

МАРКЕРЫ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ПРОНИКАЮЩИХ РАНЕНИЯХ РОГОВИЦЫ

Евгения Алексеевна СОЗУРАКОВА^{1,2}, Елена Владимировна ГРОМАКИНА^{1,2},
Андрей Владимирович ШАБАЛДИН², Дарья Юрьевна СЕДОВА¹

¹ Кемеровская областная клиническая офтальмологическая больница
650066, г. Кемерово, просп. Октябрьский, 22а

² Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России
650056, г. Кемерово, ул. Ворошилова, 22а

Цель исследования – изучить наличие и локальные уровни маркеров воспаления (цитокинов) во влаге передней камеры и в крови у пациентов с проникающим ранением роговицы. **Материал и методы.** Проведено обследование 30 пациентов в возрасте 24–55 лет (средний возраст $31,2 \pm 0,34$ года) с проникающим ранением роговицы глаза, на 1–2-е сутки от момента травмы. Контрольную группу составили 30 больных в возрасте 38–55 лет (средний возраст $43,9 \pm 0,21$ года), госпитализированных в плановом порядке на оперативное лечение – факэмульсификацию катаракты без сопутствующей патологии. Всем пациентам выполнен забор влаги передней камеры глаза: в основной группе во время первичной хирургической обработки, в контрольной – при проведении факэмульсификации катаракты, а также забор периферической крови, непосредственно перед операцией. Исследовали содержание IL-1 β , IL-1Ra, IL-4, IL-6, IFN- α , TNF- α методом ИФА, а также экспрессию герпетических вирусов (цитомегаловирус и вирус простого герпеса I и II типа) методом ПЦР. **Результаты и их обсуждение.** У обследованных в крови и во влаге передней камеры глаза обнаруживались все исследуемые цитокины. Во влаге передней камеры глаза пациентов основной группы концентрация IL-1Ra, IL-1 β , TNF- α и IL-4 была выше по сравнению с контрольной группой. Системный врожденный иммунитет был активирован в основной группе, содержание С-реактивного белка в крови пациентов основной группы превышало величину соответствующего показателя лиц группы контроля. **Заключение.** Острый период травмы глаза сопровождается локальным и системным повышением концентрации про- и противовоспалительных цитокинов, что указывает на дисбаланс регуляции иммунного воспаления как основы реализации иммуновоспалительных осложнений.

Ключевые слова: ранение роговицы, маркеры воспаления, катаракта.

Известно, что цитокины представляют собой систему полипептидных молекул, регулирующих многие жизненно важные процессы в организме, в том числе защитные реакции против ксено- и эндобиотиков. Кроме того, система цитокинов восстанавливает гомеостаз, нарушенный любыми причинами, включая биологические, химические и физиологические факторы [7]. Их значимой функцией является обеспечение местной защитной реакции путем инициации и регуляции воспалительного процесса. К основным провоспалительным цитокинам относят интерлейкин 1 (IL-1), IL-6, фактор некроза опухоли α (TNF- α), основной хемокин воспаления IL-8, при активации системы распознавания патогенов запускается синтез интерферонов I типа. В настоящее время во внутриглазной жидкости определяют

практически весь спектр как цитокинов, так и факторов роста [2, 4–6]. Наиболее значимыми и наиболее часто изучаемыми в офтальмологии являются IL-1 β , TNF- α [3].

Результаты фундаментальных экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что в норме ИОПК («иммунное отклонение, связанное с передней камерой глаза») обеспечивается целым комплексом «пассивных» (морфоструктурных) и «активных» (растворимых) факторов, среди которых важнейшую роль играют вещества, присутствующие во влаге передней камеры и обладающие «иммуносупрессивными» свойствами [11]. В свете современных достижений молекулярной иммунологии установлена приоритетная роль про- и противовоспалительных клеточных медиаторов – цитокинов – в развитии местного

Созуракова Е.А. – врач-офтальмолог, аспирант кафедры курса офтальмологии, e-mail: edel_86@mail.ru

Громакина Е.В. – д.м.н., доцент, зав. курсом офтальмологии

Шабалдин А.В. – д.м.н., проф. кафедры оториноларингологии и клинической иммунологии, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий

Седова Д.Ю. – врач-офтальмолог

воспалительного процесса после любого тканевого повреждения, в том числе травмы [3, 4, 8]. Известно, что развитие физиологической регенерации в любом очаге тканевого повреждения возможно только при наличии сбалансированности провоспалительных клеточных медиаторов IL-1 β , TNF- α , их антагонистов, таких как рецепторный антагонист интерлейкина-1 (IL-1Ra), и противовоспалительных цитокинов (IL-4), играющих ведущую роль в характере формирования регенераторно-восстановительных реакций [10].

Ранения глаза (проникающие, непроникающие) относятся к тяжелой патологии органа зрения. Они приводят не только к снижению зрения, но и к потере глаза [1]. Проникающее ранение глаза служит примером ограниченного по объему повреждения, при котором развиваются не только локальные реакции с нарушением механизмов иммунной регуляции непосредственно в органе, но и системные стрессорные изменения в иммунной системе в ответ на угрозу утраты органа [8]. Ранение глаза, как и любая другая травма, характеризуется локальным выбросом провоспалительных цитокинов (IL-1 α и β , IL-6, TNF α и β , хемокинов и пр.), запускающих процессы травматического воспаления и последующей регенерации [9].

Исходя из этого, целью настоящего исследования послужило изучение особенностей цитокинового профиля во влаге передней камеры и в крови у пациентов с проникающим ранением роговицы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Настоящее исследование одобрено локальным этическим комитетом Кемеровского государственного медицинского университета Минздрава России (протокол № 21 от 24.11.2015). Набор клинического материала проведен в Кемеровской областной клинической офтальмологической больнице (ГБУЗ КО КОКОБ). После разъяснения условий все пациенты давали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

В основную группу вошли 30 пациентов в возрасте 24–55 лет (средний возраст $31,2 \pm 0,34$ года) с проникающим ранением роговицы глаза, которые были госпитализированы экстренно на 1–2-е сутки от момента травмы в ГБУЗ КО КОКОБ в период с августа 2015 г. по сентябрь 2017 г. для проведения первичной хирургической обработки раны роговицы. Контрольную группу составили 30 человек в возрасте 38–55 лет (средний возраст $43,9 \pm 0,21$ года), госпитализированные в плановом порядке в ГБУЗ КО КОКОБ в период с февраля 2016 г. по сентябрь 2017 г. на оперативное

лечение – фактоэмульсификацию катаракты без сопутствующей патологии. Дополнительными критериями включения в исследуемые группы было отсутствие острых инфекционных заболеваний, хронического гепатита С, гепатита В, сифилиса и ВИЧ-инфекции, а также наличие у пациента проникающего ранения роговицы глаза (в основной группе) и неосложненной пресенильной катаракты одного глаза (в контрольной группе).

Метод забора влаги запатентован (справка о приоритете № 2017137581 от 26.10.2017). Основными этапами забора влаги передней камеры глаза (ПКГ) являются парацентез роговицы глаза ножом Mani 1,2 мм на 3 или 9 ч в зависимости от глаза (правый или левый), забор влаги передней камеры шприцем 5,0 мл, надетым на аспирационную систему Alkon Grishhiber, в количестве 100–120 мкл. Канюля устанавливается под углом 30° для уменьшения риска дополнительного травмирования роговицы глаза, через нее проводится восстановление объема влаги передней камеры глаза физиологическим раствором в объеме 100 мкл через ирригационную систему Alkon Grishhiber, которая вводится также через сделанные парацентезы под углом 30°. Забранная влага ПКГ переносится в микропробирки объемом 500 мкл и криоконсервируется при –80° С для хранения. Выполненные парацентезы используются для дальнейших этапов фактоэмульсификации катаракты с имплантацией интраокулярной линзы, а также при первичной хирургической обработке для промывания ПКГ и введения антибактериального раствора.

Концентрацию IL-1 β , IL-1Ra, IL-4, IL-6, TNF- α и INF- α в сыворотке крови и во влаге ПКГ исследовали методом ИФА на коммерческих наборах ООО «Цитокин» (г. Санкт-Петербург) и eBioscience (Thermo Fisher Scientific, США) соответственно согласно прилагаемым инструкциям в модификации. Модификация заключалась в следующем: поскольку объем влаги ПКГ не превышал 120 мкл, для определения концентрации одного цитокина использовали 10 мкл влаги ПКГ и 40 мкл буфера для разведения образцов (разведение 1 : 5), что не противоречит рекомендациям к наборам eBioscience. Первичное разведение учитывали при снятии результатов ИФА влаги ПКГ. Общий объем затраченной влаги ПКГ для исследования шести цитокинов составлял 60 мкл.

В сыворотке крови определяли содержание двух системных иммуновоспалительных маркеров: С-реактивного белка (СРБ) и циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). Концентрацию СРБ измеряли с помощью ИФА с использованием наборов СРБ-ИФА-Бест (ООО «Вектор-Бест», г. Новосибирск) согласно прилагаемым

инструкциям, ЦИК – турбодиметрическим методом с использованием наборов реагентов «ЦИК-ХЕМА» (ООО «Хема-Медика», г. Москва).

Характер распределения полученных при статистическом анализе данных был определен с помощью критерия Лиллиефорса. Проверку статистических гипотез об отсутствии межгрупповых различий количественных признаков осуществляли с помощью непараметрического критерия Краскела – Уоллиса, при отклонении нулевой гипотезы в ходе анализа проводили попарное сравнение групп. Данные представляли в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей. Результаты считали статистически значимыми при ошибке менее 5 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У пациентов основной и контрольной групп обнаруживались все исследуемые цитокины (рис. 1), при этом в наибольших количествах выявлялся IL-1 β , в наименьших – IL-6; содержание IL-1Ra в крови и во влаге ПКГ было на порядок выше, чем основных исследуемых цитокинов. Из представленных на рисунках данных видно, что, в отличие от пациентов контрольной группы, у лиц основной группы содержание IL-6 во влаге ПКГ на 18 % больше, чем в крови. Эти данные указывают на значимость локального синтеза

провоспалительного IL-6 в острый период травмы глаза. Наиболее выраженное значимое различие между пациентами основной и контрольной групп установлено для концентрации TNF- α : десятикратная в сыворотке крови и семикратная во влаге ПКГ (см. рис. 1). Содержание IL-1Ra как в крови, так и во влаге ПКГ у больных основной группы было в 2 раза больше, чем у пациентов контрольной группы (см. рис. 1). Значимое повышение концентраций во влаге ПКГ у пациентов основной группы по сравнению с контролем обнаружено для IL-1 β и IL-4 (см. рис. 1). Из маркеров системного воспаления было значимо повышено у пациентов основной группы по сравнению с контролем только содержание СРБ (рис. 2).

Полученные данные свидетельствуют о том, что при проникающей травме глаза прежде всего активируется местный иммунитет, но также появляются маркеры системного иммуновоспалительного процесса, такие как СРБ, TNF- α и IL-1Ra. Именно тот факт, что при проникающей травме глаза активируется системное воспаление, указывает на возможность манифестации реактивного воспаления с поражением второго глаза. Развитие этого осложнения зависит от активности провоспалительного (TNF- α) цитокина и противовоспалительного (IL-1Ra) медиатора. Кроме того, настоящее исследование показало возможность

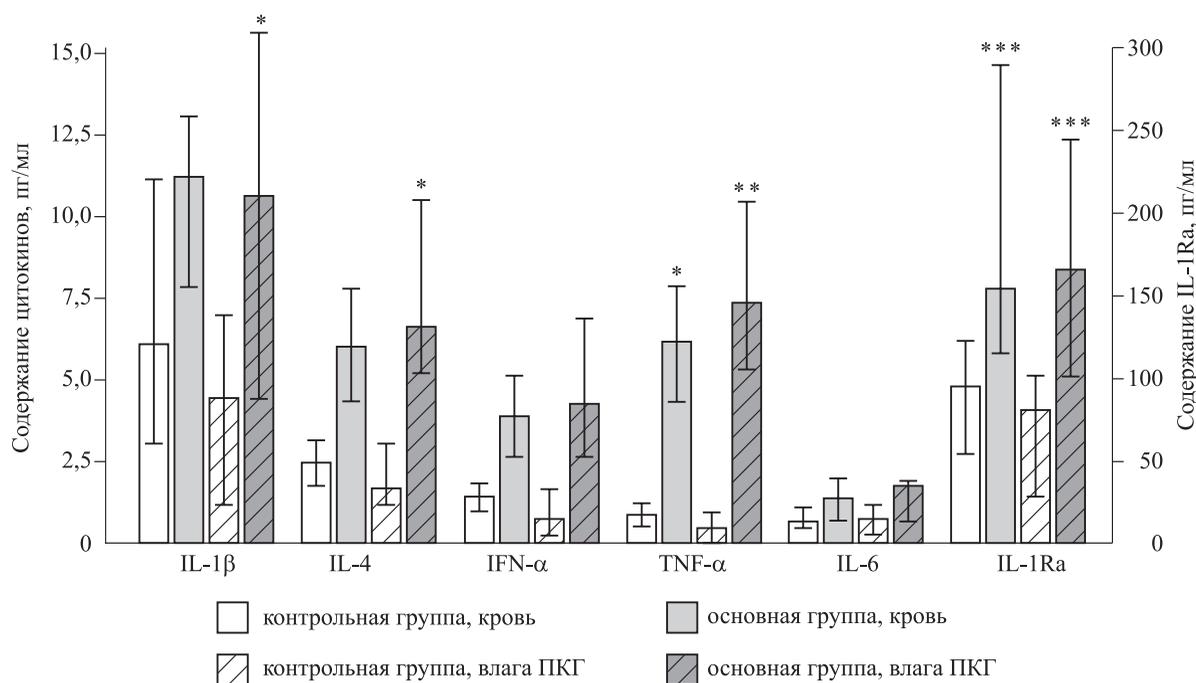


Рис. 1. Концентрация цитокинов и IL-1Ra в крови и во влаге ПКГ у пациентов с неосложненной пресенильной катарактой (контрольная группа) и травмой глаза (основная группа); здесь и на рис. 2 обозначены статистически значимые отличия от соответствующих показателей контрольной группы: * – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$, *** – при $p < 0,001$

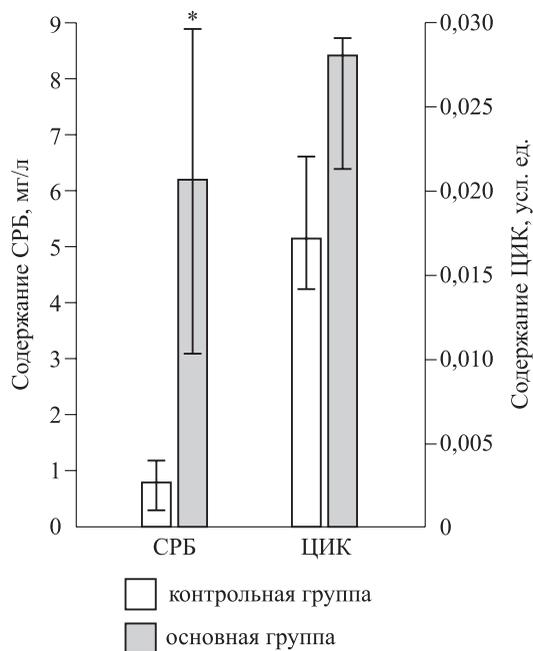


Рис. 2. Концентрация СРБ и ЦИК в крови пациентов с неосложненной пресенильной катарактой (контрольная группа) и травмой глаза (основная группа)

оценки развития реактивного воспаления по изменению содержания цитокинов и острофазовых белков крови, что может быть применено в практическом здравоохранении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Острый период травмы глаза сопровождается локальным и системным повышением провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, что указывает на дисбаланс регуляции иммунного воспаления как основы реализации иммуновоспалительных осложнений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Архипова Л.Т., Захарова Г.П. Симпатическая офтальмия через 21 год после проникающей травмы глаза // Вестн. офтальмологии. 1997. 113. (3). 41–42.

2. Бикбов М.М., Шевчук Н.Е., Файзрахманов Р.Р., Ярмухаметова А.Л., Гильманишин Т.Р. Локальный уровень цитокинов при различных морфологических вариантах неоваскулярной мембраны у пациентов с влажной формой возрастной макулярной дегенерации // Мед. альм. 2014. (1). 66–68.

3. Еричев В.П., Петров С.Ю., Суббот А.М., Волжанин А.В., Германова В.Н., Карлова Е.В. Роль цитокинов в патогенезе глазных болезней // Глаукома. 2017. 16. (1). 85–99.

4. Зайцева Н.В., Якимов А.П., Шевела Е.Я., Юрьева Т.Н., Григорьева А.В. Изменение внутриглазного баланса цитокинов у пациентов с миопической хориоидальной неоваскуляризацией // Соврем. технологии в офтальмологии. 2016. (1). 82.

5. Кашкин К.П. Цитокины иммунной системы: основные свойства и иммунобиологическая активность // Клин. лаб. диагностика. 1998. (11). 21–32.

Куликова И.Г., Слепова О.С., Ковалева Л.А., Макаров П.В., Ловначев Д.Н. Цитокины во влаге передней камеры глаза и их роль в развитии системного иммунного ответа на антигены тканей глаза // Мед. иммунология. 2015. 17. (2). 179–182.

7. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. СПб.: Фолиант, 2018. 512 с.

8. Черешнев В.А., Шилов Ю.И., Гаврилова Т.В., Усова В.В., Черешнева М.В. Зависимость пролиферативного ответа лимфоцитов на митоген лаконоса от концентрации эндогенного кортизола в раннем травматическом периоде у пострадавших с проникающим ранением глаза // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2012. 153. (5). 680–683.

9. Черешнев В.А., Шилов Ю.И., Черешнева М.В., Гаврилова Т.В., Усова В.В., Лобанова Н.Л. Изменения функций иммунной системы и их коррекция миелопептидами при проникающем ранении глаза // Рос. иммунол. журн. 2010. 4. (3). 225–236.

10. Шаимова В.Л. Роль провоспалительных цитокинов при заболеваниях глаз // Офтальмохирургия и терапия. 2004. (3). 30–32.

11. Denniston A.K., Kottoor S.H., Khan I., Oswal K., Williams G.P., Abbott J., Wallace G.R., Salmon M., Rauz S., Murray P.I., Curnow S.J. Endogenous cortisol and TGF-beta in human aqueous humor contribute to ocular immune privilege by regulating dendritic cell function // J. Immunol. 2011. 186. (1). 305–311.

INFLAMMATION MARKERS IN CORNEA PENETRATING WOUND

Evgeniya Alekseevna SOZURAKOVA^{1,2}, Elena Vladimirovna GROMAKINA^{1,2},
Andrey Vladimirovich SHABALDIN², Darya Yuryevna SEDOVA¹

¹ Kemerovo Regional Clinical Ophthalmological Hospital
650066, Kemerovo, Oktyabrskiy av., 22a

² Kemerovo State Medical University of Minzdrav of Russia
650056, Kemerovo, Voroshilov str., 22a

Research purpose was to study the presence and local levels of inflammation markers (cytokines) in the anterior chamber and blood in patients with penetrating corneal wound. **Material and methods.** Thirty patients aged 24–55 years (mean age 31.2 ± 0.34 years) with penetrating corneal wound for 1–2 days from the moment of trauma were examined. The control group consisted of 30 patients aged 38–55 years (mean age 43.9 ± 0.21 years) hospitalized for surgical treatment - phacoemulsification of cataract without concomitant pathology. Anterior chamber aqueous humor sampling was made in all patients: in the experimental group during the primary surgical debridement of cornea penetrating wound, in the control group – during the phacoemulsification of cataract. Peripheral blood sampling also was made just before the operation. IL-1 β , IL-1Ra, IL-4, IL-6, IFN- α , TNF- α levels, measured by EIA, and the expression of the herpes viruses (cytomegalovirus and herpes simplex virus I and II), measured by PCR, were studied. **Results and discussion.** The study showed that all the investigated cytokines were in the blood and in the AC aqueous humor of examined patients. High concentration of IL-1Ra, IL-1 β , TNF- α и IL-4 was in the experimental group, as compared to control group. Systemic innate immunity was activated in the experimental group and was significantly higher in the C-reactive protein index in patients of the experimental group as compared to control group. **Conclusion.** An acute period of eye injury is accompanied by a local and systemic increase in proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, which indicates an imbalance in the regulation of immune inflammation, as the basis for the implementation of immuno-inflammatory complications.

Key words: corneal wound, inflammation markers, cataract.

Sozurakova E.A. – ophthalmologist, postgraduate student

Gromakina E.V. – doctor of medical sciences, associate professor, head of ophthalmology course

Shabaldin A.V. – doctor of medical sciences, professor of the department of otorhinolaryngology and clinical immunology, leading researcher of cellular technologies laboratory

Sedova D.Yu. – ophthalmologist