

УДК: 617.7-007.681-089.84-07:617.72-008.848.3-07.

ВМІСТ ТРАНСФОРМУЮЧОГО ФАКТОРУ РОСТУ $\beta 2$ У ВОЛОЗІ ПЕРЕДНЬОЇ КАМЕРИ ОЧНОГО ЯБЛУКА ПАЦІЄНТІВ ІЗ ВІДКРИТОКУТОВОЮ ГЛАУКОМОЮ ПІСЛЯ МІКРОПУЛЬСОВОЇ ДІОДНОЇ ЛАЗЕРНОЇ ТРАБЕКУЛОПЛАСТИКИ

Л.М. Рудавська¹, О.Ю. Ключівська², Р.С. Стойка², І.Я. Новицький¹

¹ Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

² Інститут біології клітини НАН України, Львів

Реферат

Мета. Вивчити вміст цитокіну трансформуючого фактору росту $\beta 2$ у волозі передньої камери за впливу діодної лазерної трабекулопластики у режимі мікропульсу у хворих із відкритокутовою глаукомою та оцінити ефективність поєданого хірургічного лікування і лазерної трабекулопластики у вказаному режимі у даних пацієнтів.

Матеріал і методи. 34 пацієнти із відкритокутовою глаукомою поділено на дві групи: основна (17 пацієнтів, 17 очей) і контрольна (17 пацієнтів, 17 очей). В основній групі пацієнтам проведено операцію глибокої непроникаючої склеректомії у поєднанні із інтраопераційною лазерною діодною трабекулопластикою. Пацієнти контрольної групи перенесли глибоку непроникаючу склеректомію. Після аспірації вологи передньої камери в об'ємі 0,1 мл у кожного пацієнта обох груп проводили визначення вмісту активної форми ТФР $\beta 2$.

Результати й обговорення. Встановлено, що у пацієнтів після імпульсного лазерного опромінення зростає середній вміст ТФР $\beta 2$ у волозі передньої камери із 53,79±23,13 пг/мл до 68,85±26,89 пг/мл. Середнє значення внутрішньоочного тиску (ВОТ) у пацієнтів основної групи через рік після операції знизилося із 28,11±2,31 мм.рт.ст. до 16,51±1,32 мм.рт.ст., тоді як у контрольній групі цей показник становив 27,19±1,73 мм.рт.ст. і 17,80±1,50, відповідно.

Висновок. Мікропульсова діодна лазерна трабекулопластика призводить до зростання вмісту ТФР $\beta 2$ у волозі передньої камери очного яблука, що, ймовірно, викликає локальний імуносупресорний вплив і сприяє більш ефективному та якісному загоєнню трабекулярної тканини після непроникаючої глибокої склеректомії.

Ключові слова: відкритокутова глаукома, глибока непроникаюча склеректомія, лазерна трабекулопластика, внутрішньоочний тиск трансформуючий фактор росту $\beta 2$

Abstract

THE LEVEL OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR $\beta 2$ IN AQUEOUS HUMOR IN THE ANTERIOR CHAMBER OF PATIENTS WITH OPEN ANGLE GLAUCOMA FOLLOWING DIODE LASER TRABECULOPLASTY

L.M. RUDAVSKA¹, O.Yu. KLUCHIVSKA², R.S. STOIKA², I.Ya. NOVYTSKYI¹

¹ The Danylo Halytsky National Medical University in Lviv

² Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv

Aim. To evaluate the effect of diode laser trabeculoplasty in the micropulse mode in patients with open angle glaucoma on transforming growth factor (TGF) $\beta 2$ content in aqueous humor of the anterior chamber, and to evaluate the effectiveness of combined surgical and laser treatment in these patients.

Methods. 34 patients with uncontrolled open-angle glaucoma were divided into two groups: experimental (17 patients, 17 eyes) and control (17 patients, 17 eyes). Experimental group patients underwent a combined non-penetrating deep sclerectomy in combination with intraoperative laser diode trabeculoplasty, while the control group patients underwent only a non-penetrating deep sclerectomy. A total of 0.1 mL of aqueous humor of the anterior chamber was collected, and the level of the active form of TGF $\beta 2$ was measured.

Results. The mean TGF $\beta 2$ level was significantly higher in the aqueous humor of patients who underwent micropulse laser trabeculoplasty (68.85±26.89 pg/mL versus 53.79±23.13 pg/mL in control patients). The mean intraocular pressure (IOP) in the experimental group was 28.11±2.31 mm Hg before surgery, and it decreased considerably (16.51±1.32 mm Hg) at 1-year follow-up. In the control group, the mean IOPs were 27.19±1.73 mm Hg and 17.80±1.50 mm Hg, respectively.

Conclusions. Micropulse laser trabeculoplasty appears to increase the level of the active form of TGF $\beta 2$, and this might inhibit the local immune response and cause more effective and smoother healing of the trabecular meshwork after surgery.

Keywords: open angle glaucoma, deep non-penetrating sclerectomy laser trabeculoplasty, intraocular pressure, transforming growth factor beta 2

Вступ

Підвищений рівень внутрішньоочного тиску (ВОТ) вважається беззаперечним фактором ризику при первинній відкритокутовій глаукомі (ПВКГ) і прогресуванні цієї хвороби. За недостатньої гіпотензивної медикаментозної терапії чи у випадку непереносимості або фізичної неспроможності інстиляції крапель, застосовують лазерні методи або оперативне лікування глаукоми. Лазерну трабекулопластику із нанесенням аплікантів у ділянку трабекулярної сітки було вперше застосовано у 1979 р. Wise JB і Witter SL, які за-

стосували аргонний лазер (6) На сьогодні в офтальмології для лікування пацієнтів із ПВКГ використовують аргонний лазер (аргон-лазерна трабекулопластика - АЛТ), Q-switched Nd:YAG (селективна лазерна трабекулопластика - СЛТ) і діодний лазер у режимі мікропульсу (мікропульсова діодна лазерна трабекулопластика - МДТП). Однак докладний механізм гіпотензивної дії лазера все ще залишається до кінця не вивченим. Вважають, що внаслідок впливу енергії лазера на клітини трабекули запускаються регуляторні механізми, які призводять до поділу клітини [3, 4]. Не виключений також вплив лазера на ремоделювання юкстаканалікулярного позаклітинного матриксу (ПКМ), що може сприяти посиленому відтоку водянистої вологи з ока. Відомо, що компоненти позаклітинного матриксу постійно змінюються під впливом складних біохімічних механізмів [4]. Серед головних регуляторних чинників, що діють у передній камері і впливають на ремоделювання ПКМ, слід назвати фактор росту фібробластів лужного типу і трансформуючий фактор росту (ТФР) β -типу. ТФР β належить до цитокінів плейотропної дії і в організмі він задіяний у регуляцію проліферації клітин та апоптозу, зокрема, у модуляцію функціонування клітин імунної системи. Його вплив на клітини окремих тканин та органів суттєво залежить від одночасної дії на них інших цитокінів [5-8]. Різні форми ТФР β ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$) людини переважно існують у біологічно неактивному стані у комплексі зі спеціальними "маскувальними" білками й активуються по мірі потреби використання ТФР β [7]. У пацієнтів із ПВКГ підвищений рівень ТФР $\beta 2$ виявлено у волозі передньої камери та у реактивних астроцитах зорового нерву [8]. Діагностично-прогностичне значення цього показника, а також його динаміка після проведення діодної лазерної трабекулопластики у режимі мікропульсу раніше не вивчалися.

Мета роботи - вивчити вплив діодної лазерної трабекулопластики у режимі мікропульсу *ab externo* на концентрацію ТФР $\beta 2$ у волозі передньої камери хворих із некомпенсованою ПВКГ, а також визначити ефективність поєднаного хірургічного лікування і лазерної трабекулопластики у вказаному режимі у даних пацієнтів.

Матеріал і методи

Під нашим спостереженням перебувало 34 па-

цієнти, яких було поділено на дві групи: експериментальна (17 пацієнтів, 17 очей) і контрольна (17 пацієнтів, 17 очей). Обидві групи були однорідними за віком, стадією глаукоми і рівнем ВОТ. Середній вік пацієнтів (18 чоловіків та 16 жінок) становив $71,5 \pm 8,2$ роки. У 18 обстежених пацієнтів було діагностовано II стадію захворювання, у 12 пацієнтів - III стадію і в 4 пацієнтів - IV стадію глаукоми. Усі пацієнти отримували максимальну переносиму медикаментозну терапію, яка, в середньому, включала використання 2 або 3 різних лікарських препаратів. Переважна більшість пацієнтів одержувала комбіновану терапію, яка складалася із простагландинів і ліків, що діють як бета-блокатори. Пацієнтам було проведено операційну глибоку непроникаючу склеректомію, а для експериментальної групи додатково здійснювали інтраопераційно лазерну діодну трабекулопластику *ab externo* (Патент України на корисну модель № 53536 від 11.10.2010) [1]. Пацієнтам контрольної групи проведено лише глибоку непроникаючу склеректомію.

У випадку застосування комбінованої операції у пацієнтів експериментальної групи після видалення юкстаканалікулярної частини трабекули додатково проводили лазерну коагуляцію увеосклеральної частини трабекули із використанням зонду для ендолазеркоагуляції у режимі мікропульсу із наступними параметрами: діаметр лазерної плями - 300 мкм, потужність 2000 мВт, кількість аплікацій - 30.

До кожного пацієнта застосовували стандартні клінічні методи обстеження, такі як візометрія, біомікроскопія переднього і заднього відділів ока, тонометрія і тонографія до і після операції.

Для отримання вологи передньої камери після парацентезу рогівки, канюлею проводили аспірацію рідини в об'ємі 0,1 мл у мікрочашку, котру відразу поміщали у морозильну камеру із температурою -20°C . Аспірацію вологи передньої камери для визначення рівня ТФР β в обох групах пацієнтів проводили у кінці операції (через 10 хв після лазерної коагуляції для експериментальної групи).

Для визначення вмісту активних ізоформ ТФР $\beta 1$, 2 і 3 у волозі передньої камери використовували набори реактивів для імуноферментного аналізу (DIACLONE, США), дотримуючись стандартних протоколів фірми-виробника.

Принцип визначення полягав у тому, що рідину передньої камери поміщали у лунки пластикового планшета із адсорбованим на їх дні антитілом-1 до першого епітопу певної ізоформи ТФР β , що призводить до утворення комплексу молекули ТФР β із цим антитілом. Після цього у лунки планшета додавали антитіло-1 до другого епітопу цієї ж молекули, яке також зв'язувало молекулу ТФР β і слугувало лінкером для зв'язування антитіла-2, що було кон'юговане із специфічним ферментом (пероксидаза хрому). Останній забезпечує перебіг біохімічної реакції, продукт якої визначали на багатоканальному мікрофотометрі БіоТек 76883 (США).

Для статистичної обробки одержаних результатів дослідження визначали показник вірогідності різниці "t" (критерій Ст'юдента). Відмінність між двома змінними величинами вважали достовірною, коли ймовірність різниці "P" була меншою 0,05 (9).

Результати й обговорення

Ми не спостерігали у пацієнтів у ранньому післяопераційному періоді таких ускладнень як гіфема, мілка передня камера, відшарування судинної оболонки, гіпотонічна макулопатія та ендoftальміт. У 17-ти пацієнтів експериментальної групи до операції ВОТ становив $28,11 \pm 2,31$ мм.рт.ст., тоді як на 7-ий день після операції середнє значення ВОТ знижувалося до $16,18 \pm 0,72$ мм.рт.ст. ($p < 0,05$) і практично не змінювалося через 6 і 12 місяців після операції - $16,32 \pm 1,21$ мм.рт.ст і $16,51 \pm 1,32$ мм.рт.ст, відповідно. Коефіцієнт легкості відтоку (КЛО) зростав від $0,13 \pm 0,04$ до операції до $0,35 \pm 0,03$ через 12 місяців після операції ($p < 0,05$). Двоє пацієнтів додатково одержували аналоги простагландинів для більш повної компенсації ВОТ.

У контрольній групі пацієнтів до операції

ВОТ у середньому становив $27,19 \pm 1,73$ мм.рт.ст., Через тиждень після операції рівень ВОТ знижувався до $17,19 \pm 0,23$ ($P < 0,001$) і через 6 і 12 місяців він зберігався приблизно на такому ж рівні - $17,51 \pm 0,52$ і $17,80 \pm 1,50$, відповідно. КЛО зростав від $0,14 \pm 0,02$ до операції до $0,24 \pm 0,05$ ($p < 0,05$) через 12 місяців після операції. Для додаткового зниження ВОТ через 12 місяців після операції троє пацієнтів одержували інстиляційно аналоги простагландинів.

Середнє значення вмісту ТФР β 2 у волозі передньої камери пацієнтів експериментальної групи становило $68,85 \pm 26,89$ пг/мл, а у водянистій волозі пацієнтів контрольної групи - $53,79 \pm 23,13$ пг/мл. Вміст ізоформ ТФР β 1 і β 3 тут був за межами чутливості наборів для імуноферментного аналізу. Отже, нами виявлено зростання вмісту ТФР β 2 у волозі передньої камери у пацієнтів після імпульсного лазерного опромінення у порівнянні з пацієнтами контрольної групи.

Результати вимірювання внутрішньоочного тиску, коефіцієнту легкості відтоку та визначення вмісту ТФР β 2 у волозі передньої камери ока пацієнтів експериментальної і контрольної груп наведені у таблиці.

Порівнюючи значення досліджуваних показників на певних етапах між контрольною та експериментальною групами, ми не спостерігали достовірної різниці між ними. При цьому усереднені значення параметрів при використанні лазера є ближчими до нормальних показників, ніж без його застосування. У цьому контексті зростання вмісту ТФР β 2 у волозі передньої камери ока пацієнтів є позитивним прогностичним критерієм зміни їхнього стану.

Найбільш імовірним механізмом, що може забезпечити зростання вмісту ТФР β 2 у волозі передньої камери очного яблука після імпульсної лазерної терапії, є локальне підвищення

Таблиця

Усереднені значення ВОТ, КЛО і вмісту ТФР β 2 (пг/мл) у водянистій волозі передньої камери пацієнтів експериментальної і контрольної груп

Показник	Контрольна група	Експериментальна група
ВОТ до операції	$27,19 \pm 1,73$	$28,11 \pm 2,31$
на 7-ий день після операції	$17,19 \pm 0,23$	$16,18 \pm 0,72$
через 6 місяців після операції	$17,51 \pm 0,52$	$16,32 \pm 1,21$
через 12 місяців після операції	$17,80 \pm 1,50$	$16,51 \pm 1,32$
КЛО до операції	$0,14 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,04$
через 12 місяців після операції	$0,24 \pm 0,05$	$0,35 \pm 0,03$
ТФР β 2	$53,79 \pm 23,13$	$68,85 \pm 26,89$

температури опроміненої тканини [2], що не призводить до її пошкодження, завдяки особливостям мікропульсового випромінювання. Саме підвищення рівня цього цитокіна у волозі передньої камері може вказувати на опосередкування ним процесів ремодуляції позаклітинного матриксу у трабекулі. Встановлено, що вплив ТФР β 2 на ендотеліальні клітин, з яких, до речі, утворена трабекулярна сітка [9], супроводжується потужною локальною імуносупресорною дією, що є критичною передумовою для уникнення швидкого рубцювання і сильного протизапального ефекту. Імуносупресорні властивості ТФР β 2 добре відомі і вони проявляються через індукцію апоптозу В- і Т-лімфоцитів, що, у кінцевому рахунку, забезпечує ослаблення запальної реакції і, відповідно, зниження ВОТ [10].

Висновки

1. Виявлено зміни рівня внутрішньоочного тиску та коефіцієнту легкості відтоку, які свідчать про додатковий позитивний вплив діодної лазерної трабекулопластики *ab externo* у режимі мікропульсу при оперативному лікуванні первинної відкритокутової глаукоми.
2. Встановлено, що мікропульсова діодна лазерна трабекулопластика супроводжується зростанням вмісту ТФР β 2 у волозі передньої камери очного яблука. Це може викликати локальну імуносупресорну дію і, таким чином, сприяти більш ефективному та якісному загоєнню трабекулярної тканини після непроникаючої глибокої склеректомії.

Література

1. Patent of Ukraine 53536, МПК А61F9/007 А61N5/00. Method of surgical treatment of open-angle glaucoma in combination with laser trabeculoplasty *ab externo* mode mikropulsu / patent: I.Y. Novitsky, LM Rudavskii, The Danylo Halytsky National Medical University in Lviv №

u201004236; appl. 09.04.2010 Bull was number 19. Ukrainian (Патент 53536 Україна, МПК А61F9/007А61N5/00. Спосіб хірургічного лікування відкритокутової глаукоми у комбінації із лазерною трабекулопластиком *ab externo* у режимі мікропульсу / Заявник і патентовласник: І.Я Новицький, Л.М Рудавська; Львівський нац. мед.ун-т імені Данила Галицького-№u201004236; заявл. 09.04.2010 р. Бюл.№19).

2. Korchinsky AG Heat shock modulates the ability of cell line A-549 human lung adenocarcinoma of autocrine adjust the intensity of the biosynthesis of DNA and protein / A.G.Korchinsky, R.S.Stoyka. SI Kusiene // Biohimiya. 1992. - № 11. -S.1612-1647. Russian (Корчинський А.Г., Теплової шок модулюєть спосібність кліток лінії А-549 из аденокарциноми легких человека аутокринно регулюють интенсивність биосинтеза ДНК и белков / А.Г.Корчинський, Р.С.Стойка., С.И. Кусень //Биохимия. - 1992. - №11. - С.1612-1647).
- 3.Reiss G.R. Laser trabeculoplasty. Major review /G.R.Reiss, J.T.Wilensky, E.J. Higginbotham //Surv.Ophthalmol.-1991.- Vol 35.-P.407-428.
- 4.Tamm E.R What Increases Outflow Resistance in Primary Open-angle Glaucoma?/ E.R. Tamm, R. Fuchshofer // Surv. Ophthalmol.-2007.-Vol 52.-P.101-104.
- 5.Transforming growth factor-beta in human aqueous humor /Jampel H.D., Roche N, Stark W.J, Roberts A.B // Curr Eye Res.-1990.-Vol.9-P.963-969.
- 6.Acott T.S. Biochemistry of aqueous humor outflow /T.S. Acott, P.L Kaufman, T.W.Mittag // Glaucoma.-1991.-Vol.7.-P.147-178.
- 7.Roberts A.B. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta) /A.B. Roberts, M.B. Sporn // Growth Factors.-1993.-Vol.8.-P.1-9.
- 8.Inatani M. Transforming growth factor-b2 levels in aqueous humor of glaucomatous eyes /M.Inatani, H.Tanihara H, H.Katsuta [et al.] // Graefes Arch Clin Exp Ophtahlmol.- 2001.-Vol.239.-P.109-113.
- 9.Llobet A. Understanding trabecular meshwork physiology: a key to the control of intraocular pressure? / A. Llobet, X. Gasull, A. Gual // News Physiol Sci.-2003.-Vol.18.-P.205-209.
10. De Gorter D.J.J. Biphasic effects of transforming growth factor- β on bone morphogenetic protein-induced osteoblast differentiation /D.J.J. De Gorter, M van Dinther, O. Korchynskiy [et al.] // Bone Mineral Res.-2011.-Vol. 6.-P.1178-1187.
11. Wise J.B. Argon laser therapy for open-angle glaucoma, a pilot study /J.B. Wise S.L. Witter // Arch. Ophthalmol. 1997.- Vol.3.-P.319-322.