

УРОВЕНЬ ЛОКАЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ В РАЗЛИЧНЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КРИОДЕСТРУКЦИИ ЦИЛИАРНОГО ТЕЛА

© А. Н. Стеблюк¹, Н. В. Колесникова², В. Э. Гюнтер³, В. Н. Бодня², А. А. Церковная²

¹Краснодарский филиал ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза имени академика С. Н. Фёдорова» Минздрава России», Краснодар;

²ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар;

³НИИ медицинских материалов и имплантатов с памятью формы СФТИ при ТГУ, Томск

✧ Проведена оценка уровня содержания про- (ИЛ1β, ФНОα, ИЛ2) и противовоспалительных (ИЛ10) цитокинов во влаге передней камеры глаза лабораторных животных на 3, 7 и 30 сутки после экспериментальной деструкции цилиарного тела криоаппликатором из пористого никелида титана. Установлено, что достоверные изменения содержания цитокинов на локальном уровне являются отражением реактивности организма лабораторных животных как на оперативное вмешательство в области цилиарного тела, так и на его экспериментальную циклодеструкцию криоаппликатором из никелида титана. Выявлено преобладание провоспалительного потенциала цитокинов в ранние (3–7 сутки) сроки, и нормализация баланса про- и противовоспалительных цитокинов в поздние (30 суток) сроки наблюдения за счет усиления продукции противовоспалительного ИЛ10 с сохранением эффекта в отдалённые сроки исследования (1,5 года).

✧ *Ключевые слова:* цилиарное тело; криохирургия; никелид титана; лабораторные животные.

THE LEVEL OF LOCAL CYTOKINE PRODUCTION AT DIFFERENT TIMES AFTER EXPERIMENTAL CILIARY BODY CRYODESTRUCTION

© А. Н. Steblyuk¹, N. V. Kolesnikova², V. E. Gyunter³, V. N. Bodnya², A. A. Tserkovnaya²

¹S.N. Fyodorov Eye Microsurgery Complex, Krasnodar Branch;

²Kuban State Medical University, Krasnodar;

³Research Institute of Shape Memory Material under Siberian Physico-technical Institute and Tomsk State University, Tomsk

✧ We assessed the level of pro- (IL1β, FNOα, IL2) and anti-inflammatory (IL10) cytokines in the anterior chamber fluid of experimental animals on the 3rd, 7th and 30th day, after an experimental ciliary body destruction with porous titanium nickelid cryoapplicator. Consistent changes of the cytokine content at the local level are reflecting the reactivity of the experimental animals as an answer both to surgery in ciliary body area, and to its experimental cyclostruction using the cryoapplicator from titanium nickelid. The predominance of pro-inflammatory cytokines' potential was found during the early period (3–7 day), and the balance normalization of pro- and anti-inflammatory cytokines was found at late observation period (30 days) due to the increase of the anti-inflammatory IL-10 production; this effect was maintained at the end of the long-term study period (1.5 years).

✧ *Key words:* ciliary body; cryosurgery; titanium nickelid; experimental animals.

АКТУАЛЬНОСТЬ

В хирургическом лечении основных форм рефрактерной глаукомы обоснованы операции,

направленные на ограничение продукции внутриглазной жидкости с целью снижения внутриглазного давления и устранения болевого

синдрома. Основной операцией при данном заболевании, остаётся лазерная деструкция цилиарного тела, которая может завершаться неудовлетворительным гипотензивным эффектом, осложнениями геморрагического и воспалительного характера. Кроме того, используемые лазерные воздействия повреждают ресничное тело и вызывают увеит, имеющий тенденцию к длительному, а иногда и постоянному течению [1]. Представляется перспективным криохирургическое лечение с использованием автономного криоаппликатора из пористо-проницаемого никелида титана.

Ещё в 1933 г. метод криодеструкции цилиарного тела был предложен Bietti для лечения тяжёлых форм глаукомы. Он основан на возможности вызывать развитие очагов атрофии в цилиарном теле и тем самым добиваться снижения продукции камерной влаги. Сверхнизкие температуры от -130 до -190 °С обладают большей разрушительной силой, и для достижения необходимых результатов требуется меньшее время экспозиции в сравнении с умеренно низкими температурами от -20 до -80 °С. В прилегающих к разрушенным от холода зонах при отогревании тканей параллельно с восстановлением их питания имеют место процессы, затрудняющие жизнедеятельность клеток, — это увеличение проницаемости сосудистых стенок, нарастание местных отёков, разрыв мелких сосудов с появлением мелких экстравазатов, микротромбозы — явления, характерные для холодовой травмы, которые полностью исчезают в сроки от 1 до 2 недель. Создание в НИИ медицинских материалов и имплантатов с памятью формы СФТИ при ТГУ (г. Томск) криоаппликаторов нового поколения позволило значительно повысить качество криолечения за счёт более чёткой локализации процесса отвода тепла (криовоздействия) изменённых тканей. Аппликаторы автономные, длительно сохраняют криогенные свойства, приводят к получению сверхнизкой «азотной» температуры на поверхности объекта и не прилипают к тканям. Локальное криовоздействие, как правило, безболезненное. Очаги крионекроза обладают своеобразной «биологической инертностью» и вызывают минимальную перифокальную реакцию, довольно быстро заживают, не вызывая грубых рубцов и дают лучший лечебный эффект [3]. Изучение показателей иммунологической реактивности при травмировании глаза различной этиологии, в том числе и при операциях, позволяет обнаружить её изменения как на системном, так и на локальном уровне,

среди которых гиперпродукция провоспалительных цитокинов коррелирует с тяжестью течения посттравматического периода [2, 4]. При этом выявляемая разнонаправленность характера изменений цитокинового профиля на локальном и системном уровне свидетельствует о преобладании роли местного иммунитета над системным при травмировании иммунологически привилегированного глаза [6].

В связи с изложенным, целью исследования явилось изучение локального уровня содержания про- и противовоспалительных цитокинов у экспериментальных животных в динамике после прямой и трансконъюнктивальной криодеструкции цилиарного тела автономным криоаппликатором из пористо-проницаемого никелида титана.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования содержания цитокинов (ИЛ1 β , ФНО α , ИЛ2, ИЛ10) методом иммуноферментного анализа явилась влага передней камеры глаза экспериментальных животных (21 кролик породы Шиншилла обоего пола в возрасте до 2-х лет), взятая на 3, 7, 30 сутки и через 3 месяца и 1,5 года после экспериментальной деструкции цилиарного тела криоаппликатором из пористого никелида титана (группа 1). Контрольную группу составили 6 интактных кроликов (группа 2), а группу сравнения — 5 кроликов, которым было произведено традиционное гипотензивное вмешательство (группа 3). Метод иммуноферментного анализа проводился с использованием тест-систем ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург) на анализаторе «ASCENT» (Финляндия).

Операции выполнялись под общим обезболиванием. Наркоз осуществлялся внутримышечным введением 0,4 мл раствора золетила 100 на 1 кг массы животного, в инстилляциях — инокаин 0,4 %. Формировался разрез конъюнктивы на протяжении 5–6 мм, от лимба 6–7 мм с рассечением теноновой капсулы. Отсепаровка конъюнктивы в сторону лимба с последующим гемостазом. Из поверхностных слоев склеры выкраивался прямоугольный лоскут размером 4 × 4 мм основанием к лимбу с обнажением цилиарного тела. Выполнялась прямая криодеструкция цилиарного тела с длительностью экспозиции 35–42 секунды. Возвращали склеральный козырёк в исходное положение. На конъюнктиву накладывали непрерывный шов из монолитной нити на основе никелида титана (ТН-10)

сечением 45 мкм. В соседнем секторе глазного яблока выполнялась прямая криоциклодеструкция по описанной методике, или трансконъюнктивная криоаппликация цилиарного тела с указанной длительностью экспозиции. Взятие влаги передней камеры глаза и снятие шва с конъюнктивы проводились также под общим обезболиванием.

Использовался инструмент, основу рабочего элемента которого составляет крионоситель в виде пористого никелид-титанового стержня с диаметром наконечника 2,5 мм, заданной сквозной пористостью и соответствующей структурой пор. При погружении этого стержня в жидкий азот последний вытесняет воздух, содержащийся в порах, и криоаппликатор, как губка, полностью наполняется хладагентом в течение минуты. Температура рабочей части криоаппликатора составляет $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$, он обладает большой теплоёмкостью, малой теплопроводностью и создаёт условия мгновенного воздействия на биологическую ткань. Наполненный жидким азотом инструмент из пористого никелида титана сохраняет температуру, близкую к температуре кипения азота 1–1,5 минуты, и в течение этого времени наиболее высок эффект криохирургических манипуляций.

Методика статистического анализа включала расчет средней величины с вычислением средней арифметической M , средней ошибки m и вероятности различий p с использованием компьютерной программы SPSS Statistics 17.0 для Microsoft. Сравнение средних двух выборок производилось

с помощью критерия Стьюдента. Достоверными считались различия 95 % ($p \leq 0,01$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследованиями установлено, что само по себе оперативное вмешательство у животных 3 группы приводит к изменению содержания цитокинов на локальном уровне. В частности, отмечен противоположный характер изменений провоспалительных цитокинов — ИЛ1 β (достоверное увеличение в 1,5 раза против фоновых значений) и ФНО α (достоверное снижение в 3 раза), — отмечаемый во все сроки исследования); выявлено увеличение содержания ИЛ10, наиболее выраженное на 3-и сутки после операции (в 2,4 раза), тогда как снижение содержания ИЛ2 отмечено лишь в поздние сроки мониторинга (7, 30 сутки). Выявленный характер изменений обуславливает необходимость сравнения полученных данных в основной опытной группе, не только с фоновым контролем, но и с группой сравнения.

Так, выявленное достоверное повышение провоспалительного ИЛ1 β во все сроки наблюдения после прямой деструкции цилиарного тела криоаппликатором из никелида титана было обусловлено непосредственным оперативным вмешательством, тогда как концентрация ФНО α достоверно превышала уровень такового как в контроле, так и в группе сравнения во все сроки наблюдения (табл. 1, рис. 1).

Увеличение уровня содержания провоспалительного (ИЛ2) и противовоспалительного —

Таблица 1

Изменение цитокинов влаги передней камеры глаза кроликов в динамике наблюдения после деструкции цилиарного тела криоаппликатором из никелида титана ($M \pm m, p$)

Группа	Деструкция цилиарного тела криоаппликатором из никелида титана (группа 1, n = 21)				
	ИЛ1 β , пкг/мл	ФНО α , пкг/мл	ИЛ2, пкг/мл	ИЛ10, пкг/мл	ИЛ1 β + ФНО α + ИЛ2/ИЛ10, У.е.
3 сут,	3,83 \pm 0,28*	7,34 \pm 1,03 *#	9,16 \pm 1,15*#	13,10 \pm 1,44*#	1,55 \pm 0,28#
7 сут	3,35 \pm 0,49*	8,65 \pm 1,11 *#	16,40 \pm 1,43*#	14,23 \pm 1,27*#	2,01 \pm 0,34#
30 сут	3,72 \pm 0,37 *	7,03 \pm 0,98 #	16,30 \pm 1,58*#	15,00 \pm 1,62*#	1,65 \pm 0,21
3 мес	6,01 \pm 0,48*#	5,30 \pm 0,60#	10,50 \pm 0,96*#	6,82 \pm 0,70#	3,20 \pm 0,28*#
1,5 года	2,90 \pm 0,15#	6,48 \pm 0,55	17,90 \pm 1,45*	6,69 \pm 0,65#	4,08 \pm 0,50*#
Контроль, интактные кролики (группа 2, n = 6)					
Фон	2,40 \pm 0,21	5,91 \pm 0,63	6,83 \pm 0,86	7,80 \pm 2,20	1,94 \pm 0,19
Группа сравнения — оперированные кролики ... (группа 3, n = 5)					
3 сут,	3,63 \pm 0,38*	1,59 \pm 0,24*	6,21 \pm 0,67	18,50 \pm 2,31*	0,97 \pm 0,14*
7 сут	3,82 \pm 0,49*	2,55 \pm 0,34*	4,49 \pm 0,54*	10,68 \pm 2,47*	1,13 \pm 0,19*
30 сут	3,69 \pm 0,45*	1,61 \pm 0,22*	5,04 \pm 0,48*	7,52 \pm 0,93*	1,51 \pm 0,21*
3 мес	5,56 \pm 0,62*	7,11 \pm 0,85*	7,98 \pm 0,95	8,35 \pm 0,85	1,52 \pm 0,18
1,5 года	3,32 \pm 0,40	6,80 \pm 0,65	18,43 \pm 1,75*	9,80 \pm 0,85*	2,90 \pm 0,32

* — достоверность отличий от контроля; # — достоверность отличий от группы сравнения

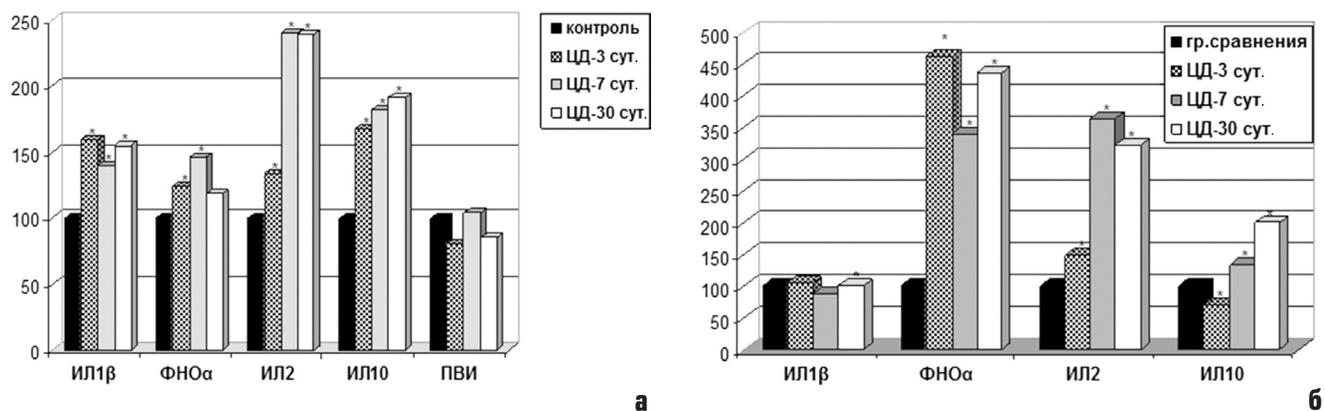


Рис. 1. Влияние деструкции цилиарного тела криоаппликатором из никелида титана на содержание цитокинов во влаге передней камеры глаза кроликов и их соотношения в динамике наблюдений; а) в % от контроля, б) в % от группы сравнения. * — достоверность отличий от контроля ($p < 0,01$, $p < 0,02$)

(ИЛ10) у животных опытной группы было более выражено по сравнению с изменениями уровня ФНОα (в среднем в 4 раза относительно группы сравнения; табл. 1, рис. 1).

Исследование содержания про- и противовоспалительных цитокинов во влаге передней камеры глаза у экспериментальных животных в наиболее отдаленные сроки после деструкции цилиарного тела криоаппликатором из никелида титана проводилось через 3 месяца и 1,5 года. При этом установлено (табл. 1), что через 3 месяца сохранялся высокий уровень ИЛ2, а концентрация провоспалительного ИЛ1β была максимальной за все сроки мониторинга и превышала фоновый уровень в 3 раза, тогда как уровень содержания ФНОα и ИЛ10 находился в пределах нормы. В наиболее отдаленные сроки (через 1,5 года) было отмечено снижение провоспалительного ИЛ1β до уровня фоновых значений с нормализацией содержания ФНОα и ИЛ10, однако уровень содержания ИЛ2 по-прежнему значительно превышал контрольные значения, причем не только в основной экспериментальной группе, но и в группе сравнения, в среднем в 2 раза (табл. 1). Такой характер изменения цитокинов не мог не отразиться на величине провоспалительного индекса (ПВИ), который был рассчитан по отношению суммы провоспалительных цитокинов (ИЛ1β + ФНОα + ИЛ2) к противовоспалительному ИЛ10. Показано, что ПВИ был изначально выше в основной экспериментальной группе, однако не за счет увеличения основных провоспалительных цитокинов — ИЛ1β и ФНОα, а благодаря высокому уровню содержания ИЛ2, играющему важную регуляторную роль в индукции и поддержании иммунного ответа как клеточного, так и гуморального типа. Величина ПВИ у животных с использованием деструкции цилиарного тела криоаппликатором из никелида

титана на 3-и и 7-е сутки мониторинга была более высокой, чем в группе сравнения ($p < 0,02$), тогда как по отношению к фоновым интактным животным достоверных различий обнаружено не было.

На 30-е сутки наблюдения сдвиг баланса цитокинов в сторону провоспалительного компонента полностью нивелировался, а величина ПВИ соответствовала таковой как в группе контроля, так и в группе сравнения, что обусловлено возрастанием противовоспалительного ИЛ10 (табл. 1, рис. 2). В наиболее отдаленные сроки (через 3 месяца и 1,5 года) величина ПВИ была выше не только таковой в группе фонового контроля, но и в соответствующей группе сравнения, что по-прежнему было обусловлено усиленной продукцией ИЛ2 и нормализацией уровня содержания ИЛ10 в основной экспериментальной группе и не может быть расценено как активация воспалительного процесса (табл. 1, рис. 2).

Оценивая общее клиническое состояние кроликов, используемых в эксперименте, необ-

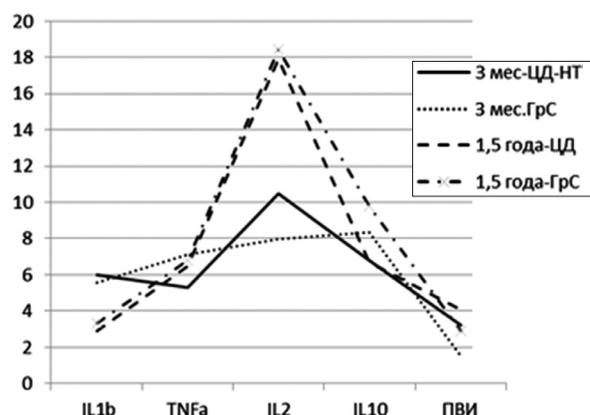


Рис. 2. Влияние деструкции цилиарного тела криоаппликатором из никелида титана на соотношение про- и противовоспалительных цитокинов во влаге передней камеры глаза кроликов в динамике наблюдений. ЦД-НТ — деструкции цилиарного тела криоаппликатором из никелида титана, ГрС — группа сравнения

ходимо констатировать, что у большинства послеоперационный период клинически протекал ареактивно, а клинические проявления единичных случаев вирусной инфекции (высыпания в области придаточного аппарата глаза) у животных к концу мониторинга были полностью купированы. При этом известная высокая чувствительность цитокинов к вирусным антигенам [5] явилась основанием для исключения образцов ВПК больных животных из общего дизайна исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, оценка уровня содержания про- (ИЛ1 β , ФНО α , ИЛ2) и противовоспалительных (ИЛ10) цитокинов во влаге передней камеры глаза лабораторных животных на 3, 7 и 30 сутки после экспериментальной деструкции цилиарного тела криоаппликатором из пористого никелида титана продемонстрировала преобладание провоспалительного потенциала цитокинов в ранние (3–7 сутки) сроки, и нормализацию баланса про- и противовоспалительных цитокинов в поздние (30 суток) сроки наблюдения за счёт усиления продукции противовоспалительного ИЛ10, с сохранением данного эффекта в наиболее отдалённые сроки мониторинга (1,5 года). При этом достоверные изменения содержания цитокинов на локальном уровне являются отражением реактивности организма лабораторных животных как на оперативное вмешательство в области цилиарного тела, так и на его экспериментальную циклодеструкцию криоаппликатором из никелида титана.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Астахов С. Ю., Астахов Ю. С. Современные тенденции в хирургическом лечении глауком. Глаукома: проблемы и решения. Всероссийская научно-практическая конференция. Москва. 2004; 257–61.
2. Керимов К. Т., Джафаров А. И., Гахраманов Ф. С. Ожоги глаз: патогенез и лечение, М.: РАМН. 2005; 462.

3. Мельник Д. Д., Гюнтер В. Э., Дамбаев Г. Ц. и соавт. Медицинские материалы и имплантаты с памятью формы. Пористо-проницаемые криоаппликаторы из никелида титана в медицине. Томск: Изд-во «НПП МИЦ». 2010; 9: 304.
4. Шилов Ю. И., Гаврилова Т. В., Черешнева М. В., Шилов С. Ю., Усова В. В., Медведева С. Ю., Блинкова Н. Б. Механизмы изменений функций иммунной системы и иммунокорригирующего действия миелопада и полиоксидония при проникающем ранении глаза. Росс. иммунол. журнал. 2013; 7 (16), 2–3; 211.
5. Hoang-Xuan T., Baudouin C., Creuzot-Garcher C. Inflammatory Diseases of the Conjunctiva. New York: Thime. 2001; 172.
6. Mondal S. K. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma in conjunctiva. Indian J. Pathol. Microbiol. 2008; 51 (3): 407–8.

REFERENCES

1. Astakhov S. Yu., Astakhov Yu. S. Sovremennyye tendentsii v khirurgicheskom lechenii glaukom [Современные тенденции в хирургическом лечении глауком]. Glaukoma: problemy i resheniya. Vserossiyskaya nauchno-prakticheskaya konferentsiya. Moskva. 2004; 257–61.
2. Kerimov K. T., Dzhafarov A. I., Gakhramanov F. S. Ozhogi glaz: patogenez i lechenie [Burns eyes: pathogenesis and treatment], М.: РАМН. 2005; 462.
3. Mel'nik D. D., Gyunter V. E., Dambaev G. Ts. i soavt. Meditsinskie materialy i implantaty s pamyat'yu formy. Poristo-pronitsaemye krioaapplikatory iz nikelida titana v meditsine [Medical materials and implants with shape memory. Porous-permeable cryoapplicator Nickel-titanium in medicine]. Tomsk: Izd-vo «NPP MITs». 2010; 9: 304.
4. Shilov Yu. I., Gavrilova T. V., Cheresheva M. V., Shilov S. Yu., Usova V. V., Medvedeva S. Yu., Blinkova N. B. Mekhanizmy izmeneniy funktsiy immunooy sistemy i immunokorriruyushchego deystviya mielopida i polioksidoniya pri pronikayushchem ranenii glaza [The mechanisms of changes in the functions of the immune system and immune correcting actions mielopid and polyoxidonium in cases of penetrating eye injury]. Ross. immunol. zhurnal. 2013; 7 (16), 2–3; 211.
5. Hoang-Xuan T., Bauduin C., Creuzot-Garcher C. Inflammatory Diseases of the Conjunctiva. New York: Thime. 2001; 172.
6. Mondal S. K. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma in conjunctiva. Indian J. Pathol. Microbiol. 2008; 51 (3): 407–8.

Сведения об авторах:

Стеблюк Алексей Николаевич — к. м. н., врач-офтальмолог. Краснодарский филиал ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза им. ак. С. Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации». 350012, Краснодар, ул. Красных партизан, д. 6.

Steblyuk Aleksey Nikolaevich — candidate of medical science, ophthalmologist. S. N. Fyodorov Eye Microsurgery Complex, Krasnodar Branch. 350012, Krasnodar, Krasnykh partisan St., 6.

Колесникова Наталья Владиславовна — д. б. н., профессор кафедры иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС. ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 350063, Краснодар, ул. Седина, д. 4. E-mail: troickaya@rambler.ru.

Понтер Виктор Эдуардович — д. т. н., проф. Директор НИИ медицинских материалов. 634034, Томск, ул. 19 Гвардейской дивизии, д. 17.

Бодня Вадим Николаевич — д. м. н., доцент кафедры онкологии с курсом торакальной хирургии ФПК и ППС. ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 350086, Краснодар, ул. 1 Мая, д. 167. E-mail: vadimbodnya@rambler.ru.

Церковная Анна Алексеевна — врач-онколог диспансерно-поликлинического отделения ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер № 1» Министерства здравоохранения Краснодарского края; аспирант кафедры онкологии с курсом торакальной хирургии ФПК и ППС. ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 350051, Краснодар, ул. Димитрова, д. 146. E-mail: 5247024@gmail.com.

Kolesnikova Natal'ya Vladislavovna — doctor of biological science, professor. Immunology, Allergology and Laboratory Testing department, Kuban State Medical University. 350063, Krasnodar, Sediva St., 4. E-mail: troickaya@rambler.ru.

Gyunter Viktor Eduardovich — doctor of technical science, professor, head of scientific research institute. Research Institute of Shape Memory Material under Siberian Physico-technical Institute and Tomsk State University. 634034, Tomsk, 19 Gvardeyskoy divizii St., 17.

Bodnya Vadim Nikolaevich — doctor of medical science, assistant professor. Oncology and Thoracic Surgery department, Kuban State Medical University. 350086, Krasnodar, 1 Maya St., 167. E-mail: vadimbodnya@rambler.ru.

Tserkovnaya Anna Alekseevna — oncologist, aspirant. Outpatient department, Clinical oncology hospital №1, Kuban State Medical University. 350051, Krasnodar, Dimitrova St., 146. E-mail: 5247024@gmail.com.