

ОСОБЛИВОСТІ ГУМОРАЛЬНОЇ ЛАНКИ ІМУНІТЕТУ ЗА УМОВИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ МЕХАНІЧНОЇ НЕПРОНИКАЮЧОЇ ТРАВМИ РОГІВКИ ТА ЇЇ КОРЕКЦІЇ КЕРАТОКСЕНОІМПЛАНТАТОМ

©М. В. Турчин

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України»

РЕЗЮМЕ. У статті наведені дані про особливості змін імуноглобулінів класів А, М, G і циркулюючих імунних комплексів в динаміці експериментальної механічної непроникаючої травми рогівки та її корекції кератоксеноімплантатом. Встановлено виражені порушення гуморального імунітету, які супроводжуються пригніченням й виснаженням сироваткових імуноглобулінів у перші 7 діб посттравматичного періоду з поступовою їх нормалізацією до кінця експерименту за умови консервативного лікування травми. Хірургічна корекція травми рогівки ксенокератоімплантатом зумовлює активацію неспецифічної резистентності організму у перші 7 діб експерименту, яка проявляється достовірно вищою концентрацією IgA, IgM, IgG і циркулюючих імунних комплексів з поступовим зниженням факторів гуморального імунітету на 14–21 доби.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: травма, рогівка, імуноглобуліни, ксенокератоімплантат.

Вступ. Неухильне зростання травматизму, збільшення соціальної нестабільності, військові події, погіршення криміногенної ситуації, падіння загального рівня культури, збільшення ступеня людської агресії призводять до різкого збільшення кількості хворих з травматичними ушкодженнями [1]. Згідно з даними ряду авторів, до 2020 року на планеті очікується зниження смертності від інфекційних захворювань та перинатальної патології поряд з різким її збільшенням у результаті транспортних аварій, насильства і воєн [2].

Одне з перших місць у структурі первинної інвалідності осіб молодого віку займає очний травматизм [3]. Розповсюдженість травм органа зору в середньому в Україні становить 24,5 випадків на 10000 населення, при цьому патологія рогівки входить до трійки основних чинників втрати зору, частка якої становить 6,6–39,3 % [4]. Травми очей зазвичай супроводжуються порушеннями в імунній системі як на рівні пошкодженого органа, так і всього організму. Ці порушення, в свою чергу, впливають на перебіг посттравматичного періоду і формування ускладнень. Не дивлячись на застосування сучасних методів лікування, нерідко у хворих спостерігається розвиток ускладнень у вигляді кератитів, рецидивуючої ерозії, помутніння і виразкування рогівки, що вимагає подальшого вдосконалення медикаментозної терапії [5, 6]. Перспективним у цьому напрямку є хірургічний метод у вигляді пересадки донорської рогівки (часткової, повної, пошарової, наскрізної) з метою радикального видалення запального комплексу з ураженої рогівки [7, 8]. В останні роки нами проведені експериментальні дослідження потенційних можливостей використання для кератопластики свинячої рогівки, яка за своїми морфологічними й імунологічними властивостями є достатньо наближеною до рогівки

людини. При розробці кріоліофілізованого кератоксеноімплантата, який зареєстрований МОЗ України як виріб медичного призначення «кератоксеноімплантат» (номер державної реєстрації 9967/2010), враховано багаторічний досвід виготовлення і клінічного застосування кріоліофілізованої шкіри (свині) як ксеноімплантата для лікування опечених хворих [9].

Метою нашого дослідження було встановити особливості змін імуноглобулінів класу А, М, G і циркулюючих імунних комплексів в динаміці експериментальної механічної непроникаючої травми рогівки та її корекції кератоксеноімплантатом.

Матеріали і методи дослідження. Експериментальні дослідження проводили на статевозрілих кролях породи «Шиншила» масою від 2,5 до 3,0 кг у відповідності з Женевською конвенцією «International Guiding principles for Biochemical research involving animals» (Geneva, 1990) та згідно із Загальними принципами експериментів на тваринах, схваленими на Національному конгресі з біоетики (Київ, Україна, 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».

Тварин поділили на три групи: контрольна група – інтактні тварини (10 кролів); перша дослідна група – непроникаюче поранення та консервативне лікування, термін спостереження 3, 7, 14 та 21 доба після травми (40 кролів); друга дослідна група – непроникаюче поранення та корекція кератоксеноімплантатом, термін спостереження 3, 7, 14 та 21 доба після травми (40 кролів).

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 рогики наносили концентричну епітеліальну насічку, в межах якої одноразовим офтальмологічним скальпелем видаляли епітелій разом з переднім шаром строми рогики (викроювали клапоть товщиною до 0,2 мм). Контроль відтворення ерозії здійснювали методом фарбування рогики 0,5 % розчином флуоресцеїну.

Корекцію травми проводили консервативним та оперативним способами. Консервативно – інстиляція розчину антибіотика фторхінолонового ряду – Вігамокс (1 крапля 3 рази на день), корнеопротектора – корнерегель 4 рази на день. Хірургічну корекцію травми здійснювали закриттям дефекту рогики ксенокератоімплантатом, пришиванням його в 4 місцях (на 12, 15, 18 та 21 годинах) до склери через кон'юнктиву за допомогою атравматичної голки 8/0 нейлон. Протягом терміну спостереження проводилась інстиляція розчину антибіотика фторхінолонового ряду – Вігамокс (1 крапля тричі на день).

Виробництво кріоліофілизованого ксенокератоімплантата здійснено за технологією, розробленою спільно Тернопільським державним медичним університетом імені І. Я. Горбачевського й Одеським інститутом очних хвороб та тканинної терапії імені акад. В. П. Філатова АМН України (Пат. 52278 U, 2010). Технологічні етапи полягають у видаленні рогики у щойно забитої свині, обробці за відповідних умов кріопротектором, консервуванні при наднизькій температурі (–196 °С), вакуумному висушуванні, проходженні технологічного контролю, пакуванні виробу та його стерилізації радіаційним методом.

В умовах тіопентало-натрієвого знеболювання (25 мг/кг) у кролів з крайової вени вуха забирали кров, після чого виводили з експерименту методом

повітряної емболії. Рівні імуноглобулінів класу А (IgA), М (IgM), G (IgG) визначали за допомогою імуноферментного методу на аналізаторі STAT–Fax з використанням наборів реагентів «GeneTex» (США) згідно з інструкціями фірми-виробника. Циркулюючі імунні комплекси (ЦІК) визначали методом преципітації у розчині поліетиленгліколю (ПЕГ) з молекулярною масою 6000 D [10].

Статистичну обробку цифрових даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення «Excel» (Microsoft, США) та «STATISTICA» 6.0. («Statsoft», США) з використанням параметричних методів оцінки одержаних даних. Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії і помилки середньої (m). Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали методом варіаційної статистики з використанням критерію Стюдента.

Результати й обговорення. Вивчення концентрації імуноглобулінів сироватки крові основних класів – А, М і G – у посттравматичному періоді непроникаючої механічної травми рогики виявило їх суттєві зміни у 1-ій дослідній групі у всі терміни спостереження (табл. 1). Так, вже через 3 доби експерименту відмічалось статистично значиме зменшення рівнів IgA на 16,3 %, IgM – на 69,8 % й IgG – на 53,5 % стосовно контролю, які досягли максимально низьких цифр через 7 діб після змодельованої травми на фоні консервативного лікування (p<0,05). Зменшення концентрації Ig A свідчить про недостатність гуморального та місцевого імунітету, порушення синтезу або посилення їх катаболізму, а також абсорбцію на імунних комплексах. Зниження кількості Ig G указує на виражену активацію імунних реакцій в організмі, яка значно послабляється в результаті надмірного ендотоксикозу в процесі захворювання [11].

Таблиця 1. Особливості гуморальної ланки імунного захисту та ЦІК у сироватці крові кролів в посттравматичному періоді за умови консервативного лікування (M±m)

Показник	Контроль (n=10)	3 доба (n=10)	7 доба (n=10)	14 доба (n=10)	21 доба (n=10)
Ig A, пг/мл	1,02±0,03	0,85±0,03*	0,64±0,02* p1<0,05	0,95±0,02 p1<0,05 p2<0,05	1,00±0,03 p1<0,05 p2<0,05 p3>0,05
Ig M, пг/мл	2,06±0,03	0,62±0,02*	0,48±0,02* p1<0,05	0,57±0,02* p1>0,05 p2<0,05	0,64±0,02* p1>0,05 p2<0,05 p3<0,05
Ig G, пг/мл	3,98±0,02	1,85±0,03*	1,51±0,03* p1<0,05	2,25±0,04* p1<0,05 p2<0,05	2,68±0,04* p1<0,05 p2<0,05 p3<0,05

Примітки: тут і в наступних таблицях: * – достовірність відмінностей між контрольною і дослідними групами (p<0,05), p1 – достовірність відмінностей між даними через 3 доби та іншими термінами спостереження, p2 – достовірність відмінностей між даними через 7 діб та іншими термінами спостереження, p3 – достовірність відмінностей між даними через 14 діб та іншими термінами спостереження.

Традиційна терапія експериментальної непроникаючої механічної травми рогівки супроводжувалася позитивною динамікою вмісту сироваткових імуноглобулінів, більш вираженою для IgA, рівень якого до кінця експерименту повертався до нормальних значень, тоді як вміст IgM був на 68,8 % й IgG – на 33,2 % нижчий контролю (табл. 1). Наявність дисімуноглобулінемії дає підставу стверджувати, що пригнічення й виснаження факторів гуморального імунітету призводить до зниження імунологічної реактивності організму.

Проведення хірургічної корекції травми рогівки ксенокератоімплантатом супроводжувалося достовірним підвищенням концентрації імуноглобулінів сироватки крові основних класів у посттравматичному періоді непроникаючої механічної травми рогівки у 2-ій дослідній групі у всі терміни

спостереження (табл. 2). Рівень сироваткових імуноглобулінів набував максимальних значень через 7 днів моделювання травми, при цьому концентрація IgA перевищувала початковий рівень у середньому в 2,6 раза, IgM – 1,4 раза й IgG – 3,2 раза ($p < 0,05$). Слід зазначити, що вміст IgA у сироватці крові через 7 днів посттравматичного періоду за умови хірургічної корекції практично не відрізнявся від отриманих даних на 3-тю добу, тоді як рівень IgM й IgG зростав відповідно на 10,4 % і 7,4 % ($p < 0,05$). Через 14 днів модельованої травми та хірургічної корекції травми рогівки ксенокератоімплантатом відмічалось зниження вмісту сироваткових імуноглобулінів, які на момент закінчення експерименту були статистично значимо менші отриманих даних через 14 днів, проте перевищували верхню межу норми ($p < 0,05$) (табл. 2).

Таблиця 2. Особливості гуморальної ланки імунного захисту та ЦІК у сироватці крові кролів в посттравматичному періоді за умови хірургічної корекції ксенокератоімплантатом ($M \pm m$)

Показник	Контроль (n=10)	3 доба (n=10)	7 доба (n=10)	14 доба (n=10)	21 доба (n=10)
Ig A, пг/мл	1,02±0,03	2,62±0,02*	2,65±0,01* p1>0,05	2,23±0,05* p1<0,05 p2<0,05	2,12±0,02* p1<0,05 p2<0,05 p3<0,05
Ig M, пг/мл	2,06±0,03	2,70±0,02*	2,98±0,03* p1<0,05	2,57±0,02* p1<0,05 p2<0,05	2,26±0,04* p1<0,05 p2<0,05 p3<0,05
Ig G, пг/мл	3,98±0,02	11,91±0,28*	12,79±0,13* p1<0,05	8,32±0,14* p1<0,05 p2<0,05	7,92±0,11* p1<0,05 p2<0,05 p3<0,05

Порівнюючи отримані дані у 1-ій і 2-ій дослідних групах можна говорити про те, що при непроникаючій механічній травмі рогівки у кролів відбувається пригнічення й виснаження факторів гуморального імунітету у перші 7 днів посттравматичного періоду з поступовою нормалізацією сироваткових імуноглобулінів до кінця експерименту.

Хірургічна корекція травми рогівки ксенокератоімплантатом зумовлювала активацію неспецифічної резистентності організму вже через 3 доби моделювання патологічного процесу, яка проявлялась достовірно вищою концентрацією IgA, IgM й IgG проти даних 1-ої дослідної групи й контролю ($p < 0,05$), з поступовою депресією факторів гуморального імунітету, починаючи з 14-ої доби і до кінця експерименту (рис. 1–3). Потрібно відмітити, що через 21 добу спостереження концентрація імуноглобулінів IgA, IgM й IgG 2-ої дослідної групи перевищувала відповідно у 2,1; 3,5 і 3,0 раза показники 1-ої групи ($p < 0,05$).

Одним з індикаторів стану імунного статусу організму і розвитку аутоімунних процесів є рівень циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) в крові. Традиційна

терапія експериментальної непроникаючої механічної травми рогівки супроводжувалася значимим зростанням даного показника через 3 доби ((184,95±0,46) ум.од.) і 7 днів ((135,95±0,64) ум. од.) експерименту відносно контролю ((113,80±0,71) ум. од.) ($p < 0,05$) з наступною нормалізацією рівня ЦІК через на 14-ту добу спостереження ((114,48±0,73) ум. од.). Різке зростання вмісту ЦІК у сироватці крові за умов модельованої травми у перші 7 днів можна розцінити як захисно-компенсаторну реакцію, що направлена на зв'язування надлишку циркулюючих антигенів з наступним виснаженням компенсаторних механізмів на 14-ту добу.

Проведення хірургічної корекції травми рогівки ксенокератоімплантатом супроводжувалося достовірним зростанням ЦІК через 3 і 7 днів експерименту приблизно в 1,6 раза відносно контролю, що ми пов'язуємо з потенціюванням компенсаторних механізмів, спрямованих на посилення елімінації антигенів шляхом утворення ЦІК. Потрібно зазначити, що даний показник у 2-ій дослідній групі перевищував через 3 доби експерименту на 15,9 % і через 7 днів – на 35,8 % дані 1-ої дослідної

групи у ці ж терміни спостереження ($p < 0,05$). За умови змодельованої травми на тлі хірургічної корекції виявлено позитивну динаміку, що

проявлялась достовірним зниженням рівня ЦІК через 14 діб експерименту ($93,65 \pm 0,80$) ум. од.) стосовно попередніх груп спостереження.

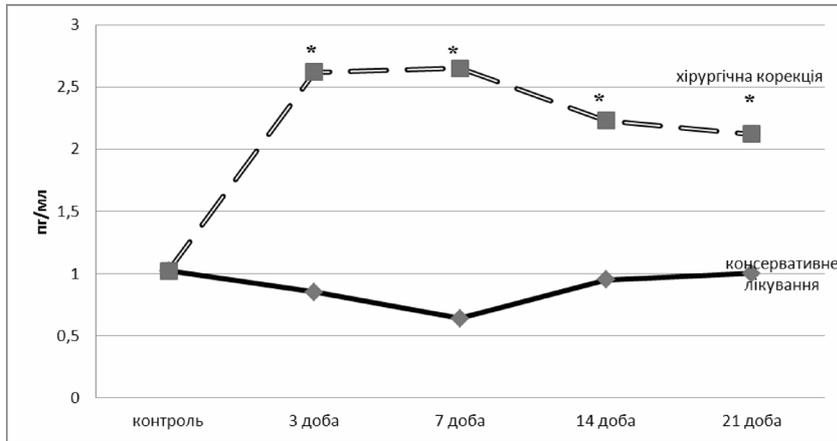


Рис. 1. Зіставлення рівня IgA у сироватці крові кролів у посттравматичному періоді за умови консервативного і хірургічного лікування.

Примітка. Тут і в наступних таблицях: * – достовірність відмінностей між дослідними групами за умови консервативного і хірургічного лікування в однаковий термін спостереження ($p < 0,05$).

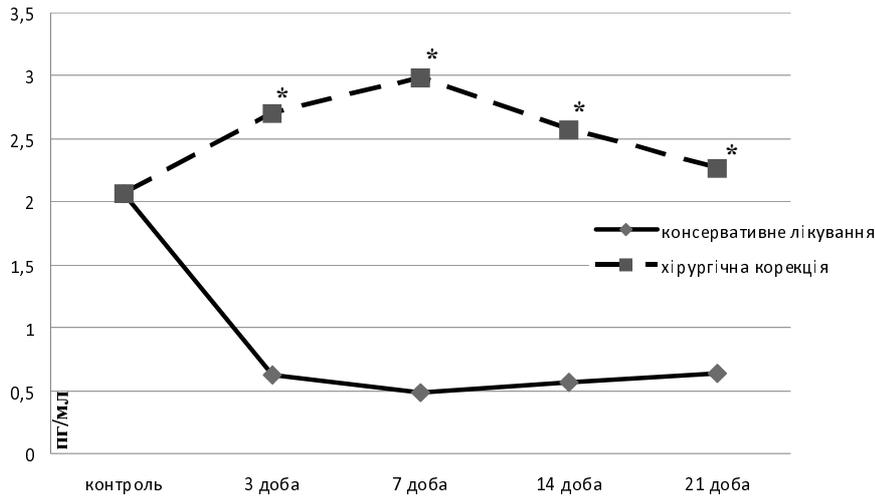


Рис. 2. Зіставлення рівня IgM у сироватці крові кролів в посттравматичному періоді за умови консервативного і хірургічного лікування.

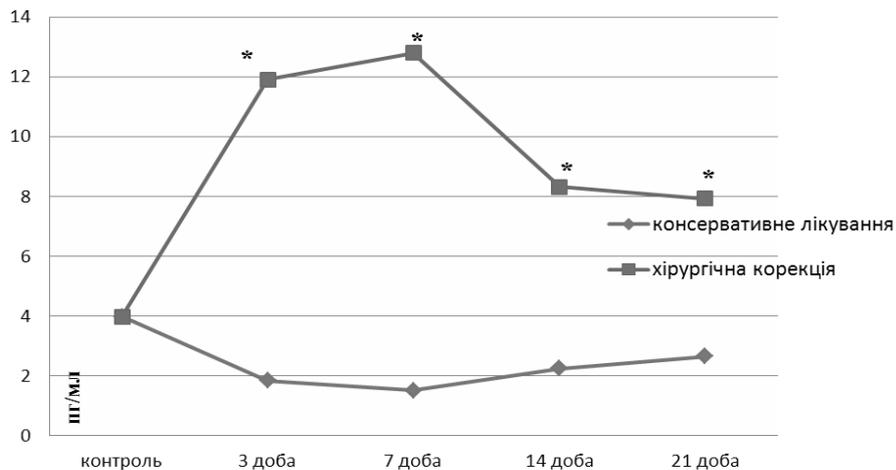


Рис. 3. Зіставлення рівня IgG у сироватці крові кролів в посттравматичному періоді за умови консервативного і хірургічного лікування.

Висновки. 1. За умови експериментальної непроникаючої механічної травми рогівки відмічаються виражені порушення гуморального імунітету, які супроводжуються пригніченням рівня сироваткових імуноглобулінів у перші 7 днів посттравматичного періоду з поступовою їх нормалізацією до кінця експерименту.

2. Проведення хірургічної корекції травми рогівки ксенокератоімплантатом зумовлює активацію неспецифічної резистентності організму у перші

7 днів експерименту, яка проявляється достовірно вищою концентрацією IgA, IgM, IgG і циркулюючих імунних комплексів з поступовим зниженням факторів гуморального імунітету на 14–21 доби.

Перспективи подальших досліджень полягають у визначенні цитокінового профілю сироватки крові та водянистої вологи ока за умови експериментальної непроникаючої механічної травми рогівки на фоні хірургічної корекції ксенокератоімплантатом.

ЛІТЕРАТУРА

1. Сравнительная оценка иммунологической реактивности при сочетанной травме глаза / Э. М. Касимов, И. А. Заргарли, И. К. Намазова, С. Р. Меджидова // Офтальмология. – 2011. – № 3 (7). – С. 50–55.
2. Закрытая сочетанная вертеброабдоминальная травма [Текст] / С. З. Горшков, В. С. Волков, М. Н. Елизаров, В. И. Сенченко // Медицинская помощь. – 2005. – № 2. – С. 35–40.
3. Либман Е. С. Слепота и инвалидность вследствие патологии органа зрения в России / Е. С. Либман, Е. В. Шахова // Вестник офтальмологии. – 2006. – № 1. – С. 35–37.
4. Чуднянцева Н. А. Восстановительное лечение больных с травмами глаза, осложненными иридодиализом / Н. А. Чуднянцева // Офтальмологический журнал. – 2010. – № 1. – С. 102–105.
5. Сакович В. М. Клінічна оцінка ефективності застосування оксигенації в лікуванні травматичних кератитів / В. М. Сакович, Т. О. Острікова // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник української медичної стоматологічної академії. – 2013. – № 4 (44), Т. 13. – С. 54–57.
6. Каспарова Е. А. Лечение рецидивирующей эрозии роговицы / Е. А. Каспарова, Пур Акбариан Ниаз // Вестник офтальмологии. – 2009. – № 2. – С. 54–56.
7. Грищенко В. Клітинної і тканинної трансплантації / В. Грищенко // Вісник НАН України. – 2002. – № 1. – С. 1–7.
8. Новицкий И. Я. Место трансплантации амниотической оболочки в лечении заболеваний роговицы, сопровождающихся ее неоваскуляризацией / И. Я. Новицкий // Вестн. офтальмол. – 2003. – № 6. – С. 9–11.
9. Пасечникова Н. В. Експериментальне обґрунтування і перший досвід використання ксенорогівки при лікувально-тектонічній кератопластиці у хворих із виразками рогівки різної етіології / Н. В. Пасечникова, С. А. Якименко, В. В. Бігуняк, М. В. Турчин / Газета «Новости медицины и фармации». Офтальмология. – 2012. – № 417. – Режим доступу: <http://www.mif-ua.com/archive/article/28928>
10. Фролов В. М. Исследование циркулирующих иммунных комплексов, их диагностическое и прогностическое значение / В. М. Фролов, В. Е. Рычнев, Н. А. Пересадин // Лабораторное дело. – 1986. – № 3. – С. 159–161.
11. Богданова І. В. Цитокіновий та імуноглобуліновий профілі сироватки крові хворих на хворобу Паркінсона / І. В. Богданова // Український вісник психоневрології. – 2012. – Т. 20, Вип. 1 (70). – С. 5–7.

PECULIARITIES OF HUMORAL IMMUNITY IN CASE OF EXPERIMENTAL NONPENETRATIVE MECHANICAL TRAUMA OF CORNEA AND ITS CORNEAL KSENOIMPLANT CORRECTION

©M. V. Turchyn

SHEI «Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky of MPH of Ukraine»

SUMMARY. The article presents information about the immunoglobulin A, M, G and circulating immune complexes changes in dynamics of experimental nonpenetrative mechanical trauma of cornea and its corneal ksenoimplant correction. It was found the disorders of human humoral immunity, accompanied by inhibition and depletion of serum immunoglobulins in the first 7 days of post-traumatic period with gradual normalization to the 21 day of the experiment in case of conservative treatment of trauma. Surgical correction of corneal injury by ksenokeratoimplantat leads to activation of nonspecific resistance of the organism during the first 7 days of the experiment, which shows significantly higher concentrations of IgA, IgM, IgG and circulating immune complexes with a gradual reduction factors of humoral immunity in 14–21 days.

KEY WORDS: trauma, cornea, immunoglobulins, ksenokeratoimplant.

Отримано 12.11.2014