

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ РОГОВИЦЫ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПОСЛОЙНОЙ КЕРАТОПЛАСТИКИ С ПРИМЕНЕНИЕМ БИОМАТЕРИАЛА «АЛЛОПЛАНТ»

Кадыров Р.З., Гареев Е.М., Яковлева В.Г.,
Курчатова Н.Н., Юсупова Р.Ш., Примов Р.Э.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Уфа

Резюме. Проведен иммунологический анализ у 45 пациентов, которым была произведена послойная кератопластика с применением БМА. Определялись антитела в сыворотке крови к тканеспецифическим антигенам глаза (BCP-54, альфа-кристаллин хрусталика, S-антиген), выявлялась клеточная сенсibilизация к тем же антигенам и иммуноглобулины G, A, M в слезной жидкости для определения уровня местного неспецифического воспаления. Установлено, что процент клеток, активированных к BCP-54, достоверно ($p < 0,04$) снижался после операции, а в отдаленный срок вновь возрастал до практически исходного уровня ($p > 0,20$). Процент клеток, активированных к α -кристаллину хрусталика в отдаленный срок снижался ($p < 0,04$). Было выявлено повышение ($p < 0,02$) в послеоперационный период и снижение ($p < 0,002$) в отдаленный период содержания иммуноглобулина G в слезной жидкости. Таким образом, применение БМА для послойной кератопластики не вызывает дополнительного напряжения специфического иммунитета к тканям глаза, что подтверждается отсутствием статистически значимых изменений по показателям гуморального и клеточного иммунитета в отдаленные сроки.

Ключевые слова: иммунный статус, послойная кератопластика, биоматериал «Аллоплант».

Адрес для переписки:

Кадыров Радик Завилович, к.м.н., заведующий научной частью, ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Яковлева Валентина Германовна, к.б.н., врач-лаборант клинично-диагностической лаборатории, ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации
450075, Башкортостан, г. Уфа, ул. Р. Зорге, 67/1.
Тел.: (347) 232-99-42.
Факс: (347) 293-42-20.
E-mail: Radkad@yandex.ru; Valya-alloplant@mail.ru

Kadyrov R.Z., Gareev E.M., Yakovleva V.G.,
Kurchatova N.N., Yusupova R.Sh., Primov R.E.

IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH DIFFERENT CORNEAL DISORDERS TREATED BY LAMELLAR KERATOPLASTY BY MEANS OF ALLOPLANT BIOMATERIAL

Abstract. We have performed immunological studies in forty-five patients who underwent lamellar keratoplasty by means of Alloplant biomaterial. Serum antibodies to eye tissue-specific antigens (bovine corneal protein (BCP)-54, lens alpha-crystallin, S-antigen) were tested, and IgG, A, M in the lacrimal fluid were also determined, to detect cellular sensitization against

same antigens, and to evaluate the levels of local non-specific inflammation. Percentage of cells activated for BCP-54 was found to be significantly decreased after surgery ($p < 0.04$), followed by increase to initial levels ($p > 0.20$) at later terms. Percentage of cells activated for lens α -crystallin was shown to be decreased upon further observation ($p < 0.04$). A post-surgical increase in IgG levels was revealed in lacrimal fluid ($p < 0.02$), followed by a decrease later on ($p < 0.002$). Thus, application of Alloplant biomaterial for lamellar keratoplasty does not cause any sufficient tension of specific humoral immunity against ocular tissues, as evidenced by lack of statistically significant changes of humoral and cellular immunity during post-surgical observations. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 6, pp 513-518)

Keywords: immune status, lamellar keratoplasty, biomaterial «Alloplant».

Введение

В настоящее время в Российской Федерации насчитывается 209 тысяч слепых и слабовидящих граждан [8]. При этом ежегодно в нашей стране выполняется около 3000 операций кератопластики, а количество нуждающихся в пересадке роговицы составляет не менее пятнадцати тысяч пациентов [3].

Высокий процент отторжения роговичного трансплантата от 5 до 70% после кератопластики [1, 5, 7, 17], недостаток качественного донорского трупного материала являются основными причинами небольшого количества успешно выполненных операций по пересадке роговицы.

Даже при положительной совместимости донора и реципиента по HLA-антигенам и адекватной иммуносупрессивной терапии в послеоперационном периоде не является гарантией успеха кератопластики в отдаленный период наблюдения. Влияние многих дополнительных факторов, таких как: наличие у реципиента предшествующих антител к HLA-антигенам донора, аутоиммунные реакции на антиген роговицы, особенно клеточная, гиперсекреция провоспалительных цитокинов, хронические инфекции и др. [15] может явиться причиной неблагоприятного исхода операции. Все перечисленное является побуждающим моментом, заставляющим искать совершенно новые пути решения этой актуальной проблемы. Так, в качестве трансплантатов для кератопластики были предложены амнион и твердая мозговая оболочка [10], обезвоженная роговица [4], хрящ трахеи и бронхов плодов и мертворожденных [9], роговица плодов мертворожденных [16]. В ФГУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» (г. Уфа) разработан и успешно применяется биоматериал «Аллоплант» (БМА) для послойной кератопластики [11]. Доказано [12], что БМА не обладает антигенными свойствами, вызывающими реакцию отторжения трансплантата.

Целью настоящего исследования явилось изучение специфических, направленных на тканеспецифические антигены глаза, гуморальных и

клеточных реакций иммунной системы реципиентов в ответ на проведение операции послойной кератопластики с применением биоматериала «Аллоплант».

Материалы и методы

Всего было обследовано 45 пациентов (25 мужчин и 20 женщин) в возрасте 13-77 лет (из них 53% старше 50 лет, 33% не старше 30 лет), которым проводилась послойная кератопластика с применением биоматериала «Аллоплант» по поводу 13 видов поражения роговицы (буллезная кератопатия 42%, послеожоговые поражения 22%, дистрофические бельма 16% и др.). Пациенты были обследованы до операции, после операции и перед выпиской (от 7 до 30 дней, 67% до 15 дней) и в «отдаленный срок» (от 3 мес. до 6 лет, 84% до 3 лет).

Исследование проводилось в отделе иммунологии ФГБУ «ВЦГПХ» Минздравсоцразвития России, при этом были использованы следующие методы: ИФА для выявления антител в сыворотке крови к тканеспецифическим антигенам глаза: BCP-54 (Bovine Corneal Protein, молекулярный вес 54 KD), альфа-кристаллин хрусталика, S-антиген сетчатки (все антигены были выделены из глаз крупного рогатого скота), РБТЛ для определения наличия специфической клеточной сенсibilизации к BCP-54, альфа-кристаллину хрусталика, S-антигену, и количественное определение иммуноглобулинов G, A, M в слезной жидкости для определения уровня местного неспецифического воспаления методом Манчини. Учет результатов ИФА проводился на автоматическом ридере планшет (Labsystems Multiscan Plus, USA) при 492 нм. Учет результатов РБТЛ проводился на проточном цитофлуориметре FacsCalibur (BD) по переднему (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию [19]. При этом высчитывался индекс стимуляции, который представлял собой отношение процента активированных (бластных) клеток в присутствии специфического антигена к проценту бластных клеток в контрольной

лунке. Все использованные иммунологические методики были разработаны или адаптированы применительно к офтальмологическим больным в отделе иммунологии ФГУ «ВЦГиПХ» и находятся «на потоке» при обследовании пациентов Центра.

В связи с тем, что подавляющее большинство пациентов составляли иногородние, получить представительную группу со строго последовательными наблюдениями не представлялось возможным, поэтому для статистической обработки полученных результатов использовались методы анализа некоррелированных групп неравного объема. Для выявления общих изменений наблюдаемых параметров (влияния фактора последовательных изменений состояния пациента) были использованы методы параметрического (по Фишеру) и непараметрического (по Краскелу–Уоллесу) дисперсионного анализа [2, 13]. Кроме того, для локальных сравнений использовались метод Фишера и метод Манна–Уитни.

Результаты

Анализ полученных результатов показал следующее. Из всего набора переменных, отражающих в динамике состояние гуморальной и клеточ-

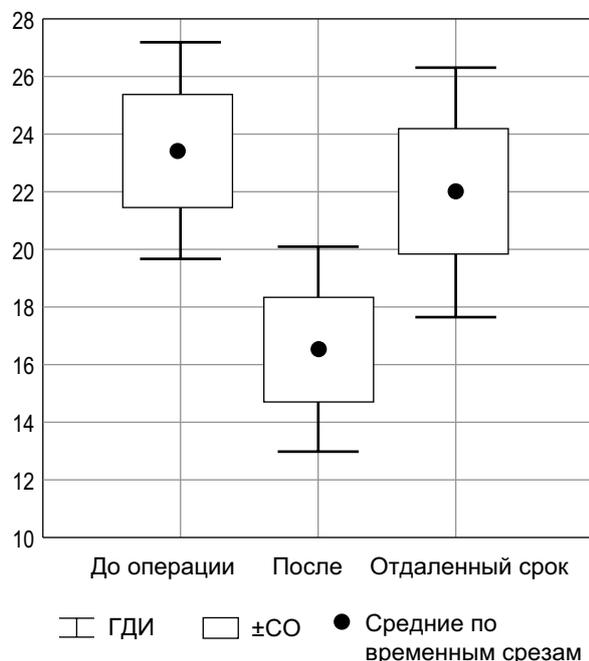


Рисунок 1. Изменения среднего процента клеток, активированных к БСР-54, по трем «временным срезам» наблюдений

Примечание. По оси абсцисс – «временные срезы наблюдений» По оси ординат – средний процент активированных клеток. ГДИ – границы доверительного интервала средних значений, ± СО – стандартная ошибка средних.

ной аутоиммунной напряженности в отношении тканеспецифических антигенов глаза (BCP-54, альфа-кристаллину хрусталика, S-антигену) значимые изменения по «временным срезам» были выявлены при количественной оценке сенсибилизации клеток, активированных к БСР-54 (рис. 1) и к α-кристаллину хрусталика.

Действительно, проверка различий процентных значений по отдельным временным срезам (рис. 1) показала, что снижение среднего процента клеток, активированных к БСР-54, с $23,4 \pm 10,8\%$ до операции до $16,5 \pm 7,3\%$ после операции является статистически значимым при $p < 0,04$. Достоверный ($p < 0,03$) сдвиг этого параметра после операции в сторону меньших значений был подтвержден и непараметрическим критерием Манна–Уитни. Как видно из рисунка 1, в отдаленный срок происходит восстановление среднего процента клеток, активированных к БСР-54, практически до исходного уровня ($21,9 \pm 8,9\%$), однако этот сдвиг к исходному состоянию оказался незначим по обоим критериям ($p > 0,20$), хотя и может рассматриваться как тенденция.

Иначе выглядели изменения среднего процента клеток, активированных к α-кристаллину хрусталика (рис. 2). Хотя в целом влияние фактора последовательно изменения состояния пациента также оказалось статистически незначимым

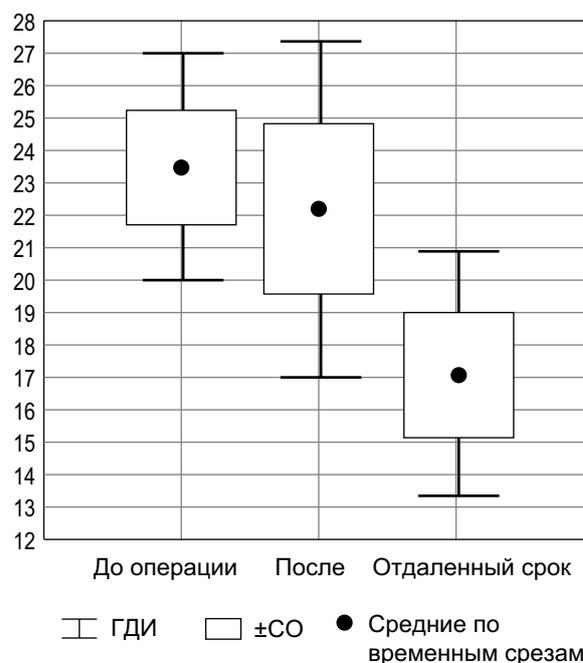


Рисунок 2. Изменения среднего процента клеток, активированных к α-кристаллину хрусталика, по трем «временным срезам» наблюдений

Примечание. Все обозначения как на рис. 1.

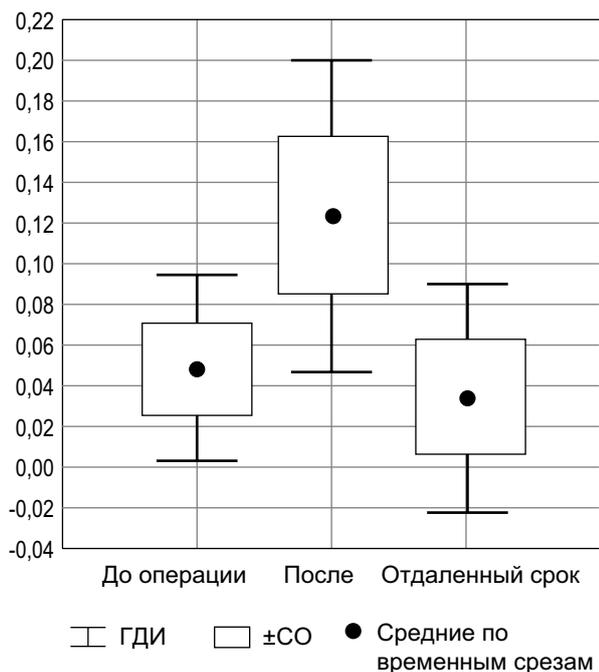


Рисунок 3. Изменения среднего уровня иммуноглобулина G по трем «временным срезам» наблюдений

Примечание. По оси ординат – общий уровень иммуноглобулина G в слезной жидкости в г/л.

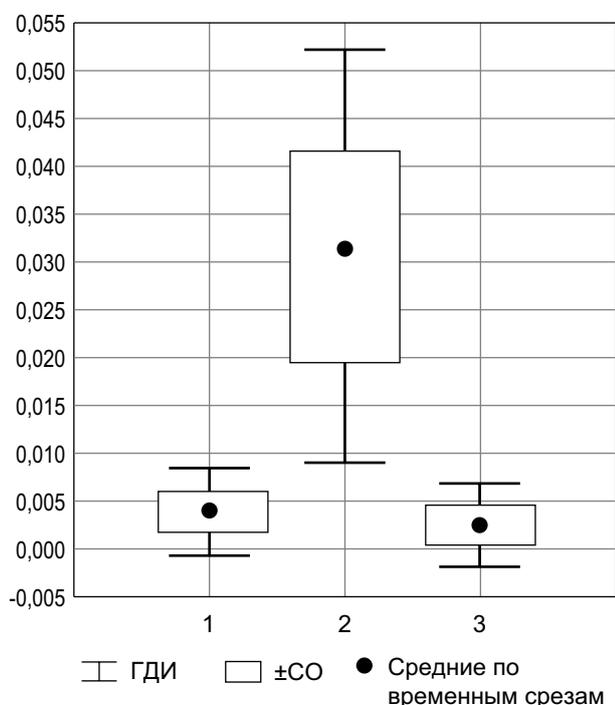


Рисунок 4. Изменения среднего уровня иммуноглобулина M в слезной жидкости, по трем «временным срезам» наблюдений

Примечание. По оси ординат – уровень иммуноглобулина M г/л.

($F = 2,3, p > 0,10; H_k = 4,2, p > 0,12$), заметно, что в отдаленный срок наблюдений среднее значение процента таких клеток снижается с $23,4 \pm 10,1\%$ перед операцией и $22,1 \pm 10,5\%$ после нее до $17,1 \pm 7,8\%$. При этом снижение среднего уровня и вообще сдвиг значений этого параметра в сторону меньших величин оказался достоверным ($p < 0,04$) по обоим критериям.

Общий уровень иммуноглобулинов в слезной жидкости пациентов, удалось измерить в 24 случаях до операции, в 17 после нее и в 19 в отдаленные сроки. Изменения содержания иммуноглобулина G при применении параметрической схемы анализа (рис. 3) оказались в целом незначимыми ($F = 2,4, p > 0,09$), хотя более чем двукратное повышение (с $0,05 \pm 0,11$ г/л перед операцией до $0,12 \pm 0,11$ г/л, после нее) среднего уровня данного иммуноглобулина оказалось достоверным ($p < 0,05$). При этом ранговый дисперсионный анализ по Краскелу–Уоллесу показал, что влияние фактора последовательных изменений состояния пациента является значимым ($H_k = 12,6, p < 0,002$), причем значимыми являются и послеоперационный подъем уровня иммуноглобулина G ($p < 0,02$) и его снижение в отдаленный срок наблюдений ($p < 0,002$).

Аналогичным образом, но еще более «контрастно» изменялся общий уровень иммуноглобулина M. Влияние фактора изменений состояния пациентов, оказалось статистически достоверным и по методу Фишера ($F = 7,2, p < 0,002$), и при применении непараметрического дисперсионного анализа ($H_k = 10,8, p < 0,005$). При этом подъем среднего уровня иммуноглобулина M (рис. 4) со «следового» значения $0,004 \pm 0,011$ г/л до $0,030 \pm 0,044$ г/л и столь же резкое падение до $0,003 \pm 0,009$ г/л оказалось значимым при $p < 0,002$.

Обсуждение

Результаты исследования специфичных к антигенам глаза гуморальных и клеточных реакций иммунной системы реципиентов в ответ на проведение операции послойной кератопластики с применением биоматериала «Аллоплант» показали следующее. По трем «временным срезам» выявлены достоверные изменения в степени активации сенсibilизированных к тканеспецифическому белку роговицы ВСП-54 (рис. 1), причем уменьшение количества клеток, сенсibilизированных к белку ВСП-54, зафиксированное в ранний постоперационный период практически восстанавливалось до исходного уровня в отдаленный срок. Это представляется вполне логичным, учитывая наличие некоторой

исходной сенсibilизации лимфоцитов у пациентов с патологией роговицы и неизбежную ее травматизацию при проведении операции, видимо, включается механизм гуморального иммунитета, т.е. антагонистического переключения механизмов клеточной памяти на гуморальный иммунный ответ [18]. За данное предположение говорят и факты статистически достоверных изменений в количественном содержании иммуноглобулинов G и M в слезной жидкости (рис. 3, 4). Так, в ранний постоперационный период выявлено более чем двукратное повышение общей концентрации иммуноглобулина G в слезной жидкости с последующим возвращением на исходный уровень. Такое же, даже более «резкое» повышение концентрации в ранний послеоперационный период с последующим «падением» в отдаленные сроки было зафиксировано и в случае с иммуноглобулином M. Концентрация обоих иммуноглобулинов (G и M) в третьем временном «срезе» не только возвратилась на исходный уровень, но и была даже несколько ниже его. При этом известно [14], что тканеспецифические антитела в основном относятся именно к классам G и M.

Другая ситуация наблюдалась при анализе сенсibilизации клеток к α -кристаллину. Достоверного изменения среднего процента клеток активированных к альфа-кристаллину хрусталика в ранний постоперационный период выявлено не было ($p > 0,12$), однако в отдаленном периоде существенное снижение этого параметра оказалось достоверным ($p < 0,04$). И это также представляется вполне логичным. Операция послойной кератопластики не затрагивает целостность хрусталика, поэтому иммунные клетки памяти не отреагировали в ранний постоперационный период, при этом статистически достоверное снижение сенсibilизации клеток к тканеспецифическому белку хрусталика в поздние сроки наблюдения можно расценивать как положительный эффект проведенной операции.

Отсутствие в динамике статистически значимых изменений гуморального специфического иммунитета (антитела к ВСП-54, альфа-кристаллину хрусталика и S-антигену в сыворотке крови пациентов) также свидетельствует об отсутствии усиления гуморального аутоиммунного напряжения при проведении данной операции.

При клиническом наблюдении за БМА после кератопластики он белого цвета, не прозрачный. Постепенно в течение 1-6 месяцев «Аллоплант» замещается прозрачной тканью. Положительный эффект при хирургическом лечении пteryгиума

был получен в 91,3% случаев, при лечении сосудистых белым в 74,5% случаев [6].

Таким образом, было выявлено, что операция кератопластики с применением биоматериала «Аллоплант» не только не усугубляет процессы аутоиммунной агрессии в отношении тканей глаза, но и способствует тенденции к ее уменьшению в направлении роговицы и хрусталика.

Список литературы

1. Абрамов В.Г. «Болезнь трансплантата» роговицы. — Ярославль: Верх. — Волж. кн. изд-во, 1972. — 215 с.
2. Банержи А. Медицинская статистика понятным языком: вводный курс. — М.: Практическая медицина, 2007. — 287 с.
3. Борзенко С.А. Проблема организации и эффективной деятельности секции «Глазные тканевые банки и клеточные технологии» при Обществе офтальмологов России // Материалы IX съезда офтальмологов России. — М., 2010. — С. 326-327.
4. Гольдфельд Н.Г. Применение высушенной роговицы для послойной кератопластики // Тезисы докл. Междунар. симпозиума по кератопластике (Одесса, 1964). — Киев, 1966. — С. 289-291.
5. Гундорова Р. А. Лечебная кератопластика при различных патологических состояниях роговицы // Офтальмол. журн. — 1983. — № 2 — С. 71-75.
6. Кадыров Р.З. Барьерная послойная кератопластика аллотрансплантатом серии «Аллоплант»: Автореф. дис. ... канд. мед.наук. — Красноярск, 1998. — С. 23.
7. Копаева В.Г., Андреев Ю.В., Сухин Г.М. и др. Новый способ фотохимической деструкции новообразованных сосудов роговицы // Офтальмохирургия. — 1993. — № 3. — С. 50-57.
8. Либман Е.С. Медико-социальные проблемы в офтальмологии // Материалы IX съезда офтальмологов России. — М., 2010. — С. 70-71.
9. Мазаева Н.Р. Брефопластика при пteryгиуме // Вестник офтальмологии. — 1989. — № 4. — С. 30-32.
10. Макеева Г.А. Применение амниона и твердой мозговой оболочки для барьерной пластики при хирургическом лечении пteryгиума // Офтальмологический журнал. — 1983. — № 2. — С. 104-106.
11. Мулдашев Э.Р., Нигматуллин Р.Т. Гомотрансплантат для послойной кератопластики / А.с 940768 СССР МКИ А 61 F 9/00. — № 2555501/28-13; Заявлено 27.12.77.; Опубл. 07.07.82, Бюл. № 47. — 2 с.

12. Нигматуллин Р.Т. Морфологические аспекты пересадки соединительнотканых аллотрансплантатов: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. – Новосибирск, 1996. – С. 32.
13. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
14. Слепова О.С. Изучение роли тканеспецифических антител к антигенам сетчатки, хрусталика, роговицы при увеитах и постувеальных осложнениях // Актуальные вопросы офтальмоиммунологии: Сб. науч. трудов. – М., 1988. – С. 20-30. [
15. Слепова О.С., Макаров П.В., Оганесян О.Г., Грачева В.В. Причины неудач при кератопластике. Анализ современного состояния проблемы (по собственным и литературным данным) // Тезисы докладов. IX съезд офтальмологов России. – М., 2010. – С. 316.
16. Овсебян Т.Л. Гомотрансплантация конъюнктивы и роговицы от плодов и погибших новорожденных больным с рецидивирующим птеригиумом и с частичным симблефароном // Вестник офтальмологии. – 1971. – № 2. – С. 28.
17. Ченцова Е.В. Система патогенетически обоснованного лечения ожоговой травмы глаз: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. – М., 1996. – С. 40.
18. Ярилин А.А. Основы иммунологии. – М.: Медицина, 1999. – С. 320-347.
19. Gaines H, Andersson L, Biberfeld G. A new method measuring lymphoproliferation at the single-cell level in whole blood cultures by flow cytometry // J. Immun. Methods. – 1996. – P. 63-72.

поступила в редакцию 02.04.2012

отправлена на доработку 23.04.2012

принята к печати 04.05.2012