

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ ФАКТОРОВ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ ОРГАНИЗМА ПРИ ВИРУСНЫХ ПОРАЖЕНИЯХ ГЛАЗНОЙ ПОВЕРХНОСТИ

Известно, что при аденовирусных конъюнктивитах, герпесе и других инфекционных заболеваниях в организме человека усиливается выработка специфических и неспецифических факторов защиты. К неспецифическим факторам относятся лизоцим (мурамидаза) и церулоплазмин, формирующие наряду с другими факторами, антибактериальную, антивирусную и антирадикальную защиту (АБЗ, АВЗ, АРЗ) организма. Аденовирусная инфекция вначале развивается в носоглотке, а затем по слезным каналам поднимается вверх, и в патологический процесс вовлекаются конъюнктив и слезный аппарат глаза. Вирус герпеса постоянно находится в организме человека в латентном состоянии и, периодически обостряясь, вызывает офтальмогерпес. Отдельные лекарственные средства, применяемые в офтальмологии для лечения вирусных инфекций (аденовирусного кератоконъюнктивита и офтальмогерпеса), обладают способностью ингибировать активность лизоцима (например, циклоферон, интерферон и полудан). Ферментная активность церулоплазмينا зависит от химической структуры лекарственного средства и дополнительно введенных в его состав ингредиентов.

Ключевые слова: аденовирусный кератоконъюнктивит, офтальмогерпес, церулоплазмин, лизоцим, слезная жидкость.

Из воспалительных заболеваний глаза вирусной этиологии наибольшее распространение имеют аденовирусный кератоконъюнктивит (АВК) и офтальмогерпес (ОГ). Аденовирусная инфекция, по данным многих авторов, занимает 5–10 % от общего числа острых вирусных инфекций [8]. А офтальмогерпес составляет 60 % в общей структуре воспалительных заболеваний глаза [2].

Известно, что при аденовирусных конъюнктивитах, герпесе и других инфекционных заболеваниях в организме человека усиливается выработка специфических и неспецифических факторов защиты. К неспецифическим факторам относятся лизоцим (мурамидаза) и церулоплазмин, формирующие наряду с другими факторами, антибактериальную, антивирусную и антирадикальную защиту (АБЗ, АВЗ, АРЗ) организма. Несмотря на то, что лизоцим и церулоплазмин не действуют непосредственно на аденовирус и на вирус герпеса, изучение динамики их активности в клинике представляет большой интерес. Это связано с тем, что вирусы, проникая в клетку, способны в ней индуцировать биосинтез не только собственных белков, необходимых для построения новых вирусов, но и клеточных белков-ферментов (например, лизоцима) [2], [15].

В настоящее время средств этиотропной химиотерапии, специфического лечения аденовирусной и герпетической инфекции не су-

ществует. Стратегия патогенетической терапии при этих инфекциях зависит от локализации поражения и тяжести заболевания и не имеет каких-либо особенностей. При тяжелых формах болезни рекомендуется присоединение иммунотропной терапии: внутривенное введение нормального человеческого иммуноглобулина и препаратов интерферона [8], а также лизоцима [5].

Лизоцим (мурамидаза) – белок, состоящий из 127 аминокислотных остатков, с молекулярной массой около 15 кД. В состав активного центра и стабилизирующих его третичную структуру аминокислот входит 24 аминокислотных остатка [7]. Он относится к ферментам гидролазам, действующим на гликозидную связь между остатками мурамовой кислоты и N-ацетил-глюкозой, которые входят в состав пептидогликанов, составляющих основу плазматических мембран бактериальных клеток [14].

Существует мнение, что лизоцим синтезируется не только железистыми клетками слизистой оболочки органов желудочно-кишечного тракта, дыхательных путей, слюнными и слезными железами и других органов [2], [9], [11], но также бактериями, особенно кишечной микрофлорой [5], вирусами и даже бактериофагами [2]. Лизоцим синтезируется и транспортируется различными формами лейкоцитов, поэтому,

по-видимому, фермент обнаруживается в различных органах и тканях человека [4, 12].

Церулоплазмин, медь-содержащий гликопротеин плазмы крови с молекулярной массой 150 кД, впервые обнаружен и выделен Хольмбергом и Лауреллем в 1948 году. Содержание церулоплазмينا в плазме человека составляет 0,2-0,3 мг/мл, с ним связано до 99 % всех ионов меди плазмы. В его молекуле имеется 8 атомов меди. Синтезируется он в печени, как и большинство плазменных белков, и относится к α 2-глобулиновой фракции [17]. Церулоплазмин является регулятором содержания меди в организме, а также обладает ферментативной активностью. Он окисляет полиамины, полифенолы, аскорбиновую кислоту и защищает вне клеток липиды от перекисного окисления, наступающего под воздействием супероксидного кислорода [16]. В настоящей работе рассматривается только его ферментативная функция.

Аденовирусная инфекция вначале развивается в носоглотке, а затем по слезным каналам поднимается вверх, и в патологический процесс вовлекаются конъюнктив и слезный аппарат глаза. Вирус герпеса постоянно находится в организме человека в латентном состоянии и, периодически обостряясь, вызывает офтальмогерпес. Вследствие этого представляет научный и практический интерес изучение активности ферментов в различных биологических жидкостях организма при этих патологических процессах и способности их лекарственной коррекции.

Цель исследования

1) изучение неспецифической антибактериальной и антирадикальной защиты в слезной жидкости и других биологических жидкостях организма;

2) выяснение действия лекарственных средств, наиболее часто применяемых для лечения аденовирусного кератоконъюнктивита и офтальмогерпеса, на активность лизоцима и церулоплазмينا.

Материал и методы исследования

В работе использованы сыворотка донорской крови, слезная (СЖ), ринолакримальная (РЛЖ) и ротовая (РЖ) жидкости, полученные натошак от здоровых людей, в которых опреде-

ляли активность лизоцима и церулоплазмينا. Наряду с этим в биологических жидкостях исследовали (in vitro) изменение активности ферментов под воздействием десяти лекарственных средств, наиболее часто применяемых для лечения аденовирусного кератоконъюнктивита и офтальмогерпеса. Для этих целей к раствору лизоцима добавляли одно из лекарственных средств (в соотношении 1:10). Полученную смесь инкубировали в течение 30 мин при температуре 22 °С, после чего в ней определяли активность фермента. Опыты с церулоплазмином сыворотки крови ставили аналогичным образом.

Лизоцим определяли методом П.Г. Сторожука и соавт., (2006) [13]. Для этого в качестве субстрата использовали патентованную лиофилизированную культуру *Micrococcus lysodeikticus* – ML (США) и фермент *Lysozyme* (активность 20000 ед/мг), выделенный из куринных яиц (Германия). Растворы субстрата и фермента готовили ex tempore на 0,067 М фосфатном буфере с рН 6,2, которые хранили в емкости со льдом. Рабочий раствор субстрата содержит ML 0,08 мг/мл (в кювете на 5 мл – 0,4 мг), при колориметрии на МФК-2МП он имеет оптическую плотность 0,300 (экстинций) при $\lambda=540$ нм и толщине слоя 10 мм. Рабочий раствор лизоцима готовили из расчета: 100 ед фермента в 100 мкл раствора. Такое количество фермента брали в опыт и принимали за 100 %.

Церулоплазмин определяли по методу Рамина (в описании В.С. Камышникова, 2000) [3], адаптированному нами для слезы. Метод основан на способности церулоплазмينا окислять р-фенилендиамин. Реакцию ставили в течение 1 ч при 35°С, а останавливали путем добавления фтористого натрия. По оптической плотности образовавшихся окрашенных продуктов, определяемой на ФЭК – 2МП в кюветах с толщиной слоя 10 мм при $\lambda=540$ нм, судили об активности церулоплазмينا.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования активности лизоцима и церулоплазмينا в слезе и других биологических жидкостях человека подвергнуты статистической обработке и внесены в таблицу 1, где активность ферментов в сыворотке крови взята за 100 %. Из приведенных данных видно,

что активность лизоцима в РЖ выше на 88 % по сравнению с сывороткой крови, в РЛЖ – на 174 %, а в СЖ она выше в 40 раз. Подобная картина наблюдалась при исследовании лизоцима в молоке, где его активность выше в 4–5 раз по сравнению с сывороткой крови. При этом активность фермента в молозиве значительно выше, чем в молоке, а повышение активности фермента находится в прямой зависимости от сроков недоношенности плода: чем больше сроки недоношенности, тем выше активность лизоцима в молозиве и молоке родильниц.

Из литературных и собственных данных видно, что железистые клетки, синтезирующие лизоцим, рассеяны по многим органам организма, и что слезные железы, вероятно, обладают собственным мощным ферментсинтезирующим аппаратом, продуцирующим лизоцим, который и обеспечивает такую высокую его концентрацию в СЖ.

Активность церулоплазмينا оказалась самой высокой в сыворотке крови (принятой за 100 %), а в СЖ она на 30 % ниже. Содержание церулоплазмينا в РЛЖ и РЖ составляет всего

11 и 8 % соответственно, по сравнению с сывороткой. Эти данные свидетельствуют о том, что церулоплазмин экскретируется слезными, слюнными железами и железистым аппаратом слизистой носа из сыворотки крови.

В настоящее время для лечения и профилактики воспалительных заболеваний глаза и слезного аппарата применяется широкий арсенал лекарственных средств. В их число наиболее часто включают противовоспалительные (диклофенак, дикло-Ф, циклоферон, интерферон), противовирусные (офтальмоферон, полудан), антисептики (раствор сульфацил-натрия), а также анестетики (лидокаин и алкаин) и аскорбиновую кислоту.

В связи с этим проведено исследование (in vitro) действия каждого из вышеперечисленных лекарственных средств на активность лизоцима и церулоплазмينا. Средние результаты из 5 опытов внесены в таблицу 2.

Только под влиянием трех препаратов: интерферона, циклоферона и полудана – активность лизоцима снижается статистически достоверно на 35–43 %. Семь других лекар-

Таблица 1. Активность лизоцима и церулоплазмينا в биологических жидкостях организма

Биологическая жидкость	n	Лизоцим M±m (ед\мл)	%	Церулоплазмин M±m (ед\мл)	%
СК	8	41,0-3,88	100	198,5-19,5	100
СЖ	8	1640,0-68,5	4000	139,1-13,8	70,0
РЛЖ	8	137,4-6,74	274	22,3-1,96	11,2
РЖ	8	94,2-7,14	188	16,2-1,63	8,1

Примечания: СК – сыворотка крови, СЖ – слезная жидкость, РЛЖ – ринолакримальная жидкость, РЖ – ротовая жидкость.

Таблица 2. Действие лекарственных средств, применяемых в офтальмологии, на активность лизоцима и церулоплазмينا после 30 мин их совместной инкубации при 22 °С

Лекарственное средство	n	Лизоцим M±m (ед\мл)	%	Церулоплазмин M±m (ед\мл)	%
Контроль	5	43-2,9	100	42,0-3,7	100
Сульфацил-натрия	5	50-3,2	116,2	45,3-2,9	107,8
Дикло-Ф	5	49-3,3	113,9	61,6-4,1	146,6
Офтальмоферон	5	42-2,6	97,6	54,9-3,3	130,7
Алкаин	5	50-3,5	116,2	63,0-4,0	150,0
Лидокаин	5	48-3,3	111,6	54,9-3,3	130,0
Контроль	5	58-4,2	100	42,0-3,7	100
Циклоферон	5	38-2,2	65,5	61,2-5,2	145,1
Аскорбиновая к-та	5	57-4,1	98,2	100 % ингибир.	–
Интерферон	5	33-2,9	56,9	63,1-4,2	150,0
Диклофенак	5	53-3,7	91,3	100 % ингибир.	–
Полудан	5	34-2,8	58,6	55,8-3,4	132,8

ственных средств оказались индифферентными по отношению к этому ферменту. Интерферон является фактором белковой природы, выделенным из лейкоцитов донорской крови, сам по себе не обладает ингибирующим действием на активность ферментов [6], но добавление к нему стабилизатора (например, бензойной кислоты), вероятно, и придает препарату ингибирующие свойства, которые четко выявляются при его действии на лизоцим. Циклоферон относится к низкомолекулярным соединениям – производным акридиноуксусной кислоты и является индуктором интерферона в макрофагах, Т – и В-лимфоцитах. Благодаря своей химической структуре препарат обладает ингибирующими свойствами. А лизоцим, по-видимому, является одним из многих ферментов, на которые действует циклоферон как ингибитор. Что же касается полудана, то это химическое соединение, состоящее из полиадениловой и полиуридиловой кислот с сильно выраженными кислотными свойствами, придающими ему свойства ингибитора [10]. Мы полагаем, что выявленное под действием этих трех препаратов снижение активности лизоцима наступает исключительно за счет существенного сдвига рН среды в кислую сторону.

Активность церулоплазмينا при действии дикло-Ф, офтальмоферона, циклоферона, интерферона, полудана, алкаина и лидокаина повышается на 30–50 %, а при действии сульфацил-натрия она остается на прежнем уровне. В присутствии аскорбиновой кислоты и диклофенака ферментная активность церулоплазмينا полностью ингибируется. О том, что реакция среды, создаваемая некоторыми препаратами, оказывает ингибирующее действие на активность изучаемых ферментов, свидетельствует динамика активности церулоплазмينا в присутствии дикло-Ф и диклофенака. В состав обоих препаратов входит одно и то же вещество – диклофенак натрия, натриевая соль 0-[(2,6 дихлорвинил)-амино]-фенил-уксусной кислоты [1], а вспомогательные вещества различные. Так, диклофенак содержит натрий пиросульфат и натр едкий, а в дикло-Ф эти

компоненты отсутствуют. Существенное смещение рН в кислую (аскорбиновая кислота) или в щелочную (натр едкий в диклофенаке) сторону вызывает полное ингибирование фермента. Тогда встает вопрос: почему при действии семи препаратов (из десяти) активность церулоплазмينا повышается на 30–50 %? Повышение активности церулоплазмينا может быть связано: 1) с изменением степени окисления меди, 2) с объединением молекул фермента в комплексы, за счет чего начинает проявляться свойство кооперативности.

Выводы

Установлено, что самой высокой активностью лизоцима обладает СЖ, где она в 40 раз выше, чем в сыворотке крови. В РЛЖ его активность почти в три раза, а в РЖ почти в два раза выше, по сравнению с сывороткой крови. Это свидетельствует о том, что слезные железы являются секреторным органом лизоцима, а слюнные железы, по-видимому, являются экскреторными.

Церулоплазмин, являясь продуктом биосинтеза печени, поступает в кровь, в которой его активность имеет наивысшие значения, из нее он достаточно хорошо экскретируется в СЖ и очень слабо в РЛЖ и РЖ.

Отдельные лекарственные средства, применяемые в офтальмологии для лечения вирусных инфекций (аденовирусного кератоконъюнктивита и офтальмогерпеса), обладают способностью ингибировать активность лизоцима (например циклоферон, интерферон и полудан), что связано с их химической структурой или химической структурой вспомогательных веществ.

Ферментная активность церулоплазмينا зависит от химической структуры лекарственного средства и дополнительно введенных в его состав ингредиентов, влияющих на степень окисления меди, которая в одних случаях способствует образованию агрегатов, приобретающих свойства кооперативности, повышающих активность церулоплазмينا, а в других – его ингибирует.

10.09.2015

Список литературы:

1. Данилов А.Б. Диклофенак в лечении болевых синдромов // Лечащий врач – 2009. – №5 – С.34-36.
2. Каспаров А.А. Офтальмогерпес. – М.: Медицина – 1994 – 224 с.

3. Камышников В.С. Определение содержания (активности) перуллоплазмина // Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике – М: МЕДпресс-информ – 2009 – С.71-75.
4. Клетикова Л.В. Влияние вакцинации на лизоцимную активность // Ветеринария – 2009 – №2 – С.19-20.
5. Мазурик Н. Одолеть микробы без опасных последствий // Наука и технологии России – 2008 – №3 – С.28-30.
6. Машковский М.Д. Лекарственные средства – Харьков: Торсинг – 1996 – т 1,2.
7. Меклер Л.Б. Иддис Р.Г. Построение модели трехмерной молекулы лизоцима белка куриного яйца – М.: Медицина – 1981.
8. Молчанов Д. Аденовирусная инфекция в XXI веке: традиционные знания против против многоликого врага человечества – Киев: Здоров'я – 2009 – №16/1 – С. 48-50.
9. Осидзе Д.Ф., Простяков А.Н. Факторы резистентности организма животных// Ветеринария, 1983 – №3 – С.32-34.
10. Регистр лекарственных средств России. Энциклопедия лекарств. – М.: РЛС, 2005. – С. 1392.
11. Ройт А. Основы иммунологии // М.: Мир – 1991 – 328 с.
12. Сохин А.А., Чернушенко Е.Ф. Прикладная иммунология – Киев: Здоров'я – 1984 – 316 с.
13. Сторожук П.Г., Сторожук И.А., Артамонов В.А., Артамонов М.В. Действие патентованных стоматологических противовоспалительных средств на неспецифические защитные факторы слюны // Вестник интенсивной терапии – 2006 – №5. – С. 346-347.
14. Усов А.И. Пептидогликаны. Справочник. Химическая энциклопедия. М: Советская энциклопедия – 1988.
15. Hamilton R. The Herpes book. Los Angeles. – 1980.
16. Нга Хьюинг Важные параметры меди в средстве для лечения ран // Cooper peptide technology – 2010.
17. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. Harper's Biochemistry // Prentice-Hall International London – 1993.

Сведения об авторах:

Быкова Елена Владимировна, врач-офтальмолог Краснодарского филиала
МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова, кандидат медицинских наук
350012 Краснодар, ул. Красных партизан 6, каб. 210; e-mail: bikova_lena@bk.ru

Соголовская Елена Евгеньевна, заведующая офтальмологическим терапевтическим отделением
Краснодарского филиала МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова, кандидат медицинских наук

Сотникова Татьяна Олеговна, врач-офтальмолог Краснодарского филиала
МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова, кандидат медицинских наук

Габриэль Татьяна Петровна, врач-офтальмолог Краснодарского филиала
МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова