

Коллагенолитическая активность конъюнктивальной жидкости у здоровых людей и больных с асептической язвой роговицы различной этиологии

И.В. Бржеская^{1,2}, Е.Е. Сомов^{1,3}

¹ ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России, Санкт-Петербург

² СПб ГБУЗ «Городская Мариинская больница», Санкт-Петербург

³ ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздрава России, Санкт-Петербургский филиал

РЕЗЮМЕ

Развитие и прогрессирование асептической язвы роговицы во многом определяются активностью протеолитических ферментов в строме роговицы, а поскольку ее отражает коллагенолитическая активность конъюнктивальной жидкости, то оценка данного параметра представляет большой практический и научный интерес.

Цель исследования: изучить протеолитическую активность конъюнктивальной жидкости у больных с асептической язвой роговицы различной этиологии.

Материал и методы: исследована конъюнктивальная жидкость у здоровых и больных с язвой роговицы (31 человек), разделенных на 3 группы. В 1-ю (16 человек) вошли пациенты с системными заболеваниями: с синдромами Сьегрена, Стивенса — Джонсона и розацеа, во 2-ю (10 человек) — с перенесенным герпетическим кератитом, в 3-ю (5 человек) — с паралитическим лагофталмом после удаления шванномы мостомозжечкового угла ствола головного мозга.

Интегральную оценку коллагенолитической активности конъюнктивальной жидкости проводили путем оценки скорости высыхания ее смеси с гелем коллагена в соотношении 1:1, напрямую зависящей от активности содержащихся в ней протеолитических ферментов.

Результаты исследования: определены границы нормы ($M \pm 2m$) коллагенолитической активности конъюнктивальной жидкости у здоровых людей — 176–212 КЕ/мл. Наиболее выраженной активностью характеризовалась конъюнктивальная жидкость у пациентов с системными заболеваниями: максимальной она оказалась у больных с синдромом Сьегрена — $852,3 \pm 22,7$ КЕ/мл (в 4,4 раза выше нормы) и незначительно ниже ($815,7 \pm 21,9$ КЕ/мл) — у пациентов с синдромом Стивенса — Джонсона. Существенно более низкой она оказалась при паралитическом лагофтальме ($482,4 \pm 21,4$ КЕ/мл), однако в 2,5 раза выше нормальных границ ($p < 0,001$).

Заключение: коллагенолитическая активность конъюнктивальной жидкости у больных с асептической язвой роговицы в среднем на 150–340% выше, чем у здоровых, и зависит от глубины и этиологии язвы. Наиболее высока она у больных с синдромами Сьегрена и Стивенса — Джонсона.

Целесообразны исследования по разработке способов снижения коллагенолитической агрессивности у больных с патологией роговицы, сопровождающейся выраженным лизисным процессом.

Ключевые слова: слезная жидкость, активность протеолитических ферментов, синдром «сухого глаза», синдром Сьегрена, асептическая язва роговицы, диагностика прогрессирования.

Для цитирования: Бржеская И.В., Сомов Е.Е. Коллагенолитическая активность конъюнктивальной жидкости у здоровых людей и больных с асептической язвой роговицы различной этиологии. РМЖ «Клиническая офтальмология». 2018;2:77–80.

ABSTRACT

Collagenolytic activity of conjunctival fluid in healthy people and patients with aseptic ulcer of the cornea of various etiologies Brzheskaya I.V.^{1,2}, Somov E.E.^{1,3}

¹ St. Petersburg State Pediatric Medical University

² St. Petersburg City Mariinsky Hospital

³ S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, St. Petersburg brunch

The development and progression of an aseptic corneal ulcer is largely determined by the activity of proteolytic enzymes in the corneal stroma. And since it reflects the collagenolytic activity of the conjunctival fluid, its evaluation is of great practical and scientific interest.

Aim: to study the proteolytic activity of the conjunctival fluid in patients with aseptic ulcer of the cornea of various etiologies.

Patients and Methods: conjunctival fluid of healthy people and patients with corneal ulcer (31 persons, 37 eyes), divided into 3 groups, was studied. Group 1 included patients (16) with systemic diseases: with Sjögren, Stevens-Johnson syndromes and

rosacea; group 2 — patients (10) after herpetic keratitis; group 3 — patients (5) with a paralytic lagophthalmos after removal of cerebellopontile angle schwannoma.

An integral evaluation of the collagenolytic activity of the conjunctival fluid was made by estimating the drying rate of its mixture with collagen gel in a ratio of 1:1, directly dependent on the activity of the proteolytic enzymes contained in it.

Results: the norm limits ($M \pm 2m$) of the collagenolytic activity of the conjunctival fluid of healthy people were determined: 176KE/ml — 212KE/ml. The most pronounced activity was characterized by a conjunctival fluid of patients with systemic diseases: it was the highest in patients with Sjögren syndrome — 852.3 ± 22.7 KE/ml (4.4 times higher than normal) and slightly lower (815.7 ± 21.9 KE/ml) in patients with Stevens-Johnson syndrome. It was significantly lower in paralytic lagophthalmos (482.4 ± 21.4 KE/ml), but 2.5 times higher than normal limits ($p < 0.001$).

Conclusion: the collagenolytic activity of the conjunctival fluid of patients with corneal aseptic ulcers is on average 150–340% higher than in healthy individuals and depends on the depth and etiology of the ulcer. It is the highest in patients with Sjögren and Stevens-Johnson syndromes.

Studies are worthwhile to develop ways to reduce collagenolytic aggressiveness in patients with corneal pathology accompanied by a pronounced lysis process.

Key words: lacrimal fluid, activity of proteolytic enzymes, dry eye syndrome, Sjogren's syndrome, corneal aseptic ulcer, diagnosis of progression.

For citation: Brzheskaya I.V., Somov E.E. Collagenolytic activity of conjunctival fluid in healthy people and patients with aseptic ulcer of the cornea of various etiologies. *RMJ "Clinical ophthalmology"*. 2018;2:77–80.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Язвы роговицы различного генеза (септические и асептические) отличаются особой тяжестью клинического течения и часто неблагоприятными исходами, поэтому все сведения, касающиеся их патогенеза, представляют большой практический интерес [1–4]. В первую очередь это касается механизма развития язвенного дефекта. Его запуску способствуют процессы, приводящие к глубоким нарушениям трофики роговицы и ее тактильной чувствительности [5, 6]. На этом фоне, в свою очередь, нарушается нормальный баланс между активностью протеолитических ферментов, в частности, матричных металлопротеаз (ММП), и их тканевыми ингибиторами, которые секретируются клетками стромы роговицы [7–11]. Лизис ее структур начинает развиваться тогда, когда упомянутый выше баланс сдвигается в сторону избыточной активности ММП [4, 12–14]. При этом активность коллагенолитических ферментов закономерно характеризует выраженность процессов деструкции роговичной ткани [15]. С учетом же того, что активность биохимических процессов, протекающих в роговице, во многом отражают соответствующие биохимические изменения слезной (конъюнктивальной) жидкости [1, 14], все большее внимание офтальмологов привлекают лабораторные исследования именно этого биологического материала [16]. В силу указанных обстоятельств оценка коллагенолитической активности конъюнктивальной жидкости у больных с язвой роговицы представляет большой практический и научный интерес.

Цель исследования: изучить протеолитическую активность конъюнктивальной жидкости у больных с асептической язвой роговицы различной этиологии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследованию подлежал биологический материал, взятый у здоровых людей и больных с язвой роговицы различного генеза (31 человек, 37 глаз), поступивших на лечение в офтальмологическое отделение Санкт-Петербургской городской Мариинской больницы. В соответствии с этиологией возникшего патологического процесса все обследованные больные были разделены на 3 группы. В 1-ю (16 человек, 22 глаза) вошли пациенты с системными заболеваниями — синдромом Сьегрена, Стивенса — Джонсона и розацеа, во 2-ю — с перенесенным ранее герпетическим кератитом (10 человек, 10 глаз),

в 3-ю — с паралитическим лагофталмом, возникшим после хирургического удаления шванномы мостомозжечкового угла ствола головного мозга (5 человек, 5 глаз).

Интегральную оценку коллагенолитической активности конъюнктивальной жидкости проводили по способу, разработанному С.Г. Журовой, В.В. Бржеским и И.В. Калининой (патент № 2419095 от 20.05.2011) [13]. В его основе лежит оценка скорости высыхания смеси, состоящей из жидкости, взятой из конъюнктивальной полости здорового или больного глаза, и геля коллагена в соотношении 1:1. Она напрямую зависит от количества и активности содержащихся в ней протеолитических ферментов.

В указанных целях нами (совместно с С.Г. Журовой) выполнены 9 тестовых проб, результаты которых были необходимы для построения калибровочной системы. Для каждой из них готовили смесь, состоящую из 0,1 мл геля коллагена и 0,1 мл раствора коллагеназы, но обладающего заданной степенью активности — в 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 и 900 KE/мл (KE — коллагеназные единицы).

Готовую смесь выдерживали при комнатной температуре (+ 20–22° С) в течение 3 мин до полного смешивания ее компонентов. Далее 0,05 мл смеси с помощью микропипетки наносили на предварительно обезжиренное предметное стекло и с помощью покровного стеклышка распределяли тонким слоем по его поверхности. Затем включали секундомер и определяли время полного высыхания этой жидкостной смеси. Исследование повторяли трижды, вычисляя средний результат.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты представлены в таблице 1. Приведенные в ней данные показывают, что по мере ступенчатого роста в тестовой пробе ферментативной активности раствора коллагеназы также ступенчато, но только в сторону снижения изменяется и время ее высыхания. Разница в крайних значениях этих показателей колеблется в пределах от 49,2% до 51,3%.

На основании полученных с тестовыми пробами раствора коллагеназы данных о соотношении времени высыхания смеси в зависимости от ее коллагенолитической активности нами построена номограмма, позволяющая пересчитывать время высыхания (в секундах) в коллагенолитическую активность (в KE/мл) исследуемой смеси (рис. 1).

Таблица 1. Динамика функциональных показателей
Table 1. Dynamics of functional parameters

Ферментативная активность раствора коллагеназы (КЕ/мл) Enzymatic activity of collagenase solution (CU/ml)	Время высыхания смеси геля коллагена и раствора коллагеназы (с) The drying time of a mixture of collagen gel and collagenase solution (s)
100	263,3±20,2
200	220,6±16,5
300	208,2±18,2
400	194,5±15,7
500	187,4±15,0
600	175,2±14,8
700	160,4±13,5
800	143,2±18,4
900	132,5±12,8

На следующем этапе работы с помощью описанной выше методики был исследован биологический материал, взятый от здоровых людей и больных с язвой роговицы различного генеза. У здоровых людей проведено 45 проб, у больных — 125, причем у каждого пациента конъюнктивальную жидкость исследовали не менее 2 раз.

При этом время высыхания каждой пробы смеси геля коллагена с исследуемой конъюнктивальной жидкостью



Рис. 1. Взаимозависимость времени высыхания исследуемой жидкости и ее коллагенолитической активности

Fig. 1. Interdependence of the drying time of the liquid and its collagenolytic activity

с помощью представленной номограммы пересчитывали уже в коллагенолитическую активность конъюнктивальной жидкости пациента (в КЕ/мл).

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что зона нормы, определенная нами по формуле ($M \pm 2m$) коллагенолитической активности конъюнктивальной жидкости, ограничена, как и положено, двумя показателями — меньшим и большим. В данном случае они равны, соответственно, 176 КЕ/мл ($M - 2m$) и 212 КЕ/мл ($M + 2m$).

Таблица 2. Показатели коллагенолитической активности конъюнктивальной жидкости в зависимости от этиологии и глубины язвы роговицы

Table 2. Parameters of collagenolytic activity of conjunctival fluid, depending on the etiology and depth of the corneal ulcer

Базовая патология пациентов Basic pathology of patients	Глубина стромального дефекта роговицы Depth of stromal corneal defect						Время высыхания смеси коллагена и конъюнктивальной жидкости (с) Time of drying of the mixture of collagen and conjunctival fluid (s)	Средний показатель коллагенолитической активности конъюнктивальной жидкости (КЕ/мл) The average index of collagenolytic activity of conjunctival fluid (CU/ml)	Степень коллагенолитической агрессивности конъюнктивальной жидкости The degree of collagenolytic aggressiveness of the conjunctival fluid
	До десцеметовой пластинки To descemet plate		С образованием десцеметоцеле With the formation of descemetocele		С перфорацией оболочки With Descemet's shell perforations				
	n	%	n	%	n	%			
1. Системного характера: 1. System character:									
— синдром Сьегрена — Sjogren's syndrome	—	—	6	27,3	11	50,0	138,3±12,7	852,3±22,7	III
— синдром Стивенса – Джонсона — Stevens – Johnson syndrome	—	—	—	—	2	9,1	141,5±13,5	815,7±21,9	
— розацеа — rosacea	—	—	1	4,5	2	9,1	170,4±15,2	634,1±17,2	
2. Связанные с патологией роговицы: 2. Correlated with the pathology of the cornea:									II
— постгерпетическая кератопатия — postherpetic keratopathy	3	30,0	3	30,0	4	40,0	177,7±12,1	583,5±21,7	
3. Связанные с патологией век: 3. Correlated with the pathology of the eyelids:									I
— паралитический лагофтальм после хирургического удаления шванномы — paralytic lagophthalmos after surgical removal of schwannoma	5	100	—	—	—	—	188,4±15,1	482,4±21,4	
Здоровые люди Healthy people	—	—	—	—	—	—	227,3±19,2	194,0±18,0	0

n – количество глаз n – number of eyes

Наиболее выраженной коллагенолитической активностью характеризовалась конъюнктивальная жидкость у пациентов с системными заболеваниями организма (табл. 2).

При этом самой высокой она оказалась у больных с синдромом Сьегрена — $852,3 \pm 22,7$ КЕ/мл (в 4,4 раза выше, чем у здоровых людей) и лишь незначительно ниже ($815,7 \pm 21,9$ КЕ/мл) — с синдромом Стивенса — Джонсона (разница в показателях статистически недостоверна).

Намного более низким учетный показатель оказался у лиц с паралимпическим лагофтальмом ($482,4 \pm 21,4$ КЕ/мл). Однако и он в 2,5 раза превышал показатели у здоровых людей (различия статистически значимо, $p < 0,001$). При этом достоверные различия в рассматриваемом отношении обнаружены между группами больных с постгерпетической кератопатией и розацеа: $583,5 \pm 21,7$ КЕ/мл и $634,1 \pm 17,2$ КЕ/мл соответственно ($p < 0,05$).

Учитывая заметный статистический разброс показателей коллагенолитической активности конъюнктивальной жидкости у больных с язвами роговицы, различными по этиологии и, отчасти, по глубине, мы сочли полезным классифицировать ее выраженность тремя степенями, а именно: I степень — коллагенолитическая активность исследованной среды в пределах 301–500 КЕ/мл, II степень — 501–700 КЕ/мл, III степень — 701 КЕ/мл и выше (табл. 2). Таким образом, I степень коллагенолитической активности выявлена у 5 больных на 5 глазах с паралимпическим лагофтальмом после хирургического удаления шванномы и язвенным дефектом, достигшим десцеметовой оболочки. II степень коллагенолитической активности отмечена на 3 глазах с розацеа и 10 глазах с постгерпетической кератопатией, причем с перфорацией роговицы — на 2 и 4 глазах соответственно. И, наконец, самая высокая — III степень выраженности литического процесса выявлена у больных с синдромами Сьегрена (17 глаз) и Стивенса — Джонсона (2 глаза), с признаками перфорации роговицы на 11 и 2 глазах соответственно.

В целом все приведенные выше данные позволяют сделать следующие выводы:

- ♦ Коллагенолитическая активность конъюнктивальной жидкости глаз у больных с асептической язвой роговицы в среднем на 150–340% выше, чем у здоровых людей.

- ♦ Степень выраженности коллагенолитической агрессивности конъюнктивальной жидкости глаз у больных зависит от глубины развившейся язвы роговицы и ее этиологии. Наиболее высока она у больных с синдромной патологией (Сьегрена и Стивенса — Джонсона).

- ♦ Использованный в работе способ определения коллагенолитической активности конъюнктивальной жидкости отличается технической простотой и может применяться как для оценки степени выраженности развившегося в роговице патологического процесса, так и для прогностических целей.

- ♦ Предполагается выполнение исследований по разработке эффективных способов снижения коллагенолитической агрессивности конъюнктивальной жидкости у больных с роговичной патологией, сопровождающейся выраженным лизисным процессом.

Литература/References

1. Бржеский В.В., Егоров Г.Б., Егоров Е.А. Синдром «сухого глаза» и заболевания глазной поверхности: клиника, диагностика, лечение. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016 [Brzheskiy V.V., Egorov G.B., Egorov E.A. Dry Eye Syndrome and Ocular Surface Diseases: Clinic, Diagnosis, Treatment. M.: GEOTAR-Media, 2016 (in Russ.)].
2. Brjeskiy V.V., Maychuk Y.F., Petrayevsky A.V., Nagorsky P.G. Use of preservative-free hyaluronic acid (Hylabak®) for a range of patients with dry eye syndrome: experience in Russia. *Clinical Ophthalmology*. 2014;8:1169–1177.
3. Бржеский В.В., Голубев С.Ю. Возможности применения гидроксипропилгуара в слезозаместительной терапии. *Вестник офтальмологии*. 2017;133(1):88–96 [Brzheskiy V.V., Golubev S. Yu. Potential for use of hydroxypropyl guar in tear substitute therapy. *Ophthalmol. Bull.* 2017; 133(1):88–96 (in Russ.)].
4. Бржеский В.В., Журова С.Г., Ефимова Е.Л., Калинина И.В. Способ хирургического лечения язвы роговицы кератической этиологии: Патент Российской Федерации № 2373908 от 2009 г. по заявке на изобретение № 2008134574 от 19.08.2008 [Brzheskiy V.V., Zhurova S.G., Efimova E.L., Kalinina I.V. Method of surgical treatment of corneal ulcer of a xerotic etiology: Patent of the Russian Federation № 2373908(2009) (in Russ.)].
5. Baradaran-Rafii A., Eslani M., Haq Z. et al. Current and upcoming therapies for ocular surface chemical injuries. *Ocular Surface*. 2017;15(1):48–64.
6. Ma J.J.K., Dohlman C.H. Mechanisms of corneal ulceration. *Ophthalmol. Clin. N. Am.* 2002;15:27–33.
7. Клишо Е.В., Кондакова И.В., Чойнозов Е.Л. Матриксные металлопротеазы в онкогенезе. *Сибирский онкологический журнал*. 2003;2:62–70 [Klisho E.V., Kondakova I.V., Chojnozov E.L. Matrix metalloproteases in oncogenesis. *Siberian J. Oncology*. 2003;2:62–70 (in Russ.)].
8. Рыжакова О.С., Гуреева Т.А., Агеев А.Н. и др. Коллагенолитическая и трипсиноподобная активности слезной жидкости больных с ожоговой травмой глаза. *Офтальмологические ведомости*. 2012;5(1):75–84 [Ryzhakova O.S., Gureeva T.A., Ageev A.N. et al. Collagenolytic and trypsin-like activity of tear fluid in patients with burn injury of the eye. *Ophthalmology J.* 2012;5(1):75–84 (in Russ.)].
9. Acera A., Rocha G., Vecino E. et al. Inflammatory markers in the tears of patients with ocular surface disease. *Ophthalmic Res.* 2008;40:315–321.
10. Corneal ulcers. Diagnosis and management / Ed. by Sharma N., Vajpayee R.B. New Delhi: Jaypee Brothers Med. Pub., 2008. 202 p.
11. Ramamurthi S., Rahman M.Q., Dutton G.N., Ramaesh K. Pathogenesis, clinical features and management of recurrent corneal erosions. *Eye*. 2006;20:635–644.
12. Белецкая И.С., Астахов С.Ю. Роль матриксных металлопротеаз в патогенезе глаукомы. *Офтальмологические ведомости*; 2015; VIII (3):28–43 [Beleckaja I.S., Astahov S. Ju. The role of matrix metalloproteases in the pathogenesis of glaucoma. *Ophthalmology J.* 2015;8(3):28–43 (in Russ.)].
13. Журова С.Г., Бржеский В.В., Калинина И.В. Определение коллагенолитической активности слезной жидкости здоровых людей и больных с синдромом «сухого глаза». *Офтальмологические ведомости*. 2011;4(1):35–38 [Zhurova S.G., Brzheskiy V.V., Kalinina I.V. Determination of the collagenolytic activity of tear fluid of healthy people and patients with the «dry eye» syndrome. *Ophthalmology J.* 2011;4(1):35–38 (in Russ.)].
14. Чеснокова Н.Б., Безнос О.В. Гидролитические ферменты слезной жидкости в норме и при патологии. *Российский офтальмологический журнал*. 2012;5(4):107–111 [Chesnokova N.B., Beznos O.V. Hydrolytic enzymes of tear fluid in normal and pathological conditions. *Russian Ophthalmol. J.* 2012;5(4):107–111 (in Russ.)].
15. Tandon R., Singh A., Gupta N., Vanathi M., Gupta V. Upgradation and modernization of eye banking services: Integrating tradition with innovative policies and current best practices. *Indian J. Ophthalmol.* 2017;65:109–115.
16. Сомов Е.Е., Бржеский В.В. Слеза (физиология, методы исследования, клиника). СПб.: Наука, 1994 [Somov E.E., Brzheskiy V.V. Tear (Physiology, Research methods, Clinic). SPb.: Nauka, 1994 (in Russ.)].

Сведения об авторах: ^{1,2}Бржеская Ирина Вячеславовна — аспирант кафедры офтальмологии, врач-офтальмолог; ^{1,3}Сомов Евгений Евгеньевич — д.м.н., профессор кафедры офтальмологии, заведующий детским отделением. ¹ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России. 194100, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2. ²СПб ГБУЗ «Городская Мариинская больница». 194104, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Литейный пр-т, д. 56. ³ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Санкт-Петербургский филиал. 192283, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Ярослава Гашека, д. 21. **Контактная информация:** Бржеская Ирина Вячеславовна, e-mail: ir-brg@yandex.ru. **Прозрачность финансовой деятельности:** никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. **Конфликт интересов отсутствует. Статья поступила 19.02.2018.**

About the authors: ^{1,2}Irina V. Brzheskaya — postgraduate student of the Department of Ophthalmology, ophthalmologist; ^{1,3}Evgeny E. Somov — MD, PhD, professor of the Department of Ophthalmology; Head of the children's department. ¹St. Petersburg State Pediatric Medical University. 2, Litovskaya str., St. Petersburg, 194100, Russian Federation. ²St. Petersburg City Mariinsky Hospital. 56, Liteyniy ave., St. Petersburg, 194104, Russian Federation. ³S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, St. Petersburg brunch. 21, Yaroslav Gashek str., St. Petersburg, 192283, Russian Federation. **Contact information:** Irina V. Brzheskaya, e-mail: ir-brg@yandex.ru. **Financial Disclosure:** no author has a financial or property interest in any material or method mentioned. **There is no conflict of interests. Received 19.02.2018.**