

КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКАЯ И ТРИПСИНОПОДОБНАЯ АКТИВНОСТИ СЛЁЗНОЙ ЖИДКОСТИ БОЛЬНЫХ С ОЖГОВОЙ ТРАВМОЙ ГЛАЗА

© О. С. Рыжакова¹, Т. А. Гуреева¹, А. Н. Агеев², Л. К. Мошетьева², Г. А. Яровая²,
И. Б. Алексеев², И. В. Воробьева², Н. И. Соловьева¹

¹ Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича РАМН (ИБМХ РАМН)

² ГБОУ ДПО Российская медицинская академия последилового образования Минздравсоцразвития РФ, кафедра офтальмологии

✧ Проведено исследование коллагенолитической (матриксных металлопротеиназ -ММП) и трипсиноподобной активности слёзной жидкости (СЖ) больных с травмой глаза, полученной в результате химического и термического ожогов роговицы. Обследовано 100 больных и 10 здоровых (контрольная группа). Степень ожога оценивали клинически. В соответствии со степенью тяжести было выделено две группы больных, соответствующие 2 и 3 стадиям заболевания. СЖ отбиралась в четыре периода времени после ожога: 1-й период соответствовал 3-му дню, 2-й — 4–9-му дням, 3-й — 10–19-му дням, 4-й — 20–31-му дням. Оценка активностей сериновых протеиназ и ММП в СЖ больных с ожогами, указывает на чрезвычайно значительное их превышение во все периоды обследования над активностями ферментов, выявленными в СЖ доноров: для ММП — от 100 до 1000 раз; для сериновых протеиназ — 4000–10000 раз, что приводит к разрушению роговицы, развитию глубоких язв и служит причиной потери зрения. Картина изменения активности исследуемых ферментов при обоих видах ожога имеет один и тот же характер: выраженное повышение активности с первых же дней после ожоговой травмы с незначительным её снижением на 4–9-й день в случае сериновых протеиназ, возрастанием на 10–19-й день и снижением к концу месяца. Однако к концу месяца активность не достигает не только уровня активности в СЖ доноров, но и уровня активности, наблюдаемой в первые дни ожога. В СЖ здоровых людей выявляется достоверно более низкий уровень активности СП и следовые количества ММП, что стало возможным при использовании нами высокочувствительных флуорогенных субстратов. Проведение идентификации протеиназ в слёзной жидкости является целесообразным для выбора экзогенного ингибитора в качестве возможного лекарственного средства и коррекции воспалительного процесса при травмировании глаз.

✧ **Ключевые слова:** коллагенолитическая активность матриксных металлопротеиназ; активность сериновых протеиназ; химические и термические ожоги глаз.

ВВЕДЕНИЕ

Травма органа зрения является одной из основных причин слепоты и потери глазного яблока, как органа. По данным литературы, доля поражений органа зрения в общей структуре травматических повреждений весьма значительна и составляет от 2 до 5 % от общего числа травм [8, 9, 11, 13, 16, 24].

В последние годы значительно изменились структура глазного травматизма и его тяжесть, возросло число пострадавших с неблагоприятным исходом процесса. Это объясняется ростом криминогенной, огнестрельной, взрывной травмы, увеличением числа террористических актов, широкого использования пиротехники, газового оружия [7, 8, 15, 33]. В вооружённых конфликтах последних лет тяжёлые повреждения глаз составляют 64,6 % среди всех пострадавших офтальмологического профиля [4].

Среди всех травм органа зрения, ожоги глаз представляют собой одну из самых серьёзных медицинских проблем и требуют сложной и длительной реабилитации. В настоящее время частота ожоговых травм глаза остаётся значительной. По данным литературы, ожоги глаз составляют 6,1–38,4 % всех глазных повреждений [3, 24, 25, 31].

В 40 % случаев ожоговые повреждения приводят к инвалидности 1 и 2 группы по зрению [24, 30]. Поражения химическими агентами происходят в 70–85 % всех ожогов глаз, из них 59 % составляют щелочные ожоги.

Этиология ожоговых повреждений глаз может быть обусловлена воздействием различных факторов. Условно выделяют химические, термические, термохимические и лучевые ожоги [45, 57, 70]. Термические ожоги чаще всего связаны с воздействием

на ткани повышенной температуры: открытое пламя, брызги горячих жидкостей, водяной пар, а также контакт с раскалёнными предметами. Страдают чаще всего веки, роговица и конъюнктивы, однако при тяжёлых ожогах наблюдается поражение глубже лежащих структур (склеры, сосудистой оболочки, хрусталика) [45, 57, 70]. Химические ожоги развиваются в результате контакта глазного яблока с химически активными веществами в виде жидкости, пара или твёрдых частиц. Самые частые химические реагенты при ожогах: кислоты (уксусная, серная, азотная, соляная, плавиковая), щелочи (аммиак, каустическая сода, едкий натр, известь, цемент и т. д.), «Белизна», анилиновые красители, содержимое аэрозольных баллончиков, слезоточивые газы оружия самообороны [45, 57, 70].

Патогенетические механизмы при ожогах до конца не известны, но независимо от локализации, при ожогах гибнут клетки повреждённых тканей, нарушается кровообращение (ток крови резко замедляется, в мелких сосудах формируются тромбы, плазма выходит в окружающие ткани), изменяется местный обмен веществ, развивается интоксикация продуктами распада тканей.

Клиническая картина ожогов многообразна: отёк, покраснение кожи век, отёк роговицы, конъюнктивы, покраснение глазного яблока, сильная режущая боль в глазу, блефароспазм, светобоязнь, слезотечение; вялотекущий увеит, изменение внутриглазного давления, помутнение роговицы, снижение остроты зрения или изменение поля зрения и др. [45, 47, 57, 58, 64, 70].

При термическом и химическом ожоге отмечается два этапа увеличения проницаемости барьера кровь водянистая влага для белка. Первый этап (3-и сутки) связан с развитием воспалительной реакции на ожог, а второй (14-е сутки), по-видимому, вызван развитием иммунного ответа на ожог и соответствует по срокам отторжению некротической ткани. Несмотря на различный механизм термических и химических ожогов, общим для них является развитие воспалительного процесса в роговице, в котором большую роль играют различные системы протеолитических ферментов.

В настоящее время принято считать, что основными ферментами, повреждающими строу роговицы глаза, являются матриксные металлопротеиназы (ММП), источником которых могут служить макрофаги, клетки роговицы в зоне повреждения (воспаления) и полиморфноядерные лейкоциты. ММП-1-8 и ММП-14 запускают деструкцию фибриллярных коллагенов, одного из основных компонентов соединительнотканного матрикса (СТМ), который выполняет структурирующую функцию в тканях [45, 57, 58, 62, 64].

Активность ММП резко увеличивается после ожога роговицы, что связано, с развитием воспалительных процессов и поступлением протеиназ из разрушенных тканей и клеток, участвующих в воспалительном процессе. Исследования показали, что наибольшая опасность перфорации роговицы имеет-ся в первые 2 недели после ожога, в течение которых создается наиболее высокая концентрация активных протеаз [19, 20, 37].

При легких ожогах в большинстве случаев независимо от вещества или фактора, вызвавшего ожог, наблюдается одинаковая клиническая картина: гиперемия и умеренный отёк кожи век, раздражение глаза, гиперемия конъюнктивы и повреждение эпителия роговицы на большем или меньшем протяжении [31].

При ожогах средней тяжести (II степени) кожа век гиперемирована, отёчна, образуются пузыри. На слизистой оболочке возникают явления хемоза, появляются участки ишемии и поверхностного некроза, иногда выпотевают фибрин, рыхло склеивающий веки с глазным яблоком. Значительный отёк конъюнктивы связан с усилением проницаемости капиллярных мембран и может приводить к сдавливанию капиллярных петель и возникновению обширных участков ишемии конъюнктивы. Часто в патологический процесс вовлекается радужка: возникают явления серозного ирита с выраженным миозом. Острота зрения при ожогах средней тяжести снижается значительно из-за выраженного отёка и нарушения оптических свойств роговицы. Ожоги средней тяжести при направленной патогенетической терапии, как правило, протекают без осложнений [31, 34].

Для тяжёлых ожогов типичны некротические, необратимые изменения в тканях глаза. Отличительным признаком таких ожогов является образование темного струпа в результате развития коагуляционного некроза тканевых белков, резкого обезвоживания тканей и нарушения их жизнедеятельности. Такие исходы ожогов, как ожоговая деформация век, симблефарон, язва и бельмо роговицы, токсический увеит, вторичная глаукома, рубцы склеры, неврит и атрофия зрительного нерва, субатрофия глазного яблока приводят к стойкой или длительной утрате трудоспособности в подавляющем большинстве случаев [26].

Выделяют стадии ожогового процесса по клинической картине [1]:

I стадия (до 2 суток) — стремительное развитие некробиоза поражённых тканей, избыточная гидратация, набухание соединительно-тканых элементов роговицы, диссоциация белково-полисахаридных комплексов, перераспределение кислых полисахаридов.

II стадия (2–18 суток) — проявление выраженных трофических расстройств вследствие фибриноидного набухания.

III стадия (до 2–3 мес.) — трофические расстройства и васкуляризация роговицы вследствие гипоксии тканей.

IV стадия (от нескольких месяцев до нескольких лет) — период рубцевания, повышение количества коллагеновых белков вследствие усиления их синтеза клетками роговицы.

По степени глубины поражения выделяют четыре степени ожогов [1]:

I — Для ожогов глаз I степени характерны возникновение гиперемии различных отделов конъюнктивы и зоны лимба, появление поверхностных эрозий роговицы, а также гиперемии и незначительной отёчности кожи век.

II — При ожогах глаз II степени отмечается ишемия и поверхностный некроз конъюнктивы с образованием легко снимаемых белесоватых струпьев, «матовый» цвет роговицы за счет повреждения эпителия и поверхностных слоев стромы, образование пузырей на коже век.

III — Ожоги глаз III степени характеризуются возникновением некроза конъюнктивы и роговицы вплоть до глубоких слоев кожи, занимающего не более половины площади поверхности глазного яблока. Цвет роговицы «матовый» или «фарфоровый». Отмечаются изменения офталмотонуса в виде кратковременного повышения внутриглазного давления (ВГД) или гипотонии. Возможно развитие токсической катаракты и иридоциклита.

IV — При ожогах глаз IV степени выявляется глубокий некроз, вплоть до обугливания, всех слоев век. Размер участков некроза конъюнктивы и склеры с ишемией поверхностных сосудов составляет более половины площади глазного яблока. Роговица приобретает «фарфоровый» цвет, возможно образование дефекта, занимающего более 1/3 поверхности, в некоторых случаях возможно прободение роговицы. Развивается вторичная глаукома и тяжёлые сосудистые нарушения (передние и задние увеиты).

Исходы ожоговой травмы глаз оказывают различную степень вреда здоровью [27]. В подавляющем большинстве случаев к стойкой и длительной утрате трудоспособности приводят следующие тяжёлые последствия ожоговой травмы глаз: ожоговая деформация век, симблефарон, язва и бельмо роговицы, токсический увеит, вторичная глаукома, неврит и атрофия зрительного нерва, рубцы склеры, субатрофия глазного яблока.

К настоящему времени накоплен значительный опыт и предложен целый арсенал эффективных, патоненетически ориентированных методов консер-

вативного, хирургического, комплексного лечения ожоговой травмы глаз [7, 36, 39, 56, 70]. Тем не менее, нерешённой остается проблема коррекции послеожоговых нарушений процессов регенерации поражённых тканей. В связи с этим привлекают внимание работы по изучению межклеточных взаимодействий и внеклеточного матрикса [47, 53], на основе которых был предложен принципиально новый метод — трансплантация аллогенных культивированных клеток — и доказан высокий эффект его применения в общей хирургии [22].

Наиболее ценными являются новые методические подходы к решению проблемы, когда лечебная тактика гибко корректируется в процессе лечения в зависимости от комплекса клинических, биохимических, иммунологических показателей [5, 6, 10].

Несмотря на определённые успехи в лечении ожогов глаз, имеется целый ряд вопросов, для решения которых необходимо дальнейшее изучение ожогового процесса и поиск новых способов диагностики и лечения с привлечением современных достижений иммунологии, биохимии, биотехнологии.

Таким образом, в результате ожоговой травмы происходят сложные биохимические процессы, приводящие к разрушению тканей глаза. Исследование слёзной жидкости, её состава, протеолитических ферментов, повреждающих факторов в слёзной жидкости, матриксных металлопротеиназ и сериновых протеиназ позволит оценить некоторые аспекты патогенеза ожоговой травмы глаза.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить роль матриксных металлопротеиназ и сериновых протеиназ слёзной жидкости у пациентов с ожогами в различные сроки после перенесённой травмы.

Исследование протеолитических ферментов проводилось при различных патологиях глаза [45, 47, 53, 56–58]. Основные работы были связаны с изучением активности сериновых протеиназ. Установлено, что развитие ряда патологических процессов связано с активацией протеолиза, выходящей из-под контроля эндогенных ингибиторов. Вопрос об источнике протеиназ в слёзной жидкости и путях их проникновения в очаг повреждения активно дискутируется. По мнению ряда авторов, источником протеиназ могут быть клетки конъюнктивы, эндотелия- и эпителия роговицы, кератоциты, полиморфоядерные лейкоциты, макрофаги, моноциты [49, 54, 65]. Кроме того, протеиназы проникают в слёзную жидкость из плазмы крови при увеличении проницаемости сосудов глазного яблока, конъюнктивы, слёзной железы, однако нельзя исключать их локальный синтез в очаге воспаления [42–44, 51]. Особая роль принадлежит

протеолитическим ферментам плазмы крови и их ингибиторам, которые достаточно полно исследованы [2, 17, 28, 35]. Как известно, основную ткань роговицы составляет строма, содержащая стромальные клетки соединительнотканного матрикса. Продукты распада повреждённого коллагена стимулируют миграцию клеток в лимбальные сосуды, затем в слёзную жидкость. В клетках воспалительного инфильтрата сосредоточен целый комплекс коллагенолитических ферментов — матриксных металлопротеиназ (ММП). Так, ММП-1 синтезируется эпителиальными клетками, фибробластами и макрофагами. Резкое увеличение экспрессии фермента происходит в частности и при изъязвлении роговой оболочки глаз [50]. ММП-8, коллагеназа нейтрофилов, имеет более высокий уровень гликозилирования, что способствует её выходу во внутриклеточные секреторные гранулы. Основными субстратами для ММП-1 и 8 являются фибриллярные коллагены [46, 52, 60]. Присутствие в слёзной жидкости ММП-1 и ММП-8 и других ММП, ответственных за деградацию коллагена, было выявлено с помощью иммунохимических методов [45, 57, 62–64]. Указанные коллагеназы гидролизуют целый ряд ингибиторов сериновых протеиназ: α 2-МГ, α 1-протеиназный ингибитор и др. и способствуют увеличению активности этих ферментов [62]. Таким образом, в зоне повреждения роговицы скапливается значительный протеолитический потенциал. Выяснение природы ферментов может служить основанием для адекватного лечения ожоговой болезни глаз ингибиторами протеиназ. В настоящей работе было проведено исследование динамики активности трипсиноподобных и коллагенолитических ферментов в слёзной жидкости в зависимости от вида и степени ожога при травме глаза. Работа проводилась совместно с кафедрами офтальмологии и биохимии РМАПО.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Отбор материала. Исследование протеиназ проводили в слёзной жидкости (СЖ), взятой у здоровых людей (контрольная группа) и у больных с травмой глаза, полученной в результате химического и термического ожогов роговицы находящихся на лечении в офтальмологической клинической больнице. СЖ отбиралась в разные периоды времени после ожога: 1-й период соответствовал 3-му дню; 2-й соответствовал 4–9-му дням; 3-й соответствовал 10–19 дням; 4-й соответствовал 20–31-му дням. Степень ожога оценивали клинически. В соответствии со степенью тяжести их заболевания больные были объединены в две группы, соответствующие 2 и 3 стадиям заболевания. В каждой группе больные были подразделены на две подгруппы в зависимости

от вида ожога (термический и химический). В отдельную группу были вынесены здоровые лица. Всего было обследовано 100 больных и 10 здоровых лиц. СЖ была предоставлена как в замороженном, так и в нативном состоянии. Образцы, содержащие кровь и слизь, отбрасывались. Перед измерением активности образцы центрифугировали при 1000 g.

Определение коллагенолитической активности. Активность определяли по гидролизу флуорогенного коллагена 1 типа, меченного флуоресценцинизотиоцианатом [32]. Раствор меченного коллагена доводили до pH 7,6 концентрированным трис-HCL буфером и 15 мкл коллагена вносили в короткие стеклянные пробирки. Пробы инкубировали в течение 2 часов при температуре 35 °С до образования реконструированных фибрилл (плёнок). Затем в течение 1–2 часов эти пробы инкубировали в 1–2 мл 0,01 М трис-HCL буфера pH 7,6 с добавлением 1 mM CaCl₂ и 0,2 М NaCl (рабочий буфер) для промывания плёнок от слабо связанного флуоресцина. Буфер отбирали и в нем измеряли флуоресценцию, значение которой в контрольных пробах не превышало 20–25 единиц флуоресценции. На поверхность плёнок вносили аликвоты СЖ от 5–100 мкл, затем объем пробы доводили до 1 мл рабочим буфером. Инкубацию проводили в течение 18–20 часов при 35 °С. Контролем служили пробы, инкубированные с буфером, а также пробы с определенным количеством трипсина (от 2 до 10 мкг). После 20-часовой инкубации в отобранном растворе измеряли флуоресценцию при длинах волн 490 нм (возбуждение) и 520 нм (поглощение). Контролем служили плёнки коллагена, инкубированные с буфером, а также пробы, содержащие трипсин (от 2 до 10 мкг). Гидролиз плёнок трипсином служил показателем степени возможной денатурации коллагена при его мечении; контроль не превышал 5–10 %. Для расчета активности использовали калибровочную кривую, построенную на зависимости степени флуоресценции от концентрации (в мкг) гидролизованного коллагена бактериальной коллагеназой, принимая за 100 % гидролиз коллагена этим ферментом. Активность выражали в мкг гидролизованного коллагена за минуту в расчёте на 1 мл СЖ.

Определение трипсиноподобной активности. Об уровне активности трипсиноподобных ферментов судили по гидролизу — Z-Phe-Arg-MCA (7-амино-4-метил-кумариламид карбобензоксиг-L-фенилаланил-L-аргинина), специфического субстрата трипсиноподобных сериновых протеиназ (СП). Инкубационная смесь объемом 600 мкл содержала 5–100 мкл СЖ, 20 мкл субстрата (0,06 mM) и 50 mM Na-фосфатный буфер pH 7,5. Гидролиз проводили при 37 °С в течение 10–40 минут. Реакцию останавливали добавлением 2,4 мл 20 mM Na-ацетатного буфера

Таблица 1

Коллагенолитическая активность в слёзной жидкости больных с химическим и термическим ожогами

Вид, стадия ожога	Число случаев	Активность, мкг/мин/мл; сроки после ожога (дни)				Торможение активности (%)	
		3	4–9	10–19	20–31	ЭДТА	ПХМБ
Химический ожог, 2 стадия	19	4,88 ± 1,1	15,52 ± 1,5	25,75 ± 3,8	5,31 ± 1,1	82,8	50,5
Химический ожог, 3 стадия	11	7,5 ± 4,7	26,01 ± 2,3	32,5 ± 4,5	11,5 ± 2,1	86,8	61,2
Термический ожог, 2 стадия	18	5,34 ± 2,1	13,88 ± 1,9	20,76 ± 3,1	8,42 ± 1,6	85–90	65–70
Термический ожог, 3 стадия	8	4,91 ± 2,1	13,97 ± 2,1	32,5 ± 2,4	7,86 ± 3,0	85–90	65–70
Доноры	10	0,025 ± 0,001				0	0

pH 4,0. Количество освобожденного при гидролизе продукта — 7-амино-4метил-кумаринына (МСА) измеряли на флуориметре “Perkin Elmer LS55” при длине волны 370 нМ (возбуждение) и 460 нМ (поглощение). Активность выражали в нмолях продукта, освобожденного за 1 мин в расчёте на 1 мл СЖ.

Идентификация ферментов. Для идентификации типа ферментов использовали группоспецифические ингибиторы: ЭДТА — ингибитор металлопротеиназ (ММП), ПХМБ — ингибитор цистеиновых, сериновых протеиназ, соевый ингибитор трипсина (СИТ) — ингибитор сериновых протеиназ (СП), конечная концентрация которых в пробах составляла 10^{-2} М, 10^{-3} М и 300 мкг/мл соответственно.

Коллагенолитическую и трипсиноподобную активности определяли в СЖ больных с химическими и термическим ожогами глаз 2 и 3 степени в динамике развития ожога (от первых трех дней до месяца). В качестве контроля использовали СЖ, взятую у здоровых людей (доноры).

Статистическую обработку результатов проводили, используя критерий Стьюдента для малых выборок [25, 26]. Данные представлены как среднее значение ± средняя квадратичная ошибка ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Активность по расщеплению коллагена представлена в таблице 1.

Коллагенолитическая активность связана с присутствием матриксных металлопротеиназ (ММП), которые специфически гидролизуют фибриллярные коллагены и ряд других компонентов матрикса. К этим протеиназам относятся интерстициальная коллагеназа — ММП-1, коллагеназы нейтрофилов — ММП-8, желатиназы А — ММП-2 и, возможно, мембраносвязанная МТ — ММП-14, которая по своей специфичности сходна с ММП-1. Следует подчеркнуть, что ММП в основном являются индуцируемыми ферментами, экспрессия которых происходит в ответ на ряд факторов, таких как цитокины, онкогены, химические агенты и др. При развитии воспалительного процесса также наблюдается экспрессия ММП, которые ответственны за

деструкцию соединительной ткани, и, прежде всего, фибриллярных коллагенов.

При определении активности ММП у больных с химическими ожогами глаз II степени тяжести отмечалось её значительное превышение по сравнению с группой контроля во все периоды исследования: на третий день после ожога — в 195 раз, на шестой день — в 620 раз, на четырнадцатый день — в 1000 раз и на двадцать пятый день — в 212 раз. Было выявлено изменение активности в динамике: её повышение с первых дней после ожога с пиком повышения на 14–15-й день и её снижение к концу месяца после травмы (рис. 1). Во всех образцах СЖ исследовали влияние на активность ингибиторов: ЭДТА-специфический ингибитор металлопротеиназ, к которым относятся и ММП, и ПХМБ — специфического ингибитора сериновых протеиназ. Как видно из таблицы 1, ЭДТА тормозил активность на 82,3 %, а ПХМБ — на 51 %, что свидетельствует о присутствии в СЖ как ММП, так и сериновых протеиназ.

При определении коллагенолитической активности в СЖ больных с химическими ожогами глаз III степени тяжести (табл. 1) также отмечалось её значительное превышение по сравнению с группой контроля: на третий день после ожога — в 300 раз, на шестой день — в 1000 раз, на четырнадцатый день — в 1300 раз и на двадцать пятый — в 460 раз. В этом случае в динамике опять отмечалось резкое повышение активности с первых дней после ожога с максимумом повышения на 14–15-й день и её снижение к концу месяца после травмы (рис. 1), т. е. картина изменения активности повторялась как и в случае больных с химическими ожогами глаз II степени тяжести. При этом показатели активности в СЖ больных с химическими ожогами глаз III степени тяжести во все сроки наблюдения были значительно выше, чем у больных II степени тяжести. Во всех образцах СЖ исследовали влияние на активность ингибиторов — ЭДТА и ПХМБ. Как видно из таблицы 1, ЭДТА тормозил активность на 86,8 %, а ПХМБ — на 61,2 %.

При определении коллагенолитической активности в СЖ больных с термическими ожогами глаз

Таблица 2

Активность по гидролизу Z-Phe-ArgMCA в слёзной жидкости больных с химическим и термическим ожогами

Вид, стадия ожога	Число случаев	Активность, мМ/мин/мл; сроки после ожога (дни)				Торможение активности (%)
		3	4–9	10–19	20–31	
Химический ожог, 2 стадия	40	15,34 ± 0,9	12,14 ± 0,8	17,64 ± 0,1	11,01 ± 0,7	90
Химический ожог, 3 стадия	40	23,43 ± 1,8	19,76 ± 2,1	26,0 ± 2,2	17,67 ± 1,9	92
Термический ожог, 2 стадия	41	14,96 ± 0,9	11,9 ± 0,7	16,86 ± 0,94	10,79 ± 0,6	95
Термический ожог, 3 стадия	40	21,18 ± 1,7	18,5 ± 2,1	22,8 ± 2,1	16,1 ± 1,8	93
Доноры	10	0,0026 ± 0,13				

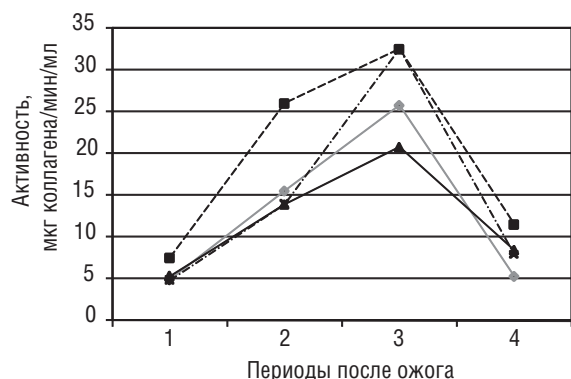


Рис. 1. Изменение активности металлопротеиназы в слёзной жидкости больных с ожогами глаз

Ось абсцисс — периоды после ожога соответствуют: 1 — 3-му дню; 2 — 4–9-му дню; 3 — 10–19-му дню; 4 — 20–31-му дню; Ось ординат — виды и стадии ожогов: А — химический ожог 2-я стадия; В — химический ожог 3-я стадия; С — термический ожог 2-я стадия; D — термический ожог 3-я стадия

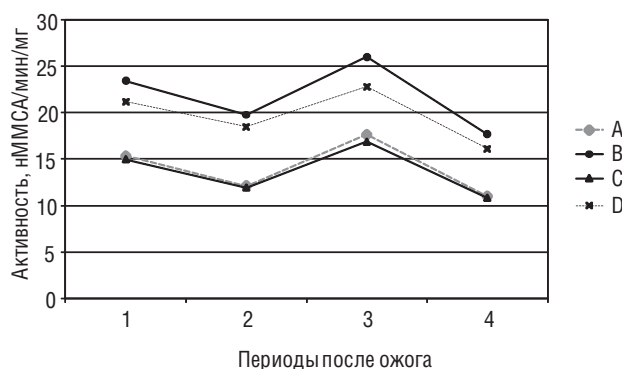


Рис. 2. Изменение активности сериновых протеиназ в слёзной жидкости больных с ожогами глаз

Ось абсцисс — периоды после ожога соответствуют: 1 — 3-му дню; 2 — 4–9-му дню; 3 — 10–19-му дню; 4 — 20–31-му дню; Ось ординат — виды и стадии ожогов: А — химический ожог 2-я стадия; В — химический ожог 3-я стадия; С — термический ожог 2-я стадия; D — термический ожог 3-я стадия

II степени тяжести в различные сроки после ожога отмечалось её повышение по сравнению с контрольной группой: на третий день после ожога — в 213 раз, на шестой день — в 550 раз, на четырнадцатый день — в 800 раз и на двадцать пятый — в 336 раз (табл. 1). Картина динамики изменения активности у больных с термическими и химическими ожогами повторялась (рис. 1). При этом, по сравнению с активностью больных с химическими ожогами II степени, отмечался всплеск активности в первые трое суток после термического ожога. В период с четвертого дня по двадцать второй активность была несколько ниже, чем у больных с химическими ожогами глаз II степени. Во всех образцах СЖ больных с термическими ожогами II степени наблюдали торможение активности на 85–90 % и на 65–70 % при действии ЭДТА и ПХМБ соответственно (табл. 1). У больных с термическими ожогами глаз III степени тяжести в различные сроки после ожога также отмечалось значительное превышение активности над контрольной группой (табл. 1). Картина динамики изменения активности у больных с термическими ожогами III степени повторяла таковую у больных с термическими

ожогами II степени, т. е. повышение активности с первых дней после ожога, с пиком активности на десятый и девятнадцатый день и снижение активности к концу месяца (рис. 1). Во всех образцах СЖ больных с термическими ожогами III степени наблюдали торможение активности на 85–90 % и на 65–70 % при действии ЭДТА и ПХМБ соответственно (табл. 2). Таким образом, использование специфического субстрата — коллагена I типа позволило идентифицировать ММП-1, а использование ПХМБ позволило определить наличие сериновых ферментов, гидролизующих коллаген.

Данные по исследованию трипсиноподобной активности по гидролизу синтетического субстрата Z-Phe-ArgMCA представлены в таблице 2. Как видно, в СЖ доноров обнаружены следовые значения этой активности. Это объясняется низкой экспрессией протеиназ в норме. При определении активности у больных с химическими ожогами в различные сроки после ожога отмечалось очень значительное её превышение над контрольной группой во все периоды исследования (от 4 000–10 000 раз).

У больных с химическими ожогами III степени тяжести в различные сроки после ожога отмечалось

её превышение (примерно в 1,5 раза) по сравнению с данными по больным с химическими ожогами II степени во все периоды исследования. В динамике наблюдалось выраженное повышение активности СП с первых же дней после ожоговой травмы с последующим её снижением на 4–9-й день, возрастанием на 10–19-й день и снижением к концу месяца (рис. 2). Однако, у больных с термическими ожогами II степени по сравнению с больными с химическими ожогами глаз II степени активность была несколько ниже, но выше активности больных с термическими ожогами глаз III степени во все периоды исследования. Как видно из рисунка 1, картина изменения активности СП при термическом ожоге имеет ранее выявленную тенденцию: выраженное повышение активности с первых же дней после ожоговой травмы с незначительным её снижением на 4–9-й день, возрастанием на 10–19-й день и снижением к концу месяца. Во всех образцах СЖ наблюдали торможение активности на 90–95 % при действии СИТ, что свидетельствовало о присутствии СП с трипсиноподобной специфичностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оценивая изменение активности сериновых и ММП в СЖ больных с ожогами, можно отметить чрезвычайно значимое превышение её значений (от 100 до 1000 раз) во все периоды обследования над активностью ферментов, выявленной в СЖ доноров. Столь резкое увеличение активности было обнаружено как в случае ММП, так и сериновых протеиназ, причем в случае ММП оно было выражено более ярко. Картина изменения активности исследуемых ферментов при ожоге имеет один и тот же характер: выраженное повышение активности с первых же дней после ожоговой травмы с незначительным её снижением на 4–9-й день, возрастанием на 10–19-й день и снижением к концу месяца. Однако к концу месяца вышеописанная активность не достигает не только уровня активности в СЖ доноров, но и уровня активности, наблюдаемой в первые дни ожога. В СЖ здоровых людей выявляется достоверный низкий уровень активности СП и следовые количества ММП. Идентификация ММП и сериновых протеолитических ферментов была проведена при использовании нами высокочувствительных флуорогенных и специфических субстратов. Активность этих ферментов резко увеличивается после ожога роговицы, что связано, с развитием воспалительных процессов и поступлением протеиназ из разрушенных тканей и клеток, участвующих в воспалительном процессе. В настоящее время принято считать, что основными ферментами, повреждающими строю роговицы глаза, являются матриксные металлопротеиназы, ис-

точником которых могут служить макрофаги, клетки роговицы в зоне повреждения (воспаления) и полиморфноядерные лейкоциты [45, 57, 62–64]. ММП-1-8 и ММП-14 запускают деструкцию фибриллярных коллагенов, одного из основных компонентов соединительнотканного матрикса (СТМ), который выполняет структурирующую функцию в тканях. Однако в деструкции СТМ могут принимать участие и другие протеиназы и пептидазы, в частности сериновые протеиназы [67, 69]. Присутствие последних в СЖ было нами выявлено как с помощью гидролиза специфического субстрата (Z-Phe-ArgMCA), так и с помощью ингибиторов. Известно также, что слёзная жидкость обладает значительным потенциалом эндогенных ингибиторов [17, 68, 66]. Однако он недостаточен при усилении экспрессии протеиназ. Кроме того, многочисленные данные свидетельствуют о том, что ММП инактивируют основные эндогенные ингибиторы сериновых протеиназ, в частности $\alpha 2$ МГ они гидролизуют даже лучше, чем фибриллярные коллагены, и таким образом происходит нарушение соотношения фермент/ингибитор в сторону увеличения активности ферментов [59]. В некоторых случаях мы не наблюдали снижения активности протеиназ до уровня активности в слезе доноров даже после лечения. Чрезвычайно высокая активность протеиназ наблюдалась на всех стадиях воспалительной реакции, которая развивается в ответ на травматическое повреждение тканей. Нарушение баланса протеиназ и их ингибиторов в роговице при травме глаза может приводить к развитию глубоких язв, что служит причиной потери зрения. Проведение идентификации протеиназ в слёзной жидкости является целесообразным для выбора экзогенного ингибитора в качестве возможного лекарственного средства и коррекции воспалительного процесса при травмировании глаз. В настоящее время в клинической практике в основном используются только ингибиторы сериновых протеиназ, такие как гордокс, кантрикал, трасилол. Причём, в офтальмологии используют только гордокс [43]. Проведённые исследования указывают на необходимость изучения действия ингибиторов ММП, в частности на моделях животных с экспериментальным воспалением роговицы, с целью дальнейшего применения их в лечебной практике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аветисов С. Э., Егоров Е. А., Мошетьева Л. К., Нероев Н. Н., Тахчиди Х. П. Офтальмология: национальное руководство. — М.: ГЭОТАР-Медиа. 2008. — 944 с. С. 886–891.
2. Бенделик Е. К., Доценко В. Л., Нешкова Е. А. и др. Общая трипсиноподобная, эластазоподобная и антитриптическая активность у пациентов с контузией глаза // *Вопр. мед. химии.* — 1999. — № 4. — С. 1–6.

3. Бойко Э.В., Черныш В.Ф., Долгих В.М. Лимбальная трансплантация в лечении пациентов с тотальными послеожоговыми бельмами роговицы // Офтальмохирургия. — 2008. — № 5. — С. 4–8.
4. Бойко Э.В., Шишкин М.М., Черныш В.Ф. Лимбальная трансплантация в лечении и зрительной реабилитации пациентов с тяжёлыми химическими ожогами глаз // Вестник офтальмологии. — 2004. — № 2. — С. 8–11.
5. Ваничкин А.А., Легеза Г.В., Дмитриев С.К. Нарушение иммунного статуса у больных в раннем периоде ожоговой болезни глаз // Офтальмол. журн. — 1987. — № 3. — С. 148–152.
6. Варданян И.Р. Клинико-иммунологическая характеристика и лечение больных с ожогами и послеожоговыми бельмами роговицы: Дис... канд. мед. наук. — М., 2000. — 301 с.
7. Волков В.В. Озвеньях патогенеза ожоговой болезни глаз // Новое в лечении ожогов глаз: тез. докладов. — М., 1989. — С. 3–4.
8. Гундорова Р.А. Повреждения глаз в чрезвычайных ситуациях, СО РАМН, Новосибирск. 2002. — 240 с.
9. Гундорова Р.А., Малаева Л.В. Значение комплексного обследования больных при протезировании роговицы с оптической и лечебной целью // Вестн. офтальмол. 1975. — № 1. — С. 27–31.
10. Гундорова Р.А., Бордюгова Г.Г., Дризе Л.А. Современные принципы лечения тяжёлых ожогов глаз // Современные средства первой помощи и методы лечения ожоговой болезни: Всесоюз. конф. — М., 1986. — С. 326–328.
11. Гундорова Р.А., Бордюгова Г.Г., Травкин А.Г. и др. Ожоговая травма глаз. — М., 1989. — 200 с.
12. Гундорова Р.А., Бордюгова Г.Г., Травкин А.Г. Реконструктивные операции на глазном яблоке. — М.: Медицина, 1983. — 208 с.
13. Гундорова Р.А., Бордюгова Г.Г., Травкин А.Т. и др. Патогенетически ориентированное консервативное и хирургическое лечение ожоговой травмы глаз: метод. рекоменд. — М., 1986. — С. 12.
14. Гундорова Р.А., Бордюгова Г.Г., Южаков А.М. Лечение и профилактика осложнений ожогов органа зрения: метод. рекоменд. — М., 1982. — 11 с.
15. Гундорова Р.А., Малаев А.А., Южаков А.М. Травмы глаза. — М.: Медицина, 1986. — 363 с.
16. Джалишвили О.А., Горбань А.И. Первая помощь при острых заболеваниях и повреждениях глаза. — Л.: Медицина, 1985. — 256 с.
17. Доценко В.Л., Нахикян Р.И., Соловьева Н.И. и др. Протеолитические ферменты слёзной жидкости как факторы патогенеза хронических язв роговой оболочки // Вopr. мед. химии. 1990. — № 3. — С. 73–76.
18. Ивантер Э.В., Коросев А.В. Основы биометрии: введение в статистический анализ биологических явлений и процессов. — Петрозаводск, 1992.
19. Капитонов Ю.А. Коррекция протеолиза роговицы в ранние сроки после химического ожога: Дис... канд. мед. наук. М., — 2001, — 260 с.
20. Капитонов Ю.А., Ченцова Е.В., Чеснокова Н.Б. Локальная регуляция протеолиза в роговице после щелочного ожога // Ожоги глаз и их последствия: Мат. научно-пр. конф. — М., 1997. — № 1. — С. 16–19.
21. Кваша О.И. Терапия оксидом азота в газовом потоке в офтальмо-травматологии (экспериментально-клиническое исследование): Дисс... д-ра мед. наук. — М., 2007. — 402 с.
22. Колокольчикова Е.Г., Будкевич Л.И., Бобровников А.Э., Туманов В.П. и др. Морфологические изменения ожоговых ран после пересадки аллогенных фибробластов // Бюлл. экспер. биол. 2001. — № 1. — с. 107–111.
23. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.
24. Либман Е.С., Кремкова Е.В., Иофан К.Л. Эпидемиология ожогов глаз и инвалидности вследствие ожоговой болезни // Новое в лечении ожогов глаз: Тез. докл. симпози. с участием иностранных специалистов. — М., 1989. — С. 76–77.
25. Макаров П.В. Осложнения тяжёлой ожоговой травмы глаз: патогенез, анализ причин, профилактика и возможные пути оптимизации результатов лечения: Дисс... доктора мед. наук. Москва, 2003. — 335 с.
26. Мошетова Л.К., Кочергин С.А. Клиническая симптоматика повреждений органа зрения в оценке утраты общей трудоспособности при проведении судебно-медицинской экспертизы // КОФТ, Рефракционная хирургия. — 2000. — с. 105–109.
27. Мошетова Л.К., Кочергин С.А. Клиническая симптоматика повреждений органа зрения в оценке утраты общей трудоспособности при проведении судебно-медицинской экспертизы // Клиническая офтальмология. — 2001. — Т. 1, № 4 — С. 105–108.
28. Мошетова Л.К., Яровая Г.А., Бенделике К. и др. (1999), Вестн Офтальмол., № 1, 11–15.
29. Офтальмология: национальное руководство под ред. С.Э. Аветисова, Е.А. Егорова, Л.К. Мошетовой, В.В. Нероева, Х.П. Тахчиди. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. — 944 с.
30. Пучковская Н.А., Войно-Ясеньский В.В. Вторичные дистрофические и структурные изменения в переднем отделе глаза. — М.: Медицина, 1985. — С. 76–89.
31. Пучковская Н.А., Якименко С.А., Непомнящая В.М. Ожоги глаз. Москва. — «Медицина», 2001. — 272 с.
32. Рыжакова О.С., Гуреева Т.А., Журбицкая В.А., Соловьева Н.И. // Биомедицинская химия. — 2007. — № 4. — 342–347.
33. Сусайкова М.С. Особенности клиники, диагностики и лечения больных с травмой органа зрения на этапе неотложной специализированной помощи: Дис... канд. мед. наук. — М., 2005. — 178 с.
34. Тартаковская А.И. Патогенез, клиника и лечение тяжёлых химических ожогов глаз: Дисс... доктора мед. наук. — 1969. — 505 с.
35. Терюханова О.В. Изучение некоторых компонентов калликреинкиновой системы при проникающих ранениях глаза // Вестн. офтальмол. — 1985. — № 4. — С. 51–53.
36. Ченцова Е.В. Система патогенетически обоснованного лечения ожоговой травмы глаз: Дисс... д-ра мед. наук. — М., 1996. — 304 с.
37. Ченцова Е.В., Романова И.Ю. Клиническая апробация нового низкомолекулярного сывороточного полипептида при ожоговых и посттравматических повреждениях роговицы // Ожоги

- глаз и их последствия: Мат. научно-пр. конференции. — М., 1997. — С. 19–20.
38. Черныш В. Ф. О местном применении дексаметазона в лечении пациентов с поверхностными ожогами глаз // Военно-медицинский журнал. — 2008. — Т. 329, № 7. — С. 63–64
 39. Чеснокова Н. Б. Исследование протеолитических ферментов и их ингибиторов в слёзной жидкости при воспалительных заболеваниях роговицы ожогового генеза // Вестн. офтальмол. — Т. 110. № 2. — С. 20–22.
 40. Чеснокова Н. Б., Сосулина Н. Е. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 4. — С. 110–113.
 41. Чеснокова Н. Б., Касавина Б. С., Щипанова А. И. Биохимическое обоснование к применению ингибиторов протеолиза при воспалительных процессах в роговице // Вестн. офтальмол. — 1983. — № 1. — С. 48–50.
 42. Чеснокова Н. Б., Кузнецова Т. П., Сосулина Н. Е. Исследование протеолитических ферментов и их ингибиторов в слёзной жидкости при воспалительных заболеваниях роговицы ожогового генеза // Вестн. офтальм. — 1994. — № 2. — С. 20–22.
 43. Чеснокова Н. Б., Кузнецова Т. П., Сосулина Н. Е. Ферменты слезы при лечении экспериментального щелочного ожога роговицы гордоксом // Офтальмол. журн. — 1990. — № 6. — С. 351–354.
 44. Чеснокова Н. Б. // Глаукома, Сб. научн. труд. МНИИГБ им. Гельмгольца. — М., 2000. — С. 32–34.
 45. Acera A., Rocha G., Vecino E. Inflammatory markers in the tears of patients with ocular surface disease // Ophthalmic. res. — 2008. — Vol. 40. — С. 315–321.
 46. Ala-Aho R., Kahari V.-M. Collagenases in cancer // Biochemie. — 2005. — Vol. 87. — P. 273–286.
 47. Ashkenas J., Byers P. H. The final stage of gene expression: chaperones and the regulation of protein fate // Am. J. Hum. Genet. — 1997. — Vol. 61, N 2. — P. 267–272.
 48. Berman M., Gordon J., Garcia L. A., Gage J. Corneal ulceration and the serum antiproteases. II. Complexes of corneal collagenases and cL o-macroglobulins // Exp. eye res. — 1975. — Vol. 20. — P. 231–244.
 49. Berman M. Collagenase and Corneal Ulceration // Collagenase in Normal and Pathological Connective Tissues / D. E. Wooley and J. M. Evanson, eds. — New York: John Wiley & Sons Ltd., 1980. — P. 141–174.
 50. Brooks D. E., Ollivier F. J. Matrix metalloproteinase inhibition in corneal ulceration // Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract. — 2004. — Vol. 34, N 3. — P. 611–622.
 51. Burnett J., Smith L., Prause J., Kenyon K. Acute inflammatory cell Jk collagenase in tears of human meltingcorneas // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 1981. — Arvo Suppl. 20. — 173 p.
 52. Chantrain C. F., Henriet P., Jodele S. et al. Mechanisms of pericyte recruitment in tumour angiogenesis: a new role for metalloproteinases // Eur. J. Cancer. — 2006. — Vol. 42, N 3. — P. 310–318.
 53. Doane K. J., Babiarz J. P., Fitch J. M. et al. Collagen fibril assembly by corneal fibroblasts in three-dimensional collagen gel cultures: small-diameter heterotypic fibrils are deposited in the absence of keratan sulfate proteoglycan // Exp. Cell. Res. — 1992. — Vol. 202, N 1. — P. 113–24.
 54. Hayasaka S. Lysosomes and the eye // Lysosomes in Biology and Pathology / Eds. J. T. Dingle, R. T. Dean, W. Sly. — Amsterdam, 1984. — P. 421–441.
 55. Kessler E., Mondino B. J., Brown S. I. The corneal response to *Pseudomonas aeruginosa*: histopathological and enzymatic characterization // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 1977. — Vol. 16, N 2. — P. 116–125.
 56. Kuckelkorn R., Kottek A., Schrage N. et al. Long-term results of Tenon-plasty in treatment of severe chemical eye burns // Ophthalmologie. — 1995. — Vol. 92, N 4. — P. 445–451.
 57. Maatta M., Kari O., Tervahartiala T. et al. Elevated expression and activation of matrix metalloproteinase 8 in tear fluid in atopic blepharoconjunctivitis // Cornea. — 2008. — Vol. 27. — P. 297–301.
 58. Murphy G., Bretz U., Baggiolini M., Reynolds J. The latent collagenase and gelatinase of human polymorphonuclear neutrophil leucocytes // Biochem. J. — 1980. — Vol. 192. — P. 517–625.
 59. Nagase H. Zinc Metalloproteinases // Health and Disease / Ed. N. M. Hooper. — London: Taylor & Francis Ltd., 1996. — P. 153–204.
 60. Nagase H., Visse R., Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs // Cardiovascular Research. — 2006. — Vol. 69. — P. 562–573.
 61. Onodera, Tsuyoshi (1987), Acta Soc. ophtal., 91, 465–471.
 62. Ollivier F. J., Brooks D. E., Van Setten G. B. et al. Profiles of matrix metalloproteinase activity in equine tear fluid during corneal healing in 10 horses with ulcerative keratitis // Vet. Ophthalmol. — 2004. — Vol. 7, N 6. — P. 397–405.
 63. Olliver F. J., Brun P., Abatangelo G. et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2003. — Vol. 44. — 3052–3058.
 64. Rohini G., Murugesvari P., Prajana N. V. Matrix metalloproteinases (MMP-8, MMP-9) and the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, TIMP-2) in patients with fungal keratitis // Cornea. — 2007. — Vol. 26, N 2. — P. 207–211.
 65. Steuhl K.-P., Ddoering J., Henni A. et al. // Invest. Ophtal. — 1982. — Vol. 28. — P. 1159–1160.
 66. Ter Rahe B. S., van Haeringen N. J. Cystatins in tears of patients with different corneal conditions // Ophthalmologica. — 1998. — Vol. 212. — P. 34–36.
 67. Turner A. J., Tanzava K. // Zinkmetalloproteinases in Health and Disease / ed. N. M. Hooper. — L.: Taylor and & Francis, London, 1996. — P. 311–331.
 68. Twining S., Averse S., Wilson P. Corneal synthesis of al- proteinase inhibitor // Invest. Ophthalmol. — 1994. — Vol. 35, N 8. — P. 3226.
 69. Vasilyeva Yu., Dilakyan E. A., Gureeva T. A. et al. // Int. Conference Biocatalysis-2000. — Moscow, 2000. — P. 172.
 70. Waldock A, Cook S. D. Corneal transplantation: how successful are we? // Br. J. Ophthalmol. — 2000. — Vol. 84, N 8. — P. 813–815.
 71. Wang L., Pan Q., Xue Q, et al. Evaluation of matrix metalloproteinase concentrations in precorneal tear film from dogs with *Pseudomonas aeruginosa*-associated keratitis // American Journal of Veterinary Research. — 2008. — Vol. 69. — P. 1341–1345

COLLAGENOLYTIC AND TRYPSIN-LIKE ACTIVITIES OF THE TEAR FLUID IN PATIENTS WITH BURN INJURY

Ryzhakova O. S., Gureeva T. A., Ageev A. N., Moshetova L. K., Yarovaya G. A., Alekseev I. B., Vorobyev I. V., Solovyeva N. I.

✧ **Summary.** Collagenolytic (matrix metalloproteinases, MMP) and trypsin-like (serine proteinases, SP) activity in the in tear fluid (TF) of patients with eye lesions that developed as a result of chemical and thermal corneal burns was studied. 100 patients and 10 practically healthy donors (a control group) were examined. The burn degree was evaluated clinically. In terms of the degree of severity, patients were divided into two groups that corresponded to 2nd and 3rd stages of the disease. TF was collected at 4 time points after the burn injury. The first point corresponded to day 3; the second, to days 4–9; the third, to days 10–19, and the fourth, between days 20–31. The activity of SP and MMP in TF from patients with burns was extremely elevated at all time periods when compared to the activity of these enzymes in TF of donors: for MMP, the activity was elevated by 100–1000

fold; for SP, by 4000–10000 fold. The elevation of proteolytic activity leads to corneal degradation, corneal ulcer formation, and is the cause of visual loss. The changes occurring in MMP and SP activity has the same character in both chemical and thermal burns: pronounced activity increase even from the first days after the burn injury was followed by an insignificant activity decrease by days 4–9 (for SP); its increase to days 10–19, followed by its decrease towards the end of the month. However, up to the end of the month the activity did not regain either the values found in the TF of controls or the levels observed during the first days after the burn. In the TF of healthy individuals, significantly lower level of SP and trace amounts of MMP were discovered. The findings of these activities became possible owing to the use of highly sensitive fluorogenic substrates. The identification of proteinases in TF advisable is the choice of exogenous inhibitors as of possible medical therapy and for the correction of the inflammatory process in treatment of eye injuries.

✧ **Key words:** matrix metalloproteinase collagenolytic activity; serine proteinase activity; chemical and thermal eye burns.

Сведения об авторах:

Рыжакова Ольга Сергеевна — к. б. н. Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича РАМН (ИБМХ РАМН). 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10. E-mail: inst@ibmc.msk.ru.

Гуреева Татьяна Александровна — к. б. н. Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича РАМН (ИБМХ РАМН). 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10. E-mail: inst@ibmc.msk.ru.

Агеев А. Н. — ГБОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования Минздравсоцразвития РФ, кафедра офтальмологии. 103001, Москва, Мамоновский пер., 7. E-mail: rmapo@rmapo.ru.

Мошетова Лариса Константиновна — доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН. ГБОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования Минздравсоцразвития РФ, кафедра офтальмологии. 103001, Москва, Мамоновский пер., 7. E-mail: rmapo@rmapo.ru.

Яровая Г. А. — ГБОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования Минздравсоцразвития РФ, кафедра офтальмологии. 103001, Москва, Мамоновский пер., 7. E-mail: rmapo@rmapo.ru.

Алексеев Игорь Борисович — доктор медицинских наук, профессор. ГБОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования Минздравсоцразвития РФ, кафедра офтальмологии. 103001, Москва, Мамоновский пер., 7. E-mail: rmapo@rmapo.ru.

Воробьева И. В. — ГБОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования Минздравсоцразвития РФ, кафедра офтальмологии. 103001, Москва, Мамоновский пер., 7. E-mail: rmapo@rmapo.ru.

Соловьева Нина Ивановна — д. б. н., проф. Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича РАМН (ИБМХ РАМН). 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10. E-mail: Nina.Solovyeva@bmc.msk.ru.

Ryzhakova Olga Sergeevna — PhD. V. N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry of Russian Academy of Medical Sciences. 119121, Moscow, Pogodinskaya st., 10. E-mail: inst@ibmc.msk.ru.

Gureeva Tfn'yana Alexandrovna — PhD. V. N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry of Russian Academy of Medical Sciences. 119121, Moscow, Pogodinskaya st., 10. E-mail: inst@ibmc.msk.ru.

Ageev A. N. — Department of Ophthalmology of Russian Medical Academy of the Post-Diploma Education. 103001, Moscow, Mamonovskiy per., 7. E-mail: rmapo@rmapo.ru.

Moshetova Larisa Konstantinovna — doctor of medical science, professor, academic RAMS. Department of Ophthalmology of Russian Medical Academy of the Post-Diploma Education. 103001, Moscow, Mamonovsky per., 7. E-mail: rmapo@rmapo.ru.

Yarovaya G. A. — Department of Ophthalmology of Russian Medical Academy of the Post-Diploma Education. 103001, Moscow, Mamonovskiy per., 7. E-mail: rmapo@rmapo.ru.

Alekseev Igor Borisovich — doctor of medical science, professor. Department of Ophthalmology of Russian Medical Academy of the Post-Diploma Education. 103001, Moscow, Mamonovskiy per., 7. E-mail: rmapo@rmapo.ru.

Vorobieva I. V. — Department of Ophthalmology of Russian Medical Academy of the Post-Diploma Education. 103001, Moscow, Mamonovskiy per., 7. E-mail: rmapo@rmapo.ru.

Solovieva Nina Ivanjvna — doctor of biological science, professor. V. N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry of Russian Academy of Medical Sciences. 119121, Moscow, Pogodinskaya st., 10. E-mail: Nina.Solovyeva@bmc.msk.ru.