

УДК 617.72-007.17-053.9-06:617.7-008.954]-008.6-092:[617.749-008.936.6+617.749-008.939.624-097

©Коллектив авторов

ОБЩАЯ ТРИПСИНОПОДОБНАЯ, ЭЛАСТАЗОПОДОБНАЯ И АНТИТРИПТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ У ПАЦИЕНТОВ С КОНТУЗИЕЙ ГЛАЗА

**БЕНДЕЛИК Е.К., ДОЦЕНКО В.Л., НЕШКОВА Е.А., МОШЕТОВА Л.К.,
ЯРОВАЯ Г.А.**

Российская медицинская академия последипломного образования, 123836, Москва,
Баррикадная, д.2, факс. 945 24 15

Показано участие процессов протеолиза в патогенезе контузий глаза. Отмечено двухфазное возрастание общей трипсиноподобной активности и постепенное увеличение эластазоподобной активности в слезе поврежденного глаза в течении первых 2-х недель после контузии. Параллельно в слезе травмированного глаза сразу после контузии обнаружено повышение антитриптической активности, которая в дальнейшем снижалась, достигая минимальных значений к 10-19 дню. При этом уровень антитриптической активности прямо коррелировал со степенью повреждений конъюнктивы, роговицы. Такие изменения протениназо-ингибиторного баланса указывают на то, что воспалительные процессы в постконтузионном периоде продолжают не менее двух недель, несмотря на клинически наблюдаемую положительную динамику. Об этом свидетельствуют также выявленные обратные корреляционные связи между эластазоподобной активностью в слезе травмированного глаза и тяжестью травмы, отеком роговицы, поверхностными ранениями конъюнктивы, роговицы, уровнем гифемы. Эти факты патогенетически обосновывают необходимость проведения при контузиях глаза противовоспалительной терапии не менее двух недель с применением поливалентных ингибиторов сериновых протеолитических ферментов в случаях тяжелых травм.

Ключевые слова: общая трипсиноподобная (БАЭЭ) активность, эластазоподобная активность, антитриптическая активность, контузия глаза

ВВЕДЕНИЕ. Известно, что протеолитические ферменты или протеиназы занимают особое место в жизнедеятельности организма. Расщепляя одну или несколько пептидных связей в белковой молекуле протеиназы активируют или изменяют свойства белков, что может служить пусковым механизмом различных биохимических процессов. Протеиназы, по существу контролируют все процессы метаболизма, участвуют в рецептор - медиаторной передаче, в координации и осуществлении защитных реакций организма, в том числе таких, как гемокоагуляция, фибринолиз, кининогенез, активация системы комплемента. Активность протеиназ зависит, как правило, от скорости их образования из неактивных предшественников и инактивации специфическими ингибиторами, которые присутствуют в клетках, тканях, в плазме крови и составляют так называемый антипротеолитический потенциал [1-7]. При взаимодействии протеолитических ферментов и их ингибиторов сохраняется определенное равновесие, которое может нарушаться при определенных патологических условиях, что ведет к негативным последствиям для организма, вплоть до развития критических состояний [8-11].

Среди протеолитических ферментов особый интерес представляют наиболее распространенные в организме сериновые протеиназы, в том числе локализованная в азурофильных гранулах нейтрофильных лейкоцитов человека гранулоцитарная эластаза. Возрастание активности эластазы во внеклеточном пространстве рассматривается как основное звено патогенеза многих заболеваний, при которых происходит инфильтрация тканей активированными нейтрофилами, наблюдаемая прежде всего при воспалительных процессах. Попадая в кровяное русло эластаза может разрушать белки протеолитических систем плазмы, тем самым нарушая процессы защиты и адаптации [3-8].

Основными ингибиторами сериновых протеиназ в плазме крови являются α_1 протеиназный ингибитор (α_1 -ПИ), интер- α -трипсиновый ингибитор, инактиватор С1-эстеразы, α_1 -антихимотрипсин, α_2 - макроглобулин (α_2 -МГ) и антитромбин III [12,13]. В плазме крови эластаза в основном связывается с α_1 -ПИ, в меньшей степени - с α_2 -МГ и интер- α -трипсиновым ингибитором.

Исследование активности протеолитических ферментов и их ингибиторов в офтальмологии проводилось в основном при различных патологиях роговицы, таких как термические и химические ожоги, бактериальные инфекции, герпетические поражения, отторжение роговичного трансплантата, хронические язвы, а также при эндогенных и факогенных увеитах, катаракте, врожденной глаукоме, цилиохориоидальной отслойке, проникающих ранениях [14-20]. Роль протеиназ в развитии патологических процессов при контузии глаза практически не изучалась.

Следует заметить, что особой диагностической ценностью при глазных заболеваниях обладают исследования слезной жидкости [21,12]. Состояние протеиназо-ингибиторного потенциала в слезе позволяет судить о проницаемости сосудистой стенки и об активности плазменных протеолитических ферментов и их ингибиторов в регионарном микроциркуляторном русле. Эластазоподобная активность в слезе отражает по сути локальный процесс воспаления. Все вышперечисленное, а также возможное участие протеиназ в процессах деструкции тканей, воспалении, репарации и проявлении особых клинических симптомов, возникающих при контузии глаза, обусловило необходимость данного исследования, задачей которого явилось изучение роли сериновых протеиназ в развитии постконтузионных процессов у пациентов с контузией глаза. Для этого было проведено определение общей трипсиноподобной (аргинин - эстеразной), эластазоподобной и антитриптической активностей в слезе и сыворотке крови.

МЕТОДИКА. Общую трипсиноподобную активность в слезной жидкости (СЖ) и сыворотке крови (СК), представляющую собой суммарную активность содержащихся в биологической жидкости трипсиноподобных сериновых протеиназ, определяли по скорости расщепления N- α -бензоил-L-аргинин-этилового эфира (БАЭЭ) [1,2]. Об эластазоподобной активности в биологических жидкостях судили по скорости расщепления N-терт-бутоксикарбонил-аланин-нитрофенилового эфира (BOC-Ala-ONp). Антитриптическую активность (АТА) определяли по методу, основанному на подавлении ингибиторами, содержащимися в исследуемых биологических жидкостях (прежде всего α_1 -ПИ), активности трипсина, остаточные значения которой измеряли по расщеплению БАЭЭ [22].

Определение указанных показателей проводили в СК и СЖ травмированного и парного интактного глаза у 56 пациентов с контузиями глазного яблока в большинстве случаев средней степени тяжести в различные сроки после травмы. Группу контроля составили 11 практически здоровых лиц. Для удобства интерпретации данных исследуемые активности определяли в расчете на 1,0 мл и на 1,0 мг белка СЖ. О содержании белка в СЖ судили по оптической плотности раствора слезы при длине волны 280 нм.

Для более точной оценки и удобства проведения статистических расчетов тяжесть контузии глазного яблока оценивалась по балльной шкале [23].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Обнаружено бифазное, статистически достоверное ($p < 0,05$) повышение общей активности трипсиноподобных протеиназ в СЖ травмированного глаза пациентов с контузией глазного яблока по сравнению с контролем в первые дни после травмы и в конце 2-ой, начале 3-ей недели (таблица, рис.1,2). К концу месяца общая трипсиноподобная активность достигала нормы. Сравнительный анализ значений общей трипсиноподобной активности в СЖ травмированного глаза и в СК, а также сопоставление этих данных с отдельными симптомами и тяжестью контузии глаза в день исследования, выраженной в баллах, не выявили в данной группе пациентов существенных закономерных связей. В то же время установлена прямая корреляция между уровнями удельной БАЭЭ-эстеразной активности в СЖ поврежденного и парного здорового глаза ($p < 0,05$; $r = 0,755$).

Таблица. Общая протеолитическая (БАЭЭ-эстеразная), эластазоподобная и антитриптическая активность в СЖ травмированного глазного яблока в различные сроки после контузии глаза ($\bar{x} \pm m$)

активность		СЖ травмированного глаза				СЖ группы контроля
		до 3-х дней	4-9 день	10-19 день	20-31 день	
общая трипсиноподобная (БАЭЭ-эстеразная)	n	12	10	11	11	11
	мЕ/мл	9,675 ± 2,764*	8,116 ± 2,559	8,479 ± 2,417*	4,654 ± 1,424	2,856 ± 0,947
	мЕ/мг	1,713 ± 0,489*	0,785 ± 0,245	0,951 ± 0,315	0,475 ± 0,163	0,453 ± 0,151
эластазоподобная	t	11	10	10	10	10
	мЕ/мл	6,142 ± 2,278	15,924 ± 4,631*	19,147 ± 5,492*	16,264 ± 3,7*	5,474 ± 1,782
	мЕ/мг	1,298 ± 0,281*	1,611 ± 0,491*	2,29 ± 0,358**	1,963 ± 0,445**	0,474 ± 0,146
антитриптическая	n	11	13	10	10	10
	ИЕ/мл	0,611 ± 0,179	0,604 ± 0,178	0,133 ± 0,434*	0,317 ± 0,103	0,293 ± 0,037
	ИЕ/мг	0,105 ± 0,025*	0,097 ± 0,03	0,022 ± 0,007*	0,04 ± 0,015	0,044 ± 0,006

Примечание: * - различия в сравнении с группой контроля достоверны, $p < 0,05$; ** - различия в сравнении с группой контроля достоверны, $p < 0,01$.

Исследования эластазоподобной активности у пациентов с контузией глаза показали, что в результате тупой травмы глазного яблока происходит постепенное возрастание этой активности в СЖ поврежденного глаза в течении первых двух недель с последующим её снижением в конце месяца (таблица, рис.1,2).

Превышение нормального уровня эластазоподобной активности статистически достоверно практически во все периоды исследования за исключением активности в мЕ/мл первых трех дней ($p < 0,05$ для активности в мЕ/мл, а также удельной активности первых трех дней и 4-9 дня с момента травмы; $p < 0,01$ для удельной активности 10-19 дня и 20-31 дня после контузии глаза). Установлена статистически достоверная обратная корреляция между эластазоподобной активностью в СЖ поврежденного глаза и тяжестью травмы ($r = -0,4353$, $p < 0,01$ для активности в мЕ/мл и $r = -0,3196$, $p < 0,05$ для удельной активности) и такими симптомами, как степень инъекции глазного яблока (лишь для активности в мЕ/мл $r = -0,3758$, $p < 0,05$), выраженность отека роговицы (лишь для активности в мЕ/мл $r = -0,5067$, $p < 0,01$), степень поверхностных ранений глазного яблока, (для активности в мЕ/мл $r = -0,3388$, $p < 0,05$, для удельной активности $r = -0,4668$, $p < 0,01$), уровень гифемы (для активности в мЕ/мл $r = -0,5703$, $p < 0,01$, для активности в мЕ/мг

$r = -0,4131, p < 0,05$), а также выявлены обратные корреляционные связи между эластазоподобной активностью в СК и тяжестью травмы в день исследования, выраженной в баллах ($r = -0,7844, p < 0,01$), обширностью ран конъюнктивы, поверхностных повреждений роговицы ($r = -0,7928, p < 0,01$). При сравнительном анализе эластазоподобной активности в СЖ травмированного, парного здорового глаза и СК в данной группе больных удалось выявить лишь тенденцию к прямой корреляции между уровнем данной активности в СЖ поврежденного и контралатерального интактного глаза.

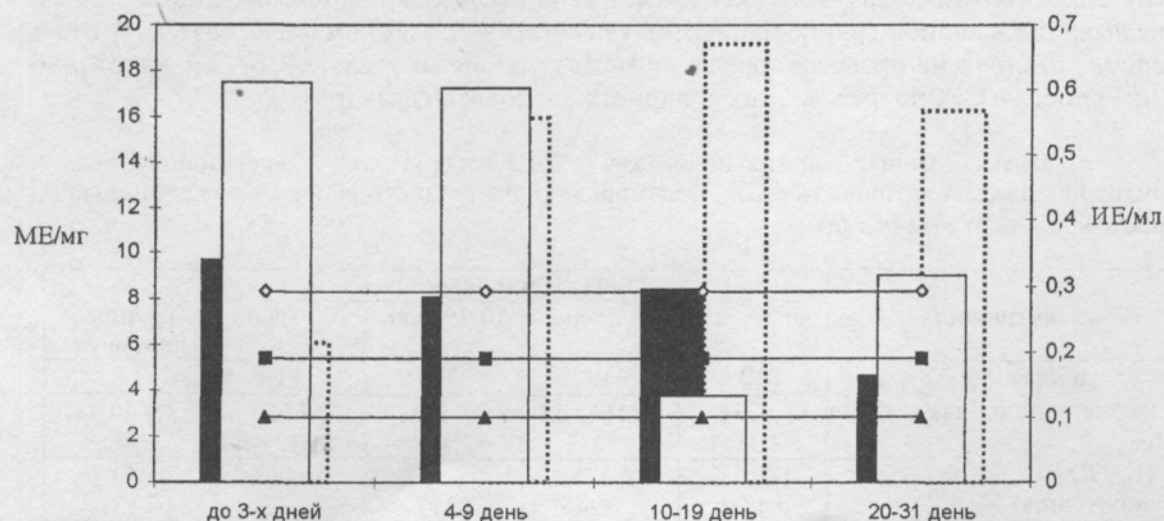


Рисунок 1.

Общая трипсиноподобная (БАЭЭ-эстеразная), эластазоподобная и антитриптическая активность в слезе (на мл) травмированного глаза в различные сроки после контузии глазного яблока (средние значения).

- - общая БАЭЭ-эстеразная активность (МЕ/мл) в СЖ травмированного глаза
- - эластазоподобная активность (МЕ/мл) в СЖ травмированного глаза
- ▤ - антитриптическая активность (ИЕ/мл) травмированного глаза
- ▲ - общая БАЭЭ-эстеразная активность (МЕ/мл) в СЖ группы контроля
- - эластазоподобная активность (МЕ/мл) в СЖ группы контроля
- ◆ - антитриптическая активность (ИЕ/мл) в СЖ группы контроля

Исследования антитриптической активности в СЖ травмированного глаза больных с контузией глазного яблока показали, что с первых дней после тупой травмы глаза происходит значительное, статистически достоверное ($p < 0,05$) возрастание удельной АТА по сравнению с контролем. В течении последующих 2-х недель наблюдается снижение антитриптической активности, наиболее выраженное и статистически достоверное ($p < 0,05$) с 10 по 19 дни с момента травматизации. В дальнейшем к концу месяца значения ингибиторного потенциала СЖ травмированного глаза практически находились на уровне контрольных величин (таблица, рис.1,2). Сравнительный анализ выявил прямые, статистически достоверные корреляционные связи между уровнем антитриптической активности в СЖ травмированного глаза и обширностью поверхностных повреждений роговицы, ран конъюнктивы (в ИЕ/мл; $p < 0,05, r = 0,3089$), уровнем антитриптической активности в СЖ парного здорового глаза (в ИЕ/мл $p < 0,05, r = 0,759$; для удельной активности - $p < 0,05, r = 0,65$).

Для удобства интерпретации данных в 30 случаях был рассчитан протеиназо-ингибиторный коэффициент, представляющий собой отношение значения общей трипсиноподобной (БАЭЭ-эстеразной) активности (в Е/мл или в Е/мг) к значению антитриптической активности (в ИЕ/мл или в ИЕ/мг). Отмечено его колебание в СЖ травмированного глаза в пределах 0 - 0,506, в шести случаях значительно

превышающее (0,048 -0,506) контрольные цифры - 0-0,0347. Повышение значения протеиназо-ингибиторного коэффициента наблюдалось у двух больных с контузией глазного яблока легкой степени, осложненной у одного пациента гифемой, эрозией роговицы и невыраженными ретинальными геморрагиями у другого. В 3-х случаях клинически отмечены контузии средней степени тяжести, осложненные на одном глазу раной конъюнктивы, гифемой, помутнением сетчатки, а в 2-х других случаях - обширным центральным субретинальным кровоизлиянием, помутнением сетчатки и хориоретинальными дегенеративными изменениями. У 1 пациента наблюдалась тяжелая контузия глазного яблока с вторичной гипертензией, обусловленной сублокацией хрусталика.

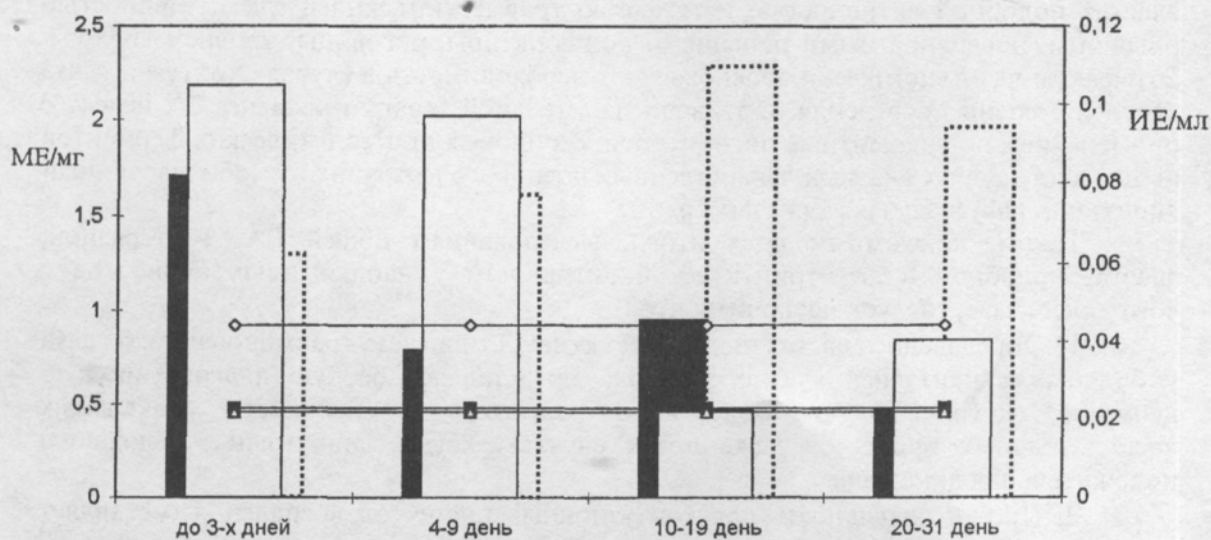


Рисунок 2.

Общая трипсिनоподобная (БАЭЭ-эстеразная), эластазоподобная и антитриптическая активность в СЖ (на мг) травмированного глаза в различные сроки после контузии глазного яблока (средние значения).

- - общая БАЭЭ-эстеразная активность (мЕ/мл) в СЖ травмированного глаза
- - эластазоподобная активность (мЕ/мл) в СЖ травмированного глаза
- ⋯ - антитриптическая активность (ИЕ/мл) травмированного глаза
- △ - общая БАЭЭ-эстеразная активность (мЕ/мл) в СЖ группы контроля
- - эластазоподобная активность (мЕ/мл) в СЖ группы контроля
- ◆ - антитриптическая активность (ИЕ/мл) в СЖ группы контроля

Проведенные исследования выявили бифазное возрастание общей БАЭЭ-эстеразной активности в СЖ поврежденного глаза, вызванное контузией глазного яблока. В то же время в СЖ травмированного глаза наблюдалось выраженное повышение эластазоподобной активности, которое, в отличие от общей трипсिनоподобной активности, происходило постепенно в течении первых двух недель с момента травмы с последующим её снижением в конце месяца. Данным изменениям общей трипсिनоподобной и эластазоподобной активности в СЖ поврежденного глазного яблока сопутствовала практически противоположная по направленности динамика антитриптической активности. Первоначально значительно возросшая АТА в ответ на травматизацию глаза (прямая корреляция с повреждениями конъюнктивы, роговицы), в последующие две недели снижалась ниже контрольного уровня, а в конце месяца повышалась до значений группы контроля (рис.1,2). Сопоставление динамики рассматриваемых показателей свидетельствует о том, что в первые 7 - 10 дней после контузии глаза и в конце месяца отношение протеиназного потенциала к ингибиторному относительно сбалансировано, а в конце второй, начале третьей недели наблюдается преобладание протеиназного потенциала над ингибиторным. Снижение антитриптической

активности вероятнее всего происходит из-за связывания α_1 протеиназного ингибитора эластазой, что проявляется в практически "зеркальном" отражении динамики эластазоподобной и антитриптической активностей (рис.1,2).

Динамика общей трипсиноподобной (БАЭЭ) активности, преобладание протеиназного потенциала над ингибиторным в конце 2-й недели после травмы, и, прежде всего, динамика эластазоподобной активности в СЖ поврежденного глаза указывают на то, что воспалительные процессы в травмированном глазу продолжаются не менее 2-х недель с момента контузии глазного яблока. Это происходит несмотря на клинически наблюдаемую положительную динамику, о чем свидетельствуют достоверные обратные корреляционные связи между эластазоподобной активностью и тяжестью травмы, инъекцией глаза, отечностью роговицы, поверхностными ранениями конъюнктивы, роговицы, уровнем гифемы. Эти факты патогенетически обосновывают необходимость в случаях контузии глаза средней степени проведения противовоспалительной терапии не менее 2-х недель с применением поливалентных ингибиторов сериновых протеолитических ферментов (в частности в виде глазных лекарственных пленок, содержащих иммобилизованный апротинин [24]) в случаях тяжелых травм.

Таким образом, подводя итоги исследованиям общей БАЭЭ-эстеразной, эластазоподобной и антитриптической активности у наблюдаемых пациентов с контузией глаза, следует заключить, что:

1. Определение эластазоподобной активности в слезе травмированного глаза у больных с контузией глазного яблока представляет особую диагностическую ценность, позволяющую объективно оценить интенсивность локальных воспалительных процессов даже в тех случаях, когда клинически наблюдается положительная динамика.

2. Продолжительность постконтузионных процессов воспаления составляет не менее 2-х недель с момента травмы и сопровождаются истощением ингибиторного потенциала. Это обосновывает данную длительность противовоспалительной терапии с применением ингибиторов сериновых протеиназ в случаях тяжелой контузии.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Пасхина Т.С., Доценко В.Л., Блинникова Е.И. (1973) Биохимия, 38, 2, 420-423.
- 2 Пасхина Т.С., Яровая Г.А. (1970) Биохимия, 35, 5, 1055-1058.
- 3 Степанов Р.В., Платонова Л.В., Суслов В.Л., Пасхина Т.С. (1991) Вопр. мед. химии, 37, 76-78.
- 4 Barret A.J. (1981) Methods Enzymol., 80, part C, 581-588.
- 5 Bond J.S., Butler P.E. (1984) Ann. Rev. Biochem., 56, 333-364.
- 6 Janoff A. (1985) Ann. Rev. Med., 36, 207-216.
- 7 Matsuda T., Nagasawa S., Koide T., Koyama J. (1985) J. Biochem., 98, 229-236.
- 8 Неишкова Е.А. (1994) Гранулоцитарные сериновые протеиназы и их действие на калликреин - кининовую систему плазмы крови человека. Автореф. дисс. ... к.б.н., М., 18.
- 9 Bieth J. (1986) Regulation of Matrix Accumulation. Acad. Press., 217-320.
- 10 Heck L.W., Blackburn W.D., Irwin M.H., Abrahamson D.R. (1990) Am. J. Pathol., 136, 1267-1274.
- 11 Tschesche H., Engelbrecht S., Wenzel H.R. (1984) Methods of Enzymatic Analysis. Weinheim: Verlag Chemie, 176-184.
- 12 Чеснокова Н.Б. (1986) МРЖ, р. VIII, 3, 7-11.
- 13 Travis J., Salvesen G. (1983) Ann. Rev. Biochem., 52, 655-709.

- 14 *Акташева Е.Л.* (1993) Значение калликреин - кининовой системы в патогенезе и лечении эндогенных увеитов (клинико - экспериментальное исследование). Автореф. дисс. к.м.н., М., 26.
- 15 *Багдаш К.С.* (1985) Патогенетическое обоснование применения протеиназ в лечении термических ожогов глаз. Автореф. дисс. к.м.н., М., 22.
- 16 *Доценко В.Л., Нахикян Р.И., Соловьева Н.И. и др.* (1990) *Вопр. мед. химии*, 36 №3, 73-76.
- 17 *Пятышина О.В.* (1989) Состояние калликреин-кининовой системы при проникающих ранениях глаза. Автореф. дисс. ... к.м.н., М., 16.
- 18 *Чеснокова Н.Б., Касавина Б.С., Щипанова А.И.* (1983) *Вестн. офтальм.*, 1, 48-50.
- 19 *Чеснокова Н.Б., Кузнецов Т.П., Сосулина Н.Е.* (1994) *Вестн. офтальм.*, 2, 20-22.
- 20 *Чеснокова Н.Б., Сосулина Н.Е.* (1986) *Вопр. мед. химии*, 32, №4, 110-113.
- 21 *Сомов Е.Е., Бржеский В.В.* (1994) Слеза. Физиология. Методы исследования. Клиника. Санкт - Петербург, "Наука", 156.
- 22 *Нартикова В.Ф., Пасхина Т.С.* (1979) *Вопр. мед. химии*, 25, 499-502.
- 23 *Бенделик Е.К.* (1991) Комплексные методы лечения проникающих ранений глаза (реконструктивная микрохирургия, сорбционная терапия). Автореф. дисс. к.м.н., М., 18.
- 24 *Мороз Н.А.* (1998) Полимерные пролонгированные лекарственные формы аprotинина. Автореф. дисс. к.х.н., М., 22.

Поступила 17.12.98.

THE TRYPSIN-LIKE ACTIVITY, ELASTASE-LIKE ACTIVITY AND ANTIPROTEINASE POTENTIAL IN PATIENTS WITH CONTUSION INJURY OF THE EYE

BENDELIC E.C., DOTSENKO V.L., NESHKOVA E.A., MOSHETOVA L.C., YAROVAYA G.A.

Russian Medical Academy for Postgraduate Education, Barrikadnaya, 2, Moscow 123836, Russia, fax. 945 24 15.

The investigations of tear fluid of eye after contusion injury revealed on increase of trypsin-like activity in 1-3 day and 10-19 day after trauma, the progressively elevation of elastase-like activity and lowering of inhibitory potential along 2-3 week. It was detected indirect correlation between the elastase-like activity and severity of the contusion injury of the eye, the grade of corneal edema, corneal erosion and conjunctival wound, hyphema. This results was shown the participation and the role of proteolytic and inflammatory processes in pathogenesis of eye blunt trauma. It was establish that the during of local inflammation is 2 week end more and is necessary antiinflammatory therapy with use the proteases inhibitors.

Keyword: trypsin-like activity, elastase-like activity, antiproteinase potential, eye contusion injury.