

На правах рукописи

ПАВЛЕНКО

Татьяна Аркадьевна

**АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩИЙ ФЕРМЕНТ В ТКАНЕВЫХ СТРУКТУРАХ И
ЖИДКИХ СРЕДАХ ГЛАЗА В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ, ПУТИ РЕГУЛЯЦИИ.**

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2009

Диссертационная работа выполнена в Федеральном Государственном Учреждении «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца Росмедтехнологий»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Н.Б.Чеснокова

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Н.Н. Ивков
доктор медицинских наук
С.В. Пирожков

Ведущая организация: ГОУ ДПО Российская медицинская академия
последипломного образования

Защита диссертации состоится « 16 » октября 2009 года в 14 часов
на заседании диссертационного совета при Д 212.203.13 при ГОУ ВПО Российском
университете дружбы народов по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.8,
Медицинский факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО Российского университета
дружбы народов по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

Автореферат разослан « 9 » сентября 2009 года

Ученый секретарь Диссертационного Совета
доктор биологических наук, профессор

Е.В. Лукашева



Общая характеристика работы.

Актуальность темы.

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) в 1999 году в Женеве официально дала старт всемирной программе «Ликвидация устранимой слепоты в мире». По данным ВОЗ в мире насчитывается 45 млн. слепых, при не выполнении лечебно-профилактических мер, к 2020 году это число удвоится. Применительно к РФ понятие «устраанимая слепота» включает в себя в том числе: травмы, воспалительные заболевания, патологию сетчатки различной этиологии, глаукому, которые трудно поддаются лечению, что определяет актуальность разработки новых эффективных методов медикаментозной терапии (Либман Е.С., 2000, Южаков А.М., 2003).

Ренин-ангиотензиновая система (РАС) является одной из важнейших регуляторных систем организма. Основной и наиболее известной функцией РАС является регуляция кровяного давления и водно-солевого баланса.

Ангиотензин-превращающий фермент (АПФ) – это ключевой фермент РАС. АПФ является цинк-зависимой пептидазой, состоит из одной олигопептидной цепи, включающей в себя два высокомолекулярных домена, каждый из которых содержит активный центр. Первым выделил АПФ Л.Т. Скеггс из сыворотки крови лошади (Skeggs L.T. et al., 1956). Интенсивное исследование фермента началось в 60-х годах, когда было показано, что основным местом энзиматического превращения ангиотензин I (AI) в ангиотензин II (AII) и инактивация брадикинина является система легочного кровообращения (Ferreira S.H. et al., 1967; Ng K.K.F. et al., 1968; Ryan J.W. et al., 1968). Однако, несколькими годами ранее Ю.Е. Елисеева и В.Н. Орехович опубликовали работу о выделении карбоксикапепсина, тканевой протеиназы из почек быка, которая отщепляла С-концевые дипептиды в синтетических субстратах (Елисеева Ю.Е., Орехович В.Н., 1963). Они также впервые обратили внимание на двойственную функцию этого фермента в отношении основных субстратов – брадикинина и AI (Елисеева Ю.Е. и соавт., 1970). Под действием АПФ из физиологически неактивного субстрата AI образуется основной эффектор РАС –AII), являющийся очень мощным вазоконстриктором. Ангиотензин II способен также усиливать процессы пролиферации и миграции гладкомышечных клеток, а продукт его дальнейшего гидролиза ангиотензин III стимулирует секрецию альдостерона (Opie L., 1999; Kim J.H., 2009). Установлено, что помимо сосудосуживающего действия AII оказывает провоспалительный эффект – он инициирует инфильтрацию тканей воспалительными и иммунокомпетентными клетками, активирует фактор транскрипции NF-κB, запуская синтез провоспалительных веществ: молекул адгезии, цитокинов, хемоаттрактантов (Suzuki Y. et al., 2004). AII также

способствует образованию активных форм кислорода, стимулирует производство ингибитора активатора плазминогена, сдвигая гемостаз крови в сторону тромбоза (Моисеев С.В., 1999; Brown N.J. et al., 2000; Labinjoh C. et al., 2000).

С другой стороны, АПФ расщепляет вазодилататор брадикинин – основной эффектор калликреин-кининовой системы, до неактивных в отношении воздействия на тонус сосудов пептидов. Помимо способности расширять просвет периферических и коронарных сосудов и снижать АД, брадикинин может повышать проницаемость капилляров, сокращать гладкую мускулатуру бронхов и других органов, стимулировать диапедез лейкоцитов и вызывать болевой эффект. Показано, что брадикинин освобождает гистамин из тучных клеток, активирует специфические рецепторы эндотелия, что приводит к образованию вазодилататоров - простагландина и NO, стимулирует синтез и освобождение простагландинов, фактора некроза опухоли, освобождение ряда интерлейкинов, способствует процессам репарации и обладает инсулиноподобным действием, стимулируя захват глюкозы периферическими тканями, модулирует передачу нервных импульсов в ЦНС и периферической нервной системе, изменяет состояние гематоэнцефалического барьера (Шилкин Г.А. и др., 2001; Farrell R. et al., 1999; Silvestre J.S., 2004).

Помимо АІ и брадикинина АПФ гидролизует другие физиологически активные пептиды: гематопозитический пептид, β -цепь инсулина и нейропептиды (Гомазков О.А., 1997; Елисеева Ю.А., 2001).

Таким образом, АПФ, участвуя в метаболизме функционально активных пептидов, влияет не только на гемоциркуляцию, но и на развитие воспалительного и ишемического процесса.

Помимо циркуляторной РАС в различных тканях выявлено наличие локальных РАС. Так, в тканевых структурах и жидких средах глаза обнаружены многие компоненты РАС, причем в концентрациях, намного превосходящих те, которые можно было бы объяснить примесью крови, и показано, что в глазу происходит их местный синтез (Savaskan E. et al, 2004; Luhtala S. et al, 2009). Имеются сведения об участии локальной РАС глаза в развитии диабетических изменений в глазу, регуляции внутриглазного давления, в развитии глазных проявлений при саркоидозе и других патологических процессах (Кост О.А. и соавт., 1996; Бенделик Е.К. и соавт., 1999; Чеснокова Н.Б. и соавт., 2000; Shah G.B. et al., 2000; .Нероев В.В. и соавт., 2005; Kim JH. et al, 2009). Вероятно, локальная регуляция активности АПФ может быть использована в терапевтических целях.

Цель работы.

Выяснение возможностей локальной регуляции активности АПФ для коррекции течения патологического процесса в глазу.

Задачи исследования.

1. изучить динамику изменения активности АПФ, протеиназно-ингибиторного баланса в слезной жидкости при ожогах глаз различной локализации у кроликов и проанализировать взаимосвязь исследуемых биохимических параметров слезы с клиническими проявлениями постожогового процесса;
2. определить распределение активности АПФ в тканевых структурах и жидких средах глаза кроликов в норме и при ожоговой травме глаза;
3. оценить влияние местного применения ингибиторов АПФ (иАПФ) на активность АПФ в слезной жидкости и во влаге, на антиокислительную активность (АОА) в слезной жидкости и на характер течения ожоговой болезни глаз.
4. оценить влияние местного применения иАПФ на состояние сетчатки кроликов при экспериментальном диабете и острой ишемии сетчатки.
5. определить влияние местного применения иАПФ на внутриглазное давление (ВГД) и гидродинамику глаза у кроликов и оценить целесообразность местного применения иАПФ при глаукоме.

Научная новизна.

- Впервые при ожогах глаз различной локализации у кроликов проведено сравнительное исследование динамики биохимических сдвигов в слезной жидкости и характера клинического течения постожогового процесса.
- Впервые определена активность АПФ в тканевых структурах и жидких средах глаза у кролика в норме и после ожога роговицы.
- Впервые установлена схожая динамика между клиническими проявлениями ожоговой болезни глаз различной локализации и количественными показателями состояния локальной РАС по активности АПФ.
- Впервые установлено повышение активности АПФ в слезной жидкости при иммуногеном увеите у кроликов.
- Впервые продемонстрировано действие инстилляций иАПФ на характер течения постожогового процесса при ожогах глаз различной локализации, которое выражается в улучшении репаративных процессов и противоишемическом действии.
- Впервые показано влияние инстилляций активных форм и проформы иАПФ на гидродинамику глаза у интактных кроликов

-Впервые показано, что местное применение иАПФ оказывает влияние на состояние сосудов сетчатки при экспериментальном диабете и острой ишемии сетчатки у кроликов.

Практическая значимость результатов исследования.

-Установлено, что изменение активности АПФ в слезной жидкости может служить критерием для оценки характера течения посттравматического процесса в роговице и конъюнктиве, его прогноза, а также для проведения обоснованной терапии и ее контроля.

-Дано обоснование для местного применения иАПФ при заболеваниях глаз, связанных с воспалительными и/или ишемическими процессами, в том числе при травмах глаза и ишемии сетчатки различной этиологии.

-Результаты исследования влияния инстилляций иАПФ (как активных, так и проформы) на внутриглазное давление, гидродинамику глаза и активность АПФ в водянистой влаге свидетельствуют о перспективности включения местного применения иАПФ в комплексную терапию глаукомы.

Положения диссертационной работы, выносимые на защиту.

-Установлено, что у кроликов в слезной жидкости при ожогах глаза различной локализации возрастает активность АПФ при изъязвлении роговицы и ишемии конъюнктивы. Установлена схожая динамика между активностью АПФ в слезе и выраженностью клинических проявлений патологического процесса.

-Определена повышенная активность АПФ в слезной жидкости у кроликов с иммуногенным увеитом.

- Изучено распределение и активность АПФ в тканевых структурах и жидких средах глаза у интактных кроликов. При ожоговой болезни глаз выявлено повышение активности АПФ как во внешних, так и во внутренних структурах глаза.

-Выявлена способность иАПФ при инстилляциях снижать активность АПФ в слезе как интактных кроликов, так и после экспериментального ожога глаз.

-Показано, что иАПФ в виде инстилляций могут применяться как для профилактики изъязвлений, так и лечения уже развившихся язв роговицы.

-Выявлено противоишемическое действие инстилляций иАПФ при ожоговой ишемии конъюнктивы у кроликов.

-Выявлена способность инстилляций иАПФ снижать активность АПФ у интактных животных во внутриглазной жидкости - водянистой влаге (Вв).

-Показано, что при инстилляциях иАПФ значительно улучшается микроциркуляция сетчатки при экспериментальном диабете и острой ретинальной ишемии у кроликов.

-Установлено повышение активности АПФ в слезе у больных первичной открытоугольной глаукомой.

-Определено, что инстилляций иАПФ как в активной форме, так и в виде проформы, вызывают снижение ВГД у здоровых кроликов, существенно увеличивают отток водянистой влаги и ее секрецию.

Апробация работы.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на научно-практических конференциях: Международной конференции "Биокатализ" в 2002 г., Москва; VII Международном медицинском конгрессе студентов и молодых ученых, 2003 г., Тернополь; Московской международной конференции "Биотехнология и медицина", 2006 г., Москва. Диссертационная работа апробирована на межотделенческой конференции в МНИИ ГБ им. Гельмгольца (28 мая, 2009 г.).

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, из них 4 - в центральной печати, 3 - в зарубежных изданиях.

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на (152) страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована (40) таблицами, (19) рисунками, (4) фотографиями. Список литературы включает в себя (249) источников, из которых (35) отечественных и (214) иностранных.

Содержание работы.

Материалы и методы исследования.

Экспериментальные исследования выполнены на 299 кроликах-самцах (598 глаз) породы шиншилла массой 2-2,5 кг. Работа с экспериментальными животными проводилась в соответствии с приказом министерства Здравоохранения №755 от 12.08.77. и положениями Хельсинкской декларации.

У кроликов моделировали патологические процессы воспалительного и ишемического характера, затрагивающие внешние и внутренние структуры глаза. Выбор моделей воспаления и ишемии обусловлен тем, что они являются типовыми реакциями, принимающими участие в патогенезе многих заболеваний глаз.

Исследовано 2302 образцов слезы, 200 образцов крови, 160 образцов глазных тканей и 60 камерной влаги кроликов. Отбор слезы у кроликов проводили с помощью дисков из фильтровальной бумаги. Слезную жидкость элюировали в фосфатном буфере pH 7,4. Элюат центрифугировали и надосадочную жидкость использовали для измерения активности биохимических показателей. Отбор влаги производили парацентезом.

Приготовление гомогенатов тканей глаза кроликов проводили на холоду. Выделяли следующие ткани: бульбарную конъюнктиву, хрусталик в капсуле, радужную оболочку, цилиарное тело с корнем радужки, сетчатку, сосудистую оболочку (хориоидею), роговицу. Гомогенаты центрифугировали и для анализа отбирали надосадочную жидкость. Кровь брали из краевой ушной вены кролика, для исследований использовали сыворотку крови.

Проведено исследование 25 образцов слезы пациентов с первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ) и 27 образцов слезы здоровых людей. Отбор слезы у пациентов с глаукомой осуществляли при помощи микрокапилляра из нижнего конъюнктивального свода.

Экспериментальные модели.

Одинаковые по площади щелочной ожог роговицы, ожог лимба и сочетанный ожог конъюнктивы, роговицы и части лимба (модель ожоговой ишемии конъюнктивы) моделировали под общим наркозом и местной анестезией модифицированным методом Obenberger. Для нанесения ожога использовали диски из хлопчатобумажной ткани диаметром 7 мм, для ожога лимба – полоску такой же площади ткани шириной 2 мм, пропитанные 10% NaOH, через 40с ткань удаляли, а глаз промывали 20 мл физиологического раствора. Слезку отбирали до и на 1, 3, 7, 14, 21 и 28 сутки после нанесения травмы.

Иммуногенный увеит моделировали методом Foss. Вначале проводили первичную сенсибилизацию организма путем подкожного введения 5 мл нормальной лошадиной сыворотки. Увеит развивался в ответ на интравитриальное введение на 8-9 сутки разрешающей дозы антигена. В качестве местной анестезии использовали 1% раствор дикаина. Слезку отбирали до эксперимента, на 4 сутки после первичного введения антигена и на 1, 2, 3 сутки увеита.

Моделирование диабета. Первой группе кроликов после 48 часов голодания внутривенно вводили стрептозотцин (60мг/кг в 50мМ цитратном буфере pH=4,0). Несмотря на тяжелое состояние кроликов, повышение панкреатической амилазы и аланинаминотрансферазы, увеличения концентрации глюкозы в крови не происходило. Диабет у второй группы кроликов моделировали тоже после 48 часов голодания путем внутривенного введения 5% раствора аллоксана в фосфатном буфере (pH=5-5,2) в дозе 130-150 мг аллоксана на 1 кг массы. Развитие диабета наступало через 24-30 ч.

Модель острой ишемии сетчатки воспроизводили путем лазеркоагуляции ретинальных сосудов I-II порядка в наружном квадранте глазного дна: 100мкм, 0.9 Вт, объем поражения сосуда на протяжении около 1 диаметра ДЗН, количество коагулятов –

до обтурации сосудов (от 15 до 65) по методу А.Н. Иванова и соавт. (Патент РФ на изобретение № 2313312, от 27.12.2007 г.).

При постановке эксперимента всегда формировали группу интактных животных, у которых слезу собирали в те же сроки, что и у опытных для исключения влияния режима содержания животных на исследуемые биохимические параметры.

Биохимические исследования.

Активность АПФ оценивали по начальным скоростям гидролиза субстрата N-карбобензоксип-фенилаланил-L-гистидил-L-лейцина (Cbz-Phe-His-Leu) (Serva, Германия), определяя продукт реакции (His-Leu) с помощью орто-фталового альдегида (Koch-Light, Великобритания) флуориметрическим методом [Conroy I.M. et al., 1978]. Флуоресценцию образованного аддукта измеряли на спектрофлуориметре Hitachi MPF-4 (Япония) при длине волны возбуждения 370 нм и длине волны эмиссии 500 нм. За единицу активности АПФ принимали то его количество, которое гидролизует 1 мкмоль субстрата за 1 мин в стандартных условиях. Активность выражали в единицах на мл пробы или на мг белка (удельная активность - мкмоль/мин×мг). Метод исследования активности АПФ был адаптирован для микроколичеств тканей и жидкостей глаза.

Для измерения антиокислительной активности (АОА) слезной жидкости была использована система гемоглобин - перекись водорода -люминол (Hb- H₂O₂-Лм), в которой в качестве субстрата окисления выступает люминол (Гулидова О.М и соавт., 1999). Метод основан на регистрации кинетики хемилюминесценции люминола. Введение в модельную систему антиоксидантов приводит к торможению свободно-радикального окисления люминола. Измеряемым параметром является латентный период – время от момента инициирования свободнорадикального окисления люминола перекисью водорода до начала развития свечения.

Трипсиноподобную активность (ТПА) определяли, используя метод Эрлангера с соавт. в модификации В.А. Шатерникова. Об уровне протеолитической активности в исследуемых образцах судили по их способности расщеплять N-бензоил-DL-аргинин- π -нитроанилид (БАПНА). Для определения анитриптической активности (АТА) использовали метод Хавербека в модификации В.А. Шатерникова, основанный на торможении расщепления трипсином белковых и низкомолекулярных субстратов. Определение активности α 2-макроглобулина (α 2-МГ) основано на том, что комплекс α 2-МГ–трипсин сохраняет протеолитическую активность по отношению к низкомолекулярным субстратам, и на эту активность не влияет ингибитор трипсина из бобов сои. Расчет активности производили с помощью калибровочной кривой, построенной по π -нитроанилину. Активность в слезе выражали в нмоль/мин×мл образца,

удельную - в нмоль/мин×мг белка в образце. Измерения в слезной жидкости проводили на спектрофотометре UV 160A (Shimadzu, Япония).

Для измерения концентрации белка использовали метод Лоури и соавт.

Гликозилированный гемоглобин определяли методом ионообменной хроматографии с помощью миниколонок с катионнообменной смолой (набор BioRad).

Определяли концентрацию глюкозы на анализаторе «Биосен» методом, основанном на электрохимическом амперометрическом определении продуктов ферментативной реакции окисления глюкозы, катализируемой глюкооксидазой.

Содержание общего холестерина, триглицеридов, панкреатической амилазы, аланинаминотрансферазы в сыворотке крови определяли на автоанализаторе “Reflotron ” (Германия).

Клиническую оценку течения патологического процесса у животных проводили при помощи биомикроскопии. Оценивали состояние конъюнктивы (отек, гиперемия, отделяемое, площадь ишемии) и роговицы (отек, васкуляризация, площадь и глубина изъязвления), данные выражали в условных баллах.

Для оценки состояния сетчатки использовали электрофизиологические методы, биомикроскопию, офтальмоскопию, фоторегистрацию глазного дна.

В работе использованы ингибиторы АПФ: каптоприл, эналаприлат, эналаприл, лизиноприл; ингибитор сериновых протеиназ – Гордокс.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистического пакета программ "XL" и Statistica 6.0. Исследуемые выборки были подвергнуты тесту на нормальность распределения. Показатели с нормальным распределением представлены как среднее значение (M) и стандартное отклонение (SD), достоверность различий между группами, с уровнем значимости не менее 95%, оценивали с помощью параметрического t–критерия Стьюдента.

Работа проводилась в отделении патофизиологии и биохимии МНИИ ГБ им. Гельмгольца (рук. проф. Чеснокова Н.Б.) и кафедре химической энзимологии МГУ им. М.В. Ломоносова (зав. проф. Варфоломеев В.И.) совместно с в.н.с. к.х.н. Кост О.А. и с.н.с. к.х.н. Никольской И.И.. Часть исследований проводилась совместно с сотрудниками МНИИ ГБ им. Гельмгольца: отделения патологии сетчатки и зрительного нерва (рук. д.м.н., проф., Нероев В.В.) – к.м.н. Давыдовой Г.А., Перовой Т.С.; отделения травматологии, реконструктивной, пластической хирургии и глазного протезирования (рук. д.м.н., проф. Гундорова Р.А.) совместно с д.м.н. Ивановым А.Н., д.м.н. Макаровым П.В.; лаборатории клинической физиологии зрения им. Кравкова (рук. д.б.н., проф. Зуева

М.В.) – к.б.н. Цапенко И.В., д.б.н. Зуевой М.В.; отделения глаукомы (руководитель д.м.н.О.А.Кисилева) - к.м.н. Ловпаче Д.Н.

Результаты исследований.

Динамика изменения активности АПФ и протеиназно-ингибиторного баланса в слезной жидкости при ожогах глаз разной локализации.

Характерным и грозным осложнением при ожогах роговицы было образование стромальных язв роговицы, при сочетанном ожоге конъюнктивы, роговицы и части лимба - ишемия конъюнктивы. Ожог лимба характеризовался субатрофией глаза.

Изменение активности АПФ и протеиназно-ингибиторного баланса в СЖ при ожоговых повреждениях глаз кроликов носило фазовый характер, имелась зависимость от стадии процесса и локализации травмы.

Активность АПФ в слезе при ожоге роговицы и сочетанном ожоге достоверно возрастала на 1-3 сутки после травмы, однако при сочетанном ожоге активность фермента была выше. В дальнейшие сроки наблюдения в обеих группах активность АПФ на 7-14 сутки снижалась и вновь увеличивалась в течение последующих 2-х недель, когда усиливались процессы изъязвления ткани роговицы. При ожоге лимба активность АПФ была наиболее высокой: на 1 сутки превышала норму практически в 4 раза, к 3 суткам возвращалась к норме, а затем в период с 7 по 21 сутки вновь значительно увеличивалась (рис.1, а).

При сравнительной оценке изменения протеиназно-ингибиторного баланса в слезной жидкости при ожогах глаз различной локализации выявлен схожий двухфазовый характер изменений ТПА, АТА, $\alpha 2$ -МГ (рис.1, б, в, г). Отмечалось два пика подъема ТПА и АТА при всех видах ожогов: первый на 1-3 сутки и второй на 14-21 сутки. Активация протеаз на ранних стадиях необходима для удаления некротизированных тканей, активация их на 14-21 сутки соответствует периоду интенсивного формирования язв роговицы. Подъем АТА по-видимому связан с поступлением плазменных антипротеаз в слезу при увеличении проницаемости сосудов и направлен на ограничение действия протеолитических ферментов. Снижение уровня $\alpha 2$ -МГ в первые сутки вероятно происходит вследствие образования комплексов с протеолитическими ферментами и постепенное повышение $\alpha 2$ -МГ можно объяснить усилением местного образования этого ингибитора. Самые значительные изменения ТПА, АТА, $\alpha 2$ -МГ отмечены в группе кроликов с ожогом лимба, где последствия ожога были наиболее тяжелыми.

Ранее было показано, что локальное ингибирование протеолитической активности с помощью поливалентных ингибиторов сериновых протеиназ на основе апротинина (Гордокса) способствует уменьшению воспаления и снижает степень изъязвления

роговицы, что обосновало широкое применение инстилляций этого ингибитора протеаз для лечения ожогов глаз (Чеснокова Н.Б., 1992). Полученные нами данные указывают на участие локального АПФ, наряду с трипсиноподобными ферментами, в патогенезе ожоговой болезни глаз, а также наличие взаимосвязи между клиническими проявлениями этого процесса и характером изменения активности в слезе. Ранее не исследовалось действие ингибиторов АПФ (иАПФ) на течение репаративных процессов в глазу после травмы.

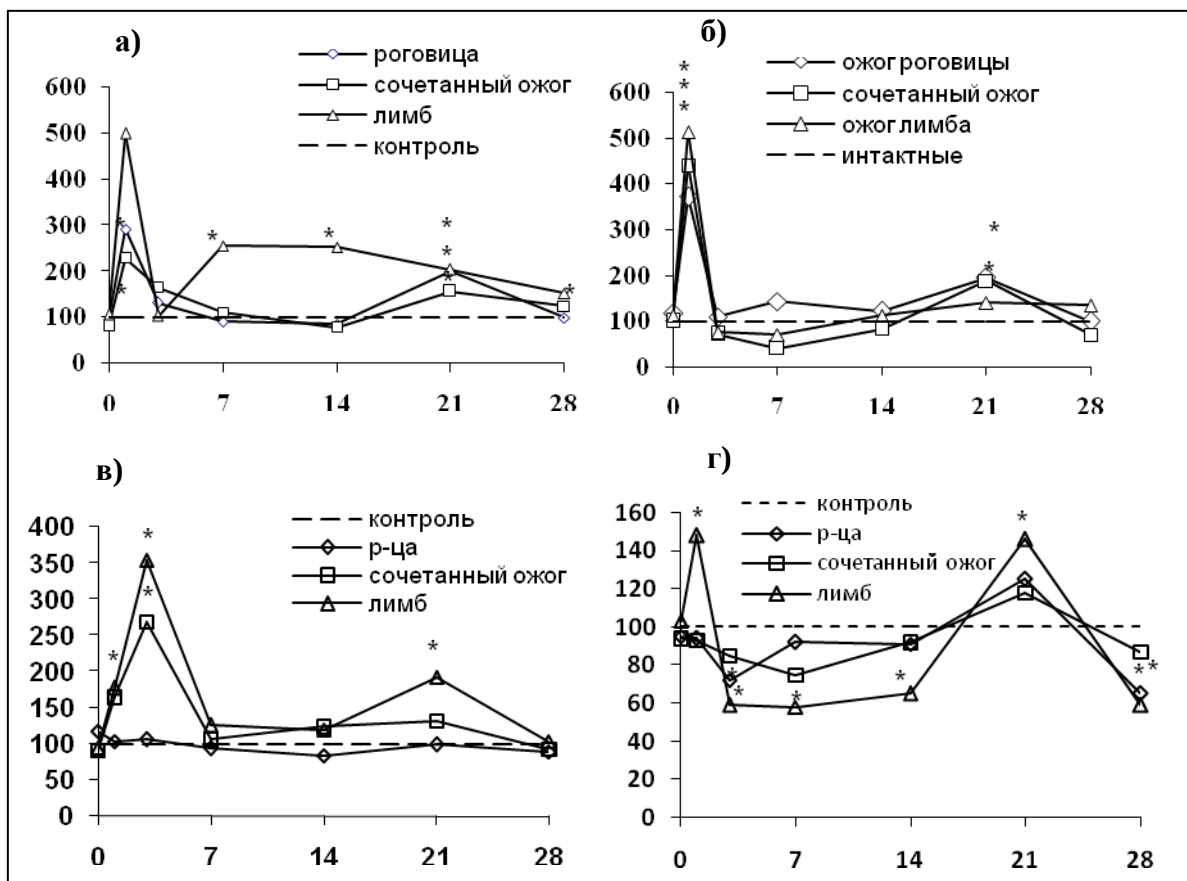


Рис.1 Изменение активности АПФ и протеиназно-ингибиторного баланса в слезной жидкости кролика после ожога глаз различной локализации.

а) активность АПФ, б) трипсиноподобная активность, в) антитриптическая активность, г) активность α_2 -макроглобулина;

ось Y- % от контроля, X –сутки после ожога.

* - $p < 0,05$ по сравнению со здоровыми животными.

Показанное нами повышение активности АПФ в слезе в момент формирования язв роговицы и ишемии конъюнктивы позволило предположить участие АПФ в этих процессах. Проведенное нами сравнение активности АПФ в слезной жидкости у кроликов с поверхностными и глубокими язвами роговицы показало, что у кроликов с глубокими язвами роговицы активность АПФ в слезе была в 2-3 раза выше, чем с поверхностными изъязвлениями, что подтвердило предположение об участии АПФ в развитии язв

роговицы (рис.2). Полученные данные явились обоснованием для местного применения иАПФ при ожогах глаз для улучшения течения постожогового процесса и предотвращения осложнений.

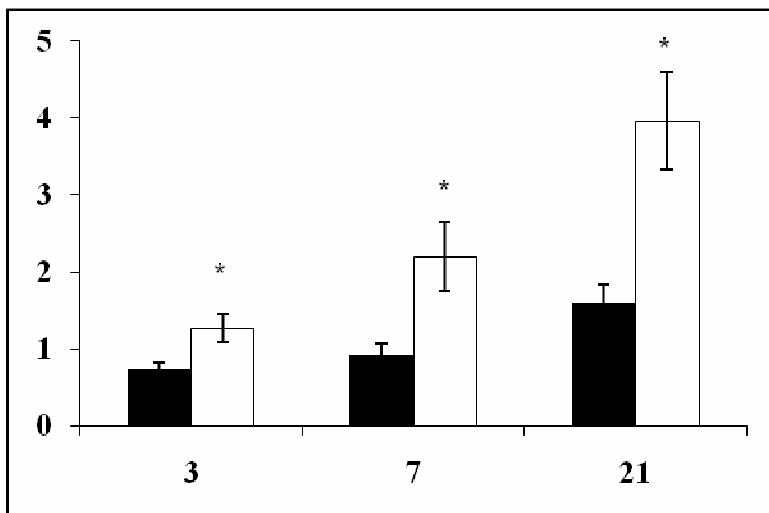


Рис.2 Активность АПФ в слезной жидкости у кроликов в зависимости от характера течения постожогового процесса.

По оси Y - активность в (ммоль/мин×мг белка) ×10⁻⁴, по оси X -сутки

■ – развитие поверхностных дефектов роговицы, □ – развитие глубоких дефектов роговицы;

* - p< 0,05 достоверно по отношению к поверхностным и глубоким язвам роговицы .

Влияние инстилляций ингибиторов АПФ (иАПФ) на активность АПФ в слезе у здоровых кроликов и при ожоге роговицы.

Для выяснения возможности и продолжительности подавления локальной активности АПФ при инстилляциях иАПФ мы исследовали влияние инстилляций иАПФ в разных концентрациях на активность АПФ в слезе у здоровых кроликов (рис. 3). Оказалось, что после местных инстилляций 0,1% каптоприла у интактных кроликов в слезной жидкости происходит падение активности АПФ более чем в 2 раза в течение 1 часа. На следующие сутки активность фермента восстанавливалась. При большей концентрации (1% каптоприл) подавление активности фермента было более значительное и длительное: не менее 5 часов и через 24 часа активность фермента еще не достигала исходного уровня. Таким образом, ингибитор при инстилляциях способен снижать активность АПФ в слезной жидкости.

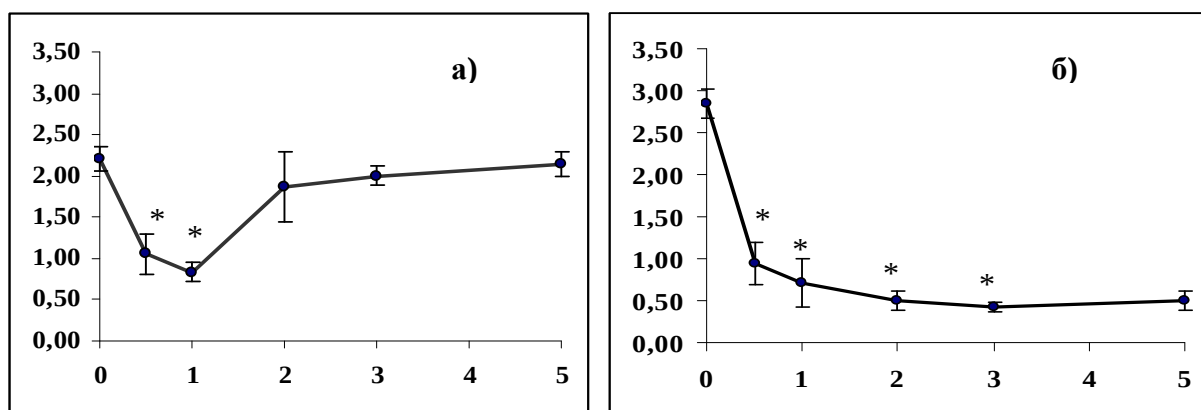


Рис.3 Влияние однократной инстилляцией иАПФ на активность АПФ в слезной жидкости у здоровых кроликов: а) 0,1% каптоприл, б) 1% каптоприл.

По оси Y – активность АПФ, % от нормы; по оси X – часы после инстилляций;

* - $p < 0,05$ достоверно по отношению к исходным значениям.

Исследовали влияние инстилляций различных иАПФ на активность АПФ в слезной жидкости при ожоге роговицы у кроликов. При ежедневных (в течение 2-х недель) инстилляциях иАПФ 0,1% каптоприла или 0,1% лизиноприла активность АПФ в слезной жидкости была значительно ниже, чем у нелеченных (рис.4, а). Действие лизиноприла начинается в более ранние сроки (1-е сутки), чем каптоприла (3-и сутки). Таким образом, с помощью инстилляций иАПФ можно снизить активность локального АПФ, что может оказать при ожогах глаз противоишемическое и противовоспалительное действие.

Изменение активности АПФ в слезе объясняет положительное влияние иАПФ каптоприла и лизиноприла на характер течения постожогового процесса (рис.4, б). Сравнение влияния на клиническое течение каптоприла и лизиноприла показало, что при применении обоих ингибиторов значительно снижается частота возникновения язв роговицы, быстрее восстанавливается микроциркуляция, происходит образование более нежной и прозрачной рубцовой ткани, что позволяет сохранять зрительные функции. По клиническим проявлениям действие лизиноприла начинается в более ранние сроки, чем каптоприла, что можно объяснить более ранним ингибированием активности АПФ.

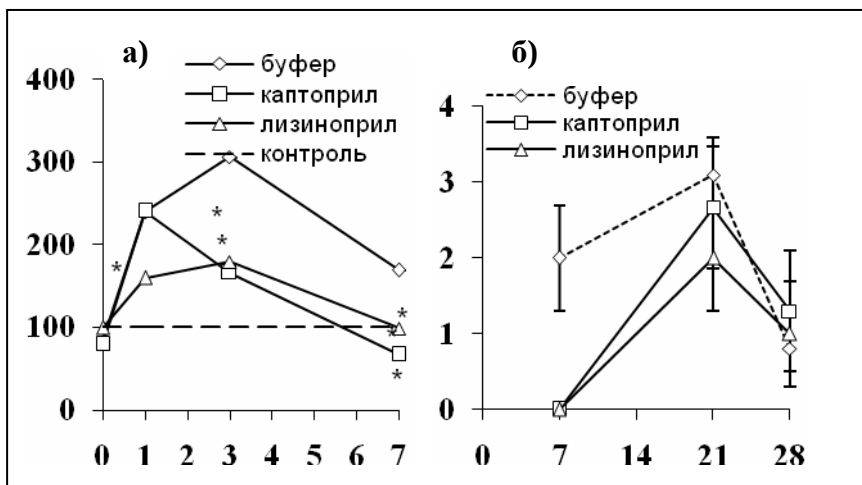


Рис.4 Влияние инстилляций иАПФ (0,1% каптоприл и 0,1% лизиноприл) при ожоге роговицы у кролика на активность АПФ в слезной жидкости и клиническое течение ожоговой болезни глаз.

а) активность АПФ; ось Y – % от контроля, ось X – сутки после ожога;

б) глубина язв; ось Y – усл. ед., ось X – сутки после ожога;

* - $p < 0,05$ достоверно по отношению к контролю.

Влияние иАПФ на антиокислительную активность в слезной жидкости при ожоге глаз различной локализации.

Показано, что после ожога глаза в слезе снижается антиокислительная активность (АОА), т.к. в условиях развивающегося при данной патологии окислительного стресса происходит расходование эндогенных антиоксидантов. Нами было изучено влияние ежедневных в течение 2-х недель инстилляций 0,1% каптоприла на АОА в слезной жидкости при ожоге роговицы и ожоговой ишемии конъюнктивы у кроликов (рис. 5). В предварительных опытах *in vitro* не было выявлено влияния каптоприла на кинетику хемилюминесценции люминола в модельной системе как в отсутствии, так и в присутствии слезной жидкости. Однако оказалось, что после ожога роговицы и сочетанного ожога, при которых в слезной жидкости падает АОА, у кроликов леченых каптоприлом, АОА была выше, чем у нелеченных животных.

Таким образом, каптоприл препятствует усилению свободно-радикальных процессов, развивающихся при ожоге, что является еще одним подтверждением положительного воздействия инстилляций иАПФ на клиническое течение ожоговой болезни глаз.

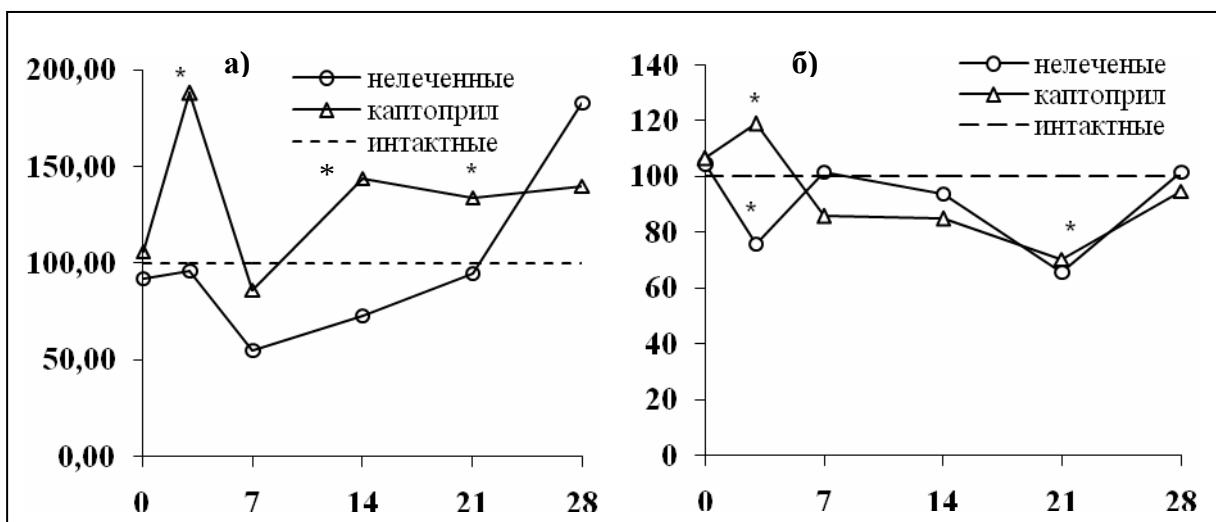


Рис.5 Влияние иАПФ (каптоприла) на АОА в слезной жидкости при а) ожоге роговицы и б) сочетанном ожоге,

Ось Y – АОА, % от контроля, ось X – сутки после ожога

* - $p < 0,05$ достоверно по отношению к здоровым животным.

Нами было проведено сравнение влияния инстилляций каптоприла и широко применяемого в лечебной практике ингибитора сериновых протеиназ Гордокса и их сочетания на течение постожогового процесса. Препараты закапывали с первого дня после ожога роговицы ежедневно в течение 14 дней. Обнаружено, что каптоприл снижал частоту образования глубоких язв роговицы даже в несколько большей степени, чем Гордокс. Совместное применение этих ингибиторов не усиливало этот эффект (Рис.6).

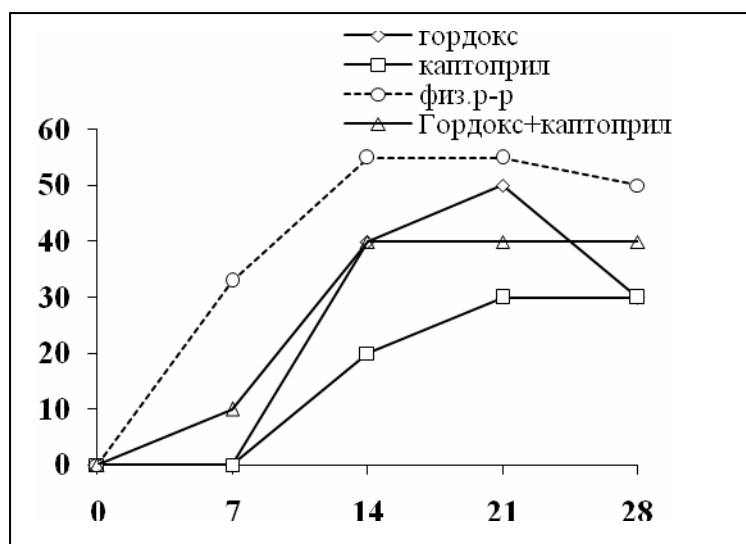


Рис.6 Влияние инстилляций каптоприла, Гордокса и их сочетания на развитие язв при ожоге роговицы.

Ось Y - процент глубоких язв (частота развития глубоких язв роговицы в %), ось X-сутки после ожога.

Активность АПФ в тканевых структурах и жидких средах глаза интактных кроликов и после ожога роговицы.

В водянистой влаге (Вв) измеренная нами общая активность АПФ (в расчете на мл) более чем в 5 раз меньше, чем в крови и слезе. При расчете удельной активности АПФ (на мг белка) оказалось, что во влаге в 5 раз выше ($1,00 \pm 0,79 \times 10^{-4}$ ммоль/мин×мг), чем в крови, но в 13 меньше, чем в слезной жидкости (рис.7). Выявлена высокая активность АПФ в васкуляризированных тканях. В хориоиде обнаружен наибольший уровень активности АПФ ($32,04 \pm 6,72 \times 10^{-4}$ ммоль/мин×мг).

После ожога роговицы происходит активация фермента, причем не только в области повреждения или в прилежащих тканях, но и во многих внутренних структурах глаза (в водянистой влаге, стекловидном и цилиарном теле, радужке). Эти изменения показывают значимость изучаемого фермента во внутренних структурах и жидких средах глаза при ожоге глаз. Можно предположить, что и при других патологических состояниях в заднем отрезке глаза, связанных с ишемическими и воспалительными процессами, активность АПФ возрастает в тканях, и местное введение иАПФ будет способствовать улучшению течения репаративных процессов и предотвращению развития осложнений, затрагивающих внутренние структуры глаза таких как, например, увеит.

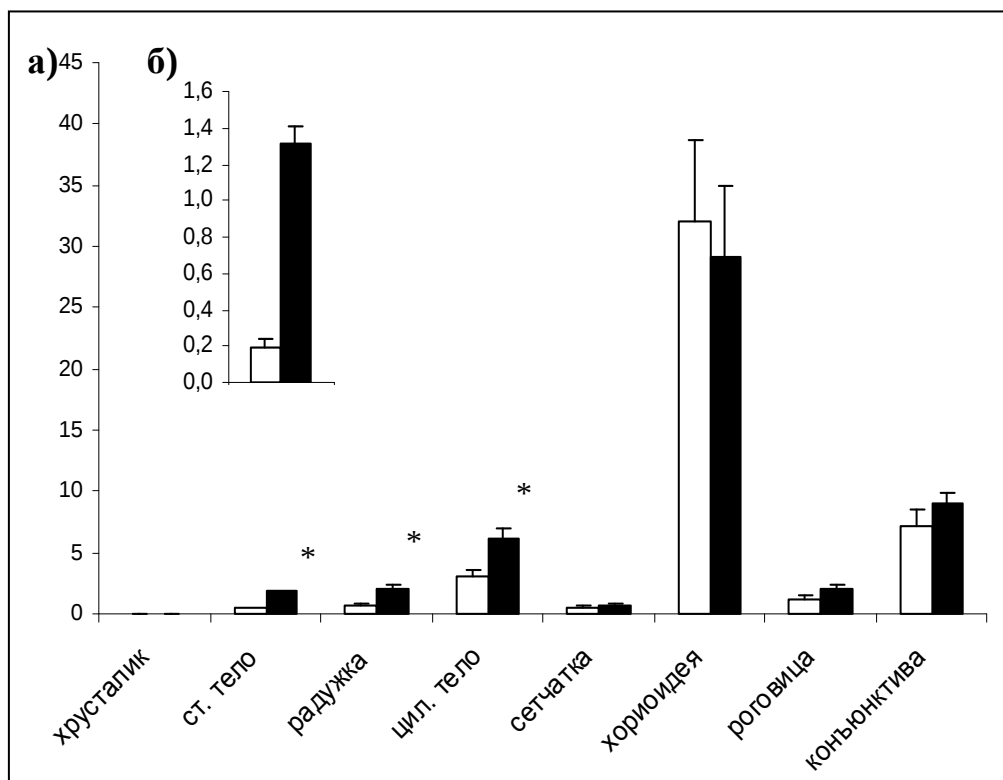


Рис.7. Удельная активность АПФ а) в гомогенатах тканей глаз кроликов, б) во влаге передней камеры.

По оси Y – активность АПФ в (ммоль/мин×мг белка) $\times 10^{-4}$, Y – активность в (ммоль/мин×мл) $\times 10^{-4}$. На всех диаграммах: – здоровые животные, – 3 суток после ожога роговицы.

* - $p < 0,05$ достоверно по отношению к здоровым животным.

Изучение возможности влияния местного введения иАПФ на течение патологического процесса в заднем отрезке глаза.

Нами проведено исследование активности АПФ после инстилляций каптоприла и эналаприлата в водянистой влаге у здоровых кроликов.

Обнаружено, что в водянистой влаге после однократного закапывания 1% каптоприла (через 45 мин.), 0,125% (через 3 часа) эналаприлата и 1% эналаприла (через 3 часа) активность АПФ значительно снижалась (рис.8), т.е. ингибитор при инстилляциях способен снижать активность АПФ во внутренних средах глаза. Таким образом, перспективным является изучение влияния инстилляций иАПФ при патологиях, затрагивающих задний отрезок глаза, в качестве таких патологий мы выбрали диабетическую ретинопатию и острую ишемию сетчатки.

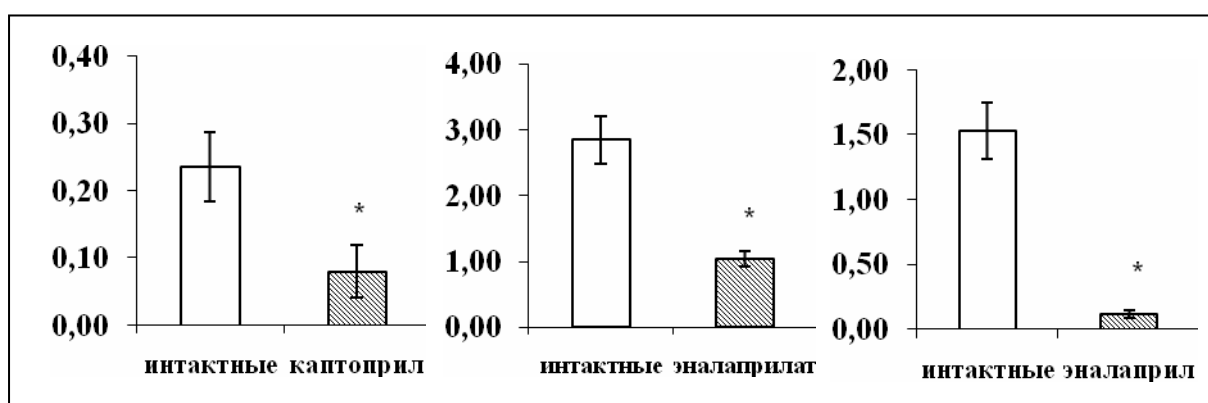


Рис.8 Активность АПФ во влаге после однократной инстилляцией каптоприла, эналаприлата и эналаприл; ось Y - активность АПФ, % от контроля.

* - $p < 0,05$ достоверно по отношению к здоровым животным.

Изучение влияния местного введения иАПФ на клиническое течение патологических процессов, протекающих в задних отделах глаза, мы проводили с помощью электрофизиологического исследования сетчатки на моделях аллоксанового диабета и острой ишемии сетчатки у кроликов. У кроликов с аллоксановым диабетом отмечалась резкая гиперреакция всех слоев сетчатки. Амплитуды а- и b-волн электроретинограммы (ЭРГ), а также низкочастотная и высокочастотная ритмической электроретинограммы (РЭРГ) превышали исходные значения в среднем на 70%. На 4 и 5 месяце диабета нарастала гиперреакция внутренних слоев сетчатки. Амплитуды b-волны ЭРГ, низкочастотной и высокочастотной РЭРГ достигали в среднем 190%. Указанные изменения развивались на фоне стойкого повышения уровня глюкозы в крови. После инстилляций эналаприлата кроликам с аллоксановым диабетом улучшений показателей ЭФИ сетчатки не было выявлено. Однако после субконъюнктивальных инъекций иАПФ (эналаприлат) в течение 2-х недель, происходило уменьшение супернормальных значений биопотенциалов сетчатки.

На модели острой ишемии сетчатки у кроликов по данным фоторегистрации глазного дна выявлено, что инстилляцией эналаприлата приводят к восстановлению кровотока в сетчатке в более ранние сроки и в более полном объеме, чем у животных без лечения. На фоне инстилляций эналаприлата при острой ретинальной ишемии отмечаются менее выраженные нарушения электрогенеза сетчатки, чем в группе животных без лечения (амплитуды b-волны ЭРГ и РЭРГ у кроликов без лечения снижались соответственно в среднем на 45% и 20% от исходных значений, у леченных эналаприлатом амплитуды b-волны ЭРГ и РЭРГ - на 20% и 11% от исходных данных). Этот эффект связан с возможным нейропротекторным свойством иАПФ.

Таким образом, при нарушении микроциркуляции в сетчатке местное применение иАПФ может оказывать лечебное действие.

Активность АПФ в слезе у больных глаукомой.

Нами впервые показано, что с возрастом у здоровых людей активность АПФ повышается, а у больных первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ) этого же возраста значение активности фермента еще выше (рис.9). Увеличение активности АПФ в слезе с возрастом у здоровых людей и больных ПОУГ указывает на возможное вовлечение этого фермента в развитие глаукоматозного процесса.

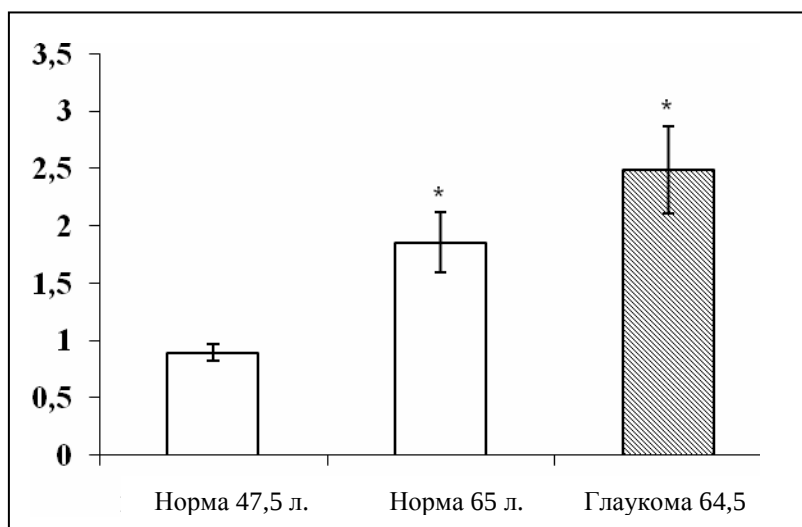


Рис.9 Активность АПФ в слезе у здоровых людей разных возрастных групп и у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой.

Ось Y – активность АПФ в (ммоль/мин×мг белка) ×10⁻⁴, ось X – средний возраст

* - p< 0,05 достоверно по отношению к норме (ср. возраст 47,5 ± 4,2 лет).

Влияние местного применения иАПФ на внутриглазное давление и гидродинамику глаза у кроликов.

Мы исследовали влияние однократной инстилляцией различных иАПФ как в активной форме (каптоприл, лизиноприл и эналаприлат), так и в виде проформы (эналаприл) на внутриглазное давление (ВГД) у здоровых кроликов.

Инстилляции иАПФ как в активной форме (каптоприл, лизиноприл и эналаприлат), так и в виде проформы (эналаприл), вызывают снижение ВГД (рис.10). Максимальное снижение ВГД у разных кроликов наблюдалось не одновременно, а в диапазоне от 1 до 3 ч после инстилляции. На графике представлены средние значения снижения ВГД на каждый момент времени ($\Delta_{\text{сред}}$). Влияние местных инстилляций иАПФ мы сравнили с действием широко применяемого для снижения ВГД препаратом - Тимололом. Полученные данные о способности проформы эналаприла при введении в виде инстилляций снижать ВГД, вероятно, свидетельствует о наличии в глазу ферментов, переводящих эналаприл в активную форму – эналаприлат.

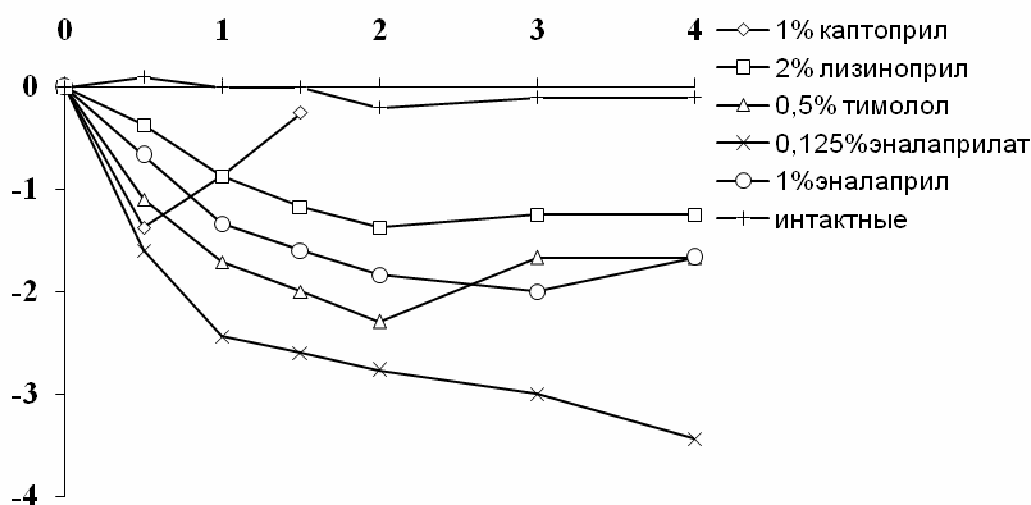


Рис.10. Изменение ВГД под действием различных иАПФ и Тимолола.

По оси X – часы, Y – среднее значение разности между исходным ВГД и ВГД после инстилляции иАПФ – $\Delta_{\text{сред}}$ (мм рт. ст.).

Исследование гидродинамики глаза у здоровых кроликов показало, что инстилляции иАПФ как активной формы (0,125%эналаприлат), так и проформы (1%эналаприл) существенно усиливают отток влаги, при этом увеличивается и ее секреция (Рис.11). Важно подчеркнуть, что в нашем эксперименте проформа иАПФ – эналаприл оказывала столь же выраженное действие, как и активная форма – эналаприлат. Тимолол оказывал на гидродинамику глаза кроликов противоположное действие – коэффициент легкости оттока и минутный объем водянистой влаги снижались в среднем на 23% и 30% соответственно.

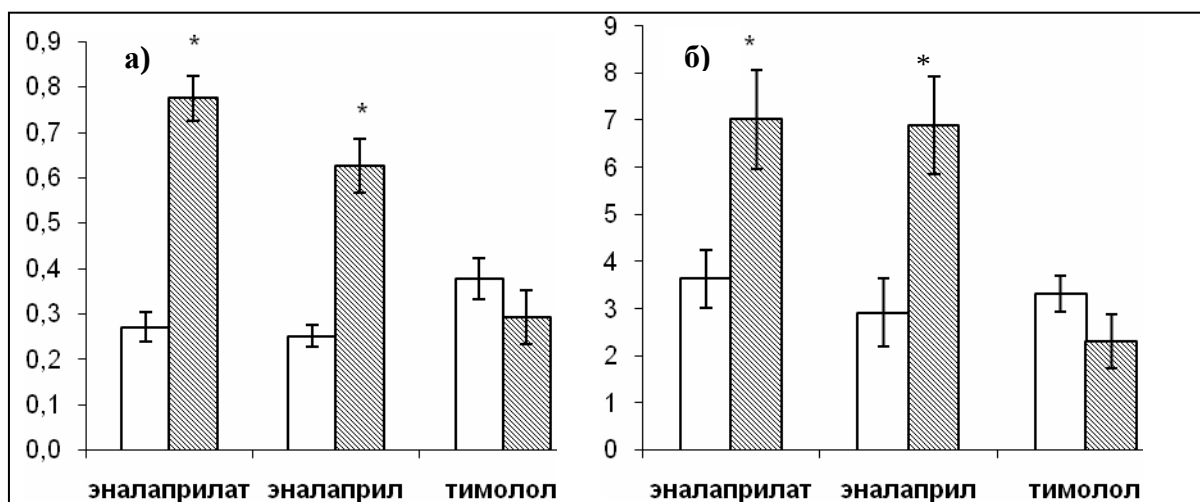


Рис.11. Влияние 1% эналаприла, 0,125% эналаприлата и Тимолола на показатели гидродинамики глаза (через 24 часа после инстилляций).

По оси Y: а) коэффициент легкости оттока – C ($\text{мм}^3/\text{мин} \cdot \text{мм рт. ст.}$); б) скорость секреции водянистой влаги – F ($\text{мм}^3/\text{мин}$). – до инстилляций, – через 4 ч после инстилляций; * - $p < 0,01$ достоверно по отношению к исходным данным .

Таким образом, показано благоприятное воздействие местного применения иАПФ на ВГД и гидродинамику глаза. По-видимому, причины снижения ВГД после инстилляций иАПФ являются комплексными и затрагивают одновременно несколько механизмов регуляции ВГД, возможно, одним из них является превосходство увеличения оттока над увеличением секреции водянистой влаги.

Выводы.

1. При экспериментальных ожогах глаз у кроликов в слезной жидкости происходит увеличение активности АПФ в периоды развития язв роговицы и ишемии конъюнктивы. Активность АПФ зависит от стадии процесса, его локализации.
2. Увеличение активности АПФ в слезе происходит при экспериментальном иммуногенном увеите у кроликов, как в глазу с увеитом, так и в парном без увеита.
3. Изучено распределение активности АПФ в тканях глаза кролика. Установлено, что активность АПФ при ожогах роговицы у кроликов увеличивается не только в тканях, окружающих зону ожога, но и во внутренних структурах глаза.
4. Применение ингибиторов АПФ в виде инстилляций при экспериментальном ожоге глаз у кроликов оказывает противовоспалительное и противоишемическое действие, что благоприятно сказывается на характере течения ожоговой болезни глаза.
5. Инстилляции ингибиторов АПФ вызывают длительное дозозависимое снижение активности АПФ в слезе, а также приводят к снижению активности АПФ в водянистой влаге.

6. На моделях диабета и острой ишемии сетчатки показано, что местное применение ингибиторов АПФ оказывает ретинопротекторное действие.
7. У больных глаукомой в слезе выявлена повышенная активность АПФ.
8. Инстилляцией ингибиторов АПФ как в виде активной формы, так и проформы кроликам вызывает снижение внутриглазного давления и значительное улучшение гидродинамических показателей глаза.

Практические рекомендации.

Проведенные экспериментальные исследования позволяют рекомендовать местное применение иАПФ при лечении широкого спектра патологий глаза, сопровождающихся воспалительными и/или ишемическими процессами, затрагивающих внешние и внутренние структуры, а также глаукомы.

Благодарность. Выражаю глубокую благодарность и признательность за большую помощь и ценные консультации при выполнении данной работы сотрудникам кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова к.х.н. Кост О.А., а также к.х.н. Никольской И.И.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Pavlenko T.A., Kost O.A., Nikolskaya I.I., Beznos O.V., Makarov P.V., *Chesnokova N.B.* "Influence of eye burn localization on proteinase-inhibitor balance and angiotensin-converting enzyme activity in tears. // XV International congress of eye research. – Geneva. – Switzerland. – 2002. - 6-10.10– P.30.
2. *Chesnokova N.B.*, Kost O.A., Nikolskaya I.I., Beznos O.V., Makarov P.V., Pavlenko T.A., Kazanskaya N.F. *Influence of eye burn localizatoion on proteinase-inhibitor balance and angiotensin-converting enzyme activity in tears. // МГУ, International conference «Biocathalysis-2002: fundamentals and applications». - Moscow. - 2002. - 22-27.06. - P.125-126.*
3. *Чеснокова Н.Б., Павленко Т.А., Никольская И.И., Кост О.А., Казанская Н.Ф. Локальная ренин-ангиотензиновая система глаза, роль в офтальмопатологии. // Вестник РАМН. - 2003. - №9. - С.29-32.*
4. Павленко Т.А., Кост О.А., Никольская И.И., Безнос О.В., Макаров П.В., Чеснокова Н.Б. *Характер изменений биохимических показателей в слезе кроликов при ожогах глаз различной локализации. // Материалы VII Международного медицинского конгресса студентов и молодых ученых. – Тернополь. – 2003. - 21-23.05. - С.206.*
5. *Чеснокова Н.Б., Кузнецова Т.П., Казанская Н.Ф., Кост О.А., Никольская И.И., Безнос О.В., Павленко Т.А., Столярова Е.П., Скиргелло О.А. Значение исследования протеолитических ферментов и их ингибиторов в слезе для изучения патогенеза раневого процесса в глазу. // Материалы II Московского международного конгресса "Биотехнология: состояние и перспективы развития". – Москва. – 2003. - 10-14.11. - С. 193.*
6. *Chesnokova N.B., Kuznetsova T.P., Kazanskaya N.F., Kost O.A., Nikolskaya I.I., Beznos O.V., Pavlenko T.A., Stolyarova E.P., Skirgello O.E. Significance of proteinase-inhibitory balance in tears for the study of pathogenesis and for elaboration of methods for therapy and prognosis of the burn wound healing in the eye. // Biocatalytic technology and nanotechnology, ed. J.I. Zaikov, Nova Science Publishers Inc. - New York. – 2004. - P.119-126.*

7. Еричев В.П., Никольская И.И., Ловпаче Дж.Н., Павленко Т.А., Чеснокова Н.Б. *Активность ангиотензин-превращающего фермента в слезе у больных глаукомой и здоровых людей разного возраста.* // Тезисы докладов: VIII съезд офтальмологов России. – Москва. – 2005. - 1-4.06. - С. 169.
8. Чеснокова Н.Б., Казанская Н.Ф., Безнос О.В., Макаров П.В., Павленко Т.А., Столярова Е.П. *Экспериментальное обоснование местного применения ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента для лечения глазных болезней, связанных с нарушением микроциркуляции и/или воспалительными процессами.* // Тезисы докладов: VIII съезд офтальмологов России. – Москва. – 2005. - 1-4.06. - С. 551.
9. Нероев В.В., Чеснокова Н.Б., Охочимская Т.Д., Рябина М.В., Кост О.А., Никольская И.И., Павленко Т.А. *Активность ангиотензинпревращающего фермента в крови и слезе у больных диабетической ретинопатией.* // Вестник офтальмологии. – 2006. - Т. 122. - № 3. - С. 11-14.
10. Кост О.А., Чеснокова Н.Б., Макаров П.В., Никольская И.И., Биневский П.В., Безнос О.В., Павленко Т.А. *Новое применение ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента в офтальмологии.* // Сборник тезисов Московской международной конференции "Биотехнология и медицина". – Москва. – 2006. - 14-17.03. - С.207.
11. Чеснокова Н.Б., Кост О.А., Никольская И.И., Безнос О.В., Биневский П.В., Столярова Е.П., Павленко Т.А. *Экспериментальное обоснование местного применения ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента в лечении воспалительных процессов в глазу.* // Вестник офтальмологии. -2008. - Т.124. - №2. - С.16-19.
12. Чеснокова Н.Б., Кост О.А., Никольская И.И., Безнос О.В., Биневский П.В., Макаров П.В., Столярова Е.П., Павленко Т.А. *Экспериментальное обоснование местного применения ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента для лечения ишемии тканей глаза на модели постожоговой ишемии конъюнктивы.* // Вестник офтальмологии. – 2008. - Т.124. - №4. - С.28-31.
13. Чеснокова Н.Б., Кост О.А., Никольская И.И., Безнос О.В., Столярова Е.П., Давыдова Н.Г., Павленко Т.А. *Перспективы применения ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента в офтальмологии.* // Российский общенациональный офтальмологический форум. – Москва. – 2008. - С.467-470.
14. Чеснокова Н.Б., Кост О.А., Никольская И.И., Безнос О.В., Давыдова Н.Г., Столярова Е.П., Биневский П.В., Павленко Т.А. *Влияние местного применения ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента на внутриглазное давление, гидродинамику глаза и активность ангиотензин-превращающего фермента в слезе и водянистой влаге (экспериментальное исследование).* // Российский офтальмологический журнал. - 2009. - Т.2. - №1. - С.42-49.

Аннотация.

Работа посвящена изучению возможности локальной регуляции активности АПФ для коррекции течения патологического процесса в глазу. Проведенная оценка активности АПФ в слезной жидкости при ожогах глаз различной локализации, а также в тканевых структурах и жидких средах глаз интактных кроликов и после ожога позволили обосновать целесообразность местного применения ингибиторов АПФ для лечения заболеваний глаза, связанных с воспалительными и/или ишемическими процессами. Выявлена способность ингибиторов АПФ при инстилляциях снижать активность АПФ в слезе и во влаге. На моделях ожога глаза показано, что ингибиторы АПФ в виде инстилляций могут применяться как для профилактики изъязвлений, так и лечения уже развившихся язв роговицы, а также оказывать противоишемическое действие. На моделях экспериментального диабета и острой ретинальной ишемии у кроликов установлено, что при инстилляциях ингибиторов АПФ значительно улучшается микроциркуляция сетчатки. Показано, что инстилляцией ингибиторов АПФ как в активной форме, так и в виде проформы вызывают снижение ВГД и улучшают состояние гидродинамики глаза.

Таким образом, в работе на основании изучения роли АПФ в глазной патологии дано экспериментальное обоснование местного применения ингибиторов АПФ для лечения заболеваний глаза.

The study devotes the possibility of local regulation of ACE activity for treatment the pathologic processes in the eye.

Estimation of ACE activity in tear fluid, tissues and fluids of the eyes of intact rabbits and rabbits with severe alkali eye burns grounds the topical administration of ACE inhibitors in the therapy of inflammatory and ischemic eye diseases. It was revealed that topical ACE inhibitors can decrease ACE activity in tear fluid and aqueous humor of rabbits. It was demonstrated on the eye burn model that instillations of ACE inhibitors can be used for the prevention and treatment of corneal ulceration and ischemia of eye tissues. Experiments with the models of diabetes and acute retinal ischemia demonstrated that instillations of ACE inhibitors improve microcirculation in retina. Instillation of ACE inhibitors both in active form and in proform was proved to decrease intraocular pressure in healthy rabbits and sufficiently improve hydrodynamic of the eye.

Thus the dissertation gives the experimental grounds for the topical administration of ACE inhibitors for the treatment of eye diseases, based on the results of investigation of ACE role in the eye pathology.