УДК 617.7-007.681-092:612.017.1

ЛОКАЛЬНАЯ ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ В РАННИЕ И ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ДЕСТРУКЦИИ ЦИЛИАРНОГО ТЕЛА КРИОАППЛИКАТОРОМ ИЗ НИКЕЛИДА ТИТАНА

© А.Н. Стеблюк, Н.В. Колесникова, В.Э. Гюнтер, В.Н. Бодня, А.А. Церковная, Л.И. Амбарцумян

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

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 циклодеструкции 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 отдаленные сроки исследования (1,5 года).

АКТУАЛЬНОСТЬ

Более полувека назад в офтальмологии специализировалось клиническое направление, занимающееся вопросами диагностики и лечения опухолей органа зрения, его придаточного аппарата и орбиты. Это обусловлено высокой ответственностью, т. к. в малых объемах глаза и орбиты сконцентрировано большое многообразие важных для зрительных функций анатомических структур. Учитывается особенность, когда опухоли данной локализации обладают большим полиморфизмом, и это обстоятельство усложняет проведение лечебных мероприятий, сохраняющих зрительные функции. Основной задачей в деле профилактики патологических очаговых образований, в т. ч. и злокачественных опухолей, сводится к активному выявлению и лечению больных на ранних стадиях заболевания, при небольших объемах патологически измененных тканей. И наиболее успешным методом лечения при подобных состояниях может явиться криогенное вмешательство автономным аппликатором из пористо-проницаемого никелида титана, несмотря на высокий уровень микрохирургического оснащения в офтальмологии. Создание в НИИ медицинских материалов и имплантатов с памятью формы СФТИ при ТГУ (г. Томск) криоаппликаторов нового поколения позволило значительно повысить качество криолечения за счет более четкой локализации процесса отвода тепла (криовоздействия) измененных тканей. Аппликаторы автономные, длительно сохраняют криогенные свойства, приводят к получению сверхнизкой «азотной» температуры на поверхности объекта и не прилипают к тканям. Применяя криовоздействие, можно полностью разрушить патологические клетки в заданном объеме живой ткани, не повредив окружающие клетки. Локальное криовоздействие, как правило, безболезненное. Очаг крионекроза обладает своеобразной «биологической инертностью» и вызывает самую минимальную перифокальную реакцию. Блокируются мелкие сосуды, обуславливая «гемостатический эффект» замораживания. Очаги криодеструкции довольно быстро заживают, не вызывая грубых рубцов, и дают лучший лечебный эффект [1]. Перспективны научные исследования, где возможно применение автономных криоаппликаторов, изготовленных из пористо-проницаемого никелида титана, отличающихся новыми свойствами. Изучение показателей иммунологической реактивности при травмировании глаза различной этиологии, в т. ч. и операции, позволяет обнаружить ее изменения как на системном, так и на локальном уровне, среди которых гиперпродукция провоспалительных цитокинов коррелирует с тяжестью течения посттравматического периода [2–3]. 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 [4–5].

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 (ИЛ1β, ФНОα, 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 экс-

периментальной 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 лазерное вмешательство (группа-3). Метод иммуноферментного анализа проводился с использованием тест-систем ООО «Цитокин» (г. 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 с. Возвращали склеральный козырек в исходное положение. Накладывали непрерывный шов на конъюнктиву из монолитной нити на основе никелида титана (ТН-10) сечением 45 мкм. В соседнем секторе глазного яблока выполнялась прямая криоциклодеструкция по описанной методике, или трансконъюнктивальная 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 хладоагентом в течение минуты. Температура рабочей части криоаппликатора составляет –200 °С, он обладает большой теплоемкостью, малой теплопроводностью и создает условия мгновенного воздействия на биологическую ткань. Наполненный жидким азотом инструмент из пористого никелида титана сохраняет температуру, близкую к температуре кипения азота 1–1,5 мин., 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 – ИЛ1β (достоверное увеличение в 1,5 раза против фоновых значений) и ФНОα (достоверное снижение в 3 раза), отмечаемый во все сроки исследования); выявлено увеличение содержания ИЛ-10, наиболее выраженное на 3 сутки после операции (в 2,4 раза), тогда как снижение содержания ИЛ-2 отмечено лишь в поздние сроки мониторинга (7, 30 сутки). Выявленный характер изменений обусловливает необходимость сравнения полученных данных в основной опытной группе, не только с фоновым контролем, но и с группой сравнения.

Так, выявленное достоверное повышение провоспалительного ИЛ1β во все сроки наблюдения после прямой циклодеструкции цилиарного тела криоаппликатором из никелида титана обусловлено непосредственным оперативным вмешательством, тогда как концентрация ФНОα достоверно превышала уровень такового как в контроле, так и в группе сравнения во все сроки наблюдения (табл. 1, рис. 1).

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)				
	ИЛ1β, пкг/мл	ФНОα, пкг/мл	ИЛ2, пкг/мл	ИЛ10, пкг/мл	ИЛ1β + ФНОα + + ИЛ2/ИЛ10, у. е.
3 сут.	3,83 ± 0,28*	7,34 ± 1,03*#	9,16 ± 1,15*#	13,10 ± 1,44*#	1,55 ± 0,28#
7 сут.	3,35 ± 0,49*	8,65 ± 1,11*#	16,40 ± 1,43*#	14,23 ± 1,27*#	2,01 ± 0,34#
30 сут.	3,72 ± 0,37*	7,03 ± 0,98#	16,30 ± 1,58*#	15,00 ± 1,62*#	1,65 ± 0,21
3 мес.	6,01 ± 0,48*#	5,30 ± 0,60#	10,50 ± 0,96*#	6,82 ± 0,70#	3,20 ± 0,28*#
1,5 года	2,90 ± 0,15#	6,48 ± 0,55	17,90 ± 1,45*	6,69 ± 0,65#	4,08 ± 0,50*#
Контроль, интактные кролики (группа 2, n = 6)					
Фон	2,40 ± 0,21	5,91 ± 0,63	6,83 ± 0,86	7,80 ± 2,20	1,94 ± 0,19
Группа сравнения – оперированные кролики (группа 3, n = 5)					
3 сут.	3,63 ± 0,38*	1,59 ± 0,24*	6,21 ± 0,67	18,50 ± 2,31*	0,97 ± 0,14*
7 сут.	3,82 ± 0,49*	2,55 ± 0,34*	4,49 ± 0,54*	10,68 ± 2,47*	1,13 ± 0,19*
30 сут.	3,69 ± 0,45*	1,61 ± 0,22*	5,04 ± 0,48*	7,52 ± 0,93*	1,51 ± 0,21*
3 мес.	5,56 ± 0,62*	7,11 ± 0,85*	7,98 ± 0,95	8,35 ± 0,85	1,52 ± 0,18
1,5 года	3,32 ± 0,40	6,80 ± 0,65	18,43 ± 1,75*	9,80 ± 0,85*	2,90 ± 0,32

Примечание: * – достоверность отличий от контроля; # – достоверность отличий от группы сравнения.

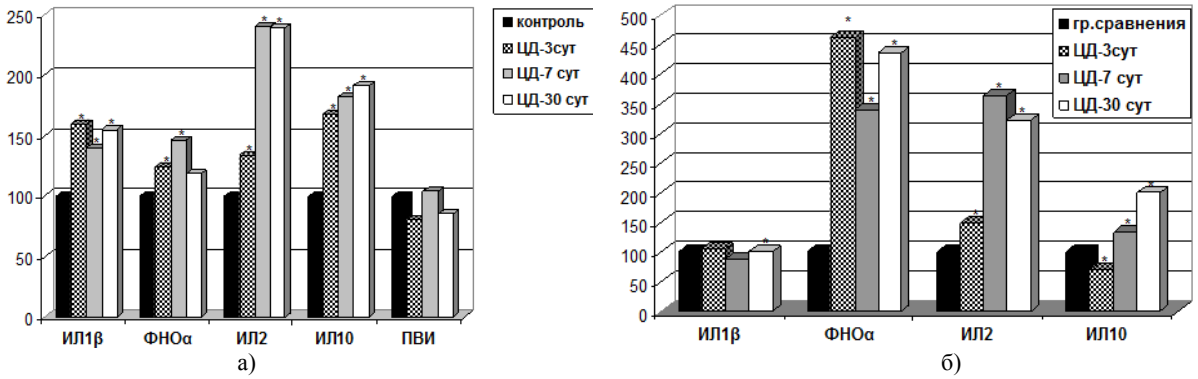

Рис. 1. Влияние деструкции цилиарного тела криоаппликатором из никелида титана на содержание цитокинов во влаге передней камеры глаза кроликов и их соотношения в динамике наблюдений: а) в % от контроля; б) в % от группы сравнения. * – достоверность отличий от контроля ($p < 0,01$; $p < 0,02$)

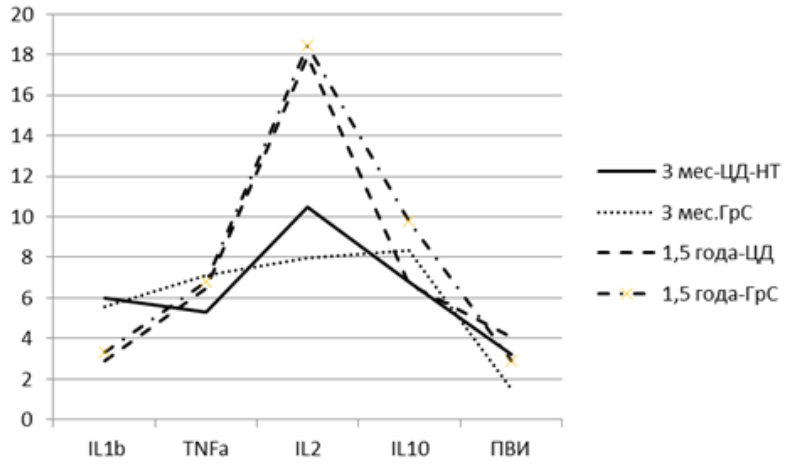

Рис. 2. Влияние деструкции цилиарного тела криоаппликатором из никелида титана на соотношение про- и противовоспалительных цитокинов во влаге передней камеры глаза кроликов в динамике наблюдений: ЦД-НТ – деструкции цилиарного тела криоаппликатором из никелида титана; ГрС – группа сравнения

Увеличение уровня содержания провоспалительного ИЛ2 и противовоспалительного – ИЛ10 у животных опытной группы было более выражено по сравнению с 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 ФНОа 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 7 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 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, необходимо констатировать, что у большинства послеоперационный период клинически протекал ареактивно, а клинические проявления (высыпания в области придаточного аппарата глаза) единичных случаев вирусной инфекции у животных к концу мониторинга были полностью купированы. При этом известная высокая чувствительность цитокинов к вирусным антигенам [6] явилась основанием для исключения образцов ВПК больных животных из общего дизайна исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, 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 циклодеструкции 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 счет усиления продукции противовоспалительного ИЛ10, с сохранением данного эффекта в наиболее отдаленные 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.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Мельник Д.Д., Гюнтер В.Э., Дамбаев Г.Ц. и др.* Медицинские материалы и имплантаты с памятью формы. Пористо-проницаемые криоаппликаторы из никелида титана в медицине. Томск: Изд-во «НПП МИЦ», 2010. Т. 9. 304 с.
2. *Керимов К.Т., Джафаров А.И., Гахраманов Ф.С.* Ожоги глаз: патогенез и лечение. М.: РАМН, 2005. 462 с.
3. *Слепова О.С., Герасименко В.А., Макаров П.В. и др.* Сравнительное исследование роли цитокинов при разных формах глазных заболеваний // Вестн. офтальмол. 1998. Т. 114. № 3. С. 28-32.
4. *Mondal S.K.* Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma in conjunctiva // Indian J. Pathol. Microbiol. 2008. V. 51. № 3. P. 407-408.
5. *Nichols J.E., Niles G.A., Roberts N.G.* Human lymphocytes apoptosis after exposure to influenza A virus // J. Virol. 2001. V. 75. № 13. P. 5921-5929.
6. *Hoang-Xuan T., Bauduin C., Creuzot-Garcher C.* Inflammatory Deseases of the Conjunctiva. N. Y.: Thime, 2001. 172 p.

Поступила в редакцию 6 февраля 2015 г.

Steblyuk A.N., Kolesnikova N.V., Gunther V.E., Bodnya V.N., Tserkovnaya A.A., Ambartsumyan L.I. LOCAL PRODUCTION OF CYTOKINES IN EARLY AND LONG-TERM PERIODS AFTER EXPERIMENTAL DESTRUCTION OF CILIARY BODY WITH NICKELID TITANIUM CRYOAPPLICATOR

The assessment of level of the contents pro - (IL1β, FNOα, IL2) and anti-inflammatory (IL10) cytokine in moisture of the anterior camera of an eye with laboratory animals on the 3rd, 7th and 30th days after an experimental destruction of a ciliary body with porous nickelid titanium cryoapplicator has been carried out. It is established that reliable changes of the contents cytokine at local level are reflection of reactivity of an organism of laboratory animals both on surgery in a ciliary body, and on its experimental ciklodestruction the cryoapplicator from nickelid titanium. Prevalence of pro-inflammatory cytokines in the capacity of early (3–7 day) periods, and the normalization of the balance of pro- and anti-inflammatory cytokines in the late (30 days) periods of observation by increasing the production of anti-inflammatory IL-10 effect in maintaining long-term period of study (1.5 years) .

Key words: ciliary body; cryosurgery; nickelid titanium; laboratory animals.

Стеблюк Алексей Николаевич, Краснодарский филиал МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова, г. Краснодар, Российская Федерация, кандидат медицинских наук, врач-офтальмолог, e-mail: troickaya@rambler.ru

Steblyuk Aleksey Nikolaevich, Academician S.N. Fyodorov FSBI IRTC “Eye Microsurgery”, Krasnodar branch, Krasnodar, Russian Federation, Candidate of Medicine, Ophthalmologist, e-mail: troickaya@rambler.ru

Колесникова Наталья Владиславовна, Кубанский государственный медицинский университет, г. Краснодар, Российская Федерация, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки, e-mail: troickaya@rambler.ru

Kolesnikova Natalya Vladislavovna, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation, Doctor of Biology, Professor, Professor of Immunology, Allergology and Laboratory of Diagnostics Department of Professional Development and Professional Retraining Faculty, e-mail: troickaya@rambler.ru

Гюнтер Виктор Эдуардович, Научно-исследовательский институт медицинских материалов и имплантатов с памятью формы Сибирского физико-технического института при Томском государственном университете, г. Томск, Российская Федерация, доктор технических наук, профессор, директор, e-mail: troickaya@rambler.ru

Gunther Viktor Eduardovich, Scientific-research Institute of Medical Materials and Implants with Memory of Form of Siberian Physical-Technical Institute under Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation, Doctor of Technics, Professor, Director, e-mail: troickaya@rambler.ru

Бодня Вадим Николаевич, Кубанский государственный медицинский университет, г. Краснодар, Российская Федерация, доктор медицинских наук, доцент кафедры онкологии с курсом торакальной хирургии факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки, e-mail: vadimbodnya@rambler.ru

Bodnya Vadim Nikolaevich, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation, Doctor of Medicine, Associate Professor of Oncology with Course of Thoracic Surgery Department of Professional Development and Professional Retraining Faculty, e-mail: vadimbodnya@rambler.ru

Церковная Анна Алексеевна, Клинический онкологический диспансер № 1 Министерства здравоохранения Краснодарского края, г. Краснодар, Российская Федерация, врач-онколог диспансерно-поликлинического отделения; Кубанский государственный медицинский университет, г. Краснодар, Российская Федерация, аспирант, кафедра онкологии с курсом торакальной хирургии факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки, e-mail: 5247024@gmail.com

Tserkovnaya Anna Alekseevna, Clinical Oncologic Dispensary № 1 of Ministry of Public Health of Krasnodar territory, Krasnodar, Russian Federation, Oncologist of Dispensary-Policlinic Department; Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation, Post-graduate Student, Oncology with Course, of Thoracic Surgery Department of Professional Development and Professional Retraining Faculty, e-mail: 5247024@gmail.com

Амбарцумян Лора Исаковна, Кубанский государственный медицинский университет, г. Краснодар, Российская Федерация, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник кафедры иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки, e-mail: troickaya@rambler.ru

Ambartsumyan Lora Isakovna, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation, Candidate of Medicine, Senior Scientific Worker of Immunology, Allergology and Laboratory of Diagnostics Department of Professional Development and Professional Retraining Faculty, e-mail: troickaya@rambler.ru