

## ЦИТОКІНОВИЙ ПРОФІЛЬ КРОВІ ТА ВОДЯНИСТОЇ ВОЛОГИ ЗА УМОВИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ МЕХАНІЧНОЇ НЕПРОНИКНОЇ ТРАВМИ РОГІВКИ

*В експериментах на кролях при модельованій непроникній механічній травмі рогівки встановлено активацію цитокінопродукування через 7 діб патологічного процесу, тоді як на початку моделювання травми рогівки відмічали зниження рівнів ФНП- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ), ІЛ-1 $\beta$  й ІЛ-6 як у водянистій волозі, так і в сироватці крові. Зменшення цитокінів у перші доби пошкодження, на нашу думку, пов'язане з цитокіновою ареаактивністю внаслідок порушень у системі імунорегуляції. Підвищення вмісту прозапальних цитокінів через 14 діб експериментальної непроникної механічної травми рогівки вказує на компенсаторну активацію клітинної ланки імунітету. При порівнюванні цитокінового профілю в обох біологічних рідинах встановлено, що локальне ураження за умови непроникної механічної травми рогівки є більш значущим, ніж її системні прояви.*

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **травма, рогівка, прозапальні цитокіни.**

ВСТУП. Травматизм органа зору залишається актуальною проблемою офтальмології, оскільки займає перше місце у структурі причин первинної інвалідності по зору в багатьох країнах світу [11, 14]. Епідеміологічні дослідження вказують на зростання травматизму очей, що пов'язано, на думку ряду авторів, зі збільшенням числа жителів сільської місцевості, погіршенням економічної і воєнно-політичної ситуації [4, 12, 13]. Дані В. А. Шаїмової свідчать про те, що дослідники в галузі офтальмології довели провідну роль цитокінів в імунопатогенезі захворювань очей як активних біорегуляторів запальних і репаративних процесів [10]. Дослідник вказує на те, що рівень цитокінів у вогнищі запалення може відрізнятися від їх вмісту в циркулюючій крові, оскільки локальне ураження часто може бути більш значущим, ніж його системні прояви. За даними О. С. Слепової, принцип локальності порушується при патологіях, які супроводжуються генералізованою активацією імунної системи [9].

Тому метою даного дослідження було з'ясувати роль прозапальних цитокінів, зокрема фактора некрозу пухлин- $\alpha$  (ФНП- $\alpha$ ), інтерлейкінів 1 $\beta$  і 6 (ІЛ-1 $\beta$  та ІЛ-6) у водянистій волозі та периферичній крові експериментальних тварин у патогенезі механічної непроникної травми рогівки.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експериментальні дослідження проводили на статевозрілих

кролях породи Шиншила масою від 2,5 до 3,0 кг згідно з Женевською конвенцією "International Guiding principles for Biochemical research involving animals" (Женева, 1990) та Загальними принципами експериментів на тваринах, ухваленими на Національному конгресі з біоетики (Київ, 2001). Кролі отримували повноцінне збалансоване харчування і перебували в належних санітарно-гігієнічних умовах віварію ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України".

Експериментальну модель пошкодження рогівки відтворювали на обох очах тварини під місцевою епібульбарною анестезією 0,5 % розчином алкаїну та ретробульбарною анестезією 2 % розчином лідокаїну (1,0 мл). Трепаном діаметром 7 мм у верхній половині рогівки наносили концентричну епітеліальну насічку, в межах якої одноразовим офтальмологічним скальпелем видаляли епітелій разом із переднім шаром строми рогівки (викроювали клапоть товщиною до 0,2 мм). Контроль відтворення ерозії здійснювали методом фарбування рогівки 0,5 % розчином флуоресцеїну.

Тварин поділили на п'ять груп: контрольна група – інтактні тварини (10 кролів); 1-ша дослідна група – термін спостереження через 3 доби після травми (10 кролів); 2-га дослідна група – через 7 днів після травми (10 кролів); 3-тя дослідна група – через 14 днів після травми (10 кролів); 4-та дослідна група – термін спостереження через 21 день після травми (10 кролів).

За умов тіопентало-натрієвого знеболювання (25 мг/кг) у кролів з крайової вени вуха забирали кров, після чого тварин виводили з експерименту методом повітряної емболії. Рівні ФНП- $\alpha$ , ІЛ-1 $\beta$  й ІЛ-6 визначали імуноферментним методом на аналізаторі STAT-Fax за допомогою стандартних методик [8].

Статистичну обробку результатів виконано у відділі системних статистичних досліджень університету в програмному пакеті Statsoft STATISTIKA з використанням непараметричних методів оцінки одержаних даних. Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії і помилки середньої (m).

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Згідно з даними досліджень, за фізіологічних умов ФНП- $\alpha$  є імунорегулятором процесів проліферації і диференціювання різних типів клітин, основним медіатором апоптозу [5]. Ця молекула проявляє різноманітні біологічні ефекти, стимулюючи продукування інших прозапальних цитокінів (ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-8). Результати проведеного нами дослідження вказали на те, що через 3 доби моделювання патологічного про-

цесу рівень ФНП- $\alpha$  у сироватці крові вірогідно зменшився на 24,6 % і практично не змінився до 7-ї доби. У 3-й дослідній групі концентрація ФНП- $\alpha$  була вищою на 14,5 %, у 4-й – на 27,3 % стосовно показників контрольної групи. Потрібно відмітити статистично значиме зростання рівня досліджуваного цитокіну в сироватці крові через 14 діб (в 1,5 раза) відносно даних 2-ї дослідної групи з максимальними показниками через 21 добу (табл. 1). У водянистій волозі передньої камери ока кролів з механічною непроникною травмою рогівки через 3 доби відзначали зниження рівня ФНП- $\alpha$  на 39,9 % проти контрольних значень ( $p < 0,05$ ) з наступним поверненням до норми через 7 діб. У 3-й і 4-й дослідних групах рівень досліджуваного цитокіну був вищим, відповідно, на 51,2 та 86,6 % відносно контролю (табл. 1). При порівнюванні отриманих даних у двох біологічних рідинах виявлено односпрямоване зниження рівня ФНП- $\alpha$  через 3 доби дослідження, що вказує, на нашу думку, на послаблення в системі імунорегуляції. Через 14 діб ФНП- $\alpha$  як у водянистій волозі, так і в сироватці крові різко зростав та продовжував підвищуватися до 21-ї доби, проявляючи патологічну дію (рис.).

Таблиця 1 – Рівень ФНП- $\alpha$  (пг/мл) у водянистій волозі й сироватці крові кролів при механічній непроникній травмі рогівки (M $\pm$ m)

Контрольна група (n=10)	1-ша дослідна група (n=10)	2-га дослідна група (n=10)	3-тя дослідна група (n=10)	4-та дослідна група (n=10)
Сироватка крові				
11,43 $\pm$ 0,45	8,65 $\pm$ 0,22*	8,62 $\pm$ 0,29*	13,09 $\pm$ 0,25*	14,55 $\pm$ 0,53*
		p>0,05	p<0,05	p<0,05
Водяниста волога				
1,42 $\pm$ 0,15	0,85 $\pm$ 0,03*	1,43 $\pm$ 0,09	2,14 $\pm$ 0,12*	2,64 $\pm$ 0,08*
		p<0,05	p<0,05	p<0,05

Примітки. Тут і в наступних таблицях:

- \* – достовірність відмінностей між контрольною і дослідними групами ( $p < 0,05$ ).
- p – достовірність відмінностей між дослідними групами.

ІЛ-1 є системою з трьох цитокінів ІЛ-1 $\alpha$ , ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-1Ra та двох рецепторів R1 і R2, домінує при цьому багатфункціональний ІЛ-1 $\beta$ . Він ініціює та регулює запальні, імунні процеси, активує нейтрофіли, Т- і В-лімфоцити, стимулює синтез білків гострої фази, ІЛ-4, ІNF- $\gamma$ , ФНП- $\alpha$ , фагоцитоз, гемопоез, проліферацію ендотеліальних клітин, проникність судинної стінки, цитотоксичну і бактерицидну активність [2, 3].

Встановлено, що у щурів 1-ї експериментальної групи рівень ІЛ-1 $\beta$  у сироватці крові й водянистій волозі односпрямовано мав тенденцію до зниження, тоді як через 7 діб спостереження практично не відрізнявся від контролю,

що може бути зумовлено його інгібуванням іншими цитокінами або саморегулюванням (табл. 2). У 3-й і 4-й дослідних групах рівень досліджуваного цитокіну був вищим, відповідно, на 36,5 і 49,1 % у сироватці крові та на 37,4 і 51,0 % у водянистій волозі відносно контролю ( $p < 0,05$ ) (табл. 2). Порівнюючи отримані дані, можна говорити про однакову динаміку ІЛ-1 $\beta$  як на локальному, так і на системному рівнях (рис.).

ІЛ-6 належить до цитокінів запалення, оскільки він є сигнальним агентом для активації та диференціації цитотоксичних Т-клітин, а також індукує синтез білків гострої фази тканинного ураження [15]. Доведено, що

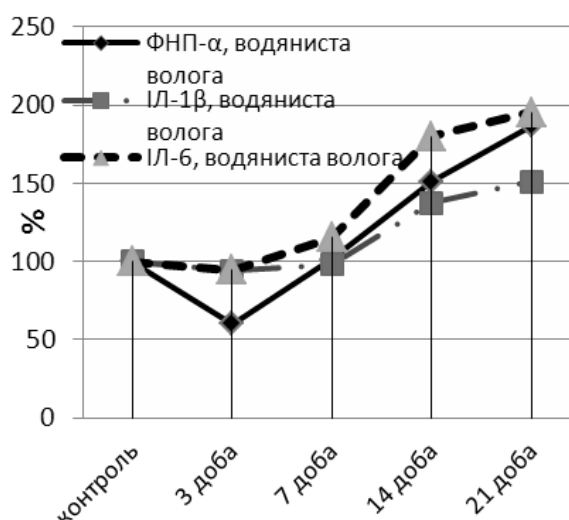
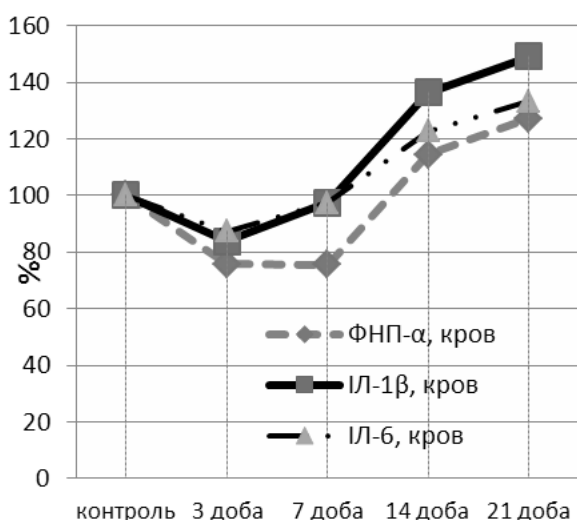


Рис. Динаміка прозапальних цитокінів сироватки крові та водянистої вологи при експериментальній механічній непроникній травмі рогівки.

активація ІЛ-6 має велике значення у розвитку запальної реакції на поверхні ока і в процесах загоєння рани [1]. Встановлено, що у щурів 1-ї експериментальної групи рівень ІЛ-6 як у сироватці крові, так і у водянистій волозі мав тенденцію до зниження, тоді як через 7 днів спостереження практично не відрізнявся від контролю (табл. 3). У 3-й і 4-й дослідних групах рівень

досліджуваного цитокіну був вищим, відповідно, на 22,6 і 33,3 % у сироватці крові та на 80,0 і 95,5 % у водянистій волозі відносно контролю ( $p < 0,05$ ) (табл. 3). Порівнюючи отримані дані, можна говорити про однакову динаміку ІЛ-6 як на локальному, так і на системному рівнях зі значно вищими показниками у водянистій волозі (рис.).

Таблиця 2 – Рівень ІЛ-1β (пг/мл) у водянистій волозі й сироватці крові кролів при механічній непроникній травмі рогівки (M±m)

Контрольна група (n=10)	1-ша дослідна група (n=10)	2-га дослідна група (n=10)	3-тя дослідна група (n=10)	4-та дослідна група (n=10)
Сироватка крові				
1,59±0,09	1,33±0,08	1,55±0,12	2,17±0,10*	2,37±0,09*
		p>0,05	p<0,05	p>0,05
Водяниста волога				
1,55±0,10	1,46±0,11	1,52±0,07	2,13±0,09*	2,34±0,07*
		p>0,05	p<0,05	p>0,05

Таблиця 3 – Рівень ІЛ-6 (пг/мл) у водянистій волозі й сироватці крові кролів при модельованій механічній непроникній травмі рогівки (M±m)

Контрольна група (n=10)	1-ша дослідна група (n=10)	2-га дослідна група (n=10)	3-тя дослідна група (n=10)	4-та дослідна група (n=10)
Сироватка крові				
1,59±0,09	1,39±0,11	1,55±0,11	1,95±0,09*	2,12±0,08*
		p>0,05	p<0,05	p>0,05
Водяниста волога				
1,10±0,08	1,04±0,08	1,27±0,08	1,98±0,12*	2,15±0,07*
		p>0,05	p<0,05	p>0,05

Відомо, що розвиток будь-якого патологічного процесу супроводжується підвищенням концентрації ФНП-α, ІЛ-1β та ІЛ-6 [6]. Продуктування цитокінів має активаційний характер і забезпечує інформаційний обмін між клітина-

ми, які залучені в запальний процес. При протективних варіантах запального процесу цитокіни переважно утворюються у вогнищі запалення, а їх надходження у системний кровотік зумовлене гострофазною відповіддю, стрес-

реакцією нейроендокринної системи, лейкоцитозом тощо [7]. У нашому дослідженні встановлено активацію цитокинопродукування через 7 діб патологічного процесу, тоді як на початку моделювання травми рогівки відмічали зниження рівнів ФНП- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ), ІЛ-1 $\beta$  й ІЛ-6 як у водянистій волозі, так і в сироватці крові. Зниження цитокинів у перші доби пошкодження, на нашу думку, пов'язане з цитокиновою ареактивністю внаслідок порушень у системі імунорегуляції. Підвищений вміст прозапальних цитокинів при експериментальній непроникній механічній травмі рогівки вказує на компенсаторну активацію клітинної ланки імунітету за умови порушеного гематофтальмологічного бар'єру, що супроводжується генералізованою активацією імунної системи. Встановлено вагомий внесок досліджуваних цитокинів у патогенезі непроникної механічної травми рогівки, проте ключовим імуномедіатором вважаємо ФНП- $\alpha$ . Порівнюючи цитокиновий профіль в обох біологічних рідинах, встановили, що локальне ураження за умови непроникної механічної травми рогівки є більш значущим, ніж її системні прояви.

**ВИСНОВКИ.** 1. Експериментальна непроникна механічна травма рогівки супроводжується зниженням рівня прозапальних цитокинів (ФНП- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ), ІЛ-1 $\beta$  й ІЛ-6) у водянистій волозі й сироватці крові протягом перших трьох діб пошкодження, що вказує на порушення у системі імунорегуляції.

2. Гіперпродукування прозапальних цитокинів через 14 діб спостереження у водянистій волозі (ФНП- $\alpha$  – на 51,2 %, ІЛ-1 $\beta$  – на 37,4 % й ІЛ-6 – на 80,0 %) і сироватці крові кролів (відповідно, на 14,5, 36,5 і 22,6 %) при непроникній механічній травмі рогівки з максимумом через 21 день може відігравати важливу роль у розвитку даного процесу.

3. Враховуючи вищі показники прозапальних цитокинів у водянистій волозі, можна стверджувати, що локальне ураження за умови непроникної механічної травми рогівки є більш значущим, ніж її системні прояви.

У перспективі буде досліджено взаємозв'язок між рівнями цитокинів, клітинного й гуморального імунітету, пероксидного окиснення ліпідів за умови експериментальної непроникної механічної травми рогівки в динаміці.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Захарова И. А. Изучение интерферонового статуса при проникающих ранениях глазного яблока / И. А. Захарова, В. Ю. Махмутов, Д. О. Найдюк // РМЖ. – 2004. – № 3. – С. 102.
- Зяблов Е. В. Закономерности изменений цитокинового статуса у больных фолликулярной и папиллярной формами рака щитовидной железы в динамике распространения неоплазии / Е. В. Зяблов, Н. П. Чеснокова, В. Ю. Барсуков // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 5. – С. 62–67.
- Кельцев В. А. Взаимосвязь цитокинового профиля и цитолиза у детей с хроническим вирусным гепатитом В / В. А. Кельцев, О. В. Чурбакова // Саратов. науч.-мед. журн. – 2011. – 7, № 2. – С. 461–465.
- Максимов И. Б. Диагностика и лечебная тактика при современных боевых огнестрельных повреждениях глаз / И. Б. Максимов // Тезисы докладов VII съезда офтальмологов России. – М., 2000. – Т. 2. – С. 87.
- Марущак М. І. Закономірності змін цитокинового статусу в бронхоальвеолярному змиві щурів за умови гострого ураження легень / М. І. Марущак // Шпит. хірургія. – 2012. – № 2. – С. 39–42.
- Мозговая Л. А. Эффективность лечения хронического генерализованного пародонтита с использованием инфракрасного лазерного света / Л. А. Мозговая, Д. В. Шмидт, А. Ю. Новиков // Стоматология. – 2012. – 90, № 6. – С. 10–11.
- Особенности развития острофазного ответа и цитокинемии при системной воспалительной реакции инфекционного и неинфекционного генеза / Д. А. Левит, И. Н. Лейдерман, Е. Ю. Гусев, А. Л. Левит // Инфекция в хирургии. – 2007. – № 1. – С. 33–37.
- Сенников С. В. Методы определения цитокинов / С. В. Сенников, А. Н. Силков // Цитокины и воспаление. – 2005. – 4, № 1. – С. 22–27.
- Слепова О. С. Патогенетическая роль цитокинов при различных заболеваниях глаз как основа для прогнозирования и выбора тактики иммунокорригирующего лечения / О. С. Слепова // Росс. офтальмол. журн. – 2008. – № 3. – С. 36–42.
- Шаимова В. А. Роль провоспалительных цитокинов при заболеваниях глаз / В. А. Шаимова // Цитокины и воспаление. – 2005. – 4, № 2. – С. 13–15.
- Эфендиев Н. М. Морфогистохимические и биофизические исследования экспериментального гемофтальма / Н. М. Эфендиев // Вестн. офтальмологии. – 1998. – № 1. – С. 16–17.
- Epidemiology of the mechanical eye injuries / M. Jovanovic, D. Vukovic, S. Glisic, M. Knezevic // Srpski Oftalmol. Arhiv. – 2004. – 1. – P. 62–71.
- Mechanical injuries of the eye / A. Potockova, P. Strmen, V. Krasnik, Z. Olah // Bratisl. Lek. Listy. – 2010. – № 111 (6). – P. 329–335.
- Naik B. S. A study on socio demographic profile of patients attending government hospital

tirupati with mechanical ocular injuries / B. S. Naik, Sushma, S. R. Dudala // International Journal of Research in Health Sciences. – 2013. – 1, Iss. 1. – P. 28–33.

15. Yoon K. C. Interleukin-6 and Tumor Necrosis factor- $\alpha$  levels in tears with dry eye syndrome / K. C. Yoon, I. Y. Jeong, S. Y. Yang // Cornea. – 2007. – 26, № 4. – P. 431–437.

**Н. В. Турчин**

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

## **ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ КРОВИ И ВОДЯНИСТОЙ ВЛАГИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕХАНИЧЕСКОЙ НЕПРОНИКАЮЩЕЙ ТРАВМЕ РОГОВИЦЫ**

### **Резюме**

*В экспериментах на кроликах при моделируемой непроникающей механической травме роговицы установлено активацию цитокинопродукции через 7 суток патологического процесса, тогда как изначально при моделировании травмы роговицы отмечали снижение уровней ФНО- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ), ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6 как в водянистой влаге, так и в сыворотке крови. Уменьшение цитокинов в первые сутки повреждения, по нашему мнению, связано с цитокиновой ареактивностью вследствие нарушений в системе иммунорегуляции. Повышение содержания провоспалительных цитокинов через 14 суток экспериментальной непроникающей механической травмы роговицы указывает на компенсаторную активацию клеточного звена иммунитета. При сравнении цитокинового профиля в обоих биологических жидкостях установлено, что локальное поражение при непроникающей механической травме роговицы является более значимым, чем ее системные проявления.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** травма, роговица, провоспалительные цитокины.

**M. V. Turchyn**

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

## **CYTOKINE PROFILE OF BLOOD AND AQUEOUS HUMOR IN CASE OF EXPERIMENTAL CORNEAL MECHANICAL NONPENETRATIVE INJURY**

### **Summary**

*In experiments on rabbits with corneal mechanical nonpenetrative injury was found the activation of cytokine production after 7 days of the pathological process, while during the first 3 days of trauma was noted lower levels of TNF- $\alpha$  ( $p < 0.05$ ), IL-1 $\beta$  and IL-6 in both aqueous humor and serum. Reduction of cytokines in the early days of injury, in our opinion, is associated with cytokine areactivity which due to disturbances in the system of immunoregulation. Increase of proinflammation cytokines after 14 days of experimental nonpenetrative mechanical injury of the cornea indicates a compensatory activation of cellular immunity. Comparing the cytokine profile in both biological fluids was found that local lesions in case of nonpenetrative mechanical injury of the cornea is more important than its systemic manifestations.*

**KEY WORDS:** trauma, cornea, proinflammation cytokines.

Отримано 07.07.14

**Адреса для листування:** М. В. Турчин, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна.