УДК 617.7-0001.4-06:616-0021-085.837.3:615.276

Л.В.Івасюк, Я.І.Пенішкевич

ВПЛИВ ЕНДОТОКСИНІВ ГРАМНЕГАТИВНОЇ ТА ГРАМПОЗИТИВНОЇ МІКРОФЛОРИ НА ІНТЕНСИВНІСТЬ ПРОТЕОЛІЗУ В СКЛИСТОМУ ТІЛІ ОКА КРОЛИКІВ З ПРОНИКНИМ ПОРАНЕННЯМ СКЛЕРИ

Кафедра офтальмології (зав. – д.мед.н. Я.І.Пенішкевич)
Буковинського державного медичного університету, м. Чернівці

Резюме. Встановлено, що в кроликів із проникною травмою склери через 24 год після поранення протеолітичний розпад низько- і високомолекулярних білків у склистому тілі залишається сталим, що відбувається на тлі зниження інтенсивності колагенолізу у 2,6 раза. Через 24 год після проникного поранення склери з інтравітреальним уведенням глюкозоамінілмурамілдипептиду інтенсивність протеолізу набуває максимальних величин.

Ключові слова: око, травма, протеоліз, ендотоксин Salmonella typhimurium, глюкозоамінілмурамілдипептид.

Вступ. Частота травм органа зору залишається високою, що є однією з головних причин первинної інвалідності в структурі офтальмологічних захворювань [6]. До основних причин видалення ока відноситься тяжка травма, особливо в поєднанні з контузійним компонентом, повторні оперативні втручання, що ініціюють імунний увеїт та швартоутворення, наявність інфекційних ускладнень [4]. Найбільш частими ускладненнями проникної травми ока є травматична катаракта (51,5 %), помутніння склистого тіла (52,7 %), гемофтальм (25,3 %), відшарування сітківки (14,7 %) та гострий іридоцикліт (14 %). Проникні поранення склери у 2,3 % випадків супроводжуються ендофтальмітом. Останній нерідко призводить до деструкції склистого тіла – розрідження, швартоутворення і фіброзогенезу [1]. Такі зміни в подальшому можуть сприяти відшаруванню сітківки у 18-26 % випадків травм ока [9]. На сьогодні залишаються маловивченими патогенетичні механізми розвитку ускладнень проникних поранень ока, не з'ясовані критерії прогнозування перебігу післятравматичного інтраокулярного запалення. Медикаментозне лікування хворих із проникними травмами ока потребує подальшого вдосконалення, особливо це стосується засобів, які запобігають надмірному фіброзогенезу [8]. Як відомо, активація протеаз у зоні запалення відбувається за зниження колагеназної активності, що забезпечує утворення рубцевої тканини [7]. Однак надлишковий розвиток сполучної тканини в склистому тілі, що виникає внаслідок проникного поранення ока, призводить не тільки до порушення оптичної прозорості, але в багатьох випадках викликає тракційне відшарування сітківки, рубцеве зморщення і, як наслідок, атрофію очного яблука. Відмічено, що гіперпроліферативні процеси з формуванням значних фіброзних шварт і травматичних кіст спостерігаються в 68% проникних поранень ока [6].

Гундорова Р.А. та співавтори [6] вказують на те, що клінічні особливості післятравматичного відшарування сітківки в більшості випадків зумовлені патологією склистого тіла. Винятки можуть скласти контузійні відшарування з відривом від зубчастої лінії або макулярними розривами. Причинами розвитку сполучної тканини за умов інфікування склистого тіла є процеси запалення, які багато в чому визначаються видом патогенної мікрофлори. Як відомо, під впливом ендотоксинів грамнегативної мікрофлори розвивається клітинна інфільтрація тканин ока [8], що призводить до увеїту [11] на тлі підвищення інтраокулярного вмісту інтерлейкіну-1b, простагландину E_2 та лейкотриєну B_4. Простагландин E_2 стимулює продукцію ендотеліального фактора росту і фактора росту фібробластів, що викликає інтраокулярний фіброз та може призвести до утворення шварт у склистому тілі з тракційним відшаруванням сітківки [6, 8, 9].

Наведені вище результати досліджень стосуються внутрішньоочних ефектів ліпополісахариду грамнегативної мікрофлори, тоді як вплив глюкозоамінілмурамілдипептиду (ГАМД), зокрема, на локальний тканинний протеоліз у травмованому оці, практично не вивчений.

Мета дослідження. Провести порівняльний аналіз впливу ліпополісахариду грамнегативної мікрофлори і ГАМД на інтенсивність протеолітичного розпаду низько-, високомолекулярних білків і колагену в склистому тілі кроликів із проникною травмою склери.

Матеріал і методи. Дослідження виконані на 31 кролику породи Шиншила з масою тіла від 2,5 до 3,0 кг. Моделювання травми ока проводили під місцевою анестезією (ретробульбарне уведення 1,5 мл 2 % розчину новокаїну з дворазовою інстиляцією в кон'юнктивальну порожнину 0,25 % розчину дикаїну). Проникну травму склери виконували в асептичних умовах сколеним лезом бритви, що фіксувалось лезотримачем. Формували лінійний розріз, довжиною 4 мм. У склисте тіло уводили 10 нг ендотоксину Salmonella typhimurium або 10 нг ГАМД. Проводили хірургічну обробку рани (ушивання рогівки). Через 24 год виконували енуклеацію травмованого ока. Перед початком операції виконували ретробульбарну анестезію 2 % розчином новокаїну (2 мл) та інстилювали в кон'юнктивальну по-

© Л.В.Івасюк, Я.І.Пенішкевич

рожнину 0,25 % розчин дикаїну. Енуклейовані очі негайно заморожували в парах рідкого азоту.

Склисте тіло (0,5 мл) змішували з 1,5 мл боратного буфера (pH 9,0) та досліджували тканинну протеолітичну активність за лізисом азоальбуміну, азоказеїну та азоколу ("Simko Ltd.", Україна). Принцип методу полягає в тому, що при інкубації білкових азосполук в присутності активаторів та інгібіторів протеолізу, які містяться в тканинах, відбувається лізис азоальбуміну (деградація низькомолекулярних протеїнів), азоказеїну (протеоліз високомолекулярних білків) та азоколу (колагеноліз), інтенсивність якого оцінюється за ступенем забарвлення інкубаційного розчину в лужному середовищі з перерахунком отриманої оптичної густини на 1 г досліджуваної тканини за 1 год інкубації [10].

Результати досліджень опрацьовували методами статистичного аналізу за програмою Excel-7 (Microsoft Ofice, США) на PC IBM 586. Експерименти проведені з дотриманням Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986).

Результати дослідження та їх обговорення. Результати дослідження наведені в таблиці й рисунку. У кроликів з проникною травмою склери інтенсивність лізису низько- і високомолекулярних білків у склистому тілі відносно контролю не змінювалась, водночас колагенолітична активність зменшувалась у 2,6 раза.

Після уведення в склисте тіло кроликів із проникною травмою склери ендотоксину Salmonella typhimurium лізис азоальбуміну підвищувався на 41,7 %, лізис азоальбуміну – на 46,6 %, лізис азоколу зростав удвічі порівняно з відповідними показниками тварин із пораненням склери, котрим ендотоксин не уводили. Проте жоден із зазначених показників тканинного протеолізу не відрізнявся від контролю.

Найбільші зміни тканинної протеолітичної активності спостерігались при інтравітреальному уведенні ГАМД: інтенсивність лізису низькомолекулярних білків перевищувала контрольний рівень у 2,3 раза, високомолекулярних білків – у 2,4 раза, колагену – у 2,5 раза.

Порівняльний аналіз отриманих даних показав, що при уведенні в склисте тіло ГАМД лізис азоальбуміну був у 2,9 раза більшим, ніж при проникній травмі склери, та вдвічі вищим, ніж у тварин із проникним пораненням склери, яким у склисте тіло уводили ендотоксин Salmonella typhimurium. Подібна інтенсифікація тканинного протеолізу стосувалася і лізису азоказеїну та азоколу, які зростали відповідно у 3,0 і 2,1 раза та 6,4 і 3,3 раза у вказаних групах тварин.

Отже, проникна травма склери не змінює протеолітичного розпаду низько- і високомолекулярних білків, проте суттєво зменшує тканинну колагенолітичну активність склистого тіла. Після уведення ендотоксину Salmonella typhimurium у склисте тіло кроликів із проникним пораненням склери лізис азоальбуміну, азоказеїну і азоколу від контролю не відрізняється, тоді як дія ГАМД характеризується різким збільшенням інтенсивності лізису низько-, високомолекулярних білків і колагену.

Відомо, що некротичне ураження клітин, як правило, розпочинається з плазматичної мембрани, коли пероксидне окиснення ліпідів та інтегральних білків викликає утворення кластерних каналів і сприяє активації протеїназ [6], що призводить до руйнування як інтегрованих, так і структурованих білків та значно поглиблює некротичні зміни в зоні запалення [2, 3].

Значне збільшення інтенсивності інтравітреального протеолізу під впливом ГАМД слід вважати наслідком вивільнення тканинних і клітинних протеолітичних ензимів, що надалі викликас

Таблиця

Вплив ендотоксину Salmonella typhimurium (eSt) та глюкозоамінілмурамілдипептиду (ГАМД) на інтенсивність протеолізу при проникній травмі склери (x±Sx)

Показники, що вивчалися	Контроль, n=10	Травма склери, n=7 1-а група	Травма склери + eSt, n=7 2-а група	Травма склери + ГАМД, n=7 3-я група
Лізис низькомолекулярних білків, мкг азоальбуміну/ 1 г тканини за 1 год	129,50±10,25	103,00±5,96 p>0.05	146,00±13,28 p>0,3 p_{1-2}<0,02	295,40±27,17 p<0,001 p_{1-3}<0,001 p_{2-3}<0,001
Лізис високомолекулярних білків, мкг азоказеїну / 1 г тканини за 1 год	124,30±11,64	98,00±10,20 p>0,1	143,70±15,73 p>0,3 p_{1-2}<0,05	297,00±30,61 p<0,001 p_{1-3}<0,001 p_{2-3}<0,001
Лізис колагену, мкг азоколу / 1 г тканини за 1 год	3,26±0,26	1,27±0,14 p<0,001	2,51±0,21 p>0.05 p_{1-2}<0,001	8,17±0,57 p<0,001 p_{1-3}<0,001 p_{2-3}<0,001

Примітка. p – ступінь достовірності різниць показників відносно контролю; $p_{1-2, 1-3, 2-3}$ – ступінь достовірності різниць показників у відповідних групах тварин; n – число спостережень

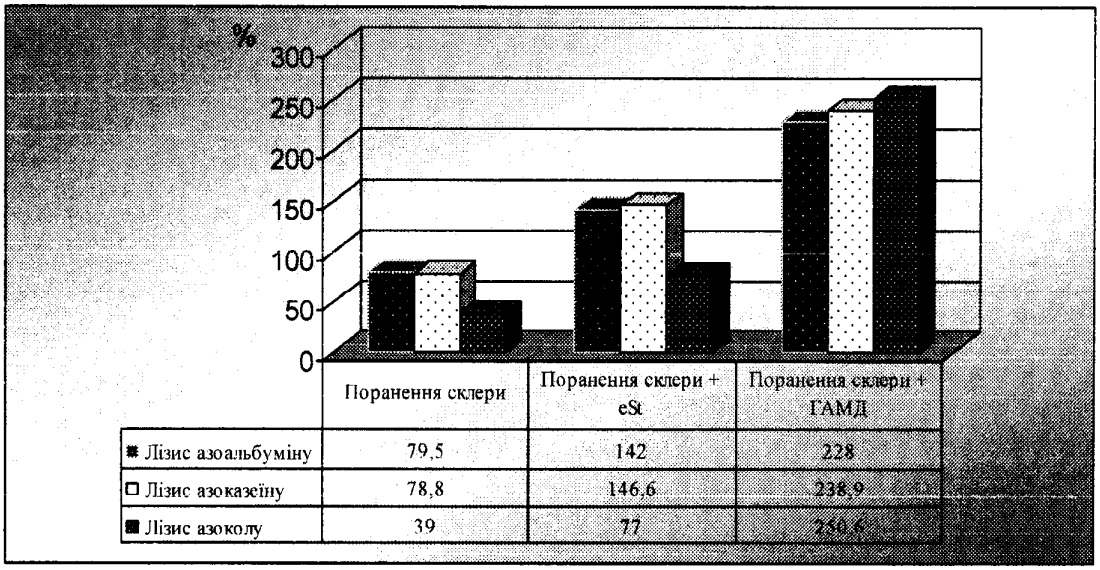

Рис. Інтенсивність тканинного протеолізу в склистому тілі кроликів із проникною травмою ока під впливом ендотоксину Salmonella typhimurium (eSt) та глюкозоамінілмурамілдипептиду (ГАМД) (у % від контролю)

глибокі судинні порушення та руйнування тканин ока на тлі ушкодження ендотеліальних клітин [5], що сприяє поширенню запального процесу практично на всі очні структури.

Висновки

1. У кроликів із проникною травмою склери через 24 год після поранення протеолітичний розпад низько- і високомолекулярних білків у склистому тілі залишається сталим, що відбувається на тлі зниження інтенсивності колагенолізу у 2,6 раза.

2. Через 24 год після уведення в склисте тіло кроликів із проникною травмою склери ендотоксину Salmonella typhimurium показники лізису азоальбуміну, азоказеїну і азоколу відповідають контролю.

3. Через 24 год після проникного поранення склери з інтравітреальним уведенням ГАМД інтенсивність протеолізу набуває максимальних величин: лізис низькомолекулярних білків зростає у 2,3 раза, високомолекулярних протеїнів – у 2,4 раза, колагену – у 2,5 раза.

Перспективи подальших досліджень. Перспективним вважаємо вивчення впливу ГАМД на процеси інтраокулярного запалення різного генезу за наявності проникного поранення склери.

Література

1. Быков В.П. Способ профилактики кровотечения из неоваскулярных шварт при последствиях проникающих ранений склеры / В.П.Быков, И.Б.Алексеева // Вестн. офтальмол. – 2003. – Т. 109, № 2. – С. 22-23.
2. Веремеенко К.Н. Белковые ингибиторы плазмы крови – регуляторы активности протеолитических ферментов / К.Н.Веремеенко // Системная энзимотерапия. Теоретические основы, опыт клинического применения. – К.: МОРИОН, 2000. – С. 21-53.
3. Веремеенко К.Н. Протеолиз в норме и при патологии / К.Н.Веремеенко, О.П.Голобородько, А.А.Кизим. – К.: Здоров'я, 2003. – 277 с.
4. Вериго Е.Н. Клинико-морфологическая характеристика энуклеированых глаз при последствиях травмы / Е.Н.Вериго, Л.Я.Полякова, Р.Т.Исаева // Тр. VII съезда офтальмологов России, Ч. 2. – Москва, 2000. – С. 67-68.
5. Галимова Р.З. Гиперрегенеративные процессы после проникающих ранений глаз / Р.З.Галимова, Б.С.Бейсенбаева // Офтальмол. ж. – 2006. – № 1. – С. 55-57.
6. Гундорова Р.А. Приоритетные направления в проблеме глазного травматизма / Р.А.Гундорова, Л.К.Мошетова, И.Б.Максимов // Тр. VII съезда офтальмологов России, Ч. 2. – Москва, 2000. – С. 55-60.
7. Даниличев В.Ф. Травмы и заболевания глаз. Применение ферментов и пептидных биорегуляторов / В.Ф.Даниличев, И.Б.Максимов. – Минск: Навука і тэхніка, 2004. – 223 с.
8. Иммунопатологические нарушения у больных с проникающими ранениями глаза / И.М.Логай, А.М.Петруня, С.В.Воротников [и др.] // Офтальмол. ж. – 2000. – № 4. – С. 240-243.
9. Имшенецкая Т.А. Результаты хирургического лечения травматических дислокаций хрусталика в стекловидное тело / Т.А.Имшенецкая, Т.А.Бирич // Офтальмол. ж. – 2004. – № 6. – С. 329-331.
10. Кухарчук О.Л. Патогенетична роль та методи корекції інтегративних порушень гомонально-месенджерних систем регуляції гомеостазу натрію при патології нирок: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра мед. наук: спец. 14.03.05 "Патологічна фізіологія" / О.Л.Кухарчук. – Одеський мед. ін-т. – Одеса, 2006. – 37 с.
11. Angiogenic activity of vitreous extract obtained from rabbit eyes with endotoxin-induced uveitis / N.Naveh, A.Nussbaum, H.Desatnik [et al.] // Ophthalmic Res. – 2005. – Vol. 27, № 1. – P. 23-31.

ВЛИЯНИЕ ЭНДОТОКСИНОВ ГРАММОТРИЦАТЕЛЬНОЙ И ГРАММПОЛОЖИТЕЛЬНИЙ МИКРОФЛОРЫ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИЗА В СТЕКЛОВИДНОМ ТЕЛЕ ГЛАЗА КРОЛИКОВ С ПРОНИКАЮЩИМ РАНЕНИЕМ СКЛЕРЫ

Л.В.Ивасюк, Я.И.Пенишкевич

Резюме. Установлено, что у кроликов с проникающей травмой склеры через 24 часа после травмы протеолитический распад низко- и высокомолекулярных белков в стекловидном теле остается постоянным, что происходит на фоне снижения интенсивности коллагенолиза в 2.6 раза. Через 24 часа после проникающего ранения склеры с интравитреальным введением глюкозоаминилмурамилдипептида интенсивность протеолиза достигает максимальных величин.

Ключевые слова: глаз, травма, протеолиз, эндотоксин Salmonella typhimurium, глюкозоаминилмурамилдипептид.

THE EFFECT OF THE ENDOTOXINS OF GRAM-NEGATIVE AND GRAM-POSITIVE MICROFLORA ON THE PROTEOLYTIC INTENSITY IN THE VITREOUS BODY OF THE RABBIT EYE WITH A PENETRATING WOUND OF THE SCLERA

L.V.Ivasiuk, Ya.I.Penishkevych

Abstract. It has been established that a proteolytic lysis of low- and high-molecular proteins in the vitreous body of rabbits with a penetrating wound of the sclera 24 hours after wounding remains constant, occuring against a background of an increase of the intensity of collagenolysis 2,6 times. In 24 hours after a penetrating wound of the sclera with an intravitreous administration of glucosoaminilmuramildipeptide the intensity of proteolysis reaches the highest values.

Key words: eye, trauma, proteolysis, S. typhimurium, glucosoaminilmuramildipeptide.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Рецензент – проф. Ю.С.Роговий

Buk. Med. Herald. – 2009. – Vol. 13, № 2. – P.69-72

Надійшла до редакції 9.04.2009 року

© Л.В.Івасюк, Я.І.Пенішкевич