

**Павлюченко К.П., Могілевський С.Ю., Гудзенко К.А.** *Вплив біофлавоноїду рутозид на ензиматичну антиоксидантну систему кришталика та внутрішньоочної рідини у тварин з експериментальним діабетом.*

Вивчений вплив біофлавоноїду рутозид на ензиматичну антиоксидантну систему кришталика та внутрішньоочної рідини тварин на моделі стрептозотозинного діабету. Встановлено, що в кришталику і внутрішньоочній рідині у тварин з експериментальним діабетом достовірно понижена активність супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази та каталази. Включення в раціон рутозиду дозволило підвищити їх активність в кришталику у внутрішньоочній рідині на 28,6% і 19,4%, глутатіонпероксидази – на 19,5% і 24,7% і каталази – на 16,4% і 20,0% відповідно.

**Ключові слова:** експериментальний діабет, кришталик, внутрішньоочна рідина, ензиматична антиоксидантна система, рутозид.

#### Summary

**Pavlyuchenko K., Mogilevskyy S., Gudzenko K.** *Influence of the bioflavonoid rutoside on the enzymatic antioxidant system of the eye lens and intraocular fluid of animals with an experimental diabetes.*

Influence of the bioflavonoid rutoside is studied on the enzymatic antioxidant system of the eye lens and intraocular fluid of animals with an experimental streptozotocin diabetes. It is set that in the eye lens and intraocular fluid for animals with experimental diabetes activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase were authentic reduce. Plugging in the ration of rutoside allowed to promote their activity in the eye lens and in an intraocular fluid the superoxide dismutase on 28,6% and 19,4%, glutathione peroxidase – on 19,5% and 24,7%, catalase – on 16,4% 20,0%.

**Key words:** experimental diabetes, lens, intraocular fluid, enzymatic antioxidant system, rutoside.

**Рецензент:** д.мед.н., проф. А.М. Петруня

## ВЛИЯНИЕ ТИОЛОВЫХ ПРЕПАРАТОВ НА СТЕПЕНЬ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА В РОГОВИЦЕ ПРИ КЕРАТОКОНЬЮНКТИВИТЕ

**А.М. Петруня, Мухамед Абдульрахман Кутайни**  
ООО «Луганский областной центр глазных болезней»

#### Введение

На сегодняшний день в практике офтальмологов довольно часто встречаются воспалительные заболевания роговой оболочки.

В настоящее время недостаточно изучена этиология и патогенез керато-конъюнктивитов, что обуславливает отсутствие высокоэффективных методов их лечения. Использование традиционных медикаментозных средств не всегда приводит к излечению больного и предупреждению возникновения рецидивов. Это обуславливает актуальность поиска новых методов патогенетического воздействия на воспалительный процесс в конъюнктиве при керато-конъюнктивитах [5,7,12,14,18]. Наличие воспалительного процесса в конъюнктиве, как правило, в значительной мере повышает степень клинических признаков, которые характеризуют интенсивность воспаления в роговой оболочке при кератите [1,3]. Было установлено, что особенности ответной реакции ткани роговицы на воспаление зависит от биохимических и морфологических изменений в этой ткани. Известно, что воспалительный процесс сопровождается нарушением структурной организации мембран лизосом, что приводит к выходу гидролаз из этих внутриклеточных структур в цитозоль клетки [4,15,19]. Также известно, что при кератите наблюдается усиление процессов перекисного окисления липидов, что имеет большое значение в увеличении проницаемости клеточных мембран и негативно влияют на антиокислительную систему [20,21,23].

В последние годы в результате многочисленных исследований была выявлена роль поверхностных структур глаза и, в частности, слизистой оболочки конъюнктивы в защитно-приспособительных реакциях органа зрения. Так, в частности, выявлена новая существенная функциональная особенность конъюнктивы, связанная с транспортом важнейшего детоксиканта глутатиона.

Слезная жидкость, как известно, играет важную роль в метаболизме роговицы и является важной средой, которую необходимо учитывать при диагностике разных патологических процессов, происходящих в данной ткани [2]. В серии исследований было показано, что при конъюнктивитах в слезной жидкости значительно снижен уровень глутатиона и повышается концентрация перекисных соединений, что неблагоприятно сказывается на метаболический и антиоксидантный статус роговицы. И действительно, нами было показано в эксперименте, что при кератите в сочетании с высокой степенью воспалительного процесса в конъюнктиве, степень патологических изменений в роговице значительно возрастает. В этих условиях представляется целесообразным корректировать, в первую очередь, тиоловый и антиоксидантный статус роговой оболочки и других тканей переднего отдела органа зрения [9,10]. Особый интерес в последнее время представляют тиоловые препараты: Витаиодурол (основным действующим веществом препарата является глутатион) и ацетилцистеин.

Ацетилцистеин – производное аминокислоты цистеина. Ацетилцистеин препятствует окислительному повреждению тканей и оказывает антиоксидантное действие. В литературе ацетилцистеин рассматривается как одно из самых распространенных и универсальных антиоксидантных средств.

Использование указанных препаратов при экспериментальном керато-конъюнктивите позволило нам в значительной степени добиться коррекции метаболических нарушений в роговой оболочке.

**Цель** данной работы изучить влияние тиоловых препаратов на степень воспалительного процесса в роговице при керато-конъюнктивитах в эксперименте и условиях клиники.

#### **Материал и методы исследования**

Для проведения эксперимента использовали кроликов весом 2,2 – 2,7 кг. Работа с животными проводилась с учетом требований Международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с экспериментальными животными, которые были предложены на Совете международных медицинских организаций (1985 г.) "О мерах по дальнейшему совершенствованию форм работы с использованием экспериментальных животных".

С целью моделирования конъюнктивита экспериментальным животным вводили раствор липополисахарида из *Escherichia coli* – K235 путем единичной субконъюнктивальной инъекции (10 мкл)

при концентрации эндотоксина 200 нг/мкл в верхний отдел бульбарной конъюнктивы. Экспериментальный кератит у животных вызывали интрастромальной инъекцией 50 мкл 0,2% эндотоксин липополисахарида на фосфатном буфере [22].

Опытная группа животных получала инстилляцию 0,1% раствора ацетилцистеина и 5-ти кратные инстилляцию Витаиодурола, производитель: НОВАРГИС ФАРМА С.А.С. Он содержит: в 100 мл изотонического раствора натрия хлорида: цистеина 0,03 г, аденозинтрифосфата 0,0027 г, кислоты никотиновой 0,03 г, глутатиона 0,006 г, тиамина хлорида, кальция хлорида и магния хлорида по 0,3 г, кальция йодида 1,5 г. Группа сравнения получала традиционную терапию.

Оценка состояния роговичной оболочки проводилась с помощью Draize-критерия (степень помутнения роговицы, степень отека роговицы, степень инфильтрации роговицы, флуоресцеиновый тест - площадь окрашивания поверхности роговицы флуоресцеином) [17].

Признаки оценивались в баллах по следующей условной шкале.

Отделяемое в конъюнктивальной полости: 0 – отсутствует; 1 – слизистое скудное; 2 – слизистое обильное; 3 – слизистое гнойное.

Степень гиперемии конъюнктивы: 0 – бледно-розовая, соответствующая физиологической норме; 1 – слабая гиперемия конъюнктивы глазного яблока; 2 – умеренно-выраженная гиперемия конъюнктивы глазного яблока; 3 – выраженная гиперемия конъюнктивы глазного яблока.

Отек роговицы: 0 – отек роговицы отсутствует, роговица прозрачная на всем протяжении; 1 – локальный отек эпителия роговицы в зоне воспаления; 2 – локальный отек эпителия с переходом на поверхностные слои стромы; 3 – локальный отек в поверхностных и средних слоях стромы.

Воспалительная инфильтрация: 0 – инфильтрация отсутствует; 1 – точечные единичные (не более трех) субэпителиальные инфильтраты; 2 – точечные множественные (более трех) субэпителиальные инфильтраты; 3 – множественные субэпителиальные инфильтраты размером более 1 мм; 4 – локальная инфильтрация в поверхностных и средних слоях стромы.

Флуоресцеиновый тест: 0 – отсутствует; 1 – точечное окрашивание роговицы; 2 – площадь окрашивания < 3 мм<sup>2</sup>; 3 – площадь окрашивания > 3 мм<sup>2</sup>.

Помутнение роговицы: 0 – отсутствует; 1 – есть.

Локализация воспалительного очага в роговице: 1 - центральная; 2 - парацентральная.

*Методы клинических исследований.* Больные были разделены на 2 группы: 1 группа — группа сравнения, пациенты с кератоконъюнктивитами, которые получали традиционную терапию (45 больных), 2 группа — основная, пациенты с кератоконъюнктивитами, которые получали тиоловые препараты (50 больных).

Выраженность воспалительной реакции в процессе лечения оценивали по объективным показателям (отека роговицы, степени воспалительной инфильтрации поверхностных слоев роговицы, площади окрашивания поверхности роговицы флюоресцеином).

Признаки оценивались по условной шкале.

Отек роговицы: 0 - отек роговицы отсутствует, роговица прозрачная на всем протяжении; 1 - локальный отек эпителия роговицы в зоне воспаления; 2 - локальный отек эпителия с переходом на поверхностные слои стромы; 3 - локальный отек в поверхностных и средних слоях стромы.

Воспалительная инфильтрация: 0 - инфильтрация отсутствует; 1 - точечные единичные (не более трех) субэпителиальные инфильтраты; 2 - точечные множественные (более трех) субэпителиальные инфильтраты; 3 - множественные субэпителиальные инфильтраты размером более 1 мм; 4 - локальная инфильтрация в поверхностных и средних слоях стромы.

Площадь окрашивания поверхности роговицы флюоресцеином: 0 - отсутствует; 1 - точечное окрашивание роговицы; 2 - площадь окрашивания < 3 мм<sup>2</sup>; 3 - площадь окрашивания > 3 мм<sup>2</sup>.

В слезной жидкости больных производили определение активности окислительно-восстановительных ферментов лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и глутатионпероксидазы [6,8,13].

Активность окислительно-восстановительных ферментов лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и глутатионпероксидазы определяли в слезе с помощью методов спектрофотометрии с использованием оптического теста Варбурга — изменение оптической плотности окисленных и восстановленных пиридин-нуклеотидов.

Определение активности лактатдегидрогеназы произведено по методу, основанном на оценке скорости ферментативного окисления

восстановленного никотинамидадениндинуклеотида при образовании лактата из пирувата, которая регистрировалась спектрофотометрически по уменьшению оптической плотности исследуемого раствора при длине волны 340 нм. Коэффициент вариации — 4,8% [16].

Определение активности малатдегидрогеназы проводили с использованием оптического теста Варбурга. Принцип расчета идентичен использованному при определении активности ЛДГ. Коэффициент вариации — 4,0%.

Принцип метода определения активности глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы основан на изменении скорости восстановления никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ) в инкубационной среде при насыщающих концентрациях субстратов, кофакторов и оптимальном значении pH. Коэффициент вариации — 4,6%.

Методика определения глутатионпероксидазы. Активность глутатионпероксидазы определяли спектрофотометрически по скорости образования окисленного глутатиона с помощью сопряженной реакции с НАДФН-зависимым ферментом глутатионредуктазой, регистрируя изменение оптической плотности при окислении НАДФН. Коэффициент вариации 1,8%. Активность фермента выражали в нкат/мг белка и в нкат/мл исследуемой жидкости.

Данные обрабатывались с помощью соответствующих методов статистического анализа [11].

#### **Полученные результаты и их обсуждение**

*Результаты экспериментальных исследований.* Изучая данные о влиянии тиоловых препаратов на выраженность клинических показателей при воспалительном процессе в конъюнктиве при кератите можно отметить следующее.

Как видно из представленных данных, у животных с кератитом и конъюнктивитом при применении тиоловых препаратов в 1 срок наблюдения отек роговицы был снижен до 69% по сравнению с группой животных с кератитом конъюнктивитом, не получавших изучаемые препараты, во 2 срок — до 54%, в 3 срок — до 67%.

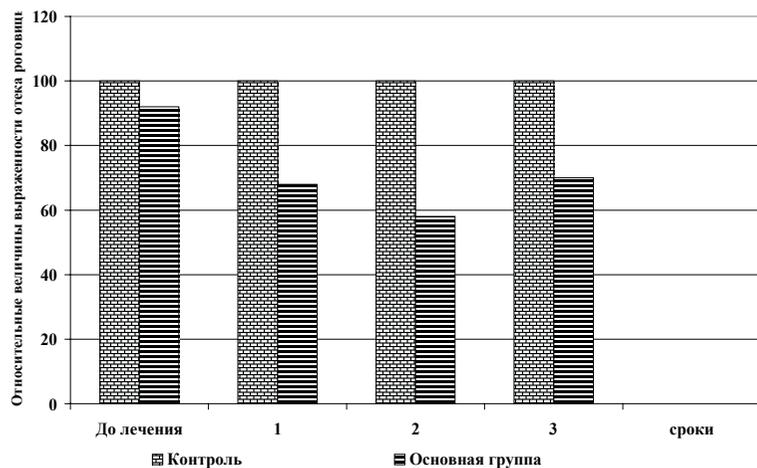
Изучая полученные данные о степени воспалительной инфильтрации роговицы у животных с кератитом и конъюнктивитом при применении тиоловых препаратов, можно отметить, что в 1 срок эксперимента, наблюдаемый клинический признак был снижен до 78% по сравнению с животными с кератитом и конъюнктивитом, не получавших препараты, во 2 срок — до 55%, в 3 срок — до 74%.

Показатели флуоресцеинового теста у животных с кератитом и конъюнктивитом при применении тиоловых препаратов в 1 срок наблюдения были снижены до 90% по сравнению с группой животных с кератитом и конъюнктивитом без применения указанных препаратов, во 2 срок — до 65%, в 3 срок — до 78%.

Таким образом, представленные экспериментальные данные показали, что применение тиоловых препаратов приводит к более выраженному терапевтическому эффекту, что выражалось в достоверном снижении клинических показателей: отека роговицы, степени воспалительной инфильтрации роговицы и показателей флуоресцеинового теста.

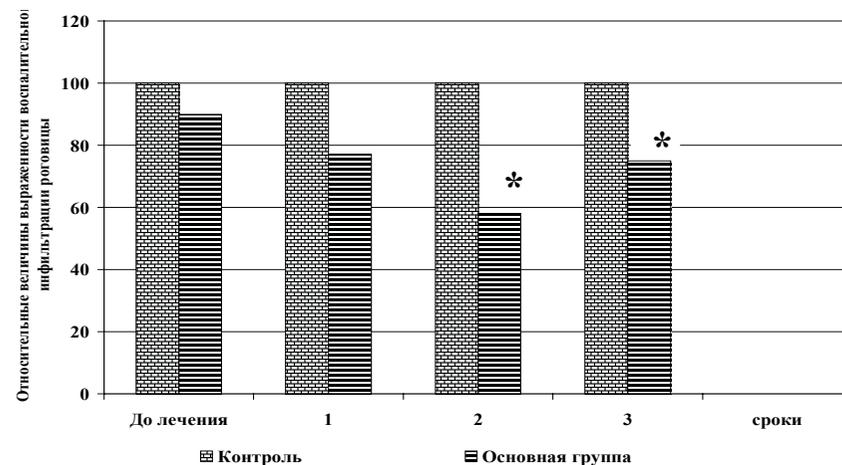
*Результаты клинических исследований.*

Данные о влиянии тиоловых препаратов на выраженность клинических признаков у больных при кератоконъюнктивите представлены на диаграммах (рис. 1-4).

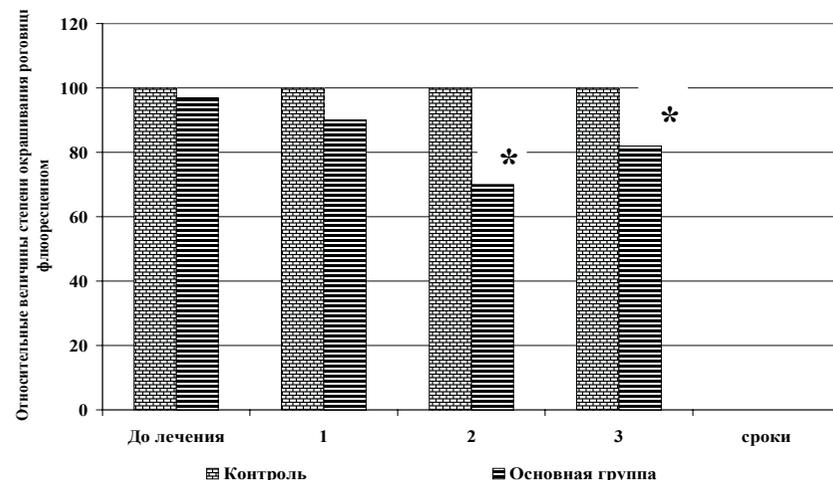


**Рис. 1.** Относительное влияние тиоловых препаратов на выраженность отека роговицы у больных при кератоконъюнктивите (на рис. 1-4 \* - уровень значимости различия данных основной группы по отношению к контрольной группе при  $p < 0,05$ ).

У больных кератоконъюнктивитом до лечения выраженность отека роговицы составила 92% по сравнению с контролем. В 1 срок наблюдения, изучаемый клинический признак у больных с кератоконъюнктивитом и применением тиоловых препаратов был снижен на 32%, во 2 срок — на 42%, в 3 срок — на 30%.



**Рис. 2.** Относительное влияние тиоловых препаратов на выраженность воспалительной инфильтрации роговицы у больных при кератоконъюнктивите.



**Рис. 3.** Относительное влияние тиоловых препаратов на выраженность степени окрашивания роговицы флуоресцеином у больных при кератоконъюнктивите.

Степень воспалительной инфильтрации роговицы у больных при кератоконъюнктивите до лечения составила 90% по отношению к контрольным данным. При применении тиоловых препара-

тов, у больных керато-конъюнктивитами в 1 срок наблюдения показатели воспалительной инфильтрации роговицы была снижена на 23%, во 2 срок — на 42%, в 3 срок — на 25%.

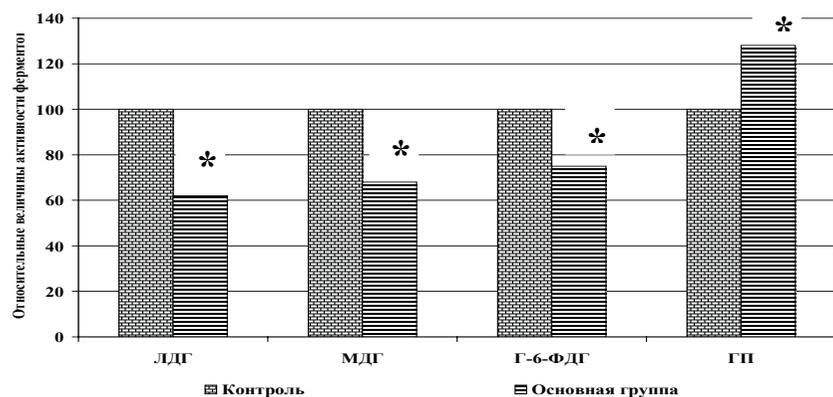


Рис. 4. Относительное влияние тиоловых препаратов на активность ферментов слезной жидкости у больных керато-конъюнктивитом основной группы по отношению к контрольной группе после лечения.

Выраженность степени окрашивания роговицы флюоресцеином у больных при керато-конъюнктивите до лечения составила — 97%. В этих же условиях при применении тиоловых препаратов, степень окрашивания роговицы флюоресцеином у больных при керато-конъюнктивите в 1 срок наблюдения была снижена на 10%, во 2 срок — на 20%, в 3 срок — на 18%.

Активность лактатдегидрогеназы в слезе больных при керато-конъюнктивите и применении тиоловых препаратов составила — 62% по сравнению с контролем. Активность малатдегидрогеназы в слезной жидкости больных при керато-конъюнктивите и применении тиоловых препаратов составила — 68% по сравнению с контролем. У больных при керато-конъюнктивите и применении тиоловых препаратов активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в слезе составила — 75% по сравнению с контролем. Активность глутатионпероксидазы в слезной жидкости больных при керато-конъюнктивите и применении тиоловых препаратов составила — 128% по сравнению с контролем.

Таким образом у больных керато-конъюнктивитами, применение тиоловых препаратов снижало активность лактатдегидрогеназы на 38%, активность малатдегидрогеназы — на 32%, уровень глюко-

зо-6-фосфатдегидрогеназы — на 25%. В слезе больных керато-конъюнктивитами активность глутатионпероксидазы при применении тиоловых препаратов повысилась на 28% по сравнению с больными, получавшими традиционную терапию.

Данные клинических исследований свидетельствуют о благоприятном влиянии включения тиоловых препаратов в традиционное лечение. Это выражалось в более значительном противовоспалительном эффекте (на отек роговицы, воспалительную инфильтрацию роговицы, степень окрашивания роговицы флюоресцеином), а также способствовало большей стабилизации роговичного эпителия, что выражалось в достоверном снижении активности маркерных ферментов в слезной жидкости.

#### Выводы

1. В условиях экспериментального кератоконъюнктивита, применение тиоловых препаратов способствует отчетливому снижению степени воспалительного процесса в роговой оболочке, по сравнению с экспериментами без тиоловых препаратов.

2. Включение в комплексное лечение тиоловых препаратов, значительно уменьшает выраженность клинических симптомов кератита и позволяет купировать патологический процесс в роговице в более короткие сроки.

3. В слезной жидкости у больных кератоконъюнктивитом под влиянием тиоловых препаратов отмечалась более высокая степень нормализации биохимических показателей, что свидетельствует о снижении процессов деструкции роговичного эпителия и повышении скорости обезвреживания липопероксидов.

#### Литература

1. Анина Е.И. Распространенность заболеваний роговой оболочки глаза у населения Украины / Е.И. Анина // Тези доп. II Міжнародної наук. конф. офтальмологів Причорномор'я. — Одеса, 2004. — С. 14.
2. Волков О.А. Современное представление слезной жидкости, значение ее в диагностике / О.А. Волков, Л.К. Моштова // Рус. мед. журн. — 2004. — Т. 5, № 4. — С. 138-140.
3. Дрожжина Г.И. Вирусные заболевания роговицы и конъюнктивы / Г.И. Дрожжина // Здоров'я України. — № 5. — 2002. — С. 35-36.
4. Дрожжина Г.И. Состояние протеиназно-ингибиторной системы и стабильности лизосом при решетчатой дистрофии роговицы, осложненной воспалительным процессом / Г.И. Дрожжина, Н.Ф. Леус, С.Г. Коломийчук // Офтальмол. журн. — 2003. — № 1. — С. 29-34.

5. Каменская Е.В. Эффективность медикаментозной коррекции нарушенного тиолового статуса при поверхностных формах герпетического кератита: автореф. дис. канд. мед. наук: спец. 14.01.18 «Офтальмология» / Е.В. Каменская. - Одесса, 2008. - 20 с.

6. Новые методы биохимического анализа. - Л.: изд-во Ленинградского универ., 1991. - 395 с.

7. Осташевский В. Л. Лечебное действие ингибиторов протеаз при гнойном язвенном кератите: автореф. дис. канд. мед. наук: спец. 14.01.18 «Офтальмология» / В.Л. Осташевский. - Одесса, 1983. - 23 с.

8. Петрович Ю.А. Дегидрогеназы в эпителии и строме роговицы при тяжелом герпетическом кератите / Ю.А. Петрович, Н.Г. Гольдфельд, Н.А. Терехина // Офтальмол. журн. - 1998. - № 1. - С. 52-54.

9. Петруня А.М. Изучение обменных процессов в роговице при экспериментальном кератите и конъюнктивите / А.М. Петруня Мухамед Абдульрахман Кутайни // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології: зб.наук.пр. - Київ; Луганськ, 2012. - Вип. 3 (111). - С. 205-221.

10. Петруня А.М. Исследование тиолового обмена и окислительно-восстановительных процессов в роговице при экспериментальном конъюнктивите / А.М. Петруня, Мухамед Абдульрахман Кутайни // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології: зб.наук.пр. - Київ; Луганськ, 2012. - Вип. 1 (109). - С. 259-272.

11. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. - М.: Медиа Сфера, 2002. - 312 с.

12. Abu el-Asrar A. M. Immunopathogenesis of vernal keratoconjunctivitis / A.M. Abu el-Asrar, K. Geboes, K.F. Tabbara // Bull. Soc. Belge Ophthalmol. - 1996. - Vol. 261. - P. 15-24.

13. Bergmeyer H.U. Methoden der enzymatischen analyse / Herausgegeben von H. U. Bergmeyer. - Berlin, 1986. - S. 2198-2203.

14. Bourcier T. Bacterial keratitis: predisposing factors, clinical and microbiological review of 300 cases / T. Bourcier, F.Thomas, V. Borderie // Br. J. Ophthalmol. - 2003. - Vol. 87. - P. 834-838.

15. Friend J. Biochemistry of the cornea / J. Friend, J. R. Hassell // The Cornea / eds. H.E. Kaufman, B.A. Barron, H.B. McDonalds. - New York: Churchill Livingstone, 1998. - P. 47-67.

16. Kahan I.L. Lactate dehydrogenase of tears and corneal epithelium / I.L. Kahan, E. Ottovay // Exp. Eye Res. - 1975. - Vol. 20. - P. 129-133.

17. Liang H. LPS-stimulated inflammation and apoptosis in corneal injury models / H. Liang, F. Brignole-Baudouin, A. Labbe // Mol. Vis. - 2007. - Vol. 13. - P. 1169-1180.

18. Limberg M.B. A review of bacterial keratitis and bacterial conjunctivitis / M.B. Limberg // Am J Ophthalmol. - 1991. - Vol. 112, Suppl.4. - P. 2S-9S.

19. Norn M.S. Peroperative protection of cornea and conjunctiva / M.S. Norn // Acta Ophthalmol. - 1981. - Vol. 59. - P. 587-594.

20. Reim M. Enzyme activities in the cornea epithelium and endothelium of different species / M. Reim, U. Hennighausen, D. Hildebrandt, R. Maier // Ophthalm. Res. - 1971. - Vol. 2. - P. 171-182.

21. Saika S. Epithelial repair. Roles of extracellular matrix / S. Saika, Y. Ohnishi // Cornea. - 2002. - Vol. 21. - P. S23-S29.

22. Trinkaus-Randall V. Quantification of stromal destruction in the inflamed cornea / V. Trinkaus-Randall, H.M. Leibowitz, W.J. Ryan // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. - 1991. - Vol. 32, № 3. - P. 603-609.

23. Wilson S.E. Stromal-epithelial interactions in the cornea / S.E. Wilson, J.J. Liu, R.R. Mohan // Prog. Retin Eye Res. - 1999. - Vol. 18. - P. 293-309.

#### Резюме

**Петруня А.М., Мухамед Абдульрахман Кутайні.** Вплив тиолових препаратів на ступінь запального процесу в роговиці при керато-кон'юнктивіті.

Досліджували вплив тиолових препаратів на клінічні ознаки запалення рогівки при керато-кон'юнктивіті і активність ферментів слізної рідини. Виявлено в експерименті та клініці, що застосування тиолових препаратів підвищує протизапальний ефект лікування і сприяє більшій стабілізації рогівкового епітелію.

**Ключові слова:** кератит, кон'юнктивіт, тиолові препарати.

#### Резюме

**Петруня А.М., Мухамед Абдульрахман Кутайни.** Влияние тиоловых препаратов на степень воспалительного процесса в роговице при керато-конъюнктивите.

Исследовали влияние тиоловых препаратов на клинические признаки воспаления роговицы при керато-конъюнктивите и активность ферментов слезной жидкости. Выведено в эксперименте и клинике, что применение тиоловых препаратов повышает протиговоспалительный эффект лечения и способствует большей стабилизации роговичного эпителия.

**Ключевые слова:** кератит, конъюнктивит, тиоловые препараты.

#### Summary

**Petrunya A. M., Muhamed Abdulrahman Kutayni.** Effect of thiol drugs on the degree of inflammation in the cornea with kerato-conjunctivitis.

Examined the effect of thiol drugs on clinical signs of inflammation of the cornea kerato-conjunctivitis and enzyme activity of tear fluid. Found in experiment and clinic that use thiol drugs increases anti-inflammatory effects of treatment and promotes greater stabilization of the corneal epithelium.

**Key words:** keratitis, conjunctivitis, thiol drugs.

*Рецензент: д.мед.н., проф. Г.Д. Жабосдов*