

УДК 617.713-08:612.017.1:612.649.011.87:615.014.41

Е.Н. Свідко, П.А. Борисов, М.В. Останков, Н.А. Бондарович, Ю.А. Демін

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, г. Харків

ИНТЕРФЕРОНОВЫЙ СТАТУС И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ КОРДОВОЙ КРОВИ В ЛЕЧЕНИИ ПОВРЕЖДЕНИЯ РОГОВИЦЫ

Для обоснования эффективности применения криоконсервированной кордовой крови человека в лечении лимбальной недостаточности роговицы был исследован уровень интерферонов α и γ . Для исследования цитокинов были выбраны сыворотка крови и слезная жидкость как наиболее доступные и атравматичные при заборе биологические субстраты. В экспериментальной работе было показано, что применение криоконсервированной кордовой крови человека с антибиотиком восстанавливает показатели цитокинов интерферона- α и интерферона- γ в сыворотке крови и слезной жидкости у кроликов при лечении лимбальной недостаточности роговицы.

Ключевые слова: лимбальная недостаточность роговицы, криоконсервированная кордовая кровь человека, цитокины интерферон- α и интерферон- γ , сыворотка крови, слезная жидкость.

В последние годы в литературе появились сообщения об участии в раневом процессе цитокинов, которые являются посредниками межклеточных взаимодействий, регулирующих иммунный ответ, клеточный цикл в различных тканях, участвуют во многих физиологических и патологических процессах. К ним относят гемопоэтические факторы роста, интерфероны, лимфокины, монокины, хемокины и др. [1–3].

Показано, что при физиологическом состоянии спектр их действия узок, но при стрессе, воспалении, повреждении и других патологических состояниях расширяется количественный и качественный состав цитокинов, обладающих как местной, так и дистантной (гормональной) активностью [4, 5].

Цитокины продуцируются различными клетками: эндотелиоцитами, кератиноцитами, фибробластами, макрофагами, нейтрофилами, лимфоцитами, тромбоцитами, стромальными и другими клетками. Действие их реализуется по сетевому принципу, т. е. передаваемая клеткой информация содержится не в индивидуальном пептиде, а в наборе регуляторных цитокинов. При этом цитокины действуют в отношениях либо синергизма, либо

антагонизма, каскадно индуцируют выработку друг друга, трансмодулируют поверхностные рецепторы к другим медиаторам [6, 7].

Стимулирующее или ингибирующее действие цитокинов осуществляется посредством связывающих их с большим количеством рецепторов на поверхности клеток. Количество рецепторов цитокинов на клетке-мишени значительно варьирует в зависимости от цитокина. Одни и те же цитокины могут выполнять различные функции. Этот феномен объясняется нейротропностью и полифункциональностью действия цитокинов, а также множеством клеток-мишеней, на которые они действуют. Показано также, что различные цитокины могут выполнять одну функцию [8].

Л.В. Ковал'чук с соавт. [9, 10] предполагают, что влияние комплекса цитокинов на reparативные процессы обусловлено торможением воспалительных процессов за счет угнетения миграции клеток, участвующих в воспалительных реакциях к очагу повреждения из зоны лимба, а также повышением пролиферативной активности фибро- и кератобластов.

R. Lang с соавт. (2003) было показано, что активация рецепторов при повреждении эпи-

© Е.Н. Свідко, П.А. Борисов, М.В. Останков и др., 2014

телия приводит к активации провоспалительных цитокинов интерлейкина 6, 8, фактора некроза опухолей-альфа и этот цитокиновый комплекс играет большую роль в развитии воспалительной реакции и процессах заживления раны [11]. Нарастание количества повреждений органа зрения побуждает исследователей к поиску новых средств и способов лечения глаза с учетом патогенеза раневого процесса [12].

Трансплантация фетальных клеток, культуры эпителия стромальных и эндотелиальных клеток, выращенных из ткани роговицы 14–22-недельных эмбрионов человека, на роговицу с помощью контактной линзы, инсталляции их или инъекции под конъюнктиву у больных с эрозиями роговицы, ожогами конъюнктивы с некрозом, язвами роговицы различного генеза, эпителиально-эндотелиальной дистрофией роговицы способствовала ускорению эпителизации роговичного дефекта, восстановлению кровотока конъюнктивы при ее ожогах, уменьшению отека роговицы [13, 14]. Положительный эффект в плане ускорения регенерации отмечен и при сочетании фетальных клеток с актовегином [15]. В последние годы появились сообщения об участии в заживлении ран различных факторов роста и стимуляции регенерации эпителия под влиянием цитокинов, в частности, интерферона [12, 16]. Сведения об изучении интерферонового статуса у пациентов с ожогами роговицы отсутствуют. В связи с этим, учитывая важную роль цитокинов, к которым относят и интерферон, в процессах воспаления, регенерации и развития иммунного ответа, мы решили изучить состояние интерферонового статуса у кроликов с индукцией экспериментальной лимбальной недостаточности роговицы (ЛНР).

Учитывая, что в ответ на развитие ЛНР происходит изменение в состоянии местного и общего иммунитета, мы решили изучить показатели ИФН- α и ИФН- γ в сыворотке крови и слезной жидкости при ожогах роговицы, а также разработать способ лечения с включением криоконсервированной кордовой крови человека (кККЧ).

Целью данной работы явилось изучение уровня интерферона- α и интерферона- γ в сыворотке крови и слезной жидкости и повы-

шение эффективности лечения у кроликов с индукцией лимбальной недостаточности роговицы введением криоконсервированной кордовой крови человека.

Материал и методы. Экспериментальная работа была проведена на кролях-самцах породы шиншилла массой 2,0–2,5 кг (n=38; 76 пар глаз) в возрасте 6 месяцев в соответствии с правилами «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, используемых в научных целях» (Страсбург, 1985), одобренными Национальным конгрессом Украины по биоэтике (Киев, 2003).

Для обоснования применения кККЧ при лечении ЛНР была выбрана экспериментальная модель ЛНР, разработанная Миллюдиным [17], в нашей модификации. В отличие от метода Миллюдина наш метод является более гуманным, так как у кроля не иссекали третье веко, выполняющее защитную функцию и способствующее снижению болевого синдрома у животного, что является важным при проведении экспериментальной работы. Все манипуляции выполняли под местной анестезией роговицы кролика, которую проводили с применением проксиметакаина в 0,5 % концентрации (препарат «Алкан», производство фирмы Alcon).

Кордовую кровь человека криоконсервировали в одноразовых пластиковых пробирках по двухэтапной программе на программном замораживателе ОП и СКТБ ИПКиК НАНУ в растворе высокомолекулярного дексстрана («Полиглюкин», «Юрия-Фарм», Украина) по методу [18]. Образцы хранили при температуре -196 °C в низкотемпературном банке ИПКиК НАНУ. В день эксперимента кККЧ отогревали в пробирке на водяной бане при температуре 40–41 °C.

Для формирования модели экспериментальной ЛНР с применением митомицина С из фильтровальной бумаги выкраивали диски диаметром 10 мм и пропитывали их 10 % этиловым спиртом. Аппликацию диска на роговицу кролика выполняли в течение 20 с. Затем с роговицы микротупфером удаляли поверхностный эпителий. Контролировали удаление эпителия окрашиванием ее 1 % раствором флюoresцеина. После этого выполняли повторную аппликацию диска, пропитанного 0,04 % раствором митомицина С, в течение 4 мин. Известно, что митомицин С

препятствует росту клеток, что приводит к истощению камбиального слоя роговицы. В целях профилактики развития вторичной инфекции на всех глазах проводили местную противоинфекционную терапию в виде инстилляций 0,25 % раствора ципрофлоксацина 4 раза в день в течение 7 дней.

Для исследования цитокинов (интерферонов – ИФН- α и ИФН- γ) были выбраны сыворотка крови и слезная жидкость как наиболее доступные и атравматичные при заборе биологические субстраты. Забор слезы проводили из нижнего конъюнктивального свода глаза в сухую герметичную пробирку в количестве 0,3–0,5 мл.

Цитокиновый статус у кролей с ЛНР и после лечения определяли в отделе криопатофизиологии и иммунологии ИПКиК НАНУ с помощью иммуноферментного анализа на тест-системах (ООО «Цитокин», Россия) согласно инструкции производителя. Результаты регистрировали при длине волны 450 нм и выражали в пг/мл. В качестве контрольных значений определяемых в настоящем исследовании показателей использованы данные обследования 7 кроликов аналогичного возраста, у которых отсутствовали аутоиммунные заболевания различных органов и систем, в том числе офтальмологической патологии, способной оказывать влияние на активность воспалительного процесса.

Все животные были разделены на группы: 1-я – индукция ЛНР и введение кККЧ; 2-я – индукция ЛНР; 3-я – индукция ЛНР и введение нежизнеспособных клеток кККЧ; 4-я – индукция ЛНР и введение изотонического раствора NaCl; 5-я – глаза интактного кроля.

Статистическую обработку полученных результатов проводили параметрическим методом с помощью t-критерия Стьюдента или непараметрическим методом Манна–Уитни [19].

Результаты и их обсуждение. В результате исследований было показано, что в слезной жидкости здоровых животных в незначительных количествах присутствуют ИФН- α и ИФН- γ . При этом содержание ИФН- γ в слезной жидкости здоровых животных было выше, чем содержание ИФН- α , в отличие от сыворотки крови (табл. 1–4). При индукции ЛНР уровень ИФН- α в крови был ниже уровня в контрольной группе в 2,3 раза, а в слезной жидкости – в 2 раза. В отличие от крови показатели ИФН- γ в слезе у животных с ЛНР были выше, чем ИФН- α . Наблюдения в динамике показали, что на фоне проводимой терапии уже к 7-м суткам показатели ИФН- α у всех животных 1-й группы как в крови, так и в слезной жидкости практически достигали уровня в контрольной группе (рис. 1, 2, табл. 1, 2).

Таблица 1. Концентрация цитокина ИФН- α в слезной жидкости у кролей с ЛНР и после лечения, пг/мл

Группа животных	Сутки			
	2-е	3-и	7-е	14-е
1-я (ЛНР + кККЧ)	162,2±3,2	143,7±4,0	120,6±2,6	118,6±2,1
2-я (ЛНР)	178,2±2,2	172,3±1,3	140,6±1,6	122,0±4,0
3-я (ЛНР + разруш. кККЧ)	164,4±4,4	149,6±2,6	122,4±2,4	120,2±2,4
4-я (ЛНР + изотон. р-р NaCl)	174,0±6,0	170,0±2,0	138,4±2,4	122,2±2,2
5-я (интактный контроль)			119,2±1,2	

Таблица 2. Концентрация цитокина ИФН- α в крови у кролей с ЛНР и после лечения, пг/мл

Группа животных	Сутки			
	2-е	3-и	7-е	14-е
1-я (ЛНР + кККЧ)	16,5±2,5	19,2±6,0	35,9±5,0	39,9±6,0
2-я (ЛНР)	13,7±2,0	12,2±2,2	18,0±2,0	26,8±5,8
3-я (ЛНР + разруш. кККЧ)	14,9±5,7	18,5±4,0	34,2±2,0	38,0±6,0
4-я (ЛНР + изотон. р-р NaCl)	14,0±6,0	13,1±5,1	18,8±2,2	27,5±5,5
5-я (интактный контроль)			45,5±2,5	

Таблица 3. Концентрация цитокина ИФН- γ в слезной жидкости у кролей с ЛНР и после лечения, пг/мл

Группа животных	Сутки			
	2-е	3-и	7-е	14-е
1-я (ЛНР + кККЧ)	84,2±2,2	72,2±3,2	52,0±2,0	50,8±0,8
2-я (ЛНР)	90,6±5,6	98,4±2,4	96,0±4,0	62,4±2,4
3-я (ЛНР + разруш. кККЧ)	86,0±2,0	78,0±5,0	54,5±2,5	51,0±1,0
4-я (ЛНР + изотон. р-р NaCl)	88,2±2,2	92,0±2,0	94,0±4,0	56,8±2,2
5-я (интактный контроль)			50,0±0,8	

Таблица 4. Концентрация цитокина ИФН- γ в крови у кролей с ЛНР и после лечения, пг/мл

Группа животных	Сутки			
	2-е	3-и	7-е	14-е
1-я (ЛНР + кККЧ)	22,0±2,0	24,5±1,5	29,0±2,0	32,0±2,0
2-я (ЛНР)	13,7±2,0	12,0±1,0	13,8±3,2	20,5±2,5
3-я (ЛНР + разруш. кККЧ)	18,7±2,7	22,0±2,0	24,6±2,6	29,2±2,2
4-я (ЛНР + изотон. р-р NaCl)	17,6±2,1	16,8±0,8	15,4±4,4	21,9±0,9
5-я (интактный контроль)			32,5±3,5	

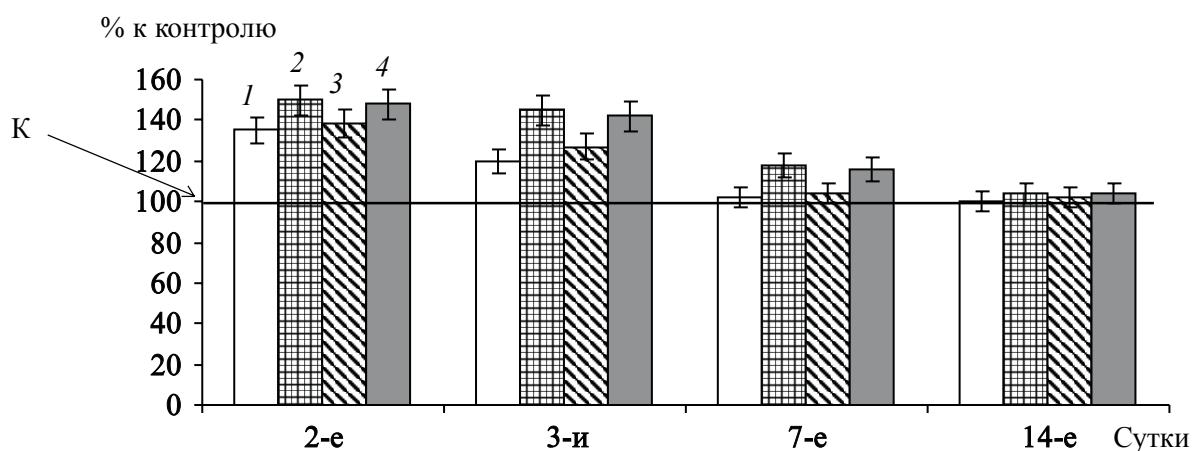


Рис. 1. Динамика концентрации ИФН- α в слезной жидкости при ЛНР и лечении:
1 – ЛНР + кККЧ; 2 – ЛНР; 3 – ЛНР + разрушенные кККЧ; 4 – ЛНР + изотонический раствор NaCl

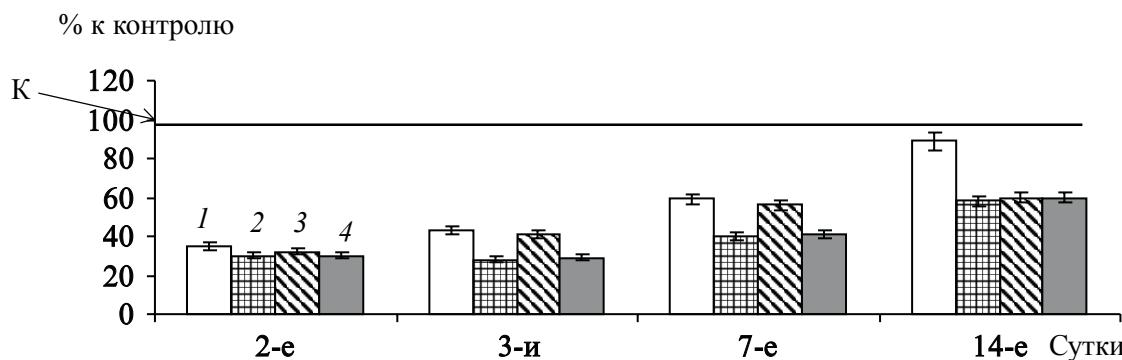


Рис. 2. Динамика концентрации ИФН- α в сыворотке крови у кроликов при ЛНР и лечении:
1 – ЛНР + кККЧ; 2 – ЛНР; 3 – ЛНР + разрушенные кККЧ; 4 – ЛНР + изотонический раствор NaCl

У кролей 3-ї групи, которым вводили разрушенные клетки кККЧ, наблюдали повышение содержания ИФН- α на 7-е сутки и этот показатель был выше, чем у животных 1-й группы. Однако на 14-е сутки и у этих животных данный показатель был достоверно выше, чем у кролей 4-й группы ($p>0,05$).

У кролей 4-й группы, которым вводили изотонический раствор NaCl, активность ИФН- α как в слезной жидкости, так и в крови

до 14-х суток была снижена относительно контроля.

Активность ИФН- γ в слезной жидкости и в крови у всех животных 1-й группы также достоверно повышалась на 7-е сутки и восстанавливалась до уровня контрольной группы на 14-е сутки (рис. 3, 4; табл. 3, 4).

Достоверных различий в показателях содержания ИФН- α и ИФН- γ в слезной жидкости и в сыворотке крови у кролей 1-й групп-

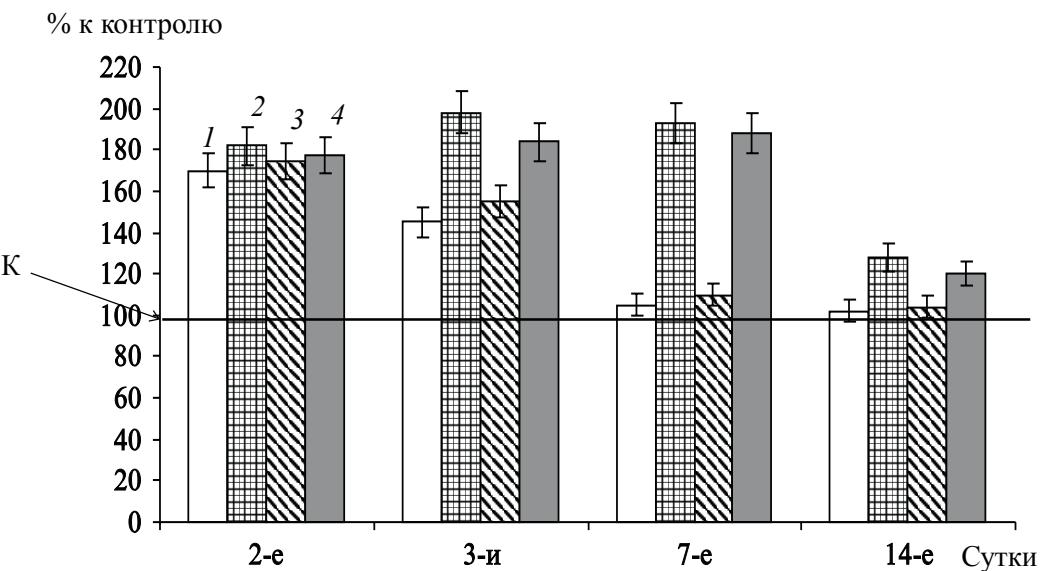


Рис. 3. Динамика концентрации ИФН- γ в слезной жидкости у кроликов с ЛНР и после лечения: 1 – ЛНР + кККЧ; 2 – ЛНР; 3 – ЛНР + разрушенные кККЧ; 4 – ЛНР + изотонический раствор NaCl

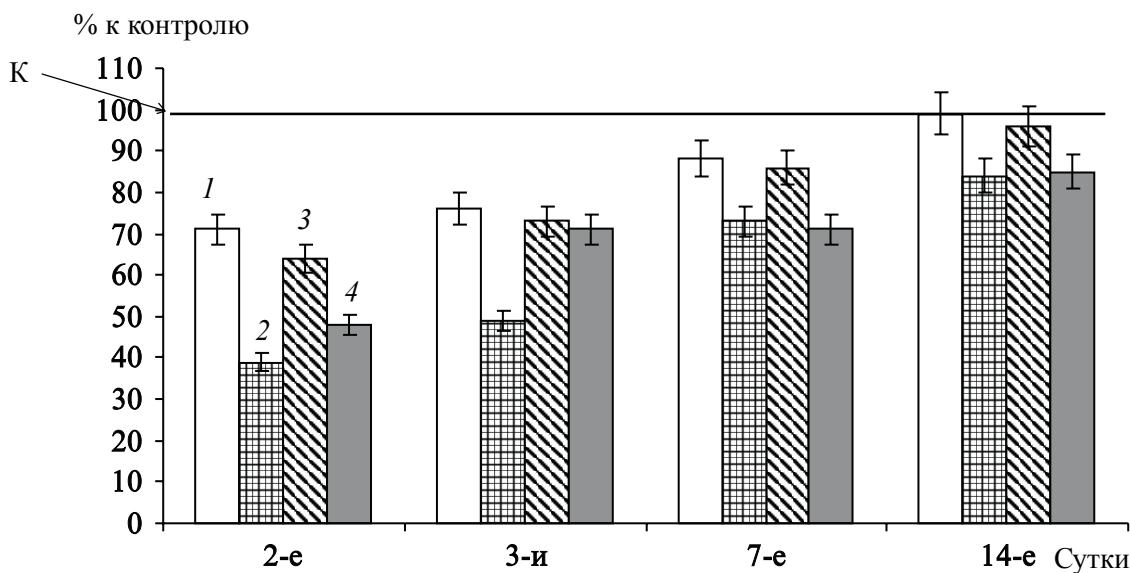


Рис. 4. Динамика концентрации ИФН- γ в сыворотке крови у кроликов с ЛНР и после лечения: 1 – ЛНР + кККЧ; 2 – ЛНР; 3 – ЛНР + разрушенные кККЧ; 4 – ЛНР + изотонический раствор NaCl

пы на 14-е сутки и контрольной группы не выявлено (рис. 1–4, табл. 1–4).

Снижение активности ИФН не может не отразиться на развитии ответной реакции на травму и клинических проявлениях развития воспалительных реакций, так как она находится в тесной взаимосвязи с иммунной системой. Полученные результаты свидетельствуют о снижении активности ИФН- α и ИФН- γ в цельной крови и о повышении – в слезной жидкости у животных с ЛНР. Главной функцией иммунной системы является контроль за белковым постоянством многоклеточных популяций организма, т. е. системе ИФН принадлежит ведущая роль в надзоре за генетическим постоянством организма. В связи с этим иммунная система имеет специализированные клетки и органы, и для нее характерна специфичность реагирования на чужеродный агент. Система ИФН, напротив, распределена практически по всем клеткам организма и обладает лишь относительной

видовой специфичностью. Показано, что при физиологическом состоянии спектр их действия узок, но при стрессе, воспалении, повреждении и других патологических состояниях расширяется количественный и качественный состав цитокинов, обладающих как местной, так и дистантной (гормональной) активностью. Механизмы иммуномодулирующих эффектов ИФН связаны с его действием на рецепторный аппарат клетки, внутриклеточные процессы и, как следствие этого, на отдельные функции иммунокомпетентных и воспалительных клеток (пролиферацию, дифференцировку, миграцию и др.).

Вывод

Учитывая перечисленные эффекты интерферонов, выявленное нами снижение их активности нуждается в коррекции и делает обоснованным использование криоконсервированной кордовой крови человека или ее субстанции разрушенных клеток при лечении поврежденной роговицы.

Список литературы

1. Mohsenin A. Ocular manifestations of systemic inflammatory diseases / A. Mohsenin, J. J. Hung // Conn. Med. – 2012. – V. 76, № 9. – P. 533–544.
2. Horai R. Cytokines in autoimmune uveitis / R. Horai, R. R. Caspi // J. Interferon Cytokine Res. – 2011. – V. 31, № 10. – P. 734–744.
3. Interleukin 17 in various ocular surface inflammatory diseases / M. H. Kang, M. K. Kim, H. J. Lee [et al.] // J. Korean Med. Sci. – 2011. – V. 26, № 7. – P. 938–944.
4. Autoimmune uveitis: the associated proinflammatory molecules and the search for immunoregulation / A. G. Commodaro, V. Bueno, R. Jr. Belfort, L. V. Rizzo // Autoimmun. Rev. – 2011. – V. 10, № 4. – P. 205–209.
5. Шабалина Н. В. Интерфероновая система человека: биологическая роль и взаимосвязь с иммунной системой / Н. В. Шабалина, В. В. Длин, В. В. Малиновская // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 1998. – № 5. – С. 29–34.
6. Interleukin-6 blockade in ocular inflammatory diseases / M. Mesquida, A. Leszczynska, V. Llorente, A. Adán // Clin. Exp. Immunol. – 2014. – Jun. – V. 176 (3). – P. 301–309.
7. Markers of inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction and the 20-year cumulative incidence of early age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study / R. Klein, C. E. Myers, K. J. Cruickshanks [et al.] // JAMA Ophthalmol. – 2014. – Apr. 1. – V. 132 (4). – P. 446–455.
8. Малашенкова И. К. Интерфероны и индукторы их синтеза (обзор) / И. К. Малашенкова, Э. Б. Газулахова, Н. А. Дидковский // Терапевтический архив. – 1998. – № 2. – С. 35–39.
9. Ковалчук Л. В. Система цитокинов : методические рекомендации / Л. В. Ковалчук, Л. В. Ганковская, Э. И. Рубакова. – М., 1999. – С. 1–78.
10. Ковалчук Л. В. Иммунокоррекция цитокинами / Л. В. Ковалчук, Л. В. Ганковская, В. А. Левченко // Вестник РГМУ. – 2002. – № 3. – С. 6–11.
11. Lang R. Human corneal epithelial cells express functional PAR-1 and PAR-2 / R. Lang, P. L. Legat // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2003. – V. 44. – P. 99–105.
12. Jonson A. M. VEGF dependent conjunctivalisation of the corneal surface / A. M. Jonson, V. Ponlaki, N. Mitsiades // Invest. Ophthalmol. Vis. Set. – 2001. – V. 44. – P. 117–123.

13. Use of amniotic membrane and autologous serum eye drops in Mooren's ulcer / P. Lavaju, M. Sharma, A. Sharma, S. Chettri // Nepal. J. Ophthalmol. – 2013. Jan.–Jun. – V. 5 (9). – P. 120–123.
14. Role of amniotic membrane transplantation in acute chemical injury / K. Lo, S. Kohanim, D. Trief, J. Chodosh // Int. Ophthalmol. Clin. – 2013. Fall. – V. 53 (4). – P. 33–41.
15. Стукалов С. Е. Применение глазных пленок с альгинатом натрия при язвенных поражениях роговицы / С. Е. Стукалов, В. В. Попова, О. В. Покровская // Ерошевские чтения : Тр. Всерос. конф. – Самара, 2002. – С. 254–255.
16. Mahaligman S. Expression of the interferon inducible chemokines Mu Mig and Crg-2 following vaccinia virus infection in vivo / S. Mahaligman, G. Karupich // Immunol. and Cell. Biol. – 2000. – № 2. – P. 156–160.
17. Милодин Е. С. Экспериментальная модель недостаточности региональных стволовых клеток роговичного эпителия / Е. С. Милодин // Вестник СамГУ. Естественнонаучная серия. – 2006. – № 9 (49). – С. 219–226.
18. Влияние криоконсервирования по двухэтапной программе в растворе высокомолекулярного декстрана на цитоморфологические и функциональные свойства клеток кордовой крови человека / О. Ю. Кожина, М. В. Останков, И. Г. Гриша, Н. А. Бондарович // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, № 1. – С. 58–65.
19. Ашмарин И. П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И. П. Ашмарин, А. А. Воробьев. – Л. : Медицина, 1962. – 180 с.

K.M. Свідко, П.А. Борисов, М.В. Останков, М.А. Бондарович, Ю.А. Дьомін

**ІНТЕРФЕРОНОВИЙ СТАТУС ТА ЕФЕКТИВНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНОЇ
КОРДОВОЇ КРОВІ У ЛІКУВАННІ ПОШКОДЖЕННЯ РОГІВКИ**

Для обґрунтування ефективності застосування кріоконсервованої кордової крові людини у лікуванні лімбальної недостатності рогівки було досліджено рівень інтерферону- α і інтерферону- γ . Для дослідження цитокінів були обрані сироватка крові та слізна рідина як найбільш доступні та атравматичні при забиранні біологічні субстрати. В експериментальній роботі було показано, що застосування кріоконсервованої кордової крові людини з антибіотиком відновлює показники цитокінів інтерферону- α і інтерферону- γ у сироватці крові та слізній рідині у кроликів при лікуванні лімбальної недостатності рогівки.

Ключові слова: лімбальна недостатність рогівки, кріоконсервована кордова кров людини, цитокіни інтерферон- α і інтерферон- γ , сироватка крові, слізна рідина.

K.N. Svidko, P.A. Borisov, M.V. Ostankov, N.A. Bondarovich, Yu.A. Dyomin

**INTERFERON STATUS AND EFFICACY OF CRYOPRESERVED CORD BLOOD IN THE TREATMENT
OF CORNEAL DAMAGE**

To justify the effectiveness of human cryopreserved cord blood cells in the treatment of limbal stem cells deficiency was performed to examine the interferon- α and interferon- γ levels. For the study of cytokines were selected serum and tear fluid as the most affordable and non-invasive when collecting biological substrates. In the experimental work it has been shown, that the use of antibiotic and cryopreserved cord blood cells restores level of cytokines interferon- α and interferon- γ in the serum and tear fluid of rabbits during treatment of limbal stem cells deficiency.

Key words: limbal stem cells deficiency, human cryopreserved cord blood cells, cytokines interferon- α and interferon- γ , serum of blood, tear fluid.

Поступила 16.06.14