

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И БОЛЬНЫХ С СИНДРОМОМ «СУХОГО ГЛАЗА»

© С. Г. Журова¹, В. В. Бржеский¹, И. В. Калинина²

¹ Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия,

² Городская Мариинская больница, Санкт-Петербург, Россия

✧ В целях повышения возможностей диагностики, мониторинга и оценки эффективности лечения деструктивных процессов, протекающих в эпителии и строме роговицы, разработан метод определения коллагенолитической активности слезной жидкости. В основе разработанного метода лежит ускорение процесса высыхания смеси слезной жидкости и коллагена при повышении коллагенолитической активности исследуемой слезной жидкости. Установлены возрастные нормативы коллагенолитической активности слезной жидкости, а также факт статистически значимого повышения рассматриваемого параметра при эрозиях и язвах роговицы ксеротической этиологии.

✧ **Ключевые слова:** слезная жидкость; коллагенолитическая активность; ксеротическая язва роговицы.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Известно, что при ряде заболеваний роговицы, сопровождающихся деструкцией ее ткани (рецидивирующая эрозия эпителия, язва стромы роговицы и др.) возрастает активность матричных металлопротеиназ (ММП) II и IX типов [2; 3]. ММП II типа продуцируется кератоцитами в норме, однако повышение ее концентрации в слезе в ряде случаев сопровождается разрушением ткани роговицы. ММП IX типа вырабатывается эпителиальными клетками и полиморфноядерными нейтрофилами поврежденной роговицы [1]. Оба протеолитических фермента расщепляют коллаген стромы роговицы, замедляя ее регенерацию, и содержание их в слезе служит косвенным свидетельством выраженности процессов деструкции ткани роговицы. Исследования активности ММП представляют большой интерес в целях прогнозирования клинического течения деструктивных процессов в роговице, в частности у больных с синдромом «сухого глаза».

Вместе с тем известные методы исследования активности ММП сложны и ориентированы преимущественно на большой объем биологического материала. Интересы же клинической практики требуют разработки метода интегральной оценки активности коллагенолитических ферментов слезной жидкости, доступного для практикующих врачей.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработать метод исследования коллагенолитической активности слезной жидкости и оценить его результативность при обследовании здоровых людей и больных с синдромом «сухого глаза».

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В целях определения нормальных значений коллагенолитической активности слезной жидкости обследованы 36 человек (72 глаза) в возрасте от 3 до 59 лет без патологии переднего отдела глаза. Все обследованные были разделены на 6 групп:

I группа (6 человек) — мальчики в возрасте от 3 до 16 лет; II (6) — девочки в возрасте от 3 до 17 лет; III (6) — мужчины в возрасте от 20 до 40 лет; IV (6) — мужчины в возрасте от 21 до 40 лет; V (6) — мужчины в возрасте от 42 до 57 лет; VI (6 человек) — женщины в возрасте от 45 до 59 лет.

В основе разработанного нами метода лежит ускорение процесса высыхания смеси слезной жидкости и коллагена при повышении коллагенолитической активности исследуемой слезной жидкости.

В указанной связи наше внимание привлек гель коллагена, который, благодаря своей высокой гомогенности, простоте хранения и широкой доступности, в наибольшей степени подходил для исследований (рис. 1).

Первоначально в серии предварительных экспериментов было установлено, что для получения пригодной к лабораторному анализу смеси исследуемой слезной жидкости с гелем коллагена служит их соотношение 1 — 1,5 : 1.

Затем предстояло разработать график-номограмму для перевода временных значений (высыхания смеси) в коллагенолитическую активность исследуемой слезной жидкости.

Для построения указанной номограммы готовили серию из 8 калибровочных проб. Каждая из указанных проб включала в себя упомянутый выше гель колла-



Рис. 1. Гель коллагена, использованный для исследования коллагенолитической активности слезной жидкости

гена (см. рис. 1) и раствор коллагеназы, в качестве которого использовали коллализин в смеси с физиологическим раствором. Концентрацию коллализина в смеси подбирали таким образом, чтобы обеспечить в каждой из проб серии определенную заданную активность указанного фермента (соответственно, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700 КЕ/мл).

Затем калибровочные пробы наносили на предметные стекла (каждую пробу с определенной заданной активностью фермента — на 5 предметных стекол) и фиксировали время полного высыхания каждого предметного стекла. Определяли среднее время высыхания каждой из проб смеси, которое рассматривали как временной показатель, соответствующий конкретной заданной активности коллализина.

Для построения калибровочной кривой по оси ординат откладывали среднее время высыхания проб смеси коллализина с гелем коллагена, по оси абсцисс — заданную активность коллализина (коллагенолитическую активность), соответствующую

Таблица 1
Коллагенолитическая активность слезной жидкости здоровых людей

Номер группы	Количество обследованных лиц	Среднее время высыхания реакционной смеси, мин	Средняя коллагенолитическая активность слезной жидкости, КЕ/мл
I	6	$3,08 \pm 0,14$	$270,84 \pm 14,77$
II	6	$3,22 \pm 0,10$	$256,40 \pm 7,55$
III	6	$3,14 \pm 0,21$	$264,15 \pm 8,08$
IV	6	$3,22 \pm 0,27$	$256,40 \pm 7,55$
V	6	$3,28 \pm 0,12$	$250,19 \pm 11,02$
VI	6	$3,07 \pm 0,09$	$271,55 \pm 9,55$
Итого	36	$3,18 \pm 0,05$	$260,02 \pm 4,90$

ую каждой конкретной калибровочной пробе (рис. 2).

В указанных выше целях определяли среднее время высыхания исследуемой реакционной смеси в каждой группе здоровых людей и среднее значение коллагенолитической активности слезной жидкости в данной группе. После этого с помощью номограммы (рис. 2) рассчитывали среднее время высыхания исследуемой смеси и среднее значение коллагенолитической активности слезной жидкости здоровых людей. Результаты исследования приведены в таблице 1.

Как видно из представленных в таблице данных, величины коллагенолитической активности слезной жидкости не имели статистически значимых различий ($p > 0,05$) в группах обследованных людей различного пола и возраста. Это обстоятельство позволило принять среднее значение коллагенолитической активности всех здоровых обследованных ($260,02 \pm 4,9$ КЕ/мл) за норму и выразить «полосу нормы» коллагенолитической активности слезной жидкости в виде интервала ($M \pm t_{95}m$) $255,12 \div 264,93$ КЕ/мл.

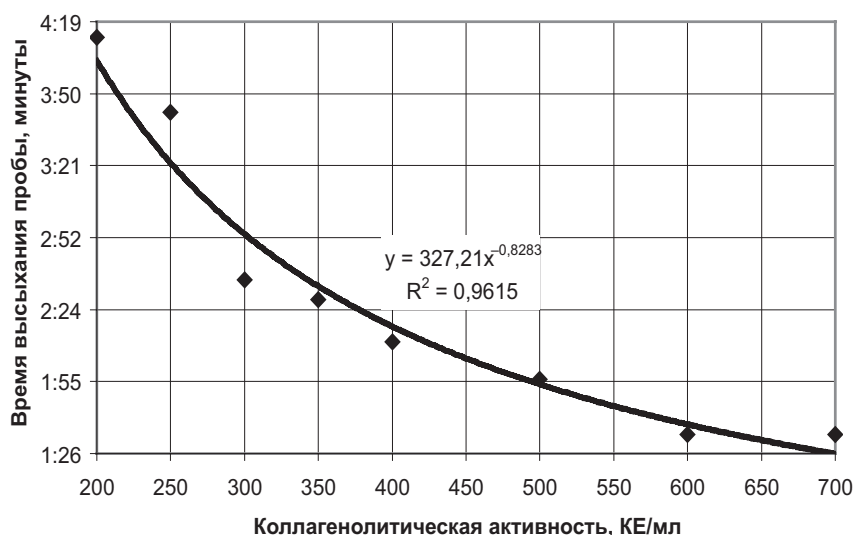


Рис. 2. Номограмма для определения коллагенолитической активности слезной жидкости

Таблица 2

Коллагенолитическая активность слезной жидкости здоровых людей

Обследованные с ССГ	Количество		Время высыхания пробы ($M \pm m$)	Коллагенолитическая активность слезной жидкости, КЕ/мл
	больных	проб		
Без деструкции ткани роговицы	6	30	$2,00 \pm 0,01^*$	$453,54 \pm 2,77^*$
С эрозией роговицы	6	30	$1,79 \pm 0,04^{\blacklozenge}$	$636,68 \pm 30,35^{\blacklozenge\clubsuit}$
С глубокой стромальной язвой	8	40	$1,51 \pm 0,06^{\blacklozenge\clubsuit}$	$536,33 \pm 7,40^*$
Всего:	20	100	$1,74 \pm 0,04^*$	$260,02 \pm 4,9$
Контрольная группа	36	180	$3,18 \pm 0,05$	$260,02 \pm 4,9$

* — данные являются статистически значимыми по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$).
 $\blacklozenge$ — данные являются статистически значимыми по сравнению с группой пациентов без деструкции ткани роговицы ($p < 0,01$).
 $\clubsuit$ — данные являются статистически значимыми по сравнению с группой пациентов с эрозией роговицы ($p < 0,01$).

На следующем этапе исследований коллагенолитическую активности слезной жидкости определяли уже у больных с ССГ.

Общее количество обследованных с ССГ составило 20 человек, в том числе 14 — с клиническими признаками деструкции ткани роговицы: 6 человек — с эрозией и 8 — с глубокой стромальной язвой роговицы. Их результаты исследований представлены в таблице 2.

Из данных, представленных в таблице 2, видно, что коллагенолитическая активность слезной жидкости пациентов с ССГ выше, чем у здоровых людей. Так, у больных с роговично-конъюнктивальным ксерозом время высыхания пробы составило $1,74 \pm 0,04$ мин, что соответствует коллагенолитической активности $536,33 \pm 7,40$ КЕ/мл. При этом среди таких больных коллагенолитическая активность слезной жидкости оказалась выше у пациентов с деструктивными процессами, протекавшими в роговице.

Так, время высыхания пробы слезной жидкости у больных с ССГ без деструктивных изменений роговицы составило $2,00 \pm 0,01$ мин, что соответствует значениям коллагенолитической активности слезной жидкости $453,54 \pm 2,77$ КЕ/мл. У больных с ССГ в сочетании с деструктивными изменениями роговицы средняя величина коллагенолитической активности слезной жидкости составила $577,53 \pm 58,95$ КЕ/мл ($p < 0,05$). При этом у больных с эрозией роговицы она оказалась равной $518,39 \pm 13,90$ КЕ/мл, а у больных с глубокой стромальной язвой роговицы — $636,09 \pm 30,35$ КЕ/мл.

При сравнении величин коллагенолитической активности слезы больных без деструкции ткани роговицы с группами больных с эрозией роговицы и с глубокой стромальной язвой было выявлено, что различия являются статистически значимыми. При сравнении коллагенолитической активности слезной жидкости контрольной группы с больными, страдающими ССГ различной степени тяжести, было выявлено, что разница между данными группами также

значительна ($p < 0,001$). Аналогичные данные получены при сравнении значений коллагенолитической активности слезной жидкости проб больных с эрозией роговицы с группой больных с глубокой язвой роговицы ($p < 0,01$).

При анализе результатов обследования группы больных без деструктивных изменений роговицы, страдающих ССГ, с пробами больных с эрозией роговицы и с глубокой язвой роговицы различия также оказались статистически значимыми ($p < 0,01$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, слезная жидкость человека обладает коллагенолитической активностью, которая возрастает у больных с роговично-конъюнктивальным ксерозом, пропорционально выраженности (по площади и глубине) процесса деструкции ткани роговицы.

Полученные результаты могут быть использованы в целях дальнейшего изучения патогенеза язвенного процесса в роговице и, возможно, прогноза клинического течения (стационарное, прогрессирующее) язвы.

Представляется также актуальным в дальнейшем определять показания к назначению противоферментной терапии, ориентируясь на результаты исследования коллагенолитической активности слезной жидкости.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ollivier F.* Matrix metalloproteinase 2, matrix metalloproteinase 9, connective tissue growth factor in the equine tear fluid: possible implications in corneal wound healing: PhD Dissertation, University of Florida, Gainesville, FL, 2004.
2. *Slansky H. H., Gnadinger M. C., Itoi M. et al.* Collagenase in corneal ulcerations // Arch. Ophthalmology. — 1969. — Vol. 89. — P. 108–111.
3. *Sakimoto T., Shoji J., Kanno H. et al.* Gelatinase expression in ocular surface disorders // Jap. J. Ophthalmol. — 2004. — Vol. 48, №1. — P.17–22.

THE TEAR COLLAGENOLYTIC ACTIVITY ASSESSMENT IN HEALTHY PEOPLE AND DRY EYE SYNDROME PATIENTS

Zhurova S. G., Brzhesky V. V., Kalinina I. V.

✧ **Summary.** To enhance the capabilities of diagnosis, follow-up and evaluation of treatment effectiveness of destructive processes in the corneal epithelium and stroma. A method to estimate tear collagenolytic activity was studied. The precipitation of tear and collagen mixture drying process at increased collagenolytic activity of tested tear fluid provides the basis for the elaborated method. Tear fluid collagenolytic activity age norms are established, as well as the fact of statistically significant increase of the parameter in question at corneal erosions and ulcers of xerotic etiology.

✧ **Key words:** tear fluid; collagenolytic activity; xerotic corneal ulcer.

Сведения об авторах:

Журова Светлана Геннадьевна — врач-офтальмолог. Кафедра офтальмологии с курсом клинической фармакологии. ГОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия Росздрава».
194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2.
E-mail: info@eye-gpma.ru.

Бржеский Владимир Всеволодович — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой офтальмологии с курсом клинической фармакологии. ГОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия Росздрава».
194100, Санкт-Петербург, Литовская ул., д. 2.
E-mail: vvbrzh@yandex.ru.

Калинина Ирина Вячеславовна — врач-офтальмолог. Городская Мариинская больница. Санкт-Петербург.
194104, Санкт-Петербург, Литейный пр., 56.
E-mail: admin@mariin.ru.

Zhurova Svetlana Gennad'evna — ophthalmologist. Department of Ophthalmology of the Saint-Petersburg State Pediatric Medical Academy.
194100, St.Petersburg, Litovskaya str., 2.
E-mail: info@eye-gpma.ru.

Brjesky Vladimir Vsevolodovich — doctor of medical science, professor, head of department. Department of Ophthalmology of the Pediatric State Medical Academy.
Litovskaya st., 2, St. Petersburg, 2194100.
E-mail: vvbrzh@yandex.ru.

Kalinina Irina Vyacheslavovna — ophthalmologist. Mariinsky City Hospital, Saint-Petersburg.
194104, St.Petersburg, Liteyniy, 56.
E-mail: admin@mariin.ru.