

I. I. Романовська¹, С. С. Декіна¹, Ю. А. Шестеренко¹,
О. П. Сотнікова², А. Б. Абрамова², В. Л. Осташевський²
ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ О. В. БОГАТСЬКОГО НАН УКРАЇНИ¹, ОДЕСА
ІНСТИТУТ ОЧНИХ ХВОРОБ І ТКАНИННОЇ ТЕРАПІЇ ІМЕНІ В. П. ФІЛАТОВА НАМН УКРАЇНИ²,
ОДЕСА

ЛІЗОЦИМВМІСНИЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ СЛЬОЗОЗАМІННОЇ ТЕРАПІЇ: ФАРМАКОТЕРАПЕВТИЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ

Вступ. Перспективним методом лікування синдрому сухого ока є сльозозамінна терапія за допомогою очних крапель, серед яких відсутні такі з ензимом лізоцимом (КФ 3.2.1.17), що має бактеріолітичну, імуностимулювальну, протизапальну, регенерувальну, знеболювальну дію і виконує захисну функцію слізної рідини. Оскільки ми розробили препарат з лізоцимом, актуальний для використання в даному напрямку, показали його офтальмобезпечність, доцільно вивчити його фармакотерапевтичну ефективність.

Мета дослідження – вивчити фармакотерапевтичну ефективність очних крапель “штучна сльоза” з лізоцимом як потенційного препарату для лікування синдрому сухого ока.

Методи дослідження. Протизапальні та регенераторні властивості виготовлених очних крапель з лізоцимом вивчали на 6 статевозрілих здорових кролях породи Шиншила з модельованим травматичним кератитом.

Результати й обговорення. На основі раніше отриманих експериментальних даних було виготовлено стабільні, високоактивні, стерильні очні краплі “штучна сльоза” з лізоцимом для дослідження їх фармакотерапевтичної ефективності на кролях породи Шиншила з модельованим травматичним кератитом. Показано, що інстиляції очних крапель “штучна сльоза” з лізоцимом при лікуванні травматичного кератиту чинять протизапальну і регенераторну дію, сприяючи більш швидкій ліквідації запалення та прискоренню процесу епітелізації порівняно з контролем.

Висновки. Для проведення доклінічних досліджень виготовлено стабільні, високоактивні, стерильні очні краплі “штучна сльоза” з лізоцимом. Інстиляції отриманих очних крапель при лікуванні травматичного кератиту чинять протизапальну і регенераторну дію, сприяючи більш швидкій ліквідації запалення та прискоренню процесу епітелізації.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: лізоцим; очні краплі “штучна сльоза”; травматичний кератит; протизапальні та регенераторні властивості.

ВСТУП. Синдром сухого ока (ССО) – комплексне захворювання з поширеністю 9–18 % – суттєва проблема сучасної офтальмології. Це комплекс ознак ураження епітелію рогівки і кон'юнктиви внаслідок зниження якості та/або кількості слізної рідини, яка формує на поверхні ока слізну плівку, що виконує найважливіші функції: трофічну, захисну, оптичну [1–3]. Порушення складу або продукції слізної рідини може призвести до пошкоджень переднього відділу ока, розвитку бактеріальних, грибкових та інших інфекційних процесів. Перспективним методом лікування ССО є сльозозамінна терапія за допомогою препаратів очних крапель, гелів, що відрізняються за в'язкістю і хімічним складом.

© I. I. Романовська, С. С. Декіна, Ю. А. Шестеренко, О. П. Сотнікова, А. Б. Абрамова, В. Л. Осташевський, 2018.

Однак серед “штучних сліз” відсутні такі з природним антибіотиком – бактеріолітичним ензимом лізоцимом (КФ 3.2.1.17), що має також імуностимулювальну, протизапальну, регенерувальну і знеболювальну дію. Лізоцим – важливий бактерицидний компонент слізної рідини; при захворюваннях очей, а також при ССО рівень ензиму в слізній рідині знижується. Враховуючи необхідність вмісту лізоциму в достатній кількості для виконання захисної функції, перспективою є розробка нового препарату з ензимом. Ми розробили склад такого препарату з використанням лізоциму білка курячого яйця, полімерів медичного призначення, вивчили його біохімічні й фізико-хімічні властивості [4]. Дослідження офтальмобезпечності “штучної сльози” з лізоцимом показало, що очні

краплі не мають алергізуючої дії. Тому перспективним є подальше дослідження біологічних особливостей препарату.

Мета дослідження – вивчити фармакотерапевтичну ефективність очних крапель “штучна сльоза” з лізоцимом як потенційного препарату для лікування синдрому сухого ока.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Готували очні лізоцимвмісні краплі, досліджували їх біохімічні й фізико-хімічні властивості [4]. Активність лізоциму визначали бактеріолітичним методом [5]. Вміст протеїну визначали за Лоурі–Хартрі [6]. В'язкість вимірювали віскозиметром Оствальда, густину визначали за допомогою ареометра, осмоляльність – осмометра Tear Lab Osmolarity System. Для стерилізації розроблених крапель з лізоцимом проводили стерилізувальну фільтрацію. Протизапальні та регенераторні властивості очних крапель [7] вивчали на 6 статевозрілих здорових кролях породи Шиншила обох статей масою 2,2–2,5 кг віком 6–7 місяців. Тварин утримували в умовах віварію Інституту очних хвороб і тканинної терапії імені В. П. Філатова НАМН України в індивідуальних клітках при температурі 20–25 °С, вологості не більше 50 %, природному світловому режимі “день – ніч”, на стандартному харчовому раціоні.

Травматичний кератит відтворювали за стандартною методикою. Під місцевою анестезією (0,4 % розчин новокаїну) за допомогою хірургічного скальпеля робили кільцевий дозований надріз рогівки діаметром 6 мм у ділянці зіниць обох очей кролів. Під контролем флуоресцеїнової (1 % розчин) опалесценції офтальмологічним скальпелем видаляли епітелій у межах насічки, не чіпаючи стромальних шарів. Кролів було поділено порівну на 2 групи: дослідну (щоденні інстиляції очних крапель “штучна сльоза” з лізоцимом по 2 краплі 3 рази на добу) і контрольну (інстиляції 0,9 % фізіологічного розчину в тому ж режимі). Інстиляції випробовуваних

розчинів проводили до повного загоєння дефекту рогівки.

Критеріями оцінки фармакотерапевтичної ефективності досліджуваних очних крапель були:

- 1) етапи ранозагоєння: зменшення площі ерозії рогівки і терміни її повної епітелізації;
- 2) динаміка інтенсивності запальної реакції на різних етапах загоєння рогівки.

Дослідження проводили щодня вранці в один і той самий час. Стан очей оцінювали методом бічного фокального освітлення і біомікроскопічно на щілинній лампі ЩЛ-2Б (ЛОМО). Площу деепітелізованої зони рогівки визначали після інстиляції 1 % розчину флуоресцеїну шляхом фотографування цифровою камерою. За отриманим зображенням на екрані монітора зону ерозії обводили курсором і виражали у відносних одиницях (пікселях) за допомогою програми Myltispec. Для обчислення площі деепітелізованої зони рогівки здійснювали перерахунок одержаних даних на мм². Інтенсивність запальної реакції оцінювали за тестом Дрейза.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Для проведення досліджень ми виготовили прозорі, безбарвні, без запаху, липкі очні краплі “штучна сльоза” з лізоцимом у кількості 25 мл із такими властивостями: бактеріолітична активність лізоциму – (38 200±2000) од./мл, рН-оптимум – 7,0–7,4, термооптимум – 40–50 °С, густина – (0,996±0,003) г/см³, осмоляльність – (298±2) мОсм/л, показник заломлення – 1,3339. Тобто розроблені краплі мають близькі зі слізною рідиною значення в'язкості, густини, осмоляльності, що відповідає вимогам до таких. Доклінічне вивчення протизапальних та регенераторних властивостей очних крапель “штучна сльоза” з лізоцимом проводили на моделі травматичного кератиту. До початку лікування, безпосередньо після скарифікації епітелію рогівки, у всіх кролів площа деепітелізованої зони рогівки була однаковою і становила в середньому 28,3 мм² (табл. 1).

Таблиця 1 – Вплив інстиляцій очних крапель “штучна сльоза” з лізоцимом на процес ранозагоєння рогівки у кролів

Група тварин	Площа деепітелізованої зони рогівки, мм ²						
	строк спостереження, доба						
	1 (модель)	2	3	4	5	6	7
Контрольна: 0,9 % розчин NaCl (n=6)	28,3	36,76±0,57	19,93±0,58	11,5±0,37	1,14±0,04	0,73±0,06	0
Дослідна: очні краплі “штучна сльоза” з лізоцимом (n=6)	28,3	18,34±0,46* (50,1)	10,2±0,51* (48,8)	4,78±1,13* (58,4)	0	0	0

Примітки:

1. n – кількість очей у групі.
2. * – p<0,05 порівняно з контролем.
3. У дужках наведено фармакологічний ефект, %.

Дані таблиці 1 свідчать про те, що в кролів контрольної групи на 2 добу спостерігали збільшення площі деепітелізованої зони рогівки на 29,9 % за рахунок сильного запалення і набряку. На 3 добу відзначали поступове зменшення площі деепітелізованої зони рогівки – на 29,6 % порівняно з вихідним рівнем, на 4 добу – на 59,4 %, на 5 і 6 доби – на 95,9 та 97,4 % відповідно. Остаточний процес епітелізації рогівки завершився тільки на 7 добу.

У дослідній групі (очні краплі “штучна сльоза” з лізоцимом) площа деепітелізованої зони рогівки, починаючи з 2 дня і протягом усього експерименту, активно відновлювалась. Так, на 2 добу площа ерозії зменшилась і становила 18,3 мм², що на 50,1 % менше, ніж у контрольній групі. На 3 добу вона зменшилась до 10,2 мм², що на 48,8 % менше від контрольних значень. На 4 добу площа ерозії зменшилась на 54 % порівняно з контролем і становила 4,78 мм². На 5 добу завершилась повна епітелізація рогівки у всіх тварин цієї групи.

Результати кількісної оцінки інтенсивності запальної реакції за тестом Дрейза наведено в таблиці 2.

Отримані результати свідчать про те, що інтенсивність запальної реакції в структурах переднього відділу очей кролів дослідної групи, які отримували інстиляції очних крапель “штучна сльоза” з лізоцимом, була слабшою, а процес загоєння рогівки перебігав швидше. Так, на 2 добу лікування інтенсивність запалення була знижена на 43,5 % (49,7 бала) порівняно з показниками контрольної групи (88,0 балів). На 3 добу запальна реакція в дослідній групі зменшилась на 78,2 % (10,7 бала, а в контрольній групі – 49,0 балів). На 4 добу запальна реакція в блоці (рогівка+райдужка+кон'юнктива) зменшилась на 79,1 % (5 балів, у контрольній групі – 24,0 бали). На 5 добу запальна реакція в дослідній групі повністю зникла, тоді як у контрольній групі на 5 і 6 доби інтенсивність її поступово знижувалась (12,0 та і 7,0 балів відповідно) та зникла на 7 добу експерименту.

Таблиця 2 – Вплив інстиляцій очних крапель “штучна сльоза” з лізоцимом на динаміку запального процесу при моделюванні травми рогівки, в балах

Група тварин	Структура переднього відділу ока	Строк лікування, доба						
		1 (модель)	2	3	4	5	6	7
Контрольна: 0,9 % розчин NaCl (n=6)	Рогівка	80,0	80,0	45,0	20,0	10,0	5,0	0
	Райдужка	0	0	0	0	0	0	0
	Кон'юнктива	6,0	8,0	4,0	4,0	2,0	2,0	0
	Сума балів	86,0	88,0	49,0	24,0	12,0	7,0	0
Дослідна: очні краплі “штучна сльоза” з лізоцимом (n=6)	Рогівка	80,0	45,0	10,0	5,0	0	0	0
	Райдужка	0	0	0	0	0	0	0
	Кон'юнктива	6,0	4,7	0,7	0	0	0	0
	Сума балів	86,0	49,7 (43,5)	10,7 (78,2)	5,0 (79,1)			

Примітки:

1. n – кількість очей у групі.
2. У дужках наведено фармакологічний ефект, %.

ВИСНОВКИ. 1. Для проведення фармакологічних досліджень виготовлено стабільні, високоактивні, стерильні очні краплі “штучна сльоза” з лізоцимом, що мають близькі зі слізною рідиною параметри в'язкості, густини, осмоляльності, що відповідає вимогам до таких.

2. Показано, що інстиляції очних крапель “штучна сльоза” з лізоцимом при лікуванні травматичного кератиту чинять протизапальну і регенераторну дію, сприяючи більш швидкій ліквідації запалення та прискоренню процесу епітелізації порівняно з контролем.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бржеский В. В. Синдром сухого глаза: современные аспекты диагностики и лечения / В. В. Бржеский, Е. Е. Сомов // Синдром сухого глаза. – 2002. – № 1. – С. 3–9.
2. Коваленко Л. Что должны знать о синдроме сухого глаза врачи общей практики / Л. Коваленко // Неонатология, хирургия та перинатальна медицина. – 2015. – 5, № 4 (18). – С. 126–128.

3. Bron A. J. The definition and classification of dry eye disease / A. J. Bron // Part of the Series Essentials in Ophthalmology. – Dry Eye. – 2015. – P. 1–19.

4. Декіна С. С. Лізоцимвмісний препарат “штучна сльоза”: отримання, властивості / С. С. Декіна, І. І. Романовська, О. П. Сотнікова // Мікробіологія і біотехнологія. – 2015. – № 4. – С. 46–52.

5. Gorin G. Assay of lysozyme by its lytic action on *M. lysodeikticus* cells / G. Gorin, S. F. Wang, L. Papapavlou // *Anal. Biochem.* – 1971. – **39** (1). – P. 113–127.

6. Hartree E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response / E. F. Hartree // *Anal. Biochem.* – 1972. – **48**, No. 2. – P. 422–427.

7. Чайка Л. А. Экспериментальное изучение безвредности и фармакологической активности глазных лекарственных средств : метод. рек. / Л. А. Чайка, А. Г. Ципкун, Т. Б. Гайдамака. – К. : Авиценна, 2003. – 43 с.

REFERENCES

1. Brzheskiy, V.V., & Somov, E.E. (2002). Sindrom sukhogo glaza: sovremennye aspekty diagnostiki i lecheniya [Dry eye syndrome: modern aspects of diagnosis and treatment]. *Sindrom sukhogo glaza – Dry Eye Syndrome*, (1), 3-9 [in Russian].

2. Kovalenko, L. (2015). Chto dolzhny znat o sindrome sukhogo glaza vrachi obshchey praktiki [What should doctors of general practices know about the dry eye syndrome]. *Neonatolohiia, khirurhiia ta perynatalna medytsyna – Neonatology, Surgery and Perinatal Medicine*, (4), 126-128 [in Russian].

3. Bron, A.J. (2015). The definition and classification of dry eye disease. *Part of the series Essentials in Ophthalmology, Dry Eye*, 1-19.

4. Dekina, S.S., Romanovska, I.I., & Sotnikova, O.P. (2015). Lizotsyymisnyi preparat "shtuchna slioz": otry-

mannia, vlastyvoli [Lysozyme-containing drug "artificial tear": obtaining, properties]. *Mikrobiolohiia i biotekhnolohiia – Microbiology and Biotechnology*, (4), 46-52 [in Ukrainian].

5. Gorin, G., Wang, S.F., Papapavlou, L. (1971). Assay of lysozyme by its lytic action on *M. lysodeikticus* cells. *Anal. Biochem.*, 39, (1), 113-127.

6. Hartree, E.F. (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem*, 48 (2), 422-427.

7. Chayka, L.A., Tsipkun, A.G., & Gaydamaka, T.B. (2003). *Eksperimentalnoe izuchenie bezvrednosti i farmakologicheskoy aktivnosti glaznykh lekarstvennykh sredstv: metod. rekomendatsii* [Experimental study of harmlessness and pharmacological activity of ophthalmic drugs: methodical recommendations]. Kyiv: Avitsenna [in Russian].

И. И. Романовская¹, С. С. Декина¹, Ю. А. Шестеренко¹,
Е. П. Сотникова², А. Б. Абрамова², В. Л. Осташевский²

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМЕНИ А. В. БОГАТСКОГО НАН УКРАИНЫ¹, ОДЕССА
ИНСТИТУТ ГЛАЗНЫХ БОЛЕЗНЕЙ И ТКАНЕВОЙ ТЕРАПИИ ИМЕНИ В. П. ФИЛАТОВА НАМН УКРАИНЫ²,
ОДЕССА

ЛИЗОЦИМСОДЕРЖАЩИЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ СЛЕЗОЗАМЕНИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ: ФАРМАКОТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ

Резюме

Вступление. Перспективным методом лечения синдрома сухого глаза является слезозаменительная терапия с помощью глазных капель, среди которых отсутствуют таковые с энзимом лизоцимом (КФ 3.2.1.17), имеющим бактериолитическое, иммуностимулирующее, противовоспалительное, регенерирующее, обезболивающее действие и выполняющим защитную функцию слезной жидкости. Поскольку мы разработали препарат с лизоцимом, актуальный для использования в данном направлении, показали его офтальмобезвредность, целесообразно изучить его фармакотерапевтическую эффективность.

Цель исследования – изучить фармакотерапевтическую эффективность глазных капель "искусственная слеза" с лизоцимом как потенциального препарата для лечения синдрома сухого глаза.

Методы исследования. Противовоспалительные и регенераторные свойства изготовленных глазных капель с лизоцимом изучали на 6 половозрелых здоровых кроликах породы Шиншилла с моделированным травматическим кератитом.

Результаты и обсуждение. На основе ранее полученных экспериментальных данных были изготовлены стабильные, высокоактивные, стерильные глазные капли "искусственная слеза" с лизоцимом для исследования их фармакотерапевтической эффективности на кроликах породы Шиншилла с моделированным травматическим кератитом. Показано, что инстилляцией глазных капель "искусственная слеза" с лизоцимом при лечении травматического кератита оказывают противовоспалительное и регенера-

торное действие, способствуя более быстрой ликвидации воспаления и ускорению процесса эпителизации по сравнению с контролем.

Выводы. Для проведения доклинических исследований изготовлены стабильные, высокоактивные, стерильные глазные капли “искусственная слеза” с лизоцимом. Инстилляцией полученных глазных капель при лечении травматического кератита оказывают противовоспалительное и регенераторное действие, способствуя более быстрой ликвидации воспаления и ускорению процесса эпителизации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: лизоцим; глазные капли “искусственная слеза”; травматический кератит; противовоспалительные и регенераторные свойства.

I. I. Romanovska¹, S. S. Dekina¹, Yu. A. Shesterenko¹,
E. P. Sotnikova², A. B. Abramova², V. L. Ostashevsky²

O. BOHATSKYI PHYSICO-CHEMICAL INSTITUTE¹, NAS OF UKRAINE
V. FILATOV INSTITUTE OF EYE DISEASES AND TISSUE THERAPY, NAMS OF UKRAINE²

LYSOZYME-CONTAINING DRUG FOR TEAR-SUBSTITUTIVE PHARMACO-THERAPEUTIC EFFECTIVENESS

Summary

Introduction. The prospective method of dry eye syndrome (DES) is the tear-substitutive therapy with the help of eye drops, among which there are absent such with enzyme lysozyme (EC 3.2.1.17), possessing bacteriolytic, immunostimulating, anti-inflammatory, regenerating, analgetic activity and have the protective function of lacrimal liquid. Because we had developed the preparation with lysozyme, timely for application in such direction and its ophthalmosafety was shown, the investigation of it's pharmacotherapeutic effectiveness was advisable.

The aim of the study – investigation of the pharmaco-therapeutic effectiveness of eye drops “artificial tear” with lysozyme as a potential drug for the dry eye syndrome treatment.

Research Methods. The study of the anti-inflammatory and regenerative properties of the produced eye drops with lysozyme was conducted on 6 sexually mature healthy rabbits of the Chinchilla strain with modelled traumatic keratitis.

Results and Discussion. Basing on the previously obtained experimental data, the stable, highly active, sterile eye drops “artificial tear” with lysozyme were made for their pharmaco-therapeutic effectiveness investigation on the Chinchilla rabbits with modelled traumatic keratitis. It was shown, that instillations of eye drops “artificial tear” with lysozyme in the treatment of traumatic keratitis have an anti-inflammatory and regenerative effect, helping the more quick liquidation of the inflammation and acceleration of the epithelization process compared with control.

Conclusions. For conduction of preclinical research, the highly-active, stable, sterile eye drops “artificial tear” with lysozyme were made. The instillations of the obtained eye drops at treatment of traumatic keratitis renders anti-inflammatory and regenerative effect, helping the more quick liquidation of inflammation and the acceleration of the epithelization process.

KEY WORDS: lysozyme; “artificial tear”, traumatic keratitis” anti-inflammatory and regenerative properties.

Отримано 30.04.18

Адреса для листування: І. І. Романовська, Фізико-хімічний інститут імені О. В. Богатського НАН України, Лютендорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна, e-mail: rotairina@gmail.com.