



## ЛОКАЛЬНЫЙ ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНТРАОКУЛЯРНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ НИКЕЛИДА ТИТАНА

© А. Н. Стеблюк<sup>1</sup>, Н. В. Колесникова<sup>2</sup>, В. Э. Гюнтер<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Краснодарский филиал ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова Минздрава России», Краснодар;

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России», Краснодар;

<sup>3</sup>НИИ медицинских материалов, 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 интраокулярной имплантации пористого никелида титана ТН-10. Установлено, что имплантация пористого никелида титана в качестве дренажного материала не отражается на локальном балансе провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, вызывая адекватное усиление продукции ИЛ1β, ИЛ2 и ИЛ10 к концу первой недели наблюдения, на фоне существенного ограничения синтеза провоспалительного ФНОα. Однако к концу мониторинга (через 30 дней) локальная концентрация ИЛ1β и ИЛ10 соответствуют таковым у контрольных интактных животных. Наряду с этим определенную значимость приобретают полученные данные о модулировании вызванного оперативным вмешательством дисбаланса в системе локальных про- и противовоспалительных цитокинов, отмечаемого на фоне интраокулярной имплантации никелида титана ТН-10.

✧ **Ключевые слова:** цитокины; интраокулярная имплантация; глаза животных; никелид титана.

В настоящее время некомпенсированная оперированная глаукома является наиболее частой разновидностью рефрактерной глаукомы. Несмотря на то, что традиционные гипотензивные операции достаточно эффективны, тем не менее длительность их позитивного действия при повторных вмешательствах заметно меньше, в сравнении с первично проведенными оперативными вмешательствами. Это обусловлено проблемой избыточного рубцевания в связи с воспалительной реакцией на операционную травму. Известны различные способы профилактики повторных хирургических вмешательств при глаукоме: применение цитостатиков, разработка различных операций без применения имплантатов, лазерные операции. Но наибольшее признание хирургов в лечении основных форм рефрактерной глаукомы получили методики с интрасклеральной имплантацией различных дренажей. Наиболее аргументированными в плане пролонгированности гипотензивного эффекта являются перфорирующие способы лечения данного заболевания, что повышает требования к биомеханическим свойствам дренажного материала. В НИИ медицинских материалов и имплантатов с памятью формы СФТИ при ТГУ (г. Томск) разработаны принципиально новые медицинские мате-

риалы, в том числе для офтальмологии. Это монолитные и пористые имплантаты с памятью формы на основе никелида титана, которые апробированы в некоторых разделах реконструктивной офтальмологии [1, 2]. Среди представленных материалов особый интерес в дренажной хирургии оперированной некомпенсированной глаукомы вызывают сверхэластичные с проницаемой пористостью имплантаты на основе никелида титана и монолитная нить (ТН-10). Данное обстоятельство послужило основанием для проведения иммунологических исследований с целью профилактики избыточного рубцевания после гипотензивных вмешательств в эксперименте на животных. Хорошо известная с середины прошлого века «иммунная привилегия» глаза Р. W. Medawar (1957), формируется за счет согласованной работы множества структурно-функциональных механизмов [6, 7]. В частности, иммунная обособленность органа зрения позволяет чужеродным тканям, помещенным внутрь глаза, находиться там достаточно долго, «незамеченными» иммунной системой. Одним из многих механизмов «иммунной привилегированности» является секреция цитокинов, факторов роста и нейропептидов во внутриглазных жидкостях, обуславливающая локальное иммуносупрессивное

и противовоспалительное микроокружение, т.е. способность предупреждать или подавлять выраженное внутриглазное иммунное воспаление. При этом в условиях патологии продукция указанных иммуносупрессивных факторов нарушается, что способствует развитию иммунно-опосредованного воспаления [3, 5]. Изложенное обуславливает целесообразность экспериментальной оценки содержания во влаге передней камеры (ВПК) про- и противовоспалительных цитокинов для контроля эффективности и безопасности интраокулярной имплантации дренажного материала на основе никелида титана.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования явилась влага передней камеры глаза экспериментальных животных (21 кролик породы Шиншилла обоего пола в возрасте до 2-х лет), взятая на 3, 7 и 30 сутки после интраокулярной имплантации пористого никелида титана ТН-10 (группа 1). Первую (контрольную) группу составили 6 интактных кроликов (группа 2), а также 5 кроликов, которым было произведено перфорирующее гипотензивное оперативное вмешательство без имплантации дренажного устройства (группа 3), составившие группу сравнения. Операции проводились под общим обезболиванием. Наркоз осуществлялся внутримышечным введением 0,4 мл раствора зоветила 100 на 1 кг массы животного, в инстилляциях — инокаин 0,4 %. Использовался имплантат на основе никелида титана ТН-10 в виде пористой пластины сечением 0,1–0,2 мм с 50–70 % пористости и размерами пор 100–400 мкм. Имплантат стерилизовался автоклавированием. Вводился интрасклерально, интракорнеально, во влагу передней камеры. Выполнялся разрез конъюнктивы на протяжении 5–6 мм, от лимба 6–7 мм с рассечением теноновой капсулы, проводилась отсепаровка конъюнктивы

в сторону лимба с последующим гемостазом. Из поверхностных слоев склеры выкраивался прямоугольный лоскут размером 4×4 мм основанием к лимбу. Из глубоких слоев склеры иссекался, таких же размеров, участок склеральной ткани и формировалось ложе для имплантата. Дно ложа формировалось с минимальной рельефностью над цилиарным телом. Имплантат размером 3,0×4,5 мм моделировался под выкроенное ложе и имплантировался с выведением в переднюю камеру на 0,5 мм, после вскрытия передней камеры по ширине имплантата копьевидным ножом. Шов на склере, на конъюнктиву накладывали непрерывный шов из монолитной нити на основе никелида титана (ТН-10) сечением 45 мкм. В исследуемой биологической жидкости (влага передней камеры глаза) экспериментальных животных всех групп оценивали содержание цитокинов (ИЛ1β, ФНОα, ИЛ2, ИЛ10) методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем ООО «Цитокин» (г. Санкт-Петербург) на анализаторе «ASCENT» (Финляндия). Методика статистического анализа включала расчёт 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 ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование локальной продукции цитокинов в ВПК глаза кроликов опытной группы относительно таковой у интактных животных показало неоднозначные достоверные их изменения (табл. 1).

Обращает на себя внимание тот факт, что само по себе оперативное вмешательство приводит к изменению содержания цитокинов у экс-

Таблица 1

Изменение цитокинов влаги передней камеры глаза кроликов в динамике наблюдения после имплантации пористого никелида титана ( $M \pm m, p$ )

Группа	Имплантация пористого никелида титана (группа 1, $n = 21$ )				
	ИЛ1β, пкг/мл	ФНОα, пкг/мл	ИЛ2, пкг/мл	ИЛ10, пкг/мл	ИЛ1β + ФНОα + ИЛ2/ИЛ10, у.е.
3 сут.	$2,58 \pm 0,30\#$	$2,85 \pm 0,93^*$	$10,51 \pm 2,57^*\#$	$8,77 \pm 1,09\#$	$1,81 \pm 0,20\#$
7 сут.	$3,61 \pm 0,42^*$	$3,86 \pm 1,16^*$	$18,67 \pm 3,31^*\#$	$13,69 \pm 2,08^*$	$1,90 \pm 0,28\#$
30 сут.	$2,86 \pm 0,44\#$	$1,52 \pm 0,69^*$	$12,60 \pm 2,11^*\#$	$7,82 \pm 0,97$	$2,20 \pm 0,19\#$
Контроль, интактные кролики (группа 2, $n = 6$ )					
	$2,40 \pm 0,21$	$5,91 \pm 0,63$	$6,83 \pm 0,86$	$7,80 \pm 2,20$	$1,94 \pm 0,19$
Группа сравнения — оперированные кролики без имплантации никелида титана (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.	$3,69 \pm 0,45^*$	$1,61 \pm 0,22^*$	$5,04 \pm 0,48^*$	$7,52 \pm 0,93^*$	$1,51 \pm 0,21^*$

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

периментальных животных. В частности, отмечен противоположный характер изменений провоспалительных цитокинов — ИЛ1 $\beta$  (достоверное увеличение в 1,5 раза против фоновых значений) и ФНО $\alpha$  (достоверное снижение в 3 раза), отмечаемый во все сроки исследования) (табл. 1). Между тем содержание противовоспалительного ИЛ-10 после оперативного вмешательства значительно возрастает, причем, наиболее выражено (в 2,4 раза) — уже на третьи сутки наблюдений, тогда как достоверное снижение содержания регуляторного ИЛ-2 наблюдается лишь в поздние сроки после оперативного вмешательства (7–30 сутки).

Исследованиями показано, что концентрация провоспалительного цитокина ИЛ1 $\beta$  в самые ранние сроки (через 3 суток) и в конце мониторинга (через 30 суток) после интраокулярной имплантации пористого никелида титана имела лишь незначительную тенденцию к увеличению относительно фонового контроля, тогда как в конце первой недели после имплантации его содержание было достоверно увеличено в 1,5 раза.

Уровень содержания провоспалительного цитокина ФНО $\alpha$  был ниже контрольного во все сроки наблюдения, однако наиболее выраженное снижение (в 3,9 раза) имело место в конце мониторинга (на 30-е сутки). Это позволяет предположить, что наблюдаемый характер изменения сывороточного содержания ИЛ1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  обусловлен не интраокулярной имплантацией, а непосредственным оперативным вмешательством.

Характер изменения регуляторного цитокина ИЛ-2 свидетельствовал о существенном увеличении его концентрации во все сроки наблюдения, но максимально — на 7-е сутки относительно контроля и группы сравнения.

Что касается оценки содержания противовоспалительного цитокина ИЛ10 — продукта активированных Тх-2-клеток, то его динамика свидетельствует о достоверном увеличении сывороточной концентрации данного цитокина лишь на 7 сутки от начала эксперимента, тогда как в более ранние сроки (3 сутки) имеет место сдерживание нарастания данного показателя, вызванного оперативным вмешательством, в присутствии ТН-10 (табл. 1). Сходный характер изменений отмечен и в отношении ИЛ1 $\beta$ , концентрация которого во все сроки наблюдения после оперативного вмешательства достоверно возрастает относительно контроля, однако при имплантации ТН-10 достоверное превышение нормы выявлено лишь на 7 день наблюдения (табл. 1).

Расчёт провоспалительного индекса (ПВИ) по отношению суммы провоспалительных цитокинов (ИЛ1 $\beta$  + ФНО $\alpha$  + ИЛ2) к противовоспалительному ИЛ10, показал, что во все сроки наблюдения после интраокулярной имплантации ТН-10 величина его была в пределах нормы интактных животных (рис. 1, табл. 1). При этом поддержка баланса про- и противовоспалительных цитокинов как в ранние, так и поздние сроки наблюдения обусловлена разнонаправленным характером изменений таких провоспалительных цитокинов, как ИЛ1 $\beta$ , ИЛ2 и ФНО $\alpha$ . Так при общей активации продукции

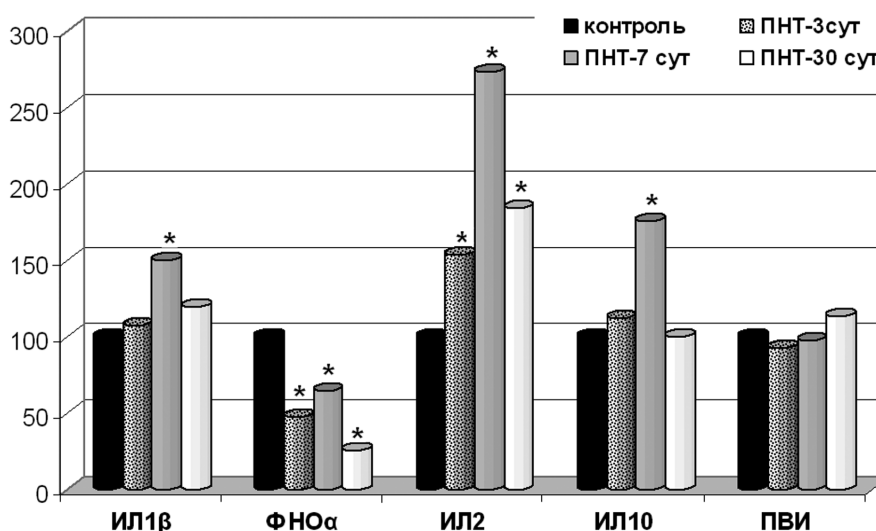


Рис. 1. Влияние интраокулярной имплантации пористого никелида титана на содержание цитокинов во влаге передней камеры глаза кроликов и их соотношения в динамике наблюдений (в % от контроля). \* — достоверность отличий от контроля ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,02$ )

ИЛ1 $\beta$  и ИЛ2, наиболее выраженной на 7-е сутки мониторинга, содержание ФНО $\alpha$  было значительно ниже контрольного, максимально — к 30-му дню наблюдения.

Между тем сопоставление данных по величине ПВИ основной экспериментальной группы с группой сравнения свидетельствует о достоверном возрастании указанного соотношения цитокинов в самые ранние сроки после имплантации ТН-10 (3 сутки), что может быть обусловлено более высоким уровнем ИЛ2 (в 1,7 раза) и существенно сниженным содержанием противовоспалительного ИЛ10 (в 2,1 раза), обусловленным экспериментальной имплантацией ТН-10 (табл. 1).

Оценивая общее клиническое состояние кроликов, используемых в эксперименте, необходимо констатировать, что у большинства животных послеоперационный период при имплантации ТН-10 клинически протекал ареактивно. Между тем наблюдались редкие случаи заболевания животных вирусной инфекцией после 3-х суток (у 9,5 %), сохраняющиеся до 7-х суток у 4,2 % животных. К концу мониторинга заболевшие животные были здоровы, за исключением 1 погибшего кролика после 3-х суток наблюдения, а у одного — послеоперационный период осложнился экссудативной реакцией в виде появления нитей фибрина в передней камере, что сопровождалось резким увеличением концентрации ИЛ1 $\beta$  (7,39 пкг/мл против среднegrupповой величины  $2,58 \pm 0,30$  пкг/мл). Поскольку цитокины весьма чувствительны к вирусной инфекции [5], а также участвуют в активации системы гемостаза, образцы ВПК больных животных были исключены из общего дизайна исследования.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализируя полученные данные в целом, следует заключить, что интраокулярная имплантация пористого никелида титана экспериментальным кроликам в качестве дренажного материала не отражается на локальном балансе провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, вызывая адекватное усиление продукции ИЛ1 $\beta$ , ИЛ2 и ИЛ10 к концу первой недели наблюдения, на фоне существенного ограничения синтеза провоспалительного ФНО $\alpha$ . Однако к концу мониторинга (через 30 дней) локальная концентрация ИЛ1 $\beta$  и ИЛ10 соответствуют таковым у контрольных интактных животных. Наряду с этим определённую значимость приобретают полученные данные о модулировании вызванного оперативным вмешательством дисбаланса в системе локальных про- и противовоспалительных цитокинов, отмечаемого на фоне интраокулярной имплантации ТН-10. При этом наблюдаемое наиболее выражен-

ное снижение провоспалительного ФНО $\alpha$  следует расценивать как прогностически благоприятный признак, поскольку данному цитокину сегодня отводится ведущая роль в развитии воспаления глаза [4] а сохраняющийся высокий уровень ИЛ2 свидетельствует о возможном усилении цитотоксического потенциала клеточного иммунитета на местном уровне у опытных животных и обуславливает безопасность и целесообразность интраокулярного и конъюнктивального использования данного материала с целью профилактики избыточного рубцевания после гипотензивных вмешательств.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Ерёмко А. И., Стеблюк А. Н. Оперированная некомпенсированная глаукома // Российский офтальмологический журнал. — 2011. — Т. 4, № 2. — С. 14–19.
2. Запускалов И. В., Гюнтер В. Э., Стеблюк А. Н. и соавт. Медицинские материалы и имплантаты с памятью формы. Том 14. Имплантаты с памятью формы в офтальмологии. — Томск, 2012. — 189 с.
3. Маркова Е. В., Климова Т. В. Анатомия, физиология и патология органа зрения. Иммунологические аспекты глазных заболеваний: учебное пособие / Новосибирск: изд. НГПУ, 2010.
4. Слепова О. С., Герасименко В. А., Макаров П. В. и соавт. Сравнительное исследование роли цитокинов при разных формах глазных заболеваний // Вестн. офтальмол., 1998. — Т. 114, № 3. — С. 28–32.
5. Hoang-Xuan T., Bauduin C., Creuzot-Garcher C. Inflammatory Diseases of the Conjunctiva // New York: Thime, 2001. — 172 p.
6. Mondal S. K. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma in conjunctiva // Indian J. Pathol. Microbiol. — 2008. — Vol 51, N 3. — P. 407–408.
7. Nichols J. E., Niles G. A., Roberts N. G. Human lymphocytes apoptosis after exposure to influenza A virus // J. Virol. — 2001. — Vol. 75, N 13. — P. 5921–5929.

## LOCAL CYTOKINE STATUS OF EXPERIMENTAL ANIMALS AT EXPERIMENTAL INTRAOCULAR IMPLANTATION OF TITANIUM NICKELIDE

*Steblyuk A. N., Kolesnikova N. V., Gyunther V. E.*

✧ **Summary.** An assessment of the level of pro- (IL1 $\beta$ , FNO $\alpha$ , IL2) and anti-inflammatory (IL10) cytokines in the intraocular fluid of experimental animals at 3, 7 and 30 days after experimental intraocular implantation of porous titanium nickelide TN-10 was carried out. It was found that the implantation of porous titanium nickelide as drainage material does not impact the pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines' local balance. It does cause an increase of IL1 $\beta$ , IL2 and IL10 production to the end of the first week of monitoring as well as a substantial limitation of anti-

inflammatory FNO $\alpha$  synthesis. However at the end of the 30 day monitoring period, local IL1 $\beta$  and IL10 concentrations corresponded to those of control animals. At the same time, of some significance are obtained data upon a modulation of a caused by the surgical procedure disbalance in the system of local pro- and anti-inflammatory cytokines which is observed at the titanium nickelide TN-10 intraocular implantation. .

✧ **Key words:** cytokines; intraocular implantation; animal eyes; titanium nickelide.

---

*Сведения об авторах:*

**Стеблюк Алексей Николаевич** — к. м. н., врач-офтальмолог. Краснодарский филиал ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова Минздрава России». 350012, Краснодар, ул Красных партизан, д. 6. E-mail: okocntr@mail.kuban.ru.

**Колесникова Наталья Владиславовна** — д. б. н., профессор. Кафедра иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС. ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России. 350063, Краснодар, ул Седина, д. 4. E-mail: troickaya@rambler.ru.

**Понтер Виктор Эдуардович** — д. т. н., профессор. Директор НИИ медицинских материалов. 634034, Томск, ул 19 Гвардейской дивизии, д. 17. E-mail: guntsme@elefot.tsu.ru.

**Steblyuk Aleksey Nikolayevich** — MD, PhD, ophthalmologist S. N. Fyodorov Eye Microsurgery Complex, Krasnodar Branch. 350012, Krasnodar, Krasnykh partizan St., 6, Russia. E-mail: okocntr@mail.kuban.ru.

**Kolesnikova Natalya Vladislavovna** — doctor of biology science, professor. Kuban State Medical University. 350063, Krasnodar, Sedina St., 4, Russia. E-mail: troickaya@rambler.ru.

**Gyunter Viktor Eduardovich** — doctor of technical science, professor. Research Institute of Shape Memory Material under Siberian Physico-technical Institute and Tomsk State University. 634034, Tomsk, 19 Gvardeyskoy divizii St., 17, Russia. E-mail: guntsme@elefot.tsu.ru.