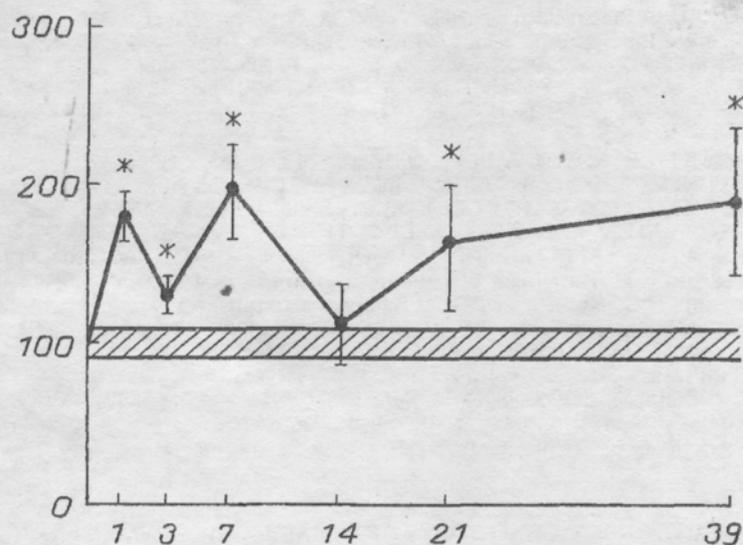


Рис. Изменение активности ангиотензинпревращающего фермента в слезной жидкости кроликов после щелочного ожога роговицы  
Звездочка — отличие от уровня нормы статистически достоверно —  $p < 0,05$ . По оси ординат — % от активности АПФ, определяемой у интактных кроликов; по оси абсцисс — время после ожога (в сутках).

римента активность фермента в слезе кроликов с изъязвлением поверхностных слоев роговицы была статистически достоверно ниже, чем при глубоких язвах роговицы.

Активность ангиотензинпревращающего фермента (в мкмоль/мин · мг, ·  $10^4$ ) в слезной жидкости кроликов с поверхностным (I) и глубоким (II) изъязвлением роговицы ( $M \pm m$ )

Характер течения ожоговой болезни	До ожога	Дни после ожога					
		1	3	7	14	21	36
I (n=6)	1,61±0,15	0,50±0,12	0,68±0,06	0,94±0,14	0,66±0,12	1,61±0,31	1,42±0,10
II (n=6)	1,90±0,16	0,71±0,06	1,21±0,16	2,11±0,16	0,84±0,09	3,97±1,04	2,90±0,45
I/II, %	84	73	56	56	79	40	48
p	<0,2	<0,2	<0,02	<0,02	<0,2	<0,05	<0,02

На данном этапе исследований трудно точно определить механизм участия АПФ в процессах деструкции и репарации тканей роговицы после ее повреждения. Тем не менее полученные данные являются свидетельством участия этого фермента в указанных процессах. Не исключено, что изменение уровня активности фермента может приводить к изменению концентрации кининов, играющих одну из ключевых ролей в воспалении, на локальном клеточном уровне [19]. Роль кининов в воспалительной реакции далеко не ограничивается их провоспалительными функциями, имеются данные, свидетельствующие о том, что кинины являются факторами, способствующими клеточной пролиферации [20]. Кроме того, АПФ обнаружен в клетках моноцитарного ряда — моноцитах, макрофагах и их производных. Предполагается, что фермент может участвовать в медиации и/или модуляции воспаления [21]. Показано, что ингибирование АПФ специфическими ингибиторами может приводить к увеличению биосинтеза и соответственно содержания фермента в макрофагах. Предполагается, что функция АПФ в макрофагах может не ограничиваться его непосредственной ферментативной функцией, а заключаться также в формировании иммунного ответа [22].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Орехович В.Н., Локшина Л.А., Елисеева Ю.Е., Павлихина Л.В. // Вестн. АМН СССР. — 1984. — N8. — С. 3—11.
2. Erdos E.G., Skidgel R.A. // Lab. Invest. — 1987. — Vol. 56, N 4. — P. 345—348.
3. Cushman D.W., Ondetti M.A. // Hypertension. — 1991. — Vol. 17. — P. 589—592.
4. Dzau V.J. // Drugs. — 1990. — Vol. 39. — Suppl. 2. — P. 11—16.

5. Ehlers M.R.W., Riordan J.F. // *Biochemistry*. — 1989. — Vol. 28, N 13. — P. 5311—5318.
6. Ferrari-Dileo G., Ryan J.W., Rockwood E.J. et al. // *Invest. Ophthalmol.* — 1988. — Vol. 29, N 6. — P. 876—881.
7. Igit R., Kojovic V. // *Exp. Eye Res.* — 1980. — Vol. 30, N 3. — P. 299—305.
8. Neels H.M., Berghe D.A., Neetens A.J. // *Ophthalmologica (Basel)*. — 1983. — Vol. 187, N 2. — P. 129—132.
9. Laliberte M.-F., Laliberte F., Alhenc-Gelas F., Chevillard C. // *Lab. Invest.* — 1988. — Vol. 59, N 2. — P. 263—270.
10. Strittmatter S.M., Snyder S.H., Braas K.M. // *Invest. Ophthalmol.* — 1989. — Vol. 30, N 10. — P. 2209—2214.
11. Vita J.B., Anderson J.A., Hulem C.D., Leopold I.H. // *Ibid.* — 1981. — Vol. 20, N 2. — P. 255—257.
12. Laliberte F., Laliberte M.-F., Alhenc-Gelas F., Chevillard C. // *Ibid.* — 1989. — Vol. 49, N 1. — P. 153—157.
13. Sharma O.P., Vita J.B. // *Arch. Ophthalmol.* — 1983. — Vol. 101, N 4. — P. 559—561.
14. Weinred R.W., Saudman R., Ryder M.I., Friberg T.R. // *Arch. Ophthalmol.* — 1985. — Vol. 103, N 1. — P. 34—36.
15. Кузнецова Т.П., Чеснокова Н.Б., Пасхина Т.С. // *Вопр. мед. химии*. — 1994. т. 40 — N3. — С. 37—42.
16. Чеснокова Н.Б., Сосулина Н.Е., Кузнецова Т.П. // *Офтальмол. журн.* — 1990. — N6. — С. 351—354.
17. Елисеева Ю.Е., Орехович В.Н., Павлихина Л.В. // *Биохимия*. — 1976. — Т. 41, N3. — С. 506—512.
18. Кочетов Г.А. // *Практическое руководство по энзимологии*. — М., 1980. — С. 224—226.
19. Campbell D.J. // *J. Clin. Invest.* — 1987. — Vol. 79, N1. — P. 1—6.
20. Schutte B., Lindner J. // *Kininogenases, Kallikrein 4*. — Stuttgart, 1977. — P. 161—177.
21. Weinstock J.V. // *Sarcoidosis*. — 1986. — Vol. 3, N 1. — P. 19—26.
22. Fyhrquist F., Gronhagen-Riska C., Hortling L. et al. // *Clin. exp. Hypertens.* — 1983. — Vol. A5. — P. 1319—1330.

ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME ACTIVITY OF IN RABBIT LACHRYMAL LIQUID AFTER A  
BURN OF CORNEA

*Kost O.A.<sup>1</sup>, Chesnokova N.B.<sup>2</sup>, Kuznetsova T.P.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Moscow State University, Chemistry Department

<sup>2</sup>Moscow Helmholtz Institute of Eye Disease.

In the experimental model of severe alkaline burns of the rabbit cornea we found the dependence of angiotensin-converting enzyme activity in tears upon both the time periods and the degree of inflammation. It was indicated that the enzyme activity in tears of animals with ulceration of deep tissues of cornea was much higher than in tears of animals with surface erosion of cornea.