

Влияние аутологичных мононуклеаров крови на регенераторные процессы при стромальных повреждениях роговицы в эксперименте

Левченко Н.А., Кривошеина О.И.

Influence of blood autologous mononuclear on regenerative processes at stromal corneal damages to experiment

Levchenko N.A., Krivosheina O.I.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Левченко Н.А., Кривошеина О.И.

В эксперименте *in vivo* изучены закономерности регенерации повреждений роговицы на фоне интрастромального введения аутологичных мононуклеаров крови. Показано, что локальное применение мононуклеарных клеток значительно уменьшает продолжительность и выраженность воспалительного процесса и, как следствие, ускоряет процесс регенерации поврежденной роговичной ткани.

Ключевые слова: экспериментальное повреждение стромы роговицы, цитокины, мононуклеарные клетки крови.

In experiment *in vivo* laws of regeneration of damages of a cornea on background intrastromal introductions of autologous mononuclear blood are studied. It is proved, that local application of mononuclear cells significantly reduces the duration and expressiveness of inflammatory process and as consequence, is accelerated process of regeneration of the damaged corneal tissue.

Key words: experimental damage to the stroma, cytokines, mononuclear blood cells.

УДК 617.713-001-003.93-035:616-008.853.3:57.08

Введение

Медико-социальная значимость воспалительных заболеваний глаз определяется их чрезвычайно высокой распространенностью, а также тяжелыми зрительными исходами [3, 8]. Несмотря на применение самой современной медикаментозной терапии, часто воспалительный процесс в роговице носит торпидный, затяжной характер, а гнойные язвы роговицы отличаются агрессивным течением и часто приводят к гибели глаза вследствие эндофтальмита [3, 4].

Трудности лечения воспалительных заболеваний роговицы связаны с ростом количества резистентных к антибиотикам штаммов микроорганизмов, а также наличием у таких больных тех или иных нарушений в иммунной системе, что и обуславливает необходимость поиска новых методов лечения данной патологии.

В последние годы результаты исследований многих офтальмологов доказали ведущую роль цитокинов

в иммунопатогенезе заболеваний глаз как активных биорегуляторов воспалительных и регенераторных процессов [2, 5, 6, 9]. Цитокины, вырабатываемые преимущественно мононуклеарами крови, представляют собой единую самостоятельную систему регуляции функций организма, обеспечивающую развитие защитных реакций и поддержание гомеостаза при внедрении патогенов и нарушении целостности тканей [7]. На местном уровне цитокины ответственны за все последовательные этапы развития адекватного ответа на внедрение инфекционного агента, обеспечение его удаления, а также за восстановление структуры поврежденной ткани [7, 13].

Цель исследования — в эксперименте *in vivo* изучить регенераторные процессы повреждений роговицы на фоне интрастромального введения аутологичных мононуклеаров крови.

Материал и методы

Выполнена серия экспериментов на 20 кроликах породы Шиншилла массой тела 2,5—4,0 кг. В условиях операционной под наркозом каждому животному выполнялась тотальная дезэпителизация роговицы и механическое повреждение стромы и эндотелия роговой оболочки одного из глаз. В зависимости от способа лечения, которое начинали через сутки после индуцированного повреждения роговой оболочки, животные были разделены на две группы (в каждой по 10 особей).

Животным основной группы наряду с инстилляциями раствора ципролета 6 раз и корнерегеля 3 раза в день в строму роговицы однократно вводили аутологичные мононуклеары крови. Мононуклеары, взятые из крови экспериментального животного непосредственно перед манипуляцией, выделяли методом фракционирования в градиенте плотности (1,067—1,077 г/мл) на разделяющем растворе фикокол-верографина [5]. Чистота клеток составляла 96—98%. Жизнеспособность клеточного материала оценивали в тесте с трипановым синим. Окрашенные (погибшие) элементы составляли 1,5—2%, что не превышало допустимое (не более 3%) количество.

Животным группы сравнения после повреждения роговицы выполнялись только инстилляции ципролета 6 раз и корнерегеля 3 раза в день.

Общая продолжительность эксперимента составила 21 сут. В ходе эксперимента проводились наружный осмотр, биомикроскопия переднего отрезка глазного яблока для оценки динамики клинической картины, флюоресцентная проба для оценки степени эпителизации роговицы, фоторегистрация. Забор материала производился на 3, 7, 14, 21-е сут от начала эксперимента. Из каждой группы с помощью глубокого наркоза выводили по два животных с последующей энуклеацией обоих глаз. Забой экспериментальных животных осуществляли с соблюдением правил и норм, прописанных в директивах Европейского сообщества (86/609 ЕЕС) и Хельсинкской декларации. Полученный материал фиксировали для световой микроскопии. В качестве фиксирующей смеси использовали жидкость Карнуа. После приготовления парафиновых срезов препараты окрашивали гематоксилином и эозином и по методу ван Гизона. Морфологическое исследование включало подсчет клеточных элементов в окулярной рамке на площади 900 мкм².

Цифровой материал обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики с расчетом

среднего арифметического значения M и ошибки среднего m . Для оценки достоверности различий при сравнении средних величин использовали непараметрический критерий Манна—Уитни. Статистически значимыми считали различия при уровне $p < 0,05$.

Результаты

Анализ экспериментального изучения эффективности интрастромального введения аутологических мононуклеаров крови при сочетанном лечении язв роговицы выявил следующие показатели. Средний срок купирования воспаления у животных основной группы сократился в отличие от группы сравнения в 1,7 раза ($p < 0,05$), составив $(9,2 \pm 0,2)$ и $(16,3 \pm 0,2)$ сут соответственно. Резорбция перифокального отека и инфильтрация стромы роговицы ускорились на 42%, завершившись к $(9,5 \pm 0,2)$ сут. В группе сравнения данный процесс завершился лишь к $(17,2 \pm 0,2)$ сут ($p < 0,05$). Эпителизация роговицы у животных основной группы наступила в достоверно более ранние сроки, чем в группе сравнения, $(7,2 \pm 0,2)$ и $(11,0 \pm 0,2)$ сут соответственно ($p < 0,05$).

На фоне интрастромального введения аутологических мононуклеаров крови при лечении повреждений роговицы отмечено сокращение числа осложнений заболевания в 5 раз. Так, у животных основной группы лишь в 1 глазу (10%) наблюдалось развитие десцеметоцеле. У животных группы сравнения развитие десцеметоцеле наблюдалось в 3 глазах (30%), в 2 глазах (20%) возникла перфорация роговицы, завершившаяся в исходе субатрофией глазного яблока.

В ходе морфологических исследований получены следующие данные.

На 3-и сут от начала эксперимента у животных основной группы эпителий роговицы был представлен 5—6 слоями плоских клеток. Подлежащая пограничная мембрана визуализировалась на всем протяжении. Основное вещество роговой оболочки содержало пучки коллагеновых волокон, расположенных несколько неупорядоченно. В строме отмечалась диффузная мононуклеарная инфильтрация ($(96,0 \pm 1,0)$ клетки в поле зрения), занимающая около трети толщины роговицы. Десцеметова мембрана и эндотелий определялись не на всем протяжении.

У животных группы сравнения эпителий роговицы был представлен дистрофически измененными

эпителиоцитами. Передняя пограничная мембрана визуализировалась не на всем протяжении. Подлежащая строма роговицы характеризовалась выраженным отеком, коллагеновые волокна в ней располагались в виде рыхлой сети. В области лимба воспалительная инфильтрация была представлена преимущественно большим количеством полиморфно-ядерных лейкоцитов ($95,0 \pm 1,0$) клетки в поле зрения). Эндотелий роговицы на большем протяжении десквамирован. Просвет передней камеры глаза заполнен оксифильными массами с примесью лимфоцитов и лейкоцитов.

На 7-е сут у животных основной группы эпителий роговицы был представлен 5—6 слоями плоских клеток. Базальные эпителиоциты активно пролиферировали. Передняя пограничная мембрана хорошо визуализировалась на всем протяжении. В строме роговицы ход коллагеновых пучков становился упорядоченным. В области лимба сохранялось диффузное скопление мононуклеарных фагоцитов ($78,0 \pm 1,0$) клеточного элемента в поле зрения) и обнаруживались единичные расширенные сосуды краевой петливой сети. Эндотелий роговицы сохранялся практически на всем протяжении и был представлен одним слоем пролиферирующих эпителиоцитов.

У животных группы сравнения клетки эпителия располагались в 6—7 слоев и имели кубическую форму. На поверхности эпителия обнаруживались очаговые отложения фибрина. В области лимба поверхностный слой эпителиоцитов характеризовался выраженными дистрофическими изменениями: клетки содержали в цитоплазме светлые вакуоли, оттеснявшие ядра к периферии. В передней трети стромы отмечалось уменьшение отека, в задней части роговицы пучки коллагеновых волокон были расслоены отечной жидкостью и имели волнообразный ход. В собственном веществе роговой оболочки обнаруживались полинуклеарные ($68,4 \pm 1,0$) клетки в поле зрения) и мононуклеарные фагоциты ($23,7 \pm 0,1$) клетки), а также тонкостенные новообразованные сосуды. Эндотелий роговицы представлял собой один ряд плоских клеток, местами был слущен.

На 14-е сут у животных основной группы эпителий роговицы содержал 4—5 слоев плоских клеток. При этом эпителиоциты базального слоя имели кубическую форму, в ядрах единичных из них наблюдались митозы. В строме роговицы отмечалось умень-

шение численности мононуклеаров ($27,0 \pm 0,1$) клеточного элемента в поле зрения), которые располагались в виде очаговых скоплений вблизи лимба. Строма роговицы содержала упорядоченно расположенные пучки коллагеновых волокон. Эндотелий был представлен одним слоем призматических клеток.

У животных группы сравнения эпителий роговицы состоял из 4—5 слоев плоских клеток, базальные эпителиоциты имели высокопризматическую форму и гиперхромные ядра. В задней трети стромы собственное вещество роговицы было гомогенным, при этом дифференцировать волокнистые структуры не представлялось возможным вследствие деструкции основного вещества. В области лимба в строме роговицы обнаруживались сосуды, некоторые из них имели утолщенную стенку за счет циркулярного расположения гладких миоцитов, что свидетельствует о формировании артериол. В клеточном составе преобладали мононуклеарные фагоциты ($59,4 \pm 0,1$) клетки в поле зрения), располагающиеся в виде скоплений вокруг сосудов. Количество полиморфноядерных лейкоцитов сокращалось до ($15,3 \pm 0,2$) клетки.

На 21-е сут у животных основной группы эпителий роговицы содержал 4—5 слоев плоских клеток. Передняя и задняя пограничные мембраны определялись на всем протяжении. В области лимба сохранялась незначительная мононуклеарная инфильтрация ($5,3 \pm 0,2$) клетки в поле зрения). Строма роговицы имела нормальное строение и была представлена упорядоченно расположенными коллагеновыми волокнами (рис. 1).



Рис. 1. Упорядоченно расположенные коллагеновые волокна стромы роговицы у животного основной группы на 21-е сут после механического повреждения роговой оболочки и интрастромального

введения аутологических мононуклеаров крови. Окраска гематоксилином

и эозином. Ув. 150

У животных группы сравнения эпителий роговицы имел нормальное строение. Передняя пограничная мембрана определялась на всем протяжении, однако была несколько утолщенной. На уровне передних двух третей стромы отмечались активное образование коллагеновых волокон и новообразованные сосуды, вокруг которых сохранялись очаговые скопления мононуклеарных клеток ($(14,5 \pm 0,1)$ клетки в поле зрения). В задней трети стромы сохранялись отек и гомогенизация волокон, дифференцировать волокнистые структуры или ядра клеток было невозможно (рис. 2).

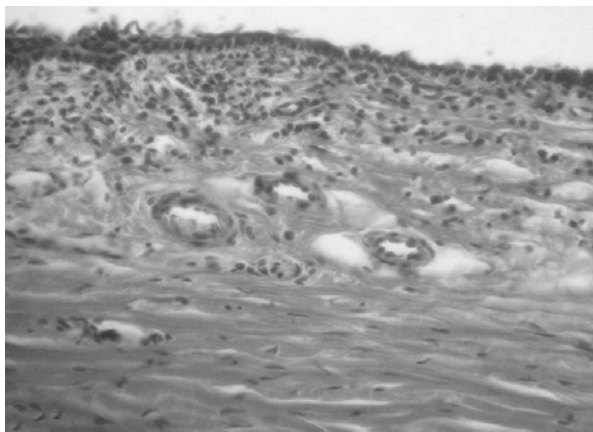


Рис. 2. Сохраняется утолщение передней пограничной мембраны, отек и гомогенизация коллагеновых волокон в задней трети стромы роговицы у животного группы сравнения на 21-е сут после механического повреждения роговой оболочки. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 150

Обсуждение

Цитокины представляют сложную сеть иммуномедиаторов (порядка двухсот), которые регулируют и определяют природу иммунного ответа [1, 2, 6]. В норме цитокины вырабатываются редко, являясь медиаторами иммунного ответа, пролиферации и регенерации. Продукентами цитокинов, как правило, являются клетки моноцитарно-макрофагального ряда. Стимуляция их продукции происходит в ответ на действие инфекционного агента, при этом цитокины действуют по каскадному принципу [1, 2, 5, 7, 11—13].

При интрастромальном введении аутологических мононуклеаров крови при заболеваниях роговицы создается локально высокая концентрация клеток данной

популяции в патологическом очаге, что позволяет направленно воздействовать на определенные стадии патологического процесса.

Можно предположить, что благодаря действию таких провоспалительных цитокинов, как интерлейкины-1, -6, -8, фактор некроза опухолей α и α -интерферон, происходит рекрутирование в очаг воспаления полиморфно-ядерных лейкоцитов с развитием респираторного взрыва, стимуляцией дегрануляции, индукцией синтеза и секреции лизосомальных ферментов, формированием аутокринного пути регуляции клеток [2, 5, 10, 12, 13].

Вследствие функциональной кооперации экзогенно введенных мононуклеарных клеток и мигрирующих под их влиянием полинуклеарных фагоцитов в патологическом очаге существенно ускоряется смена клеточных фаз и переход воспаления в фазу репарации, что подтверждается результатами экспериментального исследования. Установлено, что повреждение роговицы на фоне интрастромального введения аутологических мононуклеаров крови сопровождается развитием менее выраженной местной воспалительной реакции в сравнении с традиционным лечением. Так, например, клеточная плотность инфильтрации в зоне повреждения у кроликов основной группы начиная с 7-х сут была в 1,2 раза меньше, чем у животных группы сравнения ($p < 0,05$). Такая тенденция сохранялась в течение всего периода наблюдений, и на 14-е сут данный показатель был в 2,8 раза, на 21-е сут — в 2 раза меньше, чем у животных группы сравнения ($p < 0,05$).

Необходимо отметить, что фибропластический процесс, который находится под контролем множества механизмов, зарождается в недрах клеточной инфильтрации в очаге воспаления. Прежде всего фибропластический процесс зависит от структурно-функциональных параметров самих фибробластов, а также от формирующихся сложных каскадов межклеточных взаимодействий. Среди них важная роль принадлежит тандему макрофаг — фибробласт и триаде лимфоцит — макрофаг — фибробласт [2]. Связующей фигурой в указанных взаимодействиях является макрофаг. Мононуклеары, как отмечалось выше, представляют собой источник многочисленных биорегуляторов, в том числе факторов, стимулирующих пролиферацию и другие функции фибробластов [2, 7, 12, 13]. Это обеспечивает один из центральных меха-

низмов подключения фибробластов к репаративным процессам.

Морфологически макрофагально-фибробластические взаимодействия ведут к миграции и ускоренной пролиферации фибробластов, их дифференцировке и продукции компонентов экстрацеллюлярного матрикса [12, 13], что обеспечивает закрытие дефекта стромы соединительной тканью и формирование в исходе заболевания грубого помутнения роговицы. Однако в зависимости от меняющихся по ходу воспалительного процесса условий мононуклеары за счет коллагенолитических ферментов и других гидролаз могут также участвовать в резорбции межуточного вещества, способны секретировать факторы, стимулирующие продукцию коллагеназы в фибробластах, и факторы, усиливающие фагоцитоз фибрилл фиброкластами [2, 12, 13].

В связи с этим можно предположить, что дополнительное экзогенное поступление в патологический очаг мононуклеарных клеток способствует включению механизмов подавления избыточного разрастания соединительной ткани, обеспечивая тем самым сопряжение воспаления и регенерации. Одновременно усиливается и феномен фиброклазии, что обеспечивает ремоделирование и инволюцию вновь образованной соединительной ткани, что проявляется формированием меньшего по площади и интенсивности помутнения роговицы.

Заключение

На основании проведенных экспериментальных исследований показано, что на фоне интрастромального введения аутологичных мононуклеаров крови и традиционной фармакотерапии при повреждениях стромы роговицы значительно уменьшается продолжительность и выраженность воспалительного процесса и, как следствие, ускоряется процесс регенерации поврежденной роговичной ткани.

Литература

1. Акберова С.И., Тазулахова Э.Б. Влияние индуктора интерферона на продукцию цитокинов у больных с герпетическими поражениями // Сб. статей науч.-практ. конф. «Современные методы диагностики и лечения заболеваний роговицы и склеры». М., 2007. Т. 2. С. 193—197.

2. Бикбов М.М., Шевчук Н.Е. Цитокины в офтальмологии. Уфа, 2008. 152 с.
3. Душин Н.В., Фролов М.А., Гончар П.А. Межслойная кератопластика в лечении кератоконуса // Сб. статей науч.-практ. конф. «Современные методы диагностики и лечения заболеваний роговицы и склеры». М., 2007. Т. 2. С. 26—28.
4. Душин Н.В., Фролов М.А., Гончар П.А. Кератопластика при воспалительных и дистрофических поражениях роговицы // Федоровские чтения-2009: сб. тез. науч.-практ. конф. М., 2009. С. 494—495.
5. Каспаров А.А. Современные методы лечения герпесвирусного кератита // Сб. статей науч.-практ. конф. «Современные методы диагностики и лечения заболеваний роговицы и склеры». М., 2007. Т. 1. С. 270—277.
6. Каспаров А.А. Современные методы лечения тяжелых инфекционных заболеваний роговицы // Тез. докл. IX съезд офтальмологов России. М., 2010. С. 296—298.
7. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008. 552 с.
8. Либман Е.С., Шахова Е.В. Слепота и инвалидность вследствие патологии органа зрения // Вестн. офтальмол. 2006. № 1. С. 35—37.
9. Майчук Ю.Ф. Современные возможности диагностики и терапии инфекционных поражений глазной поверхности // Тез. докл. IX съезд офтальмологов России. М., 2010. С. 338—340.
10. Петрушенко Д.А., Недзвецкая О.В. Изменение цитокинового статуса сыворотки крови при токсической нейроретинопатии // Сб. науч. статей V Всероссийской науч. конф. молодых ученых «Актуальные проблемы офтальмологии». М., 2010. С. 150—151.
11. Сидоренко Е.И., Макарова Е.Ю. Применение препарата «Тобрек» в лечении инфекционных заболеваний глаз // Новое в офтальмологии. 2005. № 3. С. 36—38.
12. Слепова О.С. Патогенетическая роль цитокинов при различных заболеваниях глаз как основа для прогнозирования и выбора тактики иммунокорректирующего лечения // Рос. офтальмол. журн. 2008. № 3. С. 36—42.
13. Шаимова В.А. Роль провоспалительных цитокинов при заболеваниях глаз // Цитокины и воспаление. 2005. Т. 4, № 2. С. 13—15.

Поступила в редакцию 12.04.2011 г.

Утверждена к печати 01.06.2011 г.

Левченко Н.А., Кривошеина О.И.

Влияние аутологических мононуклеаров крови на регенераторные процессы...

Сведения об авторах

Н.А. Левченко — врач-офтальмолог, соискатель кафедры офтальмологии СибГМУ (г. Томск).

О.И. Кривошеина — д-р мед. наук, профессор кафедры офтальмологии СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Кривошеина Ольга Ивановна, тел. 8 (3822) 41-76-15, факс 8 (3822) 41-19-19; e-mail oikr@yandex.ru