

УДК 615.45:615.33

БИОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ 5% АЛЬТАНОВОЙ МАЗИ НА МАРКЕРНЫЕ ФЕРМЕНТЫ РОГОВОЙ ОБОЛОЧКИ

© 2004 г. Н.Д.Бунятыч, В.В.Березнякова, Т.Ю.Глазкова

ММА им.И.М.Сеченова, Москва

По данным литературы установлено, что механизм противовоспалительного действия альтанасубстанции связан с его антиоксидантными свойствами, способностью уменьшать сосудистую проницаемость и активность биогенных аминов [4, 5].

Учитывая, что изменение спектра нормальной активности ряда ключевых ферментов роговой оболочки глаза является критерием выраженности патологического процесса в ней и, одновременно, показателем эффективности применяемого лекарственного препарата, нами изучено влияние новой лекарственной формы альтана – 5% альтановой мази на маркерные ферменты роговой оболочки – лактатдегидрогеназу (ЛДГ) и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу (Г-6-ФДГ) на модели глубокого экзогенного кератита [1]. Выбор дегидрогеназ предметом биохимического исследования объясняется их участием в превращении углеводов, связанных с окислительно-восстановительными процессами и соответственно с энергетическим обменом [2, 7], а также с синтезом нуклеиновых кислот, необходимых для процесса размножения клеток [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Статистическая обработка экспериментального материала проведена методами вариационной статистики с использованием t° -критерия Стьюдента [6].

Активность лактатдегидрогеназы (К.Ф.1.1.1.27) определяли спектрофотометрически в эпителии и строме роговиц по Henry et.al. [7] и выражали в мкмоль/мин/г влажной ткани.

Фермент принимает участие в 3-ем этапе гликолиза, катализируя восстановление пирувата до лактата и является НАД-зависимым энзимом. ЛДГ находится в непрочной связи с мембранами эндоплазматической сети и отражает анаэробный вариант утилизации сахаров, являясь маркером гликолитического процесса [3].

Активность цитоплазматической глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (К.Ф.1.1.1.49) – ключевого фермента аэробного превращения фосфогексоз по пути пентозного цикла [7], необходимых при образовании нуклеиновых кислот определяли также спектрофотометрически в эпителии и строме роговиц по

Korberg A., Horecker V. [9] и выражали в мкмоль/мин/г влажной ткани. Эпителий роговицы получали соскобом по Smelser G. [10].

Животные для исследования были разделены на 4 группы: первая – интактные животные (контрольная группа – 5 кроликов, 10 глаз); вторая – животные с экспериментальным глубоким экзогенным кератитом без лечения, получавшие физиологический раствор в инстилляциях (нелеченный контроль – 10 кроликов, 20 глаз); третья – животные с экспериментальным глубоким экзогенным кератитом, леченные 5% альтановой мазью (10 кроликов, 20 глаз) и четвертая – животные с экспериментальным глубоким экзогенным кератитом, леченные 1% арениновой мазью (10 кроликов, 20 глаз).

Исследования проводили на 1, 3, 5, 7 сутки после повреждения, лечение начинали сразу после нанесения травмы. Мазь закладывали за веки 1 раз в день, физиологический раствор инстиллировали в конъюнктивальную полость также 1 раз в день.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных биохимических исследований представлены в табл.1.

При исследовании активности ЛДГ в роговичной ткани глаз интактных животных установлено, что наибольшей ферментативной активностью обладал эпителий роговиц ($200 \pm 11,6$ мкмоль/мин/г). Активность его в строме роговой оболочки была в 10 раз ниже ($18,1 \pm 0,9$ мкмоль/мин/г). Активность Г-6-ФДГ в эпителии роговиц была в 2 раза ниже активности ЛДГ ($0,85 \pm 0,26$ мкмоль/мин/г), а в строме активность фермента не установлена.

Таблица 1

Активность дегидрогеназ (мкмоль/мин/г) в эпителии и строме роговиц интактных кроликов ($M \pm m$)

Объект исследования	Ферменты	
	ЛДГ	Г-6-ФДГ
Эпителий	$200 \pm 11,6$	$0,85 \pm 0,26$
Строма	$18,1 \pm 0,9$	0

Примечание: n = 10

Данные исследования активности дегидрогеназ в роговичной ткани у животных с экспериментальным экзогенным кератитом без лечения и у животных с экспериментальным экзогенным кератитом в динамике лечения 5% альтановой и 1% аренариновой мазями представлены в табл. 2.

Анализ результатов табл. 2 свидетельствуют о том, что в первые сутки после травмы роговой оболочки у животных с экспериментальным глубоким экзогенным кератитом без лечения значительно нарушались соотношения активности ферментов в эпителии и строме роговой оболочки. Так, активность ЛДГ снижалась, причем в эпителии сильнее, чем в строме. В эпителии – $200 \pm 11,6$ и $8,7 \pm 1,3$ мкмоль/мин/г соответственно, в строме – $18,1 \pm 0,9$ и $1,8 \pm 0,4$ соответственно, $p < 0,05$.

Активность Г-6-ФДГ также резко падала в эпителии ($0,33 \pm 0,08$ мкмоль/мин/г по сравнению с нормой $0,85 \pm 0,26$ мкмоль/мин/г), однако наблюдали появление активности фермента в строме роговой оболочки (0 активности и $0,13 \pm 0,04$ мкмоль/мин/г соответственно, $p < 0,05$).

Полученные нами данные динамики активности ферментов (табл. 1 и 2) свидетельствуют о развитии выраженного воспалительного процесса в роговой оболочке.

На третьи сутки у животных с глубоким экзогенным кератитом без лечения (нелеченный аутоконтроль) активность фермента ЛДГ в переднем эпителии и строме роговой оболочки оставалась достаточно низкой ($38,7 \pm 1,5$ и $2,3 \pm 0,3$ мкмоль/мин/г соответственно). Активность Г-6-ФДГ в переднем

эпителии удерживалась на низком уровне ($0,41 \pm 0,05$): в то время как в строме роговой оболочки активность фермента уменьшалась ($0,13 \pm 0,04$ и $0,09 \pm 0,04$ соответственно, $p < 0,05$).

На пятые сутки эксперимента у животных без лечения по сравнению с третьими сутками опыта установлено статистически достоверное изменение активности ЛДГ и Г-6-ФДГ: активность ЛДГ в переднем эпителии на пятые сутки составляла $95 \pm 5,2$ мкмоль/мин/г, а Г-6-ФДГ – $0,43 \pm 0,05$ мкмоль/мин/г. Вместе с тем выявлено понижение активности Г-6-ФДГ в строме ($0,09 \pm 0,04$ и $0,07 \pm 0,01$ мкмоль/мин/г соответственно, $p < 0,05$ (табл. 2, рис 1-4).

На седьмые сутки эксперимента у животных без лечения наблюдали достаточно высокую активность ЛДГ как в эпителии ($155 \pm 6,4$ мкмоль/мин/г), так и в строме ($10,2 \pm 0,5$ мкмоль/мин/г), а Г-6-ФДГ – в эпителии роговой оболочки ($0,64 \pm 0,1$ мкмоль/мин/г), в строме активность фермента незначительна ($0,03 \pm 0,02$ мкмоль/мин/г).

Однако, несмотря на клиническое выздоровление, нормализации уровня ферментов в сравнении с исходными показателями интактных животных не было достигнуто (табл. 2).

При лечении глубокого экзогенного кератита 5% альтановой и 1% аренариновой мазями через сутки после повреждения нарушение активности ферментов как в эпителии, так и в строме были аналогичны изменениям, выявленным в эти же сроки у животных без лечения. Однако, количественные изменения активности ферментов в строме и переднем эпителии роговиц были нарушены в меньшей степени (табл. 2, рис. 1-4).

Таблица 2

Активность дегидрогеназ (мкмоль/мин/г влажной ткани) в эпителии и строме роговиц кроликов с экспериментальным глубоким экзогенным кератитом

Объект исследования	Кролики									
	без лечения (нелеченный контроль)				леченные 5% альтановой мазью			леченные 1% аренариновой мазью		
	Сроки наблюдения, сутки									
	1	3	5	7	1	3	5	1	3	5
	Лактатдегидрогеназа									
Эпителий	$8,7 \pm 1,3$	$38,7 \pm 1,5$	$95 \pm 5,2$	$155 \pm 6,4$	$37,9 \pm 3,4$	$118 \pm 3,32$	$195,5 \pm 4,5$	$31,7 \pm 4,2$	$111 \pm 2,12$	$193 \pm 6,5$
Строма	$1,8 \pm 0,4$	$2,3 \pm 0,3$	$7,1 \pm 1,0$	$10,2 \pm 0,5$	$7,6 \pm 2,5$	$12,2 \pm 1,0$	$17,9 \pm 1,1$	$7,0 \pm 1,0$	$9,6 \pm 0,9$	$18,0 \pm 1,0$
	Глюкозо – 6 – фосфат – дегидрогеназа									
Эпителий	$0,33 \pm 0,08$	$0,41 \pm 0,05$	$0,43 \pm 0,05$	$0,64 \pm 0,1$	$0,50 \pm 0,03$	$0,66 \pm 0,04$	$0,86 \pm 0,26$	$0,46 \pm 0,01$	$0,55 \pm 0,09$	$0,85 \pm 0,3$
Строма	$0,13 \pm 0,04$	$0,09 \pm 0,04$	$0,07 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,01$	0	$0,09 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,01$	0

Примечание: $n = 5$, $p < 0,05$ в сравнении с исходными данными нелеченных животных (контроль)

Вместе с тем у животных, получавших 5% альтановую мазь нарушение соотношения активности ЛДГ и Г-6-ФДГ в эпителии и строме было выражено значительно в меньшей степени, чем в группе животных, леченных 1% аренариновой мазью.

Так, у животных, получавших 5% альтановую мазь ЛДГ в эпителии и строме составляла $37,9 \pm 3,4$ и $7,6 \pm 2,5$ мкмоль/мин/г, а Г-6-ФДГ – $0,50 \pm 0,03$ и $0,06 \pm 0,02$ мкмоль/мин/г соответственно. В группе животных с лечением 1% аренариновой мазью уровень ЛДГ в эпителии и строме достигал $31,7 \pm 4,2$ и $7,0 \pm 1,0$ мкмоль/мин/г, а Г-6-ФДГ – $0,46 \pm 0,01$ и $0,09 \pm 0,03$ мкмоль/мин/г соответственно.

Биохимически тенденция к нормализации количественного и качественного соотношения активности дегидрогеназ в переднем эпителии и строме роговиц в двух группах животных, получавших лечение, отмечали уже на третьи сутки. Однако, и в эти сроки наблюдения достоверные различия в степени активности ЛДГ и Г-6-ФДГ в эпителии и строме роговиц были не выявлены у животных, получавших 5% альтановую и 1% аренариновую мази. Так, у животных, леченных 5% альтановой мазью, активность ЛДГ на третьи сутки в эпителии достигала $118 \pm 3,32$ мкмоль/мин/г, в строме – $12,2 \pm 1,0$ мкмоль/мин/г, а у животных, леченных 1% аренариновой мазью $111 \pm 2,12$ и $9,6 \pm 0,9$ мкмоль/мин/г соответственно ($p < 0,05$). Уровень активности Г-6-ФДГ в тех же группах был равен $0,66 \pm 0,04$ и $0,55 \pm 0,09$ мкмоль/мин/г в эпителии, в строме – $0,02 \pm 0,01$ и $0,04 \pm 0,01$ мкмоль/мин/г соответственно ($p < 0,05$).

Несмотря на клиническое выздоровление (3-е суток после развития воспалительного процесса), нормализация активности ферментов в строме и эпителии роговиц под влиянием лечения 5% альтановой и 1% аренариновой мазями наступила только на пятые сутки (табл. 2).

Достоверных различий в степени колебания активности ферментов у животных, получавших лечение в эти сроки, как в переднем эпителии, так и в строме роговой оболочки выявлено не было. Активность ЛДГ в эпителии достигала $195,5 \pm 4,5$ и $193 \pm 6,5$ мкмоль/мин/г ($p > 0,05$), в строме $17,9 \pm 1,14$ и $18,0 \pm 1,0$ мкмоль/мин/г соответственно ($p > 0,05$). Уровень активности Г-6-ФДГ в эпителии роговиц у животных этих групп $0,86 \pm 0,26$ и $0,85 \pm 0,3$ мкмоль/мин/г соответственно ($p > 0,05$), а в строме активность фермента отсутствовала. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы об эффективности препаратов из ольхи клейкой [4, 5].

ВЫВОДЫ

1. 5% альтановая мазь нормализует биохимические показатели соотношения активности лактатдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эпителии и строме роговой оболочки у животных с глубоким экзогенным кератитом, обеспечивая тем самым нормализацию активности ферментов цикла Кребса.

2. Более выраженное влияние на активность ключевых ферментов роговой оболочки в первые трое суток лечения оказывала 5% альтановая мазь.

3. Учитывая, что нормализация биохимических процессов в роговичной ткани наступает на 2 суток позже визуального клинического выздоровления, лечение экзогенного кератита 5% альтановой мазью следует продолжить еще в течение 2-3 суток после клинического выздоровления животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Бабак А.Ю.* Фармакотерапия экзогенных кератитов. Дисс.канд.мед.н. – Харьков, 1991. – С.29-30.
2. *Протопопов С.Б.* Лечение экспериментальной стафилококковой язвы роговой оболочки бактериофагом // Теоретические и практические вопросы бактериофагии. – Тбилиси, 1994. – С.422-424.
3. *Пчеляков В.Ф., Арнаутова Л.В.* Репаративная посттравматическая регенерация роговицы кроликов при использовании кватерина // Офтальм. журн. – 1987. – № 6. – С.369-373.
4. *Рядных Е.К.* Противовоспалительное и общетоксическое действие альтана из ольхи клейкой: Дис.канд.биол.наук. – Харьков. – 1988. – 138с.
5. *Сербин А.Г.* Фитохимическое изучение некоторых представителей родов ольха, череда, тысячелистник и разработка на их основе препаратов антибактериального, противовоспалительного и гемостатического действия: Дисс.д.фарм.н. – Харьков, 1989. – 367 с.
6. *Серной Л.Н., Гацура В.В.* Элементы экспериментальной фармакологии. – М., 2000. – С.308-315.
7. *Ушаков Н.А., Гудаковский Ю.П., Муравеева Э.В.* и соавт. МКЛ в лечении ожогов глаз // Офтальмол.журн. – 1988. – № 7. – С.440-441.
8. *Graymore C.N.* Biochemistry of the eye. London-New-Jork. 1970. – p.381-389.
9. *Kornberg A., Horecker B.* Methods in Enzymology. New-Jork. – 1985. – 1. – p.323-327.
10. *Smelser G.-Jn:* The transparency of the cornea. Oxford. – 1980. – p.125-141.